

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ALDH	Aldehyddehydrogenase
AP	Apurin/Apyrimidin
AS	Aminosäuren
AT	Akute Toxizität
BCS	Bathocuproindisulfonsäure
Bq	Becquerel
BRD	Bundesrepublik Deutschland
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
DBA	9,10-Dibromanthracen
dG	2-Desoxyguanosin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
DSB	Doppelstrangbrüche (double strand-breaks)
ECD	Elektrochemische Detektion
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMS	Ethylmethansulfonat
GSH	Glutathion (reduziert)
HPLC	high performance liquid chromatography
HPRT	Hypoxantin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HRP	horseradish peroxidase
MEM	minimum essential medium
MMS	Methylmethansulfonate
MTT	Tetrazoliumbromid
NOEC	no observed effect concentration
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
8-OHdG	8-Hydroxy-2-desoxyguanosin
PBS	phosphate buffered saline
PC	personel computer
PM2 DNA	DNA des Phagen <i>Pseudomonas 2</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (reaktive oxygen species)
SDS	sodiumdodecylsulfate
SFM	Serumfreies Medium
ESB	Einzelstrangbrüche (single strand-breaks)
Tab.	Tabelle
6-TG	6-Thioguanin
U	Units
UDS	unscheduled DNA synthesis
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume
Z	Zellteilungsrate

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. EINLEITUNG	1
1.1 Ziel der Arbeit	10
2. MATERIAL UND METHODEN	11
2.1 Material	11
2.1.1 Geräte	11
2.1.2 Chemikalien	13
2.1.3 Zelllinien und DNA	16
2.1.4 Medien, Lösungen und Puffer	16
2.1.4.1 Medien	16
2.1.4.2 Lösungen	16
2.1.4.3 Puffer	18
2.2 Methoden	21
2.2.1 <i>In vitro</i> Untersuchungen mit PM2 DNA	21
2.2.1.1 Inkubation der PM2 DNA mit den Schadstoffen in Kombination mit CuCl ₂ unter aeroben und anaeroben Verhältnissen	21
2.2.1.2 Nachweis zur Strangbruchinhibition mit Katalase, Neocuproin, Bathocuproin und DMSO	22
2.2.1.3 Untersuchungen zur Reparaturrendonukleaseaktivität an PM2 DNA	23
2.2.1.3.1 Herstellung eines AP-Endonuklease-haltigen Zellextrakts aus humanen Fibroblasten	23
2.2.1.3.2 Induktion von Apurin-/Apyrimidinstellen in nativer PM2 DNA durch Hitze-Säure-Behandlung	23
2.2.1.3.3 Nachweis von Reparaturrendonukleaseaktivität an Schadstoff/CuCl ₂ behandelte PM2 DNA	23
2.2.1.4 Nachweis und Quantifizierung von Einzel- und Doppelstrangbrüchen in PM2 DNA mit Hilfe der Gelelektrophorese	24
2.2.2 Bestimmung des Cu(I)-Gehalts in den Reaktionsgemischen	25
2.2.3 Nachweis von 8-Hydroxy-2-desoxyguanosin im Reaktionsgemisch mittels HPLC-ECD	25

2.2.4	Chemolumineszenzmessung	26
2.2.5	ESR-spektrometrische Messungen	26
2.2.5.1	Untersuchungen zur Veränderung des ESR-Signals von Cu ²⁺ durch die Kombination mit den Testsubstanzen	26
2.2.5.2	ESR-spektrometrischer Nachweis von C-zentrierten, Alkoxy- oder/und Hydroxylradikalen	26
2.2.6	Zellkulturexperimente	27
2.2.6.1	Inkubation der Zellen mit den Schadstoffen	28
2.2.6.2	Bestimmung der Akuten Toxizität	28
2.2.6.3	Bestimmung des Zellwachstums und der Koloniebildungsfähigkeit	29
2.2.6.4	Bestimmung intrazellulärer DNA-Strangbruchinduktion mit der Alkalischen Elution	30
2.2.6.5	Bestimmung intrazellulärer DNA-Strangbruchinduktion mit dem Kometen-Assay	32
2.2.6.6	Nachweis der DNA-Reparatur	33
2.2.6.6.1	Autoradiographischer Nachweis der DNA-Reparatur (UDS) und der Hemmung der DNA-Reparatur	33
2.2.6.6.2	Nachweis der DNA-Reparatur mit Hilfe der Alkalischen Elution	35
2.2.6.7	HPRT-Mutationstest	35
3.	ERGEBNISSE	37
3.1	Kombination Benzaldehyd/CuCl ₂	37
3.1.1	Untersuchungen zur Schädigung von PM2 DNA	37
3.1.1.1	Strangbruchinduktion durch verschiedene Benzaldehyde/CuCl ₂	37
3.1.1.2	Strangbruchinduktion durch Benzaldehyd/CuCl ₂	38
3.1.1.3	Induktion von AP-Stellen durch Benzaldehyd/CuCl ₂	41
3.1.2	Untersuchungen zum Mechanismus der Strangbruchinduktion von Benzaldehyd/CuCl ₂	42
3.1.2.1.	Strangbruchinduktion unter aeroben und anaeroben Bedingungen	42
3.1.2.2	Cu(I)-Bildung unter aeroben und anaeroben Bedingungen	43
3.1.2.3	Inhibition der durch Benzaldehyd/CuCl ₂ induzierten Einzelstrangbrüche durch Katalase, DMSO, Batho- und Neocuproin	44
3.1.2.4	Nachweis spezifischer reaktiver Intermediate der Benzaldehyd/CuCl ₂ -Reaktion	45

3.1.3	Untersuchungen zur zytotoxischen Wirkung in Säugerzellkulturen	46
3.1.3.1	Zytotoxische Einzelwirkung von CuCl_2	46
3.1.3.2	Bestimmung der Akuten Toxizität von Benzaldehyd/ CuCl_2 direkt und 21 Stunden nach der Schadstoffinkubation	47
3.1.3.3	Bestimmung der Wachstumshemmung durch Benzaldehyd/ CuCl_2	48
3.1.3.4	Bestimmung der Hemmung der Koloniebildungsfähigkeit durch Benzaldehyd/ CuCl_2	49
3.1.4	Untersuchungen zur gentoxischen Wirkung in Säugerzellkulturen	51
3.1.4.1	Bestimmung der Induktion intrazellulärer DNA-Strangbrüche durch Benzaldehyd/ CuCl_2	51
3.1.4.1.1	DNA-Strangbruchnachweis mit Hilfe der Alkalischen Elution	51
3.1.4.2	Bestimmung der Induktion der DNA-Reparatur durch Benzaldehyd/ CuCl_2	52
3.1.4.2.1	Nachweis der DNA-Reparatur über die Alkalische Elution	53
3.1.4.2.2	Nachweis der DNA-Reparatur über die UDS	54
3.1.4.2.3	Untersuchungen zur Hemmung der DNA-Reparatur	55
3.1.4.3	Induktion von Mutationen im HPRT-Test durch Benzaldehyd/ CuCl_2	57
3.2	Kombination p-Anisaldehyd/ CuCl_2	58
3.2.1	Untersuchungen zur Schädigung von PM2 DNA	58
3.2.1.1	Strangbruchinduktion durch verschiedene Anisaldehyde/ CuCl_2	58
3.2.1.2	Strangbruchinduktion durch p-Anisaldehyd/ CuCl_2	59
3.2.1.3	Induktion von AP-Stellen durch p-Anisaldehyd/ CuCl_2	61
3.2.2	Untersuchungen zum Mechanismus der Strangbruchinduktion von p-Anisaldehyd/ CuCl_2	62
3.2.2.1.	Strangbruchinduktion unter aeroben und anaeroben Bedingungen	63
3.2.2.2	Cu(I) -Bildung unter anaeroben und aeroben Bedingungen	63
3.2.2.3	Inhibition der durch p-Anisaldehyd/ CuCl_2 induzierten Einzelstrangbrüche durch Katalase, DMSO, Batho- und Neocuproin unter aeroben und anaeroben Bedingungen	65
3.2.2.4.	Nachweis spezifischer reaktiver Intermediate der p-Anisaldehyd/ CuCl_2 -Reaktion	66
3.2.3	Untersuchungen zur zytotoxischen Wirkung in Säugerzellkulturen	66
3.2.3.1	Bestimmung der Akuten Toxizität von p-Anisaldehyd/ CuCl_2 direkt und 21 Stunden nach der Schadstoffinkubation	66

3.2.3.2	Bestimmung der Wachstumshemmung durch p-Anisaldehyd/CuCl ₂	67
3.2.3.3	Bestimmung der Hemmung der Koloniebildungsfähigkeit durch p-Anisaldehyd /CuCl ₂	68
3.2.4	Untersuchungen zur gentoxischen Wirkung in Säugerzellkulturen	69
3.2.4.1	Bestimmung der Induktion intrazellulärer DNA-Strangbrüche durch p-Anisaldehyd/CuCl ₂	69
3.2.4.1.1	DNA-Strangbruchnachweis mit Hilfe der Alkalischen Elution	69
3.2.4.1.2	DNA-Strangbruchnachweis mit Hilfe des Kometen-Assays	71
3.2.4.2	Bestimmung der Induktion der DNA-Reparatur durch p-Anisaldehyd/CuCl ₂	73
3.2.4.2.1	Nachweis der DNA-Reparatur über die UDS	73
3.2.4.2.2	Untersuchungen zur Hemmung der DNA-Reparatur	73
3.2.4.3	Induktion von Mutationen im HPRT-Test durch p-Anisaldehyd /CuCl ₂	76
3.3	Kombination Acetophenon/CuCl ₂	77
3.3.1	Untersuchungen zur Schädigung von PM2 DNA	77
3.3.1.1	Strangbruchinduktion durch Pivalophenon und verschiedene Acetophenone/CuCl ₂	77
3.3.1.2	Strangbruchinduktion durch Acetophenon/CuCl ₂	78
3.3.1.3	Induktion von AP-Stellen durch Acetophenon/CuCl ₂	81
3.3.2	Untersuchungen zum Mechanismus der Strangbruchinduktion von Acetophenon /CuCl ₂	82
3.3.2.1	Strangbruchinduktion unter aeroben und anaeroben Bedingungen	82
3.3.2.2	Cu(I)-Bildung unter anaeroben und aeroben Bedingungen	83
3.3.2.3	Inhibition der durch Acetophenon/CuCl ₂ induzierten Einzelstrangbrüche durch Katalase, DMSO, Batho- und Neocuproin unter aeroben und anaeroben Bedingungen	84
3.3.2.4	Nachweis spezifischer reaktiver Intermediate der Acetophenon/CuCl ₂ -Reaktion	85
3.3.3	Untersuchungen zur zytotoxischen Wirkung in Säugerzellkulturen	86
3.3.3.1	Bestimmung der Akuten Toxizität von Acetophenon/CuCl ₂ direkt und 21 Stunden nach der Schadstoffinkubation	86
3.3.3.2	Bestimmung der Wachstumshemmung durch Acetophenon /CuCl ₂	88
3.3.3.3	Bestimmung der Hemmung der Koloniebildungsfähigkeit durch Acetophenon/CuCl ₂	88

3.3.4	Untersuchungen zur gentoxischen Wirkung in Säugerzellkulturen	90
3.3.4.1	Bestimmung der Induktion intrazellulärer DNA-Strangbrüche durch Acetophenon /CuCl ₂	90
3.3.4.1.1	DNA-Strangbruchnachweis mit Hilfe der Alkalischen Elution	90
3.3.4.1.2	DNA-Strangbruchnachweis mit Hilfe des Kometen-Assays	92
3.3.4.2	Bestimmung der Induktion der DNA-Reparatur durch Acetophenon /CuCl ₂	93
3.3.4.2.1	Nachweis der DNA-Reparatur über die Alkalische Elution	93
3.3.4.2.2	Nachweis der DNA-Reparatur über die UDS	93
3.3.4.2.3	Untersuchungen zur Hemmung der DNA-Reparatur	94
3.3.4.3	Induktion von Mutationen im HPRT-Test durch Acetophenon /CuCl ₂	96
4.	DISKUSSION	98
4.1	Kombinationswirkung von Benzaldehyd/Cu(II)	100
4.1.1	Charakterisierung der DNA-Strangbruchinduktion durch Benzaldehyd/Cu(II) in PM2 DNA	100
4.1.2	Zyto- und gentoxische Wirkung von Benzaldehyd/(Cu(II) in Säugerzellkulturen	108
4.2	Kombinationswirkung von p-Anisaldehyd/Cu(II)	119
4.2.1	Charakterisierung und mechanistische Aspekte der DNA-Strangbruchinduktion durch p-Anisaldehyd/Cu(II) in PM2 DNA	119
4.2.2	Zyto- und gentoxische Wirkung von p-Anisaldehyd/Cu(II)	125
4.3	Kombinationswirkung von Acetophenon/Cu(II)	131
4.3.1	Charakterisierung und mechanistische Aspekte der DNA-Strangbruchinduktion durch Acetophenon/Cu(II) in PM2 DNA	131
4.3.2	Zyto- und gentoxische Wirkung von Acetophenon/Cu(II) in Säugerzellkulturen	136
4.4	Vergleichende Aspekte der Kombinationswirkung der untersuchten Substanzpaare	141
4.5	Funktion der Katalase bei den untersuchten Redoxreaktionen	149
5.	ZUSAMMENFASSUNG	151
6.	LITERATURVERZEICHNIS	153

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Strukturformeln von Benzaldehyd, p-Anisaldehyd und Acetophenon	8
Abb. 2:	Induktion von Einzelstrangbrüchen in PM2 DNA durch Benzaldehyd, 2-, 3- und 4- Hydroxybenzaldehyd in Kombination mit CuCl ₂ .	37
Abb. 3:	Induktion von DNA-Einzelstrangbrüchen durch Benzaldehyd/CuCl ₂ in Abhängigkeit von der CuCl ₂ -Konzentration.	38
Abb. 4:	Vergleich der DNA-Strangbruchinduktion durch Benzaldehyd/CuCl ₂ in Tris•HCl- und NaPO ₄ -Puffer.	39
Abb. 5:	Bildung linearer PM2 DNA durch Induktion von Doppelstrangbrüchen in Gegenwart von Benzaldehyd in Abhängigkeit von der CuCl ₂ -Konzentration.	40
Abb. 6:	Induktion von Einzelstrangbrüchen und linearer PM2 DNA durch Benzaldehyd/CuCl ₂ in Abhängigkeit von der Benzaldehyd-Konzentration.	40
Abb. 7:	DNA-Strangbruchinduktion (ESB), sowie Nachweis der Bildung von AP-Endonuklease-sensitiven Stellen (AP-Stellen) durch die Kombination Benzaldehyd/CuCl ₂ .	41
Abb. 8:	Einzelstrangbruchinduktion in PM2 DNA durch Benzaldehyd mit und ohne CuCl ₂ in Abhängigkeit von der Benzaldehyd-Konzentration unter aeroben und anaeroben Bedingungen.	42
Abb. 9:	Cu(I)-Bildung durch die Substanzkombination Benzaldehyd/CuCl ₂ unter aeroben und anaeroben Bedingungen.	43
Abb. 10:	Toxizität von CuCl ₂ auf humane Fibroblasten direkt nach der Schadstoffinkubation und 21 Stunden nach der Schadstoffinkubation.	46
Abb. 11:	Toxizität von Benzaldehyd auf humane Fibroblasten N57 (a) und V79 Zellen (b) nach einstündiger Inkubation mit sowie ohne CuCl ₂ .	47
Abb. 12:	Toxizität von Benzaldehyd auf humane Fibroblasten N57 (a) und V79 Zellen (b) 21 Stunden nach erfolgter Schadstoffinkubation.	48
Abb. 13:	Wachstumshemmung humaner Fibroblasten durch Benzaldehyd nach einstündiger Inkubation mit sowie ohne CuCl ₂ .	49
Abb. 14a:	Hemmung der Koloniebildungsfähigkeit von V79 Zellen durch Benzaldehyd nach gemeinsamer einstündiger Inkubation mit sowie ohne CuCl ₂ .	50
Abb. 14b:	Hemmung der Koloniebildungsfähigkeit von V79 Zellen durch Benzaldehyd nach neunzigminütiger Vorinkubation mit sowie ohne CuCl ₂ .	50
Abb. 15:	Profil der Alkalischen Elution von DNA aus mit Benzaldehyd/CuCl ₂ inkubierten humanen Fibroblasten (N57).	51
Abb. 16:	Profil der Alkalischen Elution von DNA aus humanen Fibroblasten (N57), die 20 Minuten mit MMS, nachfolgend 1,5 Stunden mit bzw. ohne CuCl ₂ und anschließend 1 Stunde mit bzw. ohne Benzaldehyd inkubiert wurden.	52
Abb. 17:	Elution der DNA aus humanen Fibroblasten (N57), die 1 Stunde mit bzw. ohne CuCl ₂ in Kombination mit Benzaldehyd behandelt wurden. Die Messung der Elution erfolgte zu verschiedenen Zeiten nach Behandlung der Zellen mit den Schadstoffen.	53

Abb. 18:	Mutationsfrequenz von V79 Zellen nach Behandlung mit Benzaldehyd in Kombination mit und ohne CuCl ₂ . Die Zellen wurden gleichzeitig für 1 Stunde mit Benzaldehyd und CuCl ₂ bzw. zunächst 1,5 Stunden mit bzw. ohne CuCl ₂ vorinkubiert und anschließend 1 Stunde mit verschiedenen Benzaldehyd-Konzentrationen nachinkubiert.	57
Abb. 19:	Induktion von Einzelstrangbrüchen in PM2 DNA durch 2-, 3- und 4-Methoxybenzaldehyd in Kombination mit CuCl ₂ .	59
Abb. 20:	Einzelstrangbruchinduktion in PM2 DNA durch p-Anisaldehyd/CuCl ₂ in Abhängigkeit von der CuCl ₂ -Konzentration.	60
Abb. 21:	DNA-Strangbruchinduktion durch die Schadstoffkombination p-Anisaldehyd/CuCl ₂ in Tris •HCl- bzw. NaPO ₄ -Puffer.	60
Abb. 22:	Induktion von Einzelstrangbrüchen und prozentualer Anteil linearer PM2 DNA in Abhängigkeit von der p-Anisaldehyd-Konzentration in Kombination mit CuCl ₂ .	61
Abb. 23:	DNA-Strangbruchinduktion (ESB), sowie Nachweis der Bildung von AP-Endonuklease-sensitiven Stellen (AP-Stellen) durch die Kombination p-Anisaldehyd/CuCl ₂ .	62
Abb. 24:	Strangbruchbildung durch p-Anisaldehyd mit und ohne CuCl ₂ unter aeroben und anaeroben Bedingungen.	63
Abb. 25:	Cu(I)-Bildung durch die Substanzkombination p-Anisaldehyd und CuCl ₂ unter aeroben und anaeroben Bedingungen.	64
Abb. 26:	Toxizität von p-Anisaldehyd auf V79 Zellen nach 90-minütiger Vorinkubation der Zellen mit sowie ohne CuCl ₂ und anschließender einstündiger Inkubation mit p-Anisaldehyd. Die Messungen erfolgten direkt oder 21 Stunden nach der Schadstoffinkubation.	67
Abb. 27:	Wachstumshemmung humaner Fibroblasten durch p-Anisaldehyd nach einstündiger Inkubation mit sowie ohne CuCl ₂ .	67
Abb. 28:	Hemmung der Koloniebildungsfähigkeit von V79 Zellen durch p-Anisaldehyd in Kombination mit sowie ohne CuCl ₂ .	68
Abb. 29:	Profil der Alkalischen Elution von DNA aus humanen Fibroblasten (N57), die 1,5 Stunden mit CuCl ₂ bzw. ohne CuCl ₂ und anschließend 1 Stunde mit unterschiedlichen p-Anisaldehyd-Konzentrationen inkubiert wurden.	69
Abb. 30a:	Profil der Alkalischen Elution von DNA aus humanen Fibroblasten (N57), die 20 Minuten mit MMS, nachfolgend 1 Stunde mit bzw. ohne CuCl ₂ und p-Anisaldehyd inkubiert wurden.	70
Abb. 30b:	Anteil eluierter DNA aus humanen Fibroblasten (N57), die 20 Minuten mit 5 mM MMS, nachfolgend 1,5 Stunden mit bzw. ohne CuCl ₂ und anschließend 1 Stunde mit bzw. ohne p-Anisaldehyd inkubiert wurden.	71
Abb. 31:	Darstellung der Kometenbildung nach Behandlung humaner Fibroblasten (N57) mit CuCl ₂ und p-Anisaldehyd.	72
Abb. 32:	Mutationsfrequenz von V79 Zellen nach Behandlung mit p-Anisaldehyd in Kombination mit und ohne CuCl ₂ .	76
Abb. 33:	Induktion von Einzelstrangbrüchen in PM2 DNA durch Acetophenon, 3- und 4-Methoxyacetophenon und Pivalophenon in Kombination mit CuCl ₂ .	77

Abb. 34:	Einzelstrangbruchinduktion in PM2 DNA in Abhängigkeit von der CuCl ₂ -Konzentration und unterschiedlichen Acetophenon-Konzentrationen.	78
Abb. 35:	Einzelstrangbruchinduktion in PM2 DNA durch Acetophenon/CuCl ₂ in Abhängigkeit von der CuCl ₂ -Konzentration im μmolaren Bereich.	79
Abb. 36:	Vergleich der Einzelstrangbruchinduktion durch die Schadstoffkombination Acetophenon/CuCl ₂ in Tris•HCl-Puffer bzw. NaPO ₄ -Puffer.	79
Abb. 37:	Vergleich der Einzelstrangbruchinduktion durch die Schadstoffkombination Acetophenon/CuCl ₂ mit und ohne einstündige Vorinkubation der PM2 DNA mit CuCl ₂ .	80
Abb. 38:	Zeitabhängige Induktion von DNA-Einzelstrangbrüchen durch Acetophenon mit und ohne CuCl ₂ .	80
Abb. 39:	DNA-Strangbruchinduktion (ESB), sowie Nachweis der Bildung von AP-Endonuklease-sensitiven Stellen (AP-Stellen) durch die Kombination Acetophenon mit CuCl ₂ .	81
Abb. 40:	Einzelstrangbruchbildung in PM2 DNA durch Acetophenon in Kombination mit und ohne CuCl ₂ unter aeroben und anaeroben Bedingungen.	82
Abb. 41:	Cu(I)-Bildung durch die Substanzkombination Acetophenon und CuCl ₂ unter aeroben und anaeroben Bedingungen.	83
Abb. 42:	ESR-Signal des Cu ²⁺ -Ions in NaPO ₄ -Puffer.	85
Abb. 43:	ESR-Signal eines 4-POBN-Spin-Adduktes aus der Acetophenon/CuCl ₂ -Reaktion.	86
Abb. 44a:	Toxizität von Acetophenon in humanen Fibroblasten (N57) nach einstündiger Inkubation mit sowie ohne CuCl ₂ . Die Messungen erfolgten direkt nach der Schadstoffinkubation.	87
Abb. 44b:	Toxizität von Acetophenon in humanen Fibroblasten (N57) nach einstündiger Inkubation mit sowie ohne CuCl ₂ . Die Messungen erfolgten 21 Stunden nach der Schadstoffinkubation.	87
Abb. 45:	Wachstumshemmung humaner Fibroblasten (N57) nach 1,5-stündiger Vorinkubation mit bzw. ohne CuCl ₂ und anschließender einstündiger Inkubation mit Acetophenon.	88
Abb.46a/b:	Hemmung der Koloniebildungsfähigkeit von V79 Zellen nach einer gleichzeitigen einstündigen Inkubation der Zellen mit Acetophenon/CuCl ₂ (a) bzw. nach einer 1,5-stündigen Vorinkubation mit CuCl ₂ und anschließender Inkubation mit Acetophenon (b).	89
Abb. 46c:	Koloniebildungsfähigkeit menschlicher Fibroblasten (N57) nach 1,5-stündiger Vorinkubation der Zellen mit sowie ohne CuCl ₂ und anschließender Inkubation mit Acetophenon.	89
Abb. 47a:	Profil der Alkalischen Elution von DNA aus mit Acetophenon bzw. Acetophenon/CuCl ₂ inkubierten humanen Fibroblasten (N57). Die Zellen wurden für 1 Stunde mit verschiedenen Acetophenon-Konzentrationen in Kombination mit bzw. ohne CuCl ₂ inkubiert.	91
Abb. 47b:	Profil der Alkalischen Elution von DNA aus humanen Fibroblasten (N57), die 1,5 Stunden mit bzw. ohne CuCl ₂ und anschließend 1 Stunde Acetophenon nachinkubiert wurden.	91
Abb. 48:	Darstellung der Kometenbildung nach Behandlung humaner Fibroblasten (N57) mit CuCl ₂ und Acetophenon.	92
Abb. 49:	Elution der DNA aus humanen Fibroblasten (N57), die 1 Stunde mit bzw. ohne CuCl ₂ in Kombination mit Acetophenon behandelt wurden. Die Messung der Elution erfolgte zu verschiedenen Zeiten nach der Behandlung der Zellen mit den Schadstoffen.	93

Abb. 50: Mutationsfrequenz von V79 Zellen nach Behandlung mit Acetophenon in Kombination mit bzw. ohne CuCl_2 . Die Zellen wurden gleichzeitig für 1 Stunde mit Acetophenon und CuCl_2 (a) bzw. zunächst 1,5 Stunden mit bzw. ohne CuCl_2 vorinkubiert und anschließend 1 Stunde mit verschiedenen Acetophenon-Konzentrationen nachinkubiert (b).

96

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Strukturformeln der untersuchten Carbonylverbindungen	13
Tab. 2:	Inhibition der durch Benzaldehyd/CuCl ₂ erzeugten DNA-Einzelstrangbrüche durch DMSO, Katalase, Bathocuproin oder Neocuproin nach einstündiger Inkubation in NaPO ₄ -Puffer.	45
Tab. 3:	Induktion der DNA-Exzisionsreparatur (UDS) in menschlichen Fibroblasten (N57) durch Benzaldehyd mit und ohne neunzigminütige CuCl ₂ -Vorinkubation.	54
Tab. 4:	Beeinflussung der durch UV-Licht induzierten DNA-Reparatur durch Benzaldehyd mit und ohne CuCl ₂ .	55
Tab. 5:	Beeinflussung der MMS-induzierten DNA-Reparatur durch Benzaldehyd mit und ohne CuCl ₂ .	56
Tab. 6:	Inhibition der durch p-Anisaldehyd/CuCl ₂ erzeugten DNA-Einzelstrangbrüche durch DMSO, Katalase, Bathocuproin oder Neocuproin unter aeroben und anaeroben Bedingungen.	65
Tab. 7:	Induktion von DNA-Exzisionsreparatur (UDS) in menschlichen Fibroblasten (N57) durch p-Anisaldehyd mit und ohne neunzigminütige CuCl ₂ -Vorinkubation.	73
Tab. 8:	Beeinflussung der durch UV-Licht induzierten DNA-Reparatur durch p-Anisaldehyd mit und ohne CuCl ₂ .	74
Tab. 9:	Beeinflussung der durch MMS induzierten DNA-Reparatur durch p-Anisaldehyd mit und ohne CuCl ₂ .	75
Tab. 10:	Inhibition der durch Acetophenon/CuCl ₂ induzierten DNA-Einzelstrangbrüche durch DMSO, Katalase, Bathocuproin oder Neocuproin unter aeroben und anaeroben Bedingungen.	84
Tab. 11:	Induktion der DNA-Exzisionsreparatur (UDS) in menschlichen Fibroblasten (N57) durch Acetophenon mit und ohne neunzigminütiger CuCl ₂ -Vorinkubation.	94
Tab. 12:	Beeinflussung der durch UV-Licht induzierten DNA-Reparatur durch Acetophenon bzw. Acetophenon/CuCl ₂ .	95
Tab. 13:	Beeinflussung der MMS-induzierten DNA-Reparatur durch Acetophenon/CuCl ₂ .	95
Tab. 14:	Zusammenfassende Darstellung der <i>in vitro</i> Untersuchungen mit PM2 DNA sowie weiterer mechanistischer Aspekte zur Substanzkombination Benzaldehyd/Cu(II).	101
Tab. 15:	Zusammenfassende Darstellung der Zellkulturuntersuchungen zur Zyto- und Gentoxizität von Benzaldehyd/Cu(II).	110
Tab. 16:	Zusammenfassende Darstellung der <i>in vitro</i> Untersuchungen mit PM2 DNA sowie weiterer mechanistischer Aspekte zur Substanzkombination p-Anisaldehyd/Cu(II).	119
Tab. 17:	Zusammenfassende Darstellung der Zellkulturuntersuchungen zur Zyto- und Gentoxizität von p-Anisaldehyd/Cu(II).	125
Tab. 18:	Zusammenfassende Darstellung der <i>in vitro</i> Untersuchungen mit PM2 DNA sowie weiterer mechanistischer Aspekte zur Substanzkombination Acetophenon/Cu(II).	131
Tab. 19:	Zusammenfassende Darstellung der Untersuchungen zur Zyto- und Gentoxizität von Acetophenon/Cu(II).	136
Tab. 20:	Zusammenfassung der <i>in vitro</i> Untersuchungen mit PM2 DNA sowie mechanistischer Aspekte der untersuchten Substanzpaare.	141

Tab. 21: Zusammenfassung der Untersuchungen zur Genotoxizität der verwendeten Substanzpaare in Säugerzellkulturen.	146
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Verzeichnis der Reaktionsgleichungen

Gleichung I	3
Gleichung II	3
Gleichung III	4
Gleichung IV	4
Gleichung V	5
Gleichung VI	6
Gleichung VII	104
Gleichung VIII	105
Gleichung IX	105
Gleichung X	105
Gleichung XI	105
Gleichung XII	149

1. EINLEITUNG

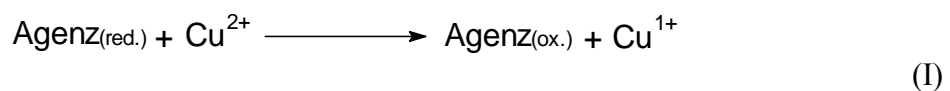
Die Toxizität von Schadstoffen wird bis heute fast ausschließlich auf der Basis von Einzelwirkungen beurteilt. Die Diskussion um Kombinationswirkungen chemischer Schadstoffe nimmt aber zunehmenden Raum in der Toxikologie ein, da sie die realen Verhältnisse der Schadstoffexposition des Menschen und der Umwelt widerspiegeln (Vainio *et al.* 1990, Appel, 1990; UBA, 1993; Mumtaz *et al.*, 1994; Cassee *et al.*, 1998; Feron *et al.*, 1998). Toxische Kombinationswirkungen sind auf verschiedenen Ebenen möglich, beginnend mit der Molekülebene (z.B. gemeinsame Angriffe von Mutagenen auf die DNA) über die Zellebene (z.B. veränderte Aufnahme einer oder mehrerer Substanzen nach Membranschädigung durch andere Substanzen) und Organebene (z.B. Beeinflussung verschiedener organspezifischer Metabolisierungssysteme) bis hin zur Ebene des ganzen Organismus (z.B. Veränderung der Aufnahme, Pharmakokinetik und Exkretion). Die Kombination mehrerer Substanzen kann zur einfachen Dosisaddition, Effektaddition und/oder zu Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Komponenten führen, die dann zu einer antagonistischen (weniger als additiv) oder einer synergistischen Wirkung (mehr als additiv) führen (Cassee *et al.*, 1998). Additive Wirkungen werden in Gemischen aus „gleich oder ähnlich wirkenden“ Noxen erwartet, wobei der Begriff „gleich wirkend“ nicht näher definiert ist (Kühn-Birett, 1989). Antagonistische und synergistische Wirkungen können durch verschiedene sogenannte interaktive Mechanismen verursacht werden (Berenbaum, 1985; Yang *et al.*, 1989). Die enorme Vielfalt sowohl der Kombinationswirkungsmöglichkeiten als auch der Wirkstoffe lässt jedoch eine Überprüfung der toxischen Wirkungen aller Substanzkombinationen nicht zu. Falls zumindest in Teilbereichen allgemeingültige Schädigungsmechanismen erwartet werden können, stellt die gezielte Untersuchung toxikologischer Wirkungsmechanismen (Cassee *et al.*, 1998) von Vertretern einzelner Stoffklassen sowie von Substanzkombinationen dieser Vertreter eine sinnvolle Ergänzung zur rein empirischen toxikologischen Bewertung dar. Grundsätzlich kann zwischen Kombinationswirkungen von Chemikalien, die nicht miteinander reagieren und solchen, die physikochemische Wechselwirkungen bzw. chemische Reaktionen eingehen, unterschieden werden. In dieser Arbeit wird der Teilbereich der Interaktionen aromatischer Aldehyde und Ketone, insbesondere von Benzaldehyd, p-Anisaldehyd und Acetophenon, mit Cu(II) und die daraus resultierenden zyto- und gentoxischen Folgen untersucht.

Als Übergangsmetall ist Kupfer in der Lage einzelne Elektronen aufzunehmen bzw. abzugeben und somit radikalische Redoxreaktionen zu initiieren. Kupferionen dienen auf diese Weise als wichtige katalytische Kofaktoren für enzymatische Redoxreaktionen, die von fundamentaler biologischer Bedeutung sind. So wird Kupfer seit vielen Jahrzehnten als essentielles Spurenelement angesehen (Linder, 1991). Kupfer bindende Proteine, wie z.B. Cu/Zn SOD, Cytochrom C Oxidase, Dopamin β -Hydroxylase, Ceruloplasmin, Metallothionein, Gerinnungsfaktoren V, VII usw. sind an einer Vielzahl biologischer Prozesse beteiligt (Peña *et al.*, 2000). Eine Dysfunktion dieser Proteine und Enzyme kann an einer Vielzahl von Erkrankungen wie z.B. Alzheimer, Creutzfeld Jacob und Gerstmann-Straussler-Scheinker beteiligt sein (Peña *et al.*, 2000).

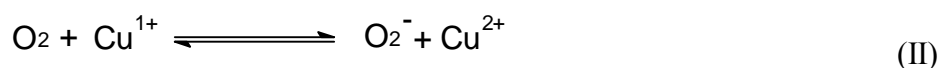
Die tägliche Aufnahmemenge für Kupfer wird auf 0,6-1,6 mg Kupfer/Tag geschätzt (Linder und Hazegh-Azam, 1996). Das über die Nahrung aufgenommene Kupfer, insbesondere aus Hülsenfrüchten, Rindfleisch und Muscheln wird absorbiert, an Transportproteine gebunden, gezielt transportiert und in Kupfer-abhängige Proteine eingebaut, so dass eine Akkumulation von freiem Kupfer im Körper verhindert wird (Peña *et al.*, 2000). Neben der oralen Aufnahme gibt es auch Hinweise darauf, dass Kupfer inhalativ aufgenommen werden kann, wie der dramatische Anstieg der Kupferkonzentration im Lungengewebe von Großstadtbewohnern aus Mexiko City zeigt (Glickman und Ostrosky, 1996). Nach Linder (1991) kann die Kupferkonzentration bei Säugern in der Leber und den Nieren 100 μ M überschreiten. Hohe Kupferkonzentrationen besitzen ein erhöhtes toxisches Potenzial, daher werden Kupferverbindungen auch als Fungizide, Insektizide, Algizide und Antifoulingmittel verwendet (Venugopal und Luckey, 1975, Ranke und Jastorff, 1999). Durch Verwendung von Wasser aus Kupferleitungen oder von in Kupfergeschirr zubereiteten Nahrungsmitteln kann die über die Nahrung aufgenommene Kupfermenge in Abhängigkeit von pH und Wasserhärte erhöht sein. Daraus resultierende akute Krankheitsbilder betreffen vor allem Personen mit einem gestörten Kupfermetabolismus wie z.B. Patienten, die an „Wilson Disease“ oder „Menkes Disease“ leiden, wobei in beiden Fällen der Kupfer-Transport betroffen ist und es zu einer erhöhten Kupferakkumulation kommt (Bull und Cox, 1994; Bull *et al.*, 1993; Chelly *et al.*, 1993; Mercer *et al.*, 1993, Vulpe *et al.*, 1993; Yamaguchi *et al.*, 1993). Säuglinge und Kleinkinder, deren Kupfermetabolismus noch nicht voll entwickelt ist, sind ebenfalls betroffen. So führt eine erhöhte Kupferakkumulation in der Leber zu Leberschäden und eventuell zur Leberzirrhose wie bei der „Wilson Disease“, der „Indian Childhood Cirrhosis“ (Gollan, 1990; Sternlieb, 1994) und

der „German Childhood Cirrhosis“ (Dieter, 1995; Schimmelpfennig *et al.*, 1996, 1997). Das Auftreten der frühkindlichen Leberzirrhose in Indien wird auf die dort übliche Nahrungszubereitung in Kupfergeschirr zurückgeführt (Alt *et al.*, 1990). Für das gleiche Krankheitsbild in Deutschland wurde aufgrund umfangreicher epidemiologischer Untersuchungen (103 Fälle zwischen 1984-1994) neben anderen hauptsächlichen Ursachen wie angeborene Gallengang-anomalie, angeborene metabolische Störungen zu einem geringen Anteil (8 Fälle) eine Verbindung zu einer chronischen Kupferexposition hergestellt (Dieter *et al.*, 1999). Möglicherweise spielt die Trinkwasserversorgung über Kupferleitungen aus Eigenbrunnen in diesen Fällen eine Rolle, die jedoch nicht als alleinige Ursache angesehen werden kann (Schimmelpfennig und Dieter, 1995; Dieter *et al.*, 1999). Von Dieter (1995) wird ein Zusatzfaktor X, der mit Kupfer synergistisch wirken könnte, postuliert. Zusätzlich ist das Krankheitsbild frühkindlicher Kupfer-assoziiertes Leberzirrhose unter dem Begriff „Idiopathische Kupfertoxikose“ (Idiopathic Copper Toxicosis (ICT)) auch aus Österreich, Australien, Deutschland, Irland und den USA bekannt (Dieter *et al.*, 1999). Die Toxizität von Kupfer(II) beruht maßgeblich auf seinen Eigenschaften als Übergangsmetallion.

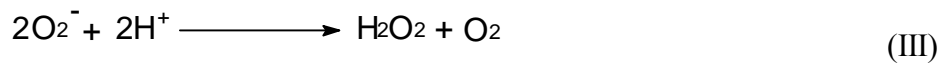
Die Bedeutung Cu(II)-katalysierter Oxidationen kann hinsichtlich ihrer zytotoxischen, mutagenen und kanzerogenen Folgen für Mensch und Umwelt noch nicht abgeschätzt werden. In Form von Naturstoffen, Bioziden, Additiven in Lebensmitteln und Pharmaka nimmt der Mensch eine Vielzahl von durch Cu(II)-oxidierbaren Verbindungen auf. Die Fähigkeit des Kupfers Elektronen aufzunehmen und abzugeben bedingt nicht nur seine erwähnte physiologische Funktion, sondern ist auch für die toxikologisch relevanten Eigenschaften von essentieller Bedeutung. Reduzierende Agenzien können durch Elektronenübertragung die Bildung von Cu(I) induzieren (I).



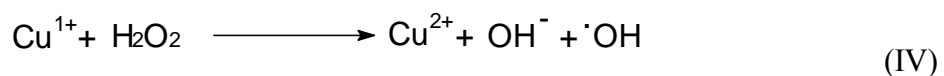
Cu(I) reagiert mit molekularem Sauerstoff zum Superoxidradikal (II),



das unter physiologischen Bedingungen spontan zu Wasserstoffperoxid und molekularem Sauerstoff dismutiert ($k=10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (III).



Analog zu einer von Fenton vorgeschlagenen Reduktion von Wasserstoffperoxid durch Eisen (Fenton, 1894) wird Gleichung IV als Kupfer-Fenton-Reaktion bezeichnet. Die Reaktionsgeschwindigkeit wird durch Kupfer ($k= 4,7 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) im Vergleich zu Eisen ($k= 76 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) stark beschleunigt.



Trotz des geringeren Redoxpotenzials von $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^{1+}$ ($E^0 = 0,17 \text{ V}$) im Vergleich zu $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ ($E^0 = 0,77 \text{ V}$) stellt Kupfer in biologischen Systemen das effektivere Fenton-Reagenz dar. Da Eisen- und Kupferionen in biologischen Systemen in der Regel komplex gebunden vorliegen und die Redoxpotenziale von Metallen komplexabhängig sind, kann die höhere Effektivität des Kupfers durch das höhere Redoxpotenzial von Cu(II)-DNA-Komplexen im Vergleich zu Fe(III)-DNA-Komplexen erklärt werden (Prütz, 1984).

Aufgrund der dargestellten kupferkatalysierten Redoxreaktionen kommt es zur Bildung sogenannter reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), wozu u.a. das gebildete Wasserstoffperoxid (H_2O_2), das radikalische Superoxidanion (O_2^-) und das Hydroxylradikal ($\cdot\text{OH}$) gehören. ROS reagieren mit biologischen Molekülen, was zu massiven Zell- und Gewebeschädigungen führt (Halliwell und Gutteridge, 1989; Sies, 1991; de Groot, 1994; Davies, 1995). Es wird vermutet, dass ROS an der Induktion einer Vielzahl degenerativer Prozesse und Erkrankungen wie Diabetes mellitus, Atherosklerose, Parkinson und Alzheimer beteiligt sind (Olanow und Arendash, 1994; de Groot und Rauen, 1998; Facchinetti *et al.*, 1998; Klaunig *et al.*, 1998; Toyokuni, 1999). Die einzelnen reaktiven Sauerstoffspezies weisen große Unterschiede in ihrer Reaktivität auf. Wasserstoffperoxid und Superoxidradikale werden im Vergleich zu Hydroxyl-Radikalen als gering DNA-schädigend angesehen (Lesko *et al.*, 1980; Bawn und Fridovich, 1981; Mello-Filho und Meneghini, 1984). Hydroxyl-Radikale hingegen werden als hochreaktive Radikale angesehen, die nahezu alle biologischen Moleküle mit Reaktionsgeschwindigkeiten von 10^{-9} - $10^{-10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ angreifen (Halliwell, 1995). Wie Gleichung III und IV

zeigen, können die weniger reaktiven Spezies zu den hochreaktiven $\cdot\text{OH}$ -Radikalen konvertiert werden. Für $\cdot\text{OH}$ -Radikale typische Reaktionen sind entweder die Wasserstoffabstraktion oder die Addition an Doppelbindungen (Pryor, 1988).

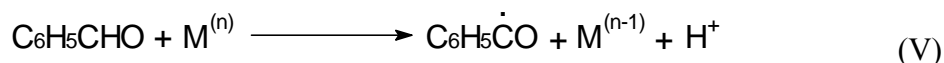
Modifizierte Purin- und Pyrimidin-Basen stellen neben DNA-Strangbrüchen, DNA-Protein Crosslinks und abasischen Stellen die Hauptklasse $\cdot\text{OH}$ -Radikal-induzierter DNA-Schäden dar (Ward und Kuo, 1978; Ward, 1988; Cadet *et al.*, 1999). In Untersuchungen an isolierter DNA werden dabei hauptsächlich Thyminglykol, Cytosinglykol, 8-Hydroxyadenin und 8-Hydroxyguanin gebildet (Fuciarelli *et al.*, 1990; Aruoma *et al.*, 1991). In zellulären Systemen wird hauptsächlich 8-Hydroxyguanin erzeugt (Kasai *et al.*, 1986; Floyd, 1990), das als Nachweis für eine $\cdot\text{OH}$ -Radikal-Bildung auch in *in vivo* Studien u.a. beim Menschen dient (Shigenaga und Ames, 1991; Suzuki *et al.*, 1995). DNA-Schäden durch $\cdot\text{OH}$ -Radikale sind als potentiell mutagen anzusehen. Darüber hinaus sind ROS ($\cdot\text{OH}$ -Radikale) als bedeutende Faktoren in der Kanzerogenese (Feig *et al.*, 1994; Emerit, 1994; Klaunig *et al.*, 1998; Toyokuni, 1999) und in der Apoptoseinitiation (Jacobson, 1996) beschrieben.

Bisher sind mehrere Arbeiten zur toxischen Wirkung von Cu(II) bzw. Fe(III) in Kombination mit oxidierbaren Sauerstoffverbindungen durchgeführt worden. Am intensivsten untersucht wurden dabei Kombinationswirkungen von Cu(II) bzw. Fe(III) mit Zytostatika und anderen DNA-reaktiven Naturstoffen. Hierzu zählen z.B. Arbeiten über Streptonigrin (Sugiura *et al.*, 1984), Bleomycin (Ehrenfeld *et al.*, 1987), Adramycin (Eliot *et al.*, 1984), Tetracyclin (Buschfort und Witte, 1994) und Quercetin (Rahman *et al.*, 1989), Epicatechin (Said *et al.*, 1992), Myricetin (Sahu und Gray, 1993), Curcumin (Ahsan und Hadi, 1998) und Bilirubin (Asad *et al.*, 1999). Auch sind in der Literatur Verstärkungen der Toxizität von Hydrochinonen durch Cu(II) beschrieben (Li und Trush, 1993a, 1993b; Li und Trush, 1994; Vollbrandt *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1996, Ahmad *et al.*, 1998). Diese Untersuchungen sind von besonderer Bedeutung, da einige Hydrochinone Metaboliten bekannter Kanzerogene wie Benzol, Östrogen und o-Phenylphenol (Zhang *et al.*, 1996; Ahmad *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1994; Martucci und Fishman, 1993; Sato *et al.*, 1988) darstellen. In einigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Antioxidantien in Kombination mit Kupfer prooxidative Eigenschaften entwickeln. Dies konnte u.a. für Ascorbinsäure, Butylhydroxytoluol (BHT), Kaffeesäure, Chlorogensäure, Propylgallat, Gallussäure, α -Tocopherol und Ferulasäure, mit unterschiedlichen toxikologisch relevanten Endpunkten nachgewiesen werden (Samuni *et al.*, 1983, Inoue *et al.*, 1992; Li und

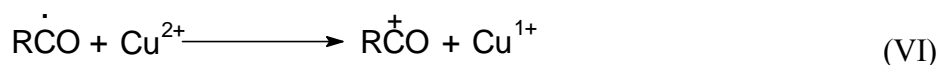
Trush, 1994; Jacobi *et al.*, 1998, 1999; Satoh und Sakagami, 1997; Kontush *et al.*, 1996; Proudfoot *et al.*, 1997; Yamashita *et al.*, 1998; Bourne und Rice-Evans, 1997; Yamanaka *et al.*, 1997).

In der Regel wurden, wie zuvor beispielhaft aufgeführt, organische Verbindungen mit mehreren Sauerstofffunktionen auf ihre toxische bzw. DNA-schädigende Wirkung untersucht, wobei keine spezielle funktionelle Gruppe als Reaktionspartner für Cu(II) identifiziert wurde. Das Interesse am Reaktionsmechanismus ist zudem häufig mit dem Nachweis von ROS erschöpft und die Induktion von DNA-Strangbrüchen wird auf die Bildung von $\cdot\text{OH}$ -Radikalen über die Kupfer-Fenton-Reaktion zurückgeführt.

Von der Chemie Cu(II)-katalysierter Reaktionen ist bekannt, dass u. a. Aldehyde und Ketone sich unter Bildung von C-zentrierten Radikalen (Kochi, 1978) oder Carbeniumionen (Sheldon und Kochi, 1981) oxidieren lassen. Schon im Jahre 1931 beschrieben Haber und Willstätter die Initiationsreaktion der „Autoxidation“ von Benzaldehyd durch reaktive Schwermetallionen unter Bildung eines Acylradikals und eines Metallions höherer Oxidationsstufe.



1956 wurde von Bawn *et al.* diese Initiationsreaktion unter Katalyse von Cu(II), Mn(II) oder Co(II) als gültig für Aldehyde postuliert. Eine weitere Ein-Elektronen-Oxidation des Acylradikals durch Cu(II) unter Bildung eines Carbeniumions wurde von Sheldon und Kochi (1981) beschrieben.



Sowohl die Untersuchungen zur Bildung eines C-zentrierten Radikals (V) als auch zur Bildung eines Carbeniumions (VI) wurden unter nicht physiologischen Bedingungen durchgeführt. Im Bearbeitungszeitraum dieser Arbeit veröffentlichte Untersuchungen mit aliphatischen Aldehyden zeigen eine Reduzierbarkeit durch Cu(II) auch unter physiologischen Bedingungen (Becker *et al.*, 1996, 1998; Vöhringer *et al.*, 1998). C-zentrierte Radikale stehen in dem Verdacht, die DNA anzugreifen und mutagen zu wirken (Augusto, 1993). Die mutagene und kanzerogene Wirkung von Carbeniumionen, die auch als kanzerogene Metaboliten von Nitrosaminen nachgewiesen wurden (Magee, 1980), ist bekannt (Singer und Grunberger, 1983).

Ketone und Aldehyde stellen eine Gruppe relativ reaktiver organischer Verbindungen dar, die durch eine polarisierte Kohlenstoff-Sauerstoffdoppelbindung charakterisiert sind. Verglichen mit dem Kohlenstoffatom ist das Sauerstoffatom stark elektronegativer, wodurch ein Dipolmoment entsteht (McMurry, 1984). Die toxikologische Wirkung von Carbonylverbindungen beruht auf dem elektrophilen Carbonylkohlenstoffatom, welches eine hohe Reaktivität mit nukleophilen Gruppen zellulärer Makromoleküle (z.B. Proteine, DNA) zeigt (Esterbauer *et al.*, 1991; Aubourg, 1993). Hierbei reagieren z.B. Aldehyde unter Bildung von Schiff'schen Basen mit Aminogruppen von Aminosäuren und Nucleinsäuren, wobei die entsprechenden Biomoleküle alkyliert werden und dadurch in ihrer Funktion gestört sein können. Neben ihrem Vorkommen als Produkte und/oder Intermediate des normalen Stoffwechsels sind Aldehyde und Ketone auch als Produkte und/oder Intermediate des Fremdstoffmetabolismus des Menschen bekannt. So werden beispielsweise die pathogenen Effekte von Ethanol im Wesentlichen seinem durch Alkoholdehydrogenase gebildeten Metaboliten Acetaldehyd zugeschrieben (Grafström *et al.*, 1994), auch wird diskutiert, dass die genotoxische Wirkung von Ethylenoxid auf dessen aldehydischen Metaboliten (Glycolaldehyd) zurückzuführen ist (Hengstler *et al.*, 1994). Eine weitere biologische Belastung durch Aldehyde stellt die Lipidperoxidation dar. Lipidperoxidation wird durch eine Vielzahl von Umweltchemikalien induziert (Plaa und Witschi, 1976) und stellt einen Radikalkettenmechanismus dar, der zum oxidativen Abbau von Membranphospholipiden führt (Halliwell und Chirico, 1993), wodurch die Fluidität und Permeabilität von Zellmembranen verändert wird (Kautiainen *et al.*, 1991; Horton und Walker, 1993). Aldehyde sind Endprodukte des peroxidativen Abbaus von Lipiden. Insbesondere Malondialdehyd und 8-Hydroxynonenal besitzen eine hohe DNA-Reaktivität mit genotoxischen Folgen (Basu und Marnett, 1984; Esterbauer *et al.*, 1988; Esterbauer, 1993). Sie werden als eigentliche Initiatoren und/oder Promotoren der Kanzerogenese durch Lipidperoxidation eingestuft (Vaca *et al.*, 1988).

In dieser Arbeit wurden folgende Carbonylverbindungen auf ihre Oxidierbarkeit durch Cu(II) untersucht (Abb.1).

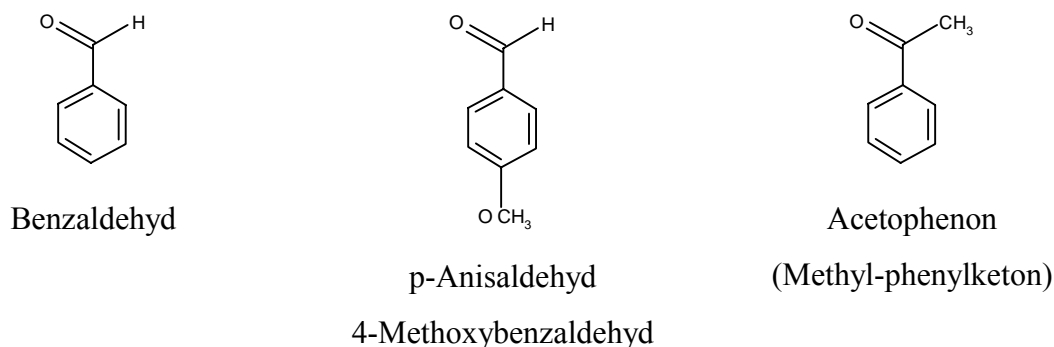


Abb. 1: Strukturformeln von Benzaldehyd, p-Anisaldehyd und Acetophenon

Benzaldehyd, p-Anisaldehyd und Acetophenon sind nicht nur aufgrund ihres natürlichen Vorkommens in Pflanzen, Früchten (p-Anisaldehyd: Birkinshaw *et al.*, 1952; Birkinshaw und Chaplen, 1955; Fenaroli's Handbook, 1975; Benzaldehyd: Fenaroli's Handbook 1975; Graedel, 1976; Nicholas, 1971; Grosjean, 1985; NRC, 1982; Acetophenon: Fenaroli's Handbook, 1975; Verschueren, 1983) und Tieren (z.B. Benzaldehyd wird als Signalstoffstoff von Tausendfüßern (Myriapoda) und Insekten (Lepidoptera, Hymenoptera) synthetisiert, Opdyke (1979)), von Bedeutung. Sie finden als Pestizide bzw. Bestandteil von Medikamenten Anwendung in der chemischen und pharmazeutischen Industrie. So wird p-Anisaldehyd beispielsweise als Anlockstoff für Kakerlaken (Nakano, 1975) und zur Antihistaminherstellung verwendet (SRI in HSDB, 1998, AN: 969, UN: 9710). Benzaldehyd wird z.B. als Insektenschutzmittel (Willoughby, 1992) eingesetzt und dient als Ausgangsmaterial für die Ampicillin- und Dibenzoquat-Herstellung (Pestizid) (Kirk-Othmer, 1978). Acetophenon wird als Lockstoff eingesetzt (Lockstoff für Olivenfliege, Stavrakis und Wright, 1974). Neben dem Vorkommen im Zigarettenrauch und in Autoabgasen (Feron *et al.*, 1991) stellt das natürliche Vorkommen und die Verwendung der 3 untersuchten Substanzen als Farb-, Geschmacks- und Duftstoffe in der Lebensmittel- und Kosmetikindustrie (p-Anisaldehyd: SRI in HSDB 1998; Volatile Compounds in Food, 1989; Benzaldehyd: SRI in HSDB 1998; Merck Index, 1989; Kirk-Othmer, 1978; Volatile Compounds in Food, 1989; Acetophenon: SRI in HSDB, 1998; Merck Index, 1989) die Hauptaufnahmequelle und damit einen bedeutenden Anteil an der Schadstoffbelastung des Menschen dar.

Von den in dieser Arbeit getesteten Substanzen ist Benzaldehyd am eingehendsten untersucht worden. Neben einer Reihe zytotoxischer Wirkungen (Nambata *et al.*, 1981; Pettersen *et al.*, 1983a, 1983b; Dornish *et al.*, 1984, 1986; Watanuki und Sakaguchi, 1980) wurden zum Teil

auch gentoxische Eigenschaften von Benzaldehyd untersucht. Benzaldehyd erwies sich im Ames-Test mit 6 unterschiedlichen *Salmonella typhimurium* Stämmen als negativ (Sasaki und Endo, 1978; Florin *et al.*, 1980; Kasamaki *et al.*, 1982; Haworth *et al.*, 1983; Nohmi *et al.*, 1985) und induzierte in *Drosophila melanogaster* ebenfalls keine geschlechtschromosomal gebundenen Letalmutationen (Woodruff *et al.*, 1985). Demgegenüber gibt es Hinweise darauf, dass Benzaldehyd Chromosomenschäden in Säugerzellkulturen induziert (Feron *et al.*, 1991). Zu p-Anisaldehyd sind in der Literatur kaum Daten veröffentlicht worden. Jansson *et al.* (1988) wiesen eine durch p-Anisaldehyd induzierte erhöhte SCE-Rate in humanen Lymphozyten nach, auch zeigte p-Anisaldehyd eine mutagene Wirkung im Mouse-Lymphoma-Assay (Wangenheim und Bolcsfoldi, 1988). Auf Grundlage der vorliegenden Daten kann keine Beurteilung des kanzerogenen Potenzials von Benzaldehyd und p-Anisaldehyd getroffen werden. Zum untersuchten aromatischen Keton (Acetophenon) liegen ebenfalls kaum toxikologisch relevante Daten vor. Lediglich von Sofuni *et al.* (1985) wird eine mutagene Wirkung in Hamsterlungenzellen beschrieben, während Acetophenon im Ames-Test negativ war (Elliger *et al.*, 1984). Acetophenon ist in toxikologischer Hinsicht in erster Linie als „Photosensitizer“ von Bedeutung, es absorbiert Lichtenergie in einem Wellenlängenbereich von 300-360 nm, wodurch es in den angeregten Triplettzustand übergeht. Die absorbierte Lichtenergie kann auf Rezeptormoleküle übertragen werden, ohne dass Acetophenon selbst dabei zersetzt wird (Epe *et al.*, 1993b). Angeregtes Triplettacetophenon kann radikaltypische DNA-Schäden verursachen (Epe *et al.*, 1993b).

1.1 Ziel der Arbeit

Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit war die Frage, ob Cu(II) durch aromatische Aldehyde und Ketone, wie Benzaldehyd, p-Anisaldehyd und Acetophenon, unter physiologischen Bedingungen reduziert wird. Insbesondere sollte geklärt werden, ob daraus resultierende Folgereaktionen mit molekularem Sauerstoff zur Bildung von ROS und somit zu gentoxischen und zytotoxischen Wirkungen führen. Zur Klärung dieser Fragen und zur Beurteilung der toxischen Einzelwirkung von Benzaldehyd, p-Anisaldehyd und Acetophenon wurden folgende Themenkomplexe bearbeitet:

- Nachweis der DNA-Strangbruchinduktion und zusätzlicher DNA-Schäden wie AP-Stellen in PM2 DNA
- Untersuchungen zur Cu(I)-Bildung und Charakterisierung der DNA-Strangbruchinduktion
- Untersuchung des zytotoxischen Potenzials in Säugerzellkulturen
- Untersuchung des gentoxischen und mutagenen Potenzials in Säugerzellkulturen

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Anaerobenkammer: Plexiglaskammer (ca. 0,25 m³ Gasvolumen) versehen mit Luftscheleuse (Herstellung durch die Werkstätten der Carl von Ossietzky Universität, Oldenburg)

Brutschrank: Heraeus Typ B5060 EK-CO₂

Cleanbench: Heraeus Lamin Air HLBC 2472 GS

Coulter-Counter: Coulter Electronics LTD. Luton, BEDS, London

Elektrophoresegeräte: LKB Bromma 2197 Power Supply; Pharmacia EPS 500; Consort E425

Elektrophoresekammer: Gel Elektrophoresis Apparatus GNA-200 Pharmacia Fine Chemicals; BIO-RAD DNA sub Cell™

ELISA-Scanner: Bio-Rad Modell 450 Microplate Reader

ESR-Spektrometer: Bruker ER 200 D; Datenaufzeichnung und Auswertung erfolgte PC-unterstützt mit Hilfe des Programms EPR-WIN Visual Control (Version 1.alpha2), Autor: Richard Kaupass, C.v.O. Universität Oldenburg

Filter: Nuclepore® Polycarbonat, φ 25 mm, Porengröße 2 µm, Costar Nuclepore GmbH, Tübingen

Filterhalter: Swinnex, φ 25 mm, Millipore, Eschborn

Fluoreszenzphotometer: Shimadzu Spectrofluorometer RF-540, Kyoto, Japan

Fraktionssammler: LKB Bromma 2211 Superrac

HPLC-Säule: Waters Delta Pak, 5 µ, C18, 300Å, 3,9 x 150

HPLC-System: Waters millipore® Model 510 Pumpe, Waters millipore® U6K Injektor, Waters millipore® Model 460 Elektrochemischer-Detektor, Waters associates Model 440 UV-Detektor; Datenaufzeichnung und Auswertung erfolgte PC-unterstützt mit Hilfe von MILLENIUM 2.1 Software

Integrator: Kontron Digiplan MOP-AM 03

Kamera: COHU High Performance CCD Camera

Mikrodensitometer: Joyce und Loebel Chromoscan 200

Photometer: Hitachi 220 Spektralphotometer

Photomultiplier: RCA, Typ C 31034 A 02

Polaroid MP-4 Land Camera mit Film Polaroid Typ 667

Schläuche für alkalische Elution: DESAGA Siliconschlauch, φ innen 0,5 mm, Wandstärke 1 mm, Heidelberg

Schlauchpumpe: DESAGA PLG-Schlauchpumpe, Heidelberg

Transilluminator: Biometra TFL-20M, 312 nm, Biometra, Göttingen

Ultraschallbad: Sonorex RX 255 Transistor, Brandelin, Berlin

Ultraschallgerät: Branson Sonifier[®] Cell Disrupter B-15p, Branson, Genf

Vakuumpumpe: Vacuubrand, Wertheim

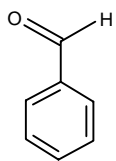
Voltmeter: Metex M-4650 CR, Ratho, Hamburg

Zentrifugen: Eppendorf Tischzentrifuge 5414; Beckmann Airfuge; Beckmann J 21 Kühlzentrifuge

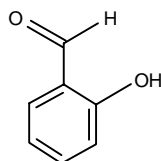
2.1.2 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden in kommerziell höchst erhältlichem Reinheitsgrad verwandt. Die Aldehyde und das Keton wurden unter Sauerstoffabschluss (Argonatmosphäre) verwahrt und der Reinheitsgrad über GC-Messung überprüft und laufend über den Brechungsindex kontrolliert.

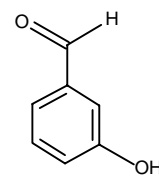
Tab. 1.: Strukturformeln der untersuchten Carbonylverbindungen



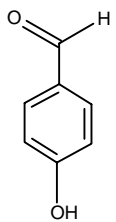
Benzaldehyd



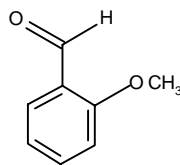
2-Hydroxybenzaldehyd



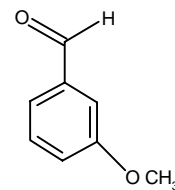
3-Hydroxybenzaldehyd



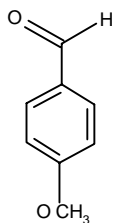
4-Hydroxybenzaldehyd



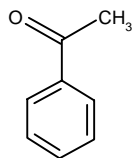
2-Methoxybenzaldehyd



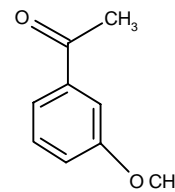
3-Methoxybenzaldehyd



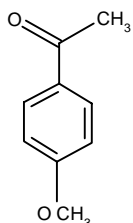
4-Methoxybenzaldehyd
(p-Anisaldehyd)



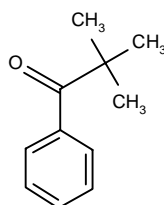
Acetophenon
(Methylphenylketon)



3-Methoxyacetophenon



4-Methoxyacetophenon



Pivalophenon
(tert.-Butylphenylketon)

Acetophenon (Butyl-phenylketon): Fluka, Buchs

Agarose: Type Seakem[®] LE; FMC Bio Products, Rockland, USA; LMP-Agarose: Sea Plaque[®]

GTG Agarose: Biozym Diagnostik, Hessisch Oldendorf, FRG.

Aminosäuren: MEM-AS ohne L-Glutamin (50fach konzentriert), Seromed Biochrom KG, Berlin

Aminosäuren: Nichtessentielle AS (100fach konzentriert), Seromed Biochrom KG, Berlin

Ampuwa: Fresenius, Bad Homburg

Bathocuproindisulfonsäure (BCS): Sigma, Deisenhofen

Benzaldehyd: Fluka, Buchs

Borsäure: Fluka, Buchs

Brij-35: Sigma, Deisenhofen

2-Desoxyguanosin: Fluka, Buchs

9,10-Dibromanthracen (DBA): Lancaster, Eastgate, White Land, Morecambe, England

Dimethylformamid (DMF): Büsing und Fasch, Oldenburg

DMPO (5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide): Sigma, Deisenhofen

Dimethylsulfoxid (DMSO): J.T. Baker, Deventer, Holland

DNA-Farbstoff Hoechst 33258: Serva, Heidelberg

Entwickler: Kodak D19, Eastman Kodak Company, Rochester, N.Y. USA

Ethanol: Riedel de Haën, Seelze

Ethidiumbromid: Sigma, Deisenhofen

Ethylendiamintetraacetat Dinatriumsalz (EDTA): Serva, Heidelberg

Ethylmethansulfonat (EMS): Merck, Darmstadt

Eukitt: Kindler GmbH, Freiburg

Fötale Kälberserum: Boehringer, Mannheim

2-Hydroxybenzaldehyd: Fluka, Buchs

3-Hydroxybenzaldehyd: Fluka, Buchs

4-Hydroxybenzaldehyd: Merck-Schuchardt, Hohenbrunn

8-Hydroxy-2-desoxyguanosin: Wako Chemicals GmbH, Neuss

Hypam Fixierer: Ilford, Mobberley, England

Katalase aus Rinderleber (65000 U/ml): Boehringer, Mannheim

Kupferchlorid (Dihydrat): Riedel de Haën, Seelze

Magnesiumchlorid (Hexahydrat): Merck, Darmstadt

Magnesiumsulfat (Heptahydrat): J.T. Baker, Deventer, Holland

Methanol: HPLC-grade, F.E.R.O.S.A. Scharlau
3-Methoxyacetophenon: Fluka, Buchs
4-Methoxyacetophenon: Fluka, Buchs
2-Methoxybenzaldehyd: Fluka, Buchs
3-Methoxybenzaldehyd: Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
4-Methoxybenzaldehyd (p-Anisaldehyd): Fluka, Buchs
Methylmethansulfonat: Sigma, Deisenhofen
(MEM) minimum essential medium: Seromed Biochrom, Berlin
Natriumazid: Aldrich Chemie, Steinheim
Natriumchlorid: Riedel de Haën, Seelze
Natriumcitrat: Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS): Sigma, Deisenhofen
Natriumsulfit: Merck, Darmstadt
Neocuproin-HCl: Fluka, Buchs, Schweiz
Papanicolaousblau-Lösung 1a: Merck, Darmstadt
Penicillin (10000 U)-/Streptomycinlösung (10000 µg/ml): Seromed Biochrom, Berlin
Photoemulsion: Ilford K2, Ilford, Mobberley, England
Pivalophenon (tert-Butylphenylketon): Fluka, Buchs
PM2 DNA: Laboreigene Herstellung modifiziert nach Espejo und Canelo (1968)
4-POBN (α -(4-pyridyl-1-oxid)-N-tert-butylnitron): Aldrich Chemie, Steinheim
Streptomycinsulfat: Merck, Darmstadt
Tetraethylammoniumhydroxid: Sigma, Deisenhofen
Tetrazoliumbromid (MTT): Sigma, Deisenhofen
6-Thioguanin: Sigma, Deisenhofen
[Methyl 1',2'-³H]-Thymidin (4,59 Tbq/mmol): Amersham, Braunschweig
Tris: Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg
Triton X-100: Serva, Heidelberg
Trypsin, 1:250 aus Rinderpankreas, (4 U/mg): Serva, Heidelberg
Vitamine: (100fach konzentriert), Seromed Biochrom, Berlin
Wasserstoffperoxid: Janssen Chimica, Geel, Belgien

2.1.3 Zelllinien und DNA

Zelllinien:

GM 05757: Primäre menschliche Hautfibroblasten (im Text abgekürzt als N57), NIGMS Human Genetic Mutant Cell Repository, Camden, N.J., USA

V79: Permanente Hamsterlungenzellen, Prof. Dr. Speit, Ulm, zur freundlichen Überlassung

Die Zelllinien wurden entsprechend den Vorschriften von Hessling *et al.* (1980) regelmäßig auf Mycoplasmenkontaminationen untersucht.

PM2 DNA: Superhelikale DNA des Phagen PM2 (*Pseudomonas*) wurde entsprechend der Methode von Espejo *et al.* (1969) produziert und isoliert.

2.1.4 Medien, Lösungen und Puffer

2.1.4.1 Medien

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in "minimum essential medium" (MEM), gelöst in Ampuwa (Aqua pro injectione), angereichert mit 1,05% (v/v) Vitaminlösung, (essentiellen und nicht essentiellen Aminosäurelösungen), sowie 12% (v/v) fötalem Kälberserum, 100 E/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin.

Serumfreies Medium wurde wie das serumhaltige Medium, aber ohne Zusatz von fötalem Kälberserum und Antibiotika, angesetzt.

2.1.4.2 Lösungen

Agarose Gel:

0,5 % Agarose in Elektrophoresepuffer

Abstopperlösung:

10 % Ficoll

0,02 % Bromphenolblau

25 % DMSO in Aqua dest.

DNA-Färbelösung Hoechst 33258

Stammlösung:

0,224 mg/ml in Aqua dest.

Gebrauchslösung:

0,8 ml Hoechst 33258 Stammlösung

20 ml Kaliumphosphatpuffer (1M)

Entfärbelösung:

1 mM MgCl₂ in Aqua dest.

Ethidiumbromidlösung:

2 mg/l Ethidiumbromid

(für Kometen-Assay 1:1000 verdünnt)

Formaldehydlösung:

4 % (v/v) in Aqua dest.

Kristallviolettlösung:

5 g/l in Aqua dest.

Lyse-Lösung, pH 10,0 für Kometen-Assay:

2,5 M NaCl

100 mM EDTA

10 mM Tris

1 % Na-Laurylsarkosinat

(pH-Werteinstellung mit NaOH, 1% Triton X-100 und 10% DMSO jeweils vor Gebrauch zugeben)

MTT-Lösungen:

(Stammlösung):

5 mg MTT/ml PBS-Puffer

(Gebrauchslösung):

1:5 Verdünnung der MTT-Stammlösung in Medium

Triton X-100 Lyselösung, pH 10, für alkalische Elution:

10 mM Na₂EDTA
0,5 % Triton X-100
2 M NaCl

(titriert mit NaOH)

Trypsinlösung (0,125%):

8 g/l NaCl
0,2 g/l KCl
0,2 g/l KH₂PO₄
1,15 g/l Na₂HPO₄ x 2H₂O
1,125 g/l Na₂EDTA
1,25 g/l Trypsin
0,1 g/l CaCl₂ x 2 H₂O
0,2 g/l MgSO₄ x 7 H₂O

Waschlösung, pH 10:

20 mM Na₂EDTA (titriert mit NaOH)

2.1.4.3 *Puffer*

Elektrophoresepuffer für PM2 DNA-Versuche (10fach konzentriert), pH 8,4 :

890 mM Tris
890 mM Borsäure
25 mM Na₂EDTA

Elektrophoresepuffer für Kometen-Assay:

300 mM NaOH
1 mM EDTA (Titriplex III), pH 13

Elutionspuffer für alkalische Elution, pH 12,6:

20 mM Na₂EDTA

(titriert durch Zugabe von Tetraethylammoniumhydroxid (20%))

Elutionspuffer für HPLC, pH 5,0 (Stammlösungen):

50 mM K_2HPO_4

50 mM KH_2PO_4

(bis zum Erreichen des gewünschten pH-Wertes gegeneinander titriert)

4,5 % Methanol

Extraktionspuffer, pH 7,5:

100 mM NaCl

200 mM KCl

50 mM Tris

1 mM Na_2EDTA

(titriert mit HCl)

Fibroblastenpuffer, pH 7,5:

100 mM NaCl

50 mM Tris

1 mM Na_2EDTA

(titriert mit HCl)

Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0 (Stammlösungen):

1 M K_2HPO_4

1 M KH_2PO_4

(bis zum Erreichen des gewünschten pH-Wertes gegeneinander titriert)

Natriumcitratpuffer, pH 5,1:

100 mM Natriumcitrat

1 mM Na_2EDTA

(titriert mit 100 mM Zitronensäure)

Natriumphosphat-Puffer, pH 7,25 (Stammlösungen):

100 mM Na_2HPO_4

100 mM NaH_2PO_4

(bis zum Erreichen des gewünschten pH-Wertes gegeneinander titriert)

Neutralisationspuffer, pH 7,5:

48,5 g/l Tris

(pH-Wert-Einstellung mit rauchender HCl)

PBS (phosphate buffered saline), pH 7,5:

8 g/l NaCl

0,2 g/l KCl

1,15 g/l Na₂HPO₄ x 2 H₂O

0,2 g/l KH₂PO₄

0,1 g/l MgCl₂ x 6 H₂O

0,125 g/l CaCl₂ x 2 H₂O

PBS (phosphate buffered saline), pH 7,4 (Ca²⁺ - und Mg²⁺ -frei):

8 g/l NaCl

0,2 g/l KCl

1,44 g/l Na₂HPO₄ x 2 H₂O

0,2 g/l KH₂PO₄

Saline A, pH 7,2:

8 g/l NaCl

0,2 g/l KCl

1 g/l Glucose-1-hydrat

0,35 g/l NaHCO₃

SDS-Lysepuffer, pH 4,7:

20 g SDS

500 ml DMF

500 ml Ampuwa

(titriert durch Zugabe von 25 ml 80-prozentiger Essigsäure sowie 25 ml 1 N HCl)

Tris•HCl -Puffer, pH 7,25:

10 mM Tris

(titriert mit HCl)

Tris•HCl -Puffer, pH 8,1:

200 mM Tris
1 mM Na₂EDTA

(titriert mit HCl)

2.2 Methoden

2.2.1 *In vitro* Untersuchungen mit PM2 DNA

Da quantitative Aussagen zur Strangbruchbildung abhängig von der jeweiligen PM2 DNA-Charge waren und da CuCl₂ in den eingesetzten Konzentrationen je nach DNA-Charge Einzelstrangbrüche (ESB) von 0,1-1,0 ESB/PM2 DNA induzierte, wurde für alle Versuche dieselbe DNA-Charge verwendet. Die Strangbruchinduktion durch CuCl₂ in dieser DNA-Charge betrug $\leq 0,2$ ESB/PM2 DNA Molekül. Die Ursache für eine erhöhte Strangbruchinduktion durch CuCl₂ in bestimmten PM2 DNA-Chargen kann in einer, isolierungsbedingt auftretenden, erhöhten Anzahl an Apurin/Apyrimidinstellen vermutet werden. Cu(II) überführt AP-Stellen in Strangbrüche (Schaaper *et al.*, 1987).

2.2.1.1 *Inkubation der PM2 DNA mit den Schadstoffen in Kombination mit CuCl₂ unter aeroben und anaeroben Verhältnissen*

PM2 DNA (100 µg/ml; 2 µl) wurde mit 4 µl CuCl₂-Lösung und 34 µl Aldehyd- bzw. Ketonlösung inkubiert. Die CuCl₂- und Aldehyd bzw. Keton-Konzentrationen sind in den Versuchen separat angegeben. Alle Verdünnungen wurden unmittelbar vor Versuchsbeginn frisch hergestellt. Bei Versuchen mit CuCl₂-Konzentrationen $> 0,1$ mM wurde sowohl die CuCl₂-Gebrauchslösung (aus einer CuCl₂-Stammlösung (200 mM) in Ampuwa) als auch die Aldehyd- bzw. Ketonlösung in Tris•HCl-Puffer (10 mM; pH 7,25) angesetzt. Der pH-Wert der Gebrauchslösungen wurde kontrolliert und gegebenenfalls mit NaOH (2 N) auf pH 7,25 eingestellt. In Experimenten mit CuCl₂-Konzentrationen $\leq 0,1$ mM wurde die Aldehyd- bzw. Ketonlösung in Phosphat-Puffer (100 mM; pH 7,25) angesetzt, während die CuCl₂-Gebrauchslösungen (ebenfalls aus der CuCl₂-Stammlösung) mit Ampuwa hergestellt wurden. Der pH-Wert der Reaktionsgemische betrug ebenfalls 7,25. Die Reaktionsgemische wurden im Eisbad pipettiert, durch Zentrifugation in einer Eppendorf-Tischzentrifuge vereinigt und entsprechend ihrer Inkubationszeit im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Zur Terminierung der DNA-Inkubation wurden dem Reaktionsgemisch 15 µl Abstopperlösung zugegeben, kurz durchmischt und der DNA-Inkubationsansatz bis zum Auftragen auf das Agarosegel auf Eis belassen.

Die Herstellung der Reaktionsgemische für die Inkubation unter anaeroben Bedingungen erfolgte wie oben beschrieben, jedoch in einer Anaerobenkammer unter 100%iger Argonatmosphäre. Alle Lösungen und Puffer wurden vor Versuchsbeginn für mindestens 40 min mit Argon durchgast, um den gelösten Sauerstoff auszutreiben. Die Überprüfung des Sauerstoffgehaltes erfolgte mit Hilfe einer Clark-Sauerstoffelektrode.

Wenn nicht anders angegeben, sind bei der Darstellung der einzelnen Versuchsergebnisse die Nettostrangbrüche angegeben, das heißt die Strangbrüche/PM2 DNA-Molekül, die sich nach Subtraktion der entsprechenden Kontrollen ergeben.

Da Acetophenon eine bekannte photosensible Substanz (Photosensitizer) ist, die im Wellenlängenbereich von 300-360 nm angeregt wird (Epe *et al.* (1993b) wurden alle Untersuchungen mit diesem aromatischen Keton im abgedunkelten Raum durchgeführt, um die Bildung angeregter Triplettzustände durch Lichtabsorption zu verhindern.

2.2.1.2 *Nachweis zur Strangbruchinhibition mit Katalase, Neocuproin, Bathocuproin und DMSO*

Die Strangbruchinhibitionsversuche wurden in NaPO₄-Puffer (100 mM; pH 7,25) durchgeführt. PM2 DNA (100 µg/ml; 2 µl) wurde mit 4 µl CuCl₂-Lösung und 34 µl Inhibitor/Aldehyd- bzw. Ketonlösung für eine Stunde bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Zunächst wurden die Inhibitoren in Phosphat-Puffer gelöst und anschließend wurden zu diesen Lösungen jeweils die Aldehyde bzw. das Keton gegeben. Die Konzentrationen der Inhibitoren bzw. der Aldehyde und des Ketons sind jeweils den einzelnen Versuchen zu entnehmen. Die Herstellung der CuCl₂-Lösung sowie der weitere Versuchsablauf entsprechen der unter 2.2.1.1 dargestellten Vorgehensweise.

2.2.1.3 *Untersuchungen zur Reparaturrendonukleaseaktivität an PM2 DNA*

2.2.1.3.1 *Herstellung eines AP-Endonukleasehaltigen Zellextrakts aus humanen Fibroblasten*

In 175 cm² Rouxflaschen subkonfluent gewachsene Zellen einer humanen Fibroblastenzelllinie (N57) wurden zweimal mit Ca²⁺- und Mg²⁺-freier PBS gespült. Bei allen folgenden Arbeitsschritten betrug die Temperatur 0 °C. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Gummischabers und 2 ml Extraktionspuffer vom Flaschenboden gelöst und mit einem Branson Sonifier durch Ultraschall (400 sec; 25% Arbeitsleistung) homogenisiert. Das Homogenat wurde anschließend in einer Airfuge zentrifugiert (105000 g, 20 min), der Überstand entnommen und zur Fällung der hierin enthaltenen DNA mit 10%iger Streptomycinsulfatlösung (30 min; Endkonzentration 0,25%) versetzt. Die Lösung wurde dann erneut zentrifugiert (37000 g, 20 min). Der entstehende Überstand wurde für ca. 12 Stunden gegen Fibroblastenpuffer dialysiert. In dem gewonnenen Extrakt wurde sowohl die AP-Endonukleaseaktivität als auch der Proteingehalt bestimmt. Der Extrakt wurde anschließend fraktioniert und bei -80 °C gelagert.

2.2.1.3.2 *Induktion von Apurin-/Apyrimidinstellen in nativer PM2 DNA durch Hitze-Säure-Behandlung*

Zur Herstellung von Apurin-/Apyrimidinstellen wurde ein Volumen native DNA (80 µg/ml in Tris•HCl-Puffer (10 mM; pH 7,25)) mit einem Volumen Natriumcitratpuffer (pH 5,1) gemischt und für 30 min bei 70 °C im Wasserbad inkubiert. Nach Hecht und Thielmann (1978) entstehen durch diese Behandlung 1,65 Apurin-/Apyrimidinstellen pro PM2 DNA Molekül, wovon 5% als Apyrimidinstellen vorliegen (Lindahl und Karlström, 1973). Zur Beendigung der Reaktion wurde die Lösung rasch auf 0 °C abgekühlt und mit zwei Volumina Tris•HCl Puffer (200 mM, pH 8,1) neutralisiert.

2.2.1.3.3 *Nachweis von Reparaturrendonukleaseaktivität an Schadstoff/CuCl₂ behandelte PM2 DNA*

PM2 DNA wurde wie beschrieben mit den Schadstoff-CuCl₂-Gemischen für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit MgCl₂-Stammlösung (12 mM; Endkonzentration 1,5 mM) versetzt. Ein Teil der Proben wurde dann mit AP-Extrakt (Proteingehalt im Reaktionsansatz 3 µg/ml), der andere Teil nur mit Fibroblastenpuffer für 30 min bei 37 °C im Wasserbad weiterinkubiert. Durch Verwendung von apurin-/apyrimidinierter PM2 DNA wurde in Parallelansätzen überprüft, inwieweit die Schadstoffe bzw. die

Schadstoffkombinationen eine enzymhemmende Wirkung zeigten. Zur Berechnung der durch AP-Endonuklease induzierten DNA-Strangbrüche wurde die Differenz zwischen den enzymbehandelten und den nur mit Fibroblastenpuffer inkubierten Proben gebildet.

2.2.1.4 Nachweis und Quantifizierung von Einzel- und Doppelstrangbrüchen in PM2 DNA mit Hilfe der Gelelektrophorese

Einzelstrangbrüche überführen die zirkuläre superhelikale DNA in die zirkuläre relaxierte Form, während Doppelstrangbrüche zu linearer PM2 DNA führen. Diese verschiedenen Konformationen der DNA wurden in einem Agarosegel mit 0,5% Agarose gelelektrophoretisch voneinander getrennt. Die Laufbedingungen hierfür betragen 2,7 V/cm bei einer Laufzeit von 3 Stunden. Anschließend erfolgte die Anfärbung der Gele für 1 Stunde im Dunkeln mit 2 mg/l Ethidiumbromidlösung. Überschüssiges Ethidiumbromid wurde mit einer 1 mM MgCl₂-Entfärbelösung entfernt (15 min.). Das Gel wurde dann auf einem Transilluminator mit UV-Licht ausgeleuchtet. Hierdurch konnten die DNA-Banden auf Grund der Fluoreszenz des interkalierenden Ethidiumbromids sichtbar gemacht werden. Die so ausgeleuchteten Gele wurden mit einer Polaroid-Kamera bei Blende 8 und einer Belichtungszeit von ¼ sec. fotografiert.

Zur weiteren Auswertung wurden die DNA-Banden auf den Fotografien mikro-densitometrisch vermessen. Die Menge der superhelikalen und relaxierten DNA wurde durch graphische Integration der resultierenden Peaks bestimmt. Durch die Annahme, dass die Häufigkeit der Einzelstrangbrüche in der DNA einer Poissonverteilung entspricht, lässt sich die Anzahl der Einzelstrangbrüche nach der Formel $N = -\ln \alpha$ (Vinograd *et al.*, 1965) berechnen. Hierbei bezeichnet N die Anzahl der Einzelstrangbrüche pro DNA Molekül und α den relativen Anteil der superhelikalen DNA. Um die geringere Anfärbbarkeit der superhelikalen DNA im Vergleich zur relaxierten und linearen DNA in die Berechnung mit einzubeziehen, wird ihr Anteil nach Hecht und Thielmann (1978) mit dem Faktor 1,25 korrigiert.

Da die Induktion eines Doppelstrangbruchs (welcher in Form einer diskreten DNA-Bande detektiert werden kann) nicht mehr der Poissonverteilung folgt, wurden im Falle des Auftretens linearer PM2 DNA sowohl die relaxierte als auch die lineare DNA als relativer Anteil der gesamten gemessenen DNA berechnet. Eine Induktion von mehr als einem Doppelstrangbruch ist quantitativ nicht mehr auswertbar, da die hierbei entstehenden DNA-Fragmente nicht als diskrete Bande auf dem Gel sichtbar gemacht werden können.

2.2.2 Bestimmung des Cu(I)-Gehalts in den Reaktionsgemischen

Der Cu(I)-Nachweis wurde nach der Methode von Rahman *et al.* (1989) durchgeführt. Hierbei wird ein Bathocuproindisulfonsäure (BCS)-Cu(I) Komplex, der ein Absorptionsmaximum bei 480 nm aufweist, photometrisch erfasst. Während der Inkubation (37 °C) der Reaktionsgemische wurden in bestimmten Zeitintervallen Proben entnommen und mit BCS versetzt (Endkonzentration 0,2 mM), um den jeweils aktuellen Gehalt an Cu(I) zu bestimmen. Parallel hierzu wurden Proben der Reaktionsgemische zu Versuchsbeginn mit BCS versetzt und der Cu(I)-Gehalt in entsprechenden Zeitintervallen bestimmt. Zur Bestimmung der Cu(I)-Bildung unter anaeroben Bedingungen wurden die Reaktionsgemische in einer Anaerobenkammer unter 100%iger Argonatmosphäre hergestellt. Die hierzu verwendeten Lösungen und Puffer wurden vor Versuchsbeginn für mindestens 40 min mit Argon durchgast, um den gelösten Sauerstoff auszutreiben. Als Berechnungsgrundlage des Cu(I)-Gehalts der Reaktionsansätze diente der molare Extinktionskoeffizient (480 nm) des BCS-Cu(I) Komplexes von $13500 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (Rahman *et al.*, 1989).

2.2.3 Nachweis von 8-Hydroxy-2-desoxyguanosin im Reaktionsgemisch mittels HPLC-ECD

2-Desoxyguanosin (dG) (2 mM) wurde mit den Schadstoffen (20 mM) allein oder in Kombination mit CuCl_2 (0,1 mM) für 3 Stunden bei 37 °C in NaPO_4 -Puffer (100 mM, pH 7,25) inkubiert. Die Reaktionsgefäße wurden nicht verschlossen, so dass eine ausreichende Sauerstoffversorgung gewährleistet war. Nach der Inkubation wurden die Proben bis zu ihrer Analyse bei -80 °C aufbewahrt.

Die Trennung und Bestimmung des Hydroxylierungsproduktes von dG und den Schadstoffen bzw. Schadstoffgemischen mit CuCl_2 , 8-Hydroxy-2-desoxyguanosin (8-OHdG), erfolgte mit Hilfe eines HPLC-Systems mit elektrochemischer Detektion (ECD) sowie nachgeschalteter UV-Detektion (Waters), in Anlehnung an die Methodik von Floyd *et al.*, (1986b) und Haegele *et al.*, (1994). Die Trennung erfolgte isokratisch auf einer "Reversed Phase" Säule (Waters Delta Pak C18, 5 μ , 3,9 x 150). Als Elutionsmittel wurde Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 5) mit Methanol (4,5% Endkonzentration) verwendet. Das Injektionsvolumen lag bei 20 μ l und die Flussrate betrug 0,9 ml/min. Die Spannung der Arbeitselektrode des ECD wurde auf +0,9 V gesetzt. Diese Spannung ermöglichte eine optimale Detektion von 8-OHdG bei gleichzeitiger starker Unterdrückung von dG-Signalen. Unter den gewählten Versuchsbedingungen

betrug die Nachweisgrenze für 8-OHdG 3,72 ng/ml. Die Aufzeichnung der Detektorsignale sowie deren Auswertung erfolgte PC-unterstützt mit Hilfe von Millennium 2.1 Software.

2.2.4 Chemolumineszenzmessung

Der Nachweis angeregter Triplettcarbonylverbindungen wurde wie von Brunetti *et al.* (1983) beschrieben durchgeführt. Hierzu wurden 5 ml einer Mischung aus Brij-35 (Endkonzentration 3 mM) und 9,10-Dibromanthracen (DBA) (Endkonzentration 10 μ M) in Ethanol (Endkonzentration 40 μ M) und 100 mM Phosphatpuffer pH 7,25 in ein Reaktionsgefäß vorgelegt und in eine lichtdichte Kammer gehängt. Das Reaktionsgefäß wurde mit einem Sammelspiegel abgedeckt, welcher seitlich austretende Photonen auf die an der Unterseite der Kammer befestigte Detektionsfläche eines Photomultipliers umlenkte. Nach Verschließen der Kammer wurde vor dem Starten der Reaktion zunächst die Basislinie des zur Rauschunterdrückung auf -20 °C gekühlten Photomultipliers gemessen. Zum Starten der Reaktion wurden über einen Silikonschlauch, welcher im Reaktionsgefäß mündete, zunächst 4 ml Acetophenonlösung (Endkonzentration im Ansatz 18 mM) gefolgt von 1 ml CuCl₂-Lösung (Endkonzentration im Ansatz 0,1 mM) zugegeben. Die detektierten Photonen wurden für jeweils 1 sec integriert und als Funktion der Reaktionszeit dargestellt.

2.2.5 ESR-spektrometrische Messungen

2.2.5.1 Untersuchungen zur Veränderung des ESR-Signals von Cu²⁺ durch die Kombination mit den Testsubstanzen

Das paramagnetische Cu²⁺-Ion kann durch ESR-Messung detektiert werden. Das ESR-Signal einer 0,1 mM CuCl₂-Lösung (NaPO₄-Puffer, pH 7,25) wurde mit dem einer Lösung aus 0,1 mM CuCl₂ und 18 mM Testsubstanz verglichen.

2.2.5.2 ESR-spektrometrischer Nachweis von C-zentrierten, Alkoxy- oder/und Hydroxylradikalen

Die eingesetzten spezifischen Radikal-Fänger 5,5- Dimethylpyrrolin-N-oxid (DMPO) zum Nachweis von Hydroxylradikalen und α -(4-Pyridyl-1-oxid)-N-tert-butylnitron (4-POBN) zum Nachweis von C-zentrierten- oder Alkoxyradikalen, gehören zur Gruppe der Nitronen und zeichnen sich durch eine hervorragende Wasserlöslichkeit aus (Rosen und Rauckman, 1981). Freie Radikale addieren an das C-Atom der funktionellen Nitron-Gruppe, wobei ein Nitroxid entsteht, das einen ungewöhnlich stabilen Typ eines freien Radikals darstellt (Mason und

Chignell, 1994). Die Reaktionsmischungen für die ESR-Messungen bestanden aus bis zu 18 mM Testsubstanz, 0,1 mM CuCl₂ und 240 mM POBN oder 100 mM DMPO in NaPO₄-Puffer (100 mmol/l, pH 7,25). Nach einer 1-3 stündigen Inkubation bei 37 °C im Wasserbad wurden 500 µl der Reaktionslösung in eine Quarzflachzelle überführt und die ESR-Messung durchgeführt.

Die ESR-Untersuchungen wurden an einem Bruker ER 200 D-Spektrometer in einer Flachzelle durchgeführt. Die ESR-Spektrometer-Bedingungen waren: Mikrowellen-Stärke: 200 mW; Modulationsamplitude: 1G, Zeitkonstante: 100 msec, Scan-Bereich: 100 G, Scan-Zeit: 120 sec und die Verstärkung betrug $5 \cdot 10^4$. Unter den gewählten Versuchsbedingungen lag die Nachweisgrenze einer Standardlösung aus H₂O₂/0,1 mM CuCl₂ zur Bestimmung des DMPO-[•]OH- Adduktes bei 10 µM H₂O₂.

2.2.6 Zellkulturexperimente

Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C mit 5%iger CO₂-Atmosphäre und 95% relativer Luftfeuchtigkeit. Zur Weiterkultivierung wurde das Medium abgesogen und die Zellen 10-20 sec mit 0,125%iger Trypsinlösung behandelt. Nach 3 - 5 min bei 37 °C nahmen die Zellen eine kugelige Gestalt an, lösten sich vom Flaschenboden und konnten in Medium aufgenommen werden. In dieser Zellsuspension wurde die Zellzahl bestimmt und die Zellen je nach Bedarf für die Experimente ausgesät bzw. weiterkultiviert (passagiert). Da das Alter der Zellen (Bayreuther *et al.*, 1988), die verschiedenen Stadien ihrer Wachstumsphase (Goldenberg *et al.*, 1971) und die Teilungsrate (Aujard und Trincal, 1985) in Bezug auf ihre Sensitivität in toxikologischen Untersuchungen von entscheidender Bedeutung sind, wurden folgende Standardbedingungen festgelegt:

- Die für die Experimente verwendeten primären Zellen befanden sich in der 9.-16. Passage;
- Die Aussaat erfolgte aus Kulturflaschen, in denen die Zellen maximal 3 - 4 Tage nach der letzten Passage subkonfluent bis konfluent gewachsen waren.

2.2.6.1 Inkubation der Zellen mit den Schadstoffen

Zur Herstellung der Inkubationslösung wurden die Schadstoffe direkt in serumfreiem Medium (SFM) gelöst. Die CuCl_2 -Inkubationslösung wurde durch Verdünnung der wässrigen Stammlösung (200 mM) mit SFM hergestellt und mit NaOH (2 M) neutralisiert. Vor der Inkubation mit den Testsubstanzen wurden die Zellen zweimal mit ca. 4 ml SFM gewaschen. Danach erfolgte entweder eine 1,5-stündige Vorbehandlung der Zellen mit SFM bzw. der CuCl_2 -Inkubationslösung und anschließend eine 1-stündige Inkubation mit den Schadstofflösungen bzw. SFM, oder die Zellen wurden gleichzeitig mit den Schadstoffen und der CuCl_2 -Lösung für eine Stunde inkubiert. Die Inkubation der Zellen mit den Testsubstanzen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C mit 5%iger CO_2 -Atmosphäre und 95% relativer Luftfeuchtigkeit. Nach der CuCl_2 -Inkubation bzw. nach der Schadstoff/ CuCl_2 -Behandlung wurden die Zellen zweimal mit SFM gewaschen und dann entsprechend der unterschiedlichen experimentellen Endpunkte weiterbehandelt.

Auch die Untersuchungen mit Acetophenon in Zellkulturen wurden im abgedunkelten Raum durchgeführt.

2.2.6.2 Bestimmung der Akuten Toxizität

Die Messung der Akuten Toxizität der Testsubstanzen mit und ohne CuCl_2 -Vorinkubation wurde im Wesentlichen durchgeführt wie von Hansen *et al.* (1989) beschrieben. Bei dieser Methode wird die, durch die mitochondriale Succinatdehydrogenase katalysierte, Reduktion von Tetrazoliumbromid (MTT) zu Formazan gemessen (Slater *et al.*, 1963). Die Hemmung des Enzyms durch Schadstoffe gilt als direktes Maß für akut toxische Wirkungen (Bohrenfreund *et al.*, 1988; Husøy *et al.*, 1993) und wird als Vitalitätsverlust bezeichnet. Zur Durchführung der Versuche wurden pro Well einer 96er Mikrotiterplatte 8000 N57 Zellen in 200 μl Medium ausgesät. Nach 48 Stunden wurde das Zellwachstum der Fibroblasten unter dem Mikroskop kontrolliert und jeweils 4 Parallelproben mit den Schadstoffen wie unter 2.2.6.1. beschrieben inkubiert. Nach der Schadstoffinkubation wurden die Fibroblasten zweimal mit SFM gespült und anschließend mit je 100 μl MTT-Gebrauchslösung für 3 Stunden im Brutschrank inkubiert. Durch Zugabe von vortemperiertem SDS-Lysepuffer (100 μl /Well) wurden die Zellen lysiert und die durch Dehydrogenaseaktivität gebildeten blauen Formazankristalle gelöst. Dazu wurde die Mikrotiterplatte im Dunkeln bei 37 °C über Nacht in einem Schüttler inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Lyseergebnis mit einem Mikroskop über-

prüft und die Mikrotiterplatte mit einem Computer gesteuerten ELISA-Scanner ausgewertet. Die Extinktion wurde bei einer Messwellenlänge von 570 nm und einer Referenzwellenlänge von 655 nm ermittelt. Zur Messung der Toxizität 21 Stunden nach der Schadstoffinkubation wurden die Fibroblasten nach der Schadstoffinkubation zweimal mit SFM gespült und für 21 Stunden mit Medium weiterinkubiert. Die Inkubation mit MTT, die Lyse und die Extinktionsmessung erfolgten dann wie oben beschrieben.

Zur Berechnung der Toxizität wurde die Extinktion der Kontrollen gleich 100% gesetzt. Als Berechnungsgrundlage dienten die jeweiligen Mittelwerte von vier Parallelproben. Die Extinktionen der schadstoffbehandelten Proben wurden prozentual gegen den Kontrollwert berechnet. Die durch die CuCl₂-Vorinkubation induzierte Toxizität wird in den Legenden zu den Abbildungen der Ergebnisse als Kupfer-Vorschädigung angegeben.

2.2.6.3 Bestimmung des Zellwachstums und der Koloniebildungsfähigkeit

Die Durchführung der Bestimmung des Zellwachstums erfolgte nach der von Jacobi *et al.* (1995) beschriebenen Methode. Hierzu wurden zwei Tage vor der Schadstoffinkubation 18000 Zellen/Well der Zelllinie N57 in sechser Multischalen ausgesät. Jeweils sechs Parallelproben wurden dann wie unter 2.2.6.1. beschrieben mit den Schadstoffen inkubiert. Anschließend wurden die Proben zweimal mit Saline A gespült. Während eine Hälfte der Proben dann mit Medium für weitere 48 Stunden im Brutschrank wachsen konnte, wurde die andere Hälfte zum Ablösen der Zellen mit 0,5 ml Trypsinlösung versetzt. Nach Abkugeln der Zellen wurden diese in 6,5 ml Saline A aufgenommen und im Coulter Counter die Ausgangszellzahl bestimmt. Die nachinkubierten Zellen wurden 48 Stunden später ebenfalls zweimal mit Saline A gespült, trypsiniert und zum Zählen in 6,5 ml Saline A überführt und die Endzellzahl gemessen.

Zur Auswertung des Versuchs wurde die Zellteilungsrate (Z/48 h) für jede eingesetzte Schadstoffkonzentration wie folgt berechnet:

$$Z/48h = \ln \frac{\text{Endzellzahl}}{\text{Ausgangszellzahl}} : \ln 2$$

Die Zellteilungsrate in den Kontrollen wurde jeweils gleich 100% gesetzt und die prozentuale Wachstumshemmung der Proben in Bezug auf diese Kontrollen berechnet. Die durch die CuCl₂-Vorinkubation induzierte Wachstumshemmung wird in den Legenden zu den Abbildungen der Ergebnisse als Kupfer-Vorschädigung angegeben.

Zur Bestimmung der Koloniebildungsfähigkeit wurden subkonfluent gewachsene N57 Fibroblasten bzw. V79 Zellen verwendet, die drei Tage vor Versuchsbeginn in Petrischalen (5 cm Ø) ausgesät wurden.

Nach der Inkubation mit den Schadstoffen wurden die Zellen durch Trypsinieren vom Boden der Petrischale abgelöst und pro Konzentration fünfmal 2000 N57 bzw. 250 V79 Zellen pro Petrischale (5 cm Ø) ausgesät. Nach ca. zwei (N57) bzw. einer Woche (V79) Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂ waren die Kolonien konfluent gewachsen. Sie wurden 10 Minuten mit 3,5% Formaldehyd fixiert, anschließend mit Kristallviolett angefärbt und ausgezählt. Die Koloniebildungsfähigkeit wurde in Prozent der Kolonien im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle angegeben.

2.2.6.4 Bestimmung intrazellulärer DNA-Strangbruchinduktion mit der Alkalischen Elution

Die Technik der Alkalischen Elution dient dem Nachweis intrazellulärer DNA-Strangbruchinduktion. Hierzu gehören sowohl chemisch als auch enzymatisch induzierte Strangbrüche, wie sie z.B. durch Reparaturenukleasen verursacht werden. Das Testprinzip beruht darauf, dass auf einen Filter aufgebrachte zelluläre DNA im alkalischen Milieu einzelsträngig wird und je nach Länge der entstehenden DNA-Fragmente zu unterschiedlichen Zeiten von diesen Filtern eluiert. Die Methode wurde im Wesentlichen so durchgeführt wie von Doerjter *et al.* (1988) und Kohn (1991) beschrieben. Hierzu wurden drei bis vier Tage vor Versuchsbeginn ca. 200 000 N57 Zellen in Gewebekulturschalen (Ø7,5 cm) ausgesät. Am Versuchstag waren die Zellen subkonfluent bis konfluent gewachsen und wurden wie unter 2.2.6.1. beschrieben mit den Schadstoffen behandelt. Um mögliche DNA-DNA-Crosslinks nachweisen zu können, die zu einer verminderten Elutionsrate führen, wurden die Fibroblasten, in Anlehnung an Brambilla *et al.* (1985) und Marinari *et al.* (1984), in den entsprechenden Versuchen vor der Schadstoffbehandlung 20 min mit MMS vorbehandelt.

Die Zellen wurden nach der Schadstoffbehandlung zweimal mit eiskalter Saline A gespült. Durch die Kälte werden die Stoffwechselaktivitäten der Zellen eingestellt und einer mögli-

chen Reparatur von Strangbrüchen vorgebeugt. Alle folgenden Versuchsschritte wurden bei Rotlicht ausgeführt. Nach dem Trypsinieren wurden die Zellen von je 2 Parallelansätzen vereinigt (Gesamtzellzahl ca. 1×10^6), in 6 ml Saline A aufgenommen und vor dem Auftragen auf Polycarbonatfilter (\varnothing 25 mm; Porengröße 2 μm) wurde jeweils ein Aliquot von 0,5 ml entnommen. Die Zellen wurden dann auf den Filtern mittels Durchpumpen von Triton X-100 Lysepuffer lysiert (3,5 ml; 3 ml/h). Um DNA-Protein-Crosslinks (s. Brambilla *et al.*, 1985) nachzuweisen, wurde dem Lysepuffer in einzelnen Versuchen Proteinase K (0,5 mg/ml) zugesetzt. Als Positivkontrolle diente Malondialdehyd, das eine verstärkte Elutionrate nach Proteinase K-Behandlung aufwies.

Anschließend wurde die auf den Filtern verbliebene DNA mit 4,5 ml Waschpuffer (pH 10) und einer Pumpgeschwindigkeit von 1,5 ml/h gespült. Die DNA wurde dann über Nacht durch Pumpen von Elutionslösung (27 ml; pH 12,6; 1,5 ml/h) von den Filtern eluiert und stündlich in ca. 2 ml Fraktionen aufgefangen. Das Eluat der ersten 20 Minuten wurde verworfen. Die auf den Filtern verbliebene DNA wurde im Ultraschallbad (4 x 15 min) in 30 ml Elutionslösung aufgenommen.

Der DNA-Gehalt der einzelnen Fraktionen und der vorher entnommenen Aliquots wurde fluoreszenzphotometrisch bestimmt. Hierzu wurde jeweils 1 ml der Fraktionen mit 2 ml Elutionslösung verdünnt und durch Zugabe von 270 μl KH_2PO_4 -Lösung (1 M) neutralisiert. Die Proben wurden dann mit 100 μl DNA-Färbelösung Hoechst 33258 (Gebrauchslösung) versetzt und für 30 min im Dunkeln belassen. Anschließend wurde die Fluoreszenz (Anregung 360 nm; Emission 450 nm) gemessen. Zur Auswertung wurde der DNA-Gehalt der vor der Elution entnommenen 0,5 ml Aliquots auf das Probenvolumen umgerechnet und dann gleich 100% gesetzt. Zur Darstellung der Ergebnisse wurde entweder der auf den Filtern verbliebene oder der eluierte DNA-Anteil als Funktion der Elutionszeit aufgetragen. Alle wiederverwendeten Gefäße wurden vor Gebrauch durch eine halbstündige Behandlung mit 0,4 N NaOH-Lösung von möglichen Nukleinsäureresten befreit.

2.2.6.5 *Bestimmung intrazellulärer DNA-Strangbruchinduktion mit dem Kometen-Assay*

Der Kometen-Assay (Einzelzellgelelektrophorese) ist eine schnelle, einfache und empfindliche Methode zum Nachweis von direkten DNA-Strangbrüchen und alkalilabilen Stellen, die in Strangbrüche überführt werden, in einzelnen Zellen (Östling und Johanson, 1984; Singh *et al.*, 1988; Fairbairn *et al.*, 1995). Hierbei werden die behandelten Zellen in Agarose eingebettet, lysiert, alkalisch behandelt, elektrophoresiert und gefärbt bevor die DNA-Schäden mittels Fluoreszenz-Mikroskopie analysiert werden (Singh *et al.*, 1988). Die während der Elektrophorese angelegte Spannung zieht die DNA-Fragmente in Abhängigkeit ihrer Größe aus dem Zellkern heraus. Nicht geschädigte DNA verbleibt im Kernbereich. Je höher die Anzahl an Strangbrüchen und je kleiner die Fragmente, um so mehr und um so weiter wandert die DNA aus dem Kernbereich heraus. Nach Anfärben der DNA mit Ethidiumbromid werden geschädigte Zellkerne im Fluoreszenzmikroskop als Kometen sichtbar.

Vor Versuchsdurchführung wurden Objektträger vorbereitet, indem sie in eine 1,5%ige Agaroselösung (in PBS), welche zuvor zweimal aufgekocht und auf 60 °C abgekühlt wurde, getaucht wurden. Nach Säubern der Unterseite wurden die Objektträger horizontal über Nacht an der Luft getrocknet. Die Fibroblastenzellen wurden 3 Tage vor Versuchsbeginn in Petrischalen (5 cm Ø) ausgesät. Am Tag der Durchführung des Experiments waren die Zellen subkonfluent bis konfluent gewachsen. Die Inkubation der Zellen mit den Testsubstanzen erfolgte wie unter 2.2.6.1. beschrieben. Nach erfolgter Schadstoffbehandlung wurden die Zellen zweimal mit 4 ml eiskaltem PBS-Puffer gespült, trysinisiert und in 300 µl eiskalter PBS-Lösung aufgenommen und bis zur Auftragung im Dunkeln im Kühlschrank gelagert. Durch wiederholtes Aufsaugen und Ablassen mit einer Eppendorfpipette wurde eine homogene Zellsuspension hergestellt. 10 µl dieser Suspension wurde mit 90 µl 37 °C warmer 0,5%iger LMP-Agarose (in PBS) versetzt, aufpipettiert und mit einem Deckglas versehen. Für jede Probe wurden jeweils zwei Objektträger beschickt. Zum Erstarren der Agarose wurden die Objektträger für 3-5 Minuten im Kühlschrank verwahrt. Nach dem Erstarren wurden die Deckgläser entfernt. Im Anschluss an eine einstündige Lyse, in einer abgedunkelten Kammer bei 4 °C, wurde die DNA alkalisch denaturiert und die alkalilabilen Stellen durch eine 40 minütige Behandlung mit alkalischem Elektrophoresepuffer (pH > 13) in Einzelstrangbrüche überführt (*alkaline unwinding*). Es erfolgte eine 20 minütige Elektrophorese bei 300 mA und 25 V im

Eisbad. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Objektträger aus der Kammer genommen und auf einem Abtropfgestell vorsichtig dreimal für fünf Minuten mit Neutralisationspuffer überschichtet und anschließend mit destilliertem Wasser gespült. Die Objektträger wurden über Nacht getrocknet. Alle Arbeitsgänge wurden auf Eis und unter gedimmten Lichtbedingungen durchgeführt, um eine zusätzliche Schädigung der DNA durch enzymatische Prozesse und Licht zu vermeiden.

Die trockenen Objektträger wurden mit 50 µl Ethidiumbromidlösung (20 µg/ml) angefärbt, mit einem Deckglas versehen und nach 15 Minuten mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops, ausgerüstet mit einem Anregungsfilter von 515-560 nm und einem Barrierefilter bei 590 nm, und der angeschlossenen Software "Comet assay II" das *tail moment* der Zellen bestimmt. Das Verhältnis von Intensität und Länge des Schweifes zum Kopf des "Kometen" wird in dem Begriff *tail moment* zusammengefasst. Die Höhe des *tail moments* nimmt mit der Stärke der Schädigung, welche durch die im Versuch verwendete Substanz hervorgerufen wurde, zu. Zellen, deren DNA so stark geschädigt war, dass diese nicht mehr korrekt detektierbar war, wurden in die Auswertung mit einbezogen, indem ihr *tail moment* gleich dem maximal noch auswertbaren *tail moment* gesetzt wurde.

2.2.6.6 Nachweis der DNA-Reparatur

2.2.6.6.1 Autoradiographischer Nachweis der DNA-Reparatur (UDS) und der Hemmung der DNA-Reparatur

Der autoradiographische Nachweis von DNA-Exzisionsreparatur folgte im wesentlichen der Beschreibung von Cleaver und Thomas (1981). Hierzu wurden 10 000 Zellen der Zelllinie N57 pro Fach in Vier-Kammer-Objektträger ausgesät. Nach Erreichen eines konfluenten Monolayers wurden die Zellen mit den Schadstoffen wie unter 2.2.6.1. beschrieben inkubiert.

Um eine mögliche Hemmung der DNA-Reparatur nachweisen zu können, wurden die Zellen vor der eigentlichen Schadstoffinkubation (2.2.6.1) mit UV-Licht (5,5 J/m²) bzw. mit MMS (5 mM, 20 min) vorbehandelt. Aufgrund seiner alkylierenden Wirkung wird durch MMS eine DNA-Reparatur induziert (Williams, 1977). Als positive Kontrollen wurden nur mit UV-Licht bzw. nur mit MMS behandelte Zellen eingesetzt.

Eine mögliche DNA-Reparatur während der Inkubation mit den Testsubstanzen (einschließlich MMS) wurde durch Anreichern der Inkubationslösungen mit 370 kBq/ml ^3H -Thymidin erfasst. Kontrollansätze zum positiven Nachweis der DNA-Reparatur wurden nach der SFM bzw. CuCl_2 -Vorinkubation mit UV-Licht (254 nm; $5,5 \text{ J/m}^2$) bestrahlt. Der Schadstoffinkubation folgte ein Spülvorgang mit SFM und anschließend eine dreistündige ^3H -Thymidin-Inkubation (370 kBq/ml Medium). Um nicht zur DNA-Reparatur verwendetes ^3H -Thymidin aus den Fibroblasten zu entfernen, wurden die Zellen nach weiteren drei Spülschritten für 2 Stunden in Medium inkubiert. Während dieser Zeit wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

Nach Demontage der Kammern wurden die Objektträger viermal mit SFM gespült und zum Schwellen der Zellkerne für 8 min in 1%ige (w/v) Natriumcitratlösung getaucht. Die Zellen wurden anschließend 30 min mit Ethanol/Eisessig (3:1 v/v) und 10 min mit Ethanol (96 %) fixiert.

Nach dem Trocknen wurden die Objektträger im Dunkeln mit Ilford K2 Photoemulsion (1:2 verdünnt in Aqua dest.) beschichtet und anschließend für 10-12 Tage in einer lichtdichten Schachtel mit Silicagel als Trockenmittel bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Die filmbeschichteten Objektträger wurden dann mit Kodak D19 entwickelt (4 min; $16 \text{ }^\circ\text{C}$), gewässert (30 sec; H_2O versetzt mit einem Tropfen Eisessig), mit Hypam fixiert (10 min; 1:5 (v/v) in H_2O) und abschließend noch einmal gewässert (5 min). Nach dem Trocknen der Objektträger wurden die Zellkerne für eine Minute mit Papanicolaous 1a-Lösung gefärbt, zweimal mit Aqua dest. gespült und nach erneutem Trocknen mit einigen Tropfen Eukitt und Deckgläschen eingedeckt.

Im Mikroskop wurden die Silberkörnchen über den blau gefärbten Zellkernen und über einer gleichgroßen Fläche des Zytoplasmas ausgezählt. Es wurden nur morphologisch unveränderte Zellen ausgewertet. Replizierende Zellen, erkennbar an einer sehr starken bis vollständigen Schwärzung der Zellkerne, fanden keine Berücksichtigung. Eine DNA-Reparatur hat dann stattgefunden, wenn die Differenz der Silberkörnchen über dem Zellkern und dem Cytoplasma im Mittel von mindestens 50 ausgewerteten Zellen ≥ 5 ist (Butterworth *et al.*, 1988).

2.2.6.6.2 *Nachweis der DNA-Reparatur mit Hilfe der Alkalischen Elution*

Untersuchungen zum Nachweis der DNA-Reparatur mit Hilfe der Alkalischen Elution wurden im Wesentlichen wie unter 2.2.6.4 beschrieben durchgeführt. Die behandelten Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeiten nach erfolgter Schadstoffinkubation alkalisch eluiert. Die Zellen wurden einerseits direkt nach Behandlung lysiert und alkalisch eluiert, oder zuvor 24, oder 48 Stunden nach erfolgter Inkubation mit den Schadstoffen, in Medium weiterkultiviert. Der Anteil auf dem Filter verbliebener DNA bzw. der Anteil eluierter DNA der Proben, die direkt eluiert wurden, wurde dann mit dem nach 24 bzw. 48 Stunden verglichen. Eine Abnahme des Anteils eluierter DNA bzw. eine Zunahme des auf dem Filter verbliebenen Anteils wurde dann auf eine erfolgte DNA-Reparatur zurückgeführt.

2.2.6.7 *HPRT-Mutationstest*

Im HPRT-Mutationstest werden Vorwärtsmutationen des Hypoxantin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Gens erfasst. Ausfallmutanten können hierbei durch Zugabe von 6-Thioguanin, das im Wildtyp zu einem letal wirkenden Intermediat metabolisiert wird, selektioniert werden. Als Ursache kommen verschiedene Mutationen im X-chromosomal lokalisierten Strukturgen (*hprt*) oder auch in Regulatorgenen in Frage (Glatt, 1993). Der Test wurde im Wesentlichen durchgeführt wie von Bradley *et al.* (1981) beschrieben. In 175 cm² Rouxflaschen subkonfluent gewachsene V79 Zellen wurden mit Schadstoffen behandelt, wie unter 2.2.6.1. dargestellt.

Gemäß international akzeptierter Prüfrichtlinien (EPA, 1986; OECD, 1983; EWG 1986) sollen bei *in vitro*-Studien zur Gentoxizität nicht nur ansteigende Substanzkonzentrationen eingesetzt werden, sondern dabei auch solche, die in der höchsten Konzentration so toxisch sind, dass sich eine „geringe Überlebensrate“ ergibt. So wird von Aaron *et al.* (1994) im Rahmen eines Workshops zur Standardisierung von Gentoxizitätstest (Melbourne 27.-28.2.1993) für Genmutationstests in Säugerzellen *in vitro* eine maximale Konzentration der zu testenden toxischen Substanzen vorgeschlagen, die noch ein 10-20%iges Überleben zulässt.

Zur Erfassung der Koloniebildungsfähigkeit wurden direkt nach der Schadstoffinkubation 250 Zellen in Petrischalen (Ø 5 cm) ausgesät und nach 7 Tagen geerntet. Der Rest der Zellen wurde weiterinkubiert. Während der Expressionszeit (7-12 Tage) wurden die Zellen jeweils bei Erreichen konfluenten Wachstums so geteilt (ca. alle 2 Tage), dass immer 1×10^7 Zellen

weiterinkubiert werden konnten. Im Anschluss an die Expressionszeit wurden die Zellen tryptiniert und zur Erfassung der Koloniebildungsfähigkeit in Petrischalen (\varnothing 5 cm) ausgesät (250 Zellen/Schale). Zur Selektion der Mutanten wurden 5×10^5 Zellen in Petrischalen (150 cm^2) ausgesät und mit im Medium gelösten 6-Thioguanin ($10 \text{ } \mu\text{g/ml}$) inkubiert. Nach weiteren 8 Tagen wurden die Zellen mit Formaldehydlösung fixiert und die Kolonien nach Färben mit Kristallviolettlösung gezählt. Die Mutationsrate wurde als Mutanten/ 10^6 Überlebende berechnet.

3. ERGEBNISSE

3.1 Kombination Benzaldehyd/CuCl₂

3.1.1 Untersuchungen zur Schädigung von PM2 DNA

3.1.1.1 Strangbruchinduktion durch verschiedene Benzaldehyde/CuCl₂

Es wurde die DNA-Strangbruchbildung durch Benzaldehyd, 2-, 3- und 4-Hydroxybenzaldehyd allein und in Kombination mit CuCl₂ untersucht. CuCl₂ allein zeigte eine minimale Strangbruchbildung von $\leq 0,1$ Einzelstrangbrüche (ESB)/PM2 DNA-Molekül. Die getesteten Aldehyde allein zeigten eine geringe Einzelstrangbruchbildung von maximal $\leq 0,3$ ESB/PM2 DNA Molekül. Bei einer Inkubation der PM2 DNA mit Benzaldehyd in Kombination mit CuCl₂ konnte eine erhöhte Einzelstrangbruchbildung festgestellt werden (Abb. 2).

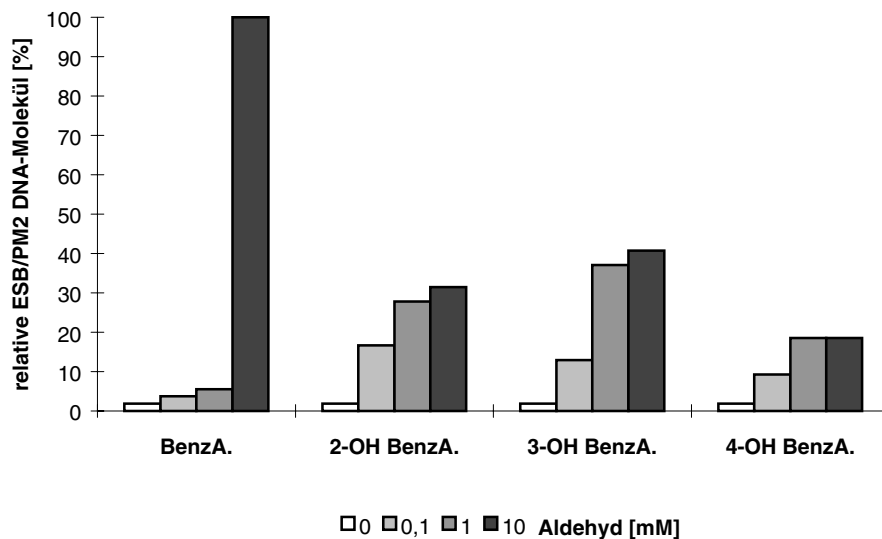


Abb. 2: Induktion von Einzelstrangbrüchen in PM2 DNA durch Benzaldehyd, 2-, 3- und 4- Hydroxybenzaldehyd (0; 0,1; 1,0; 10 mM) in Kombination mit 1 mM CuCl₂. Die Inkubation der DNA mit den Testsubstanzen erfolgte für 1 Stunde bei 37 °C in Tris•HCl-Puffer (10 mM, pH 7,25).

Die anderen untersuchten Hydroxybenzaldehyde zeigten in Kombination mit CuCl₂ nur eine geringe Einzelstrangbruchbildung, die weniger als 40% der Strangbruchbildung von Benzaldehyd/CuCl₂ ausmachte (Abb. 2). Auch bei CuCl₂-Konzentrationen von 0,5 und 1,5 mM zeigte sich das gleiche Bild (Daten nicht gezeigt). Daher wurden die hydroxylierten Benzaldehyde nicht weiter untersucht.

3.1.1.2 Strangbruchinduktion durch Benzaldehyd/CuCl₂

Es wurde die Strangbruchbildung durch Benzaldehyd/CuCl₂ in Abhängigkeit von der CuCl₂-Konzentration untersucht. Bei konstanten Benzaldehyd-Konzentration ab 5 mM konnte nach einer Stunde Inkubationszeit bei 37 °C ein Maximum an Strangbrüchen zwischen 0,5-1,5 mM CuCl₂ nachgewiesen werden. Bei höheren CuCl₂-Konzentrationen nahm die Anzahl der Strangbrüche/PM2 DNA-Molekül wieder ab (Abb. 3).

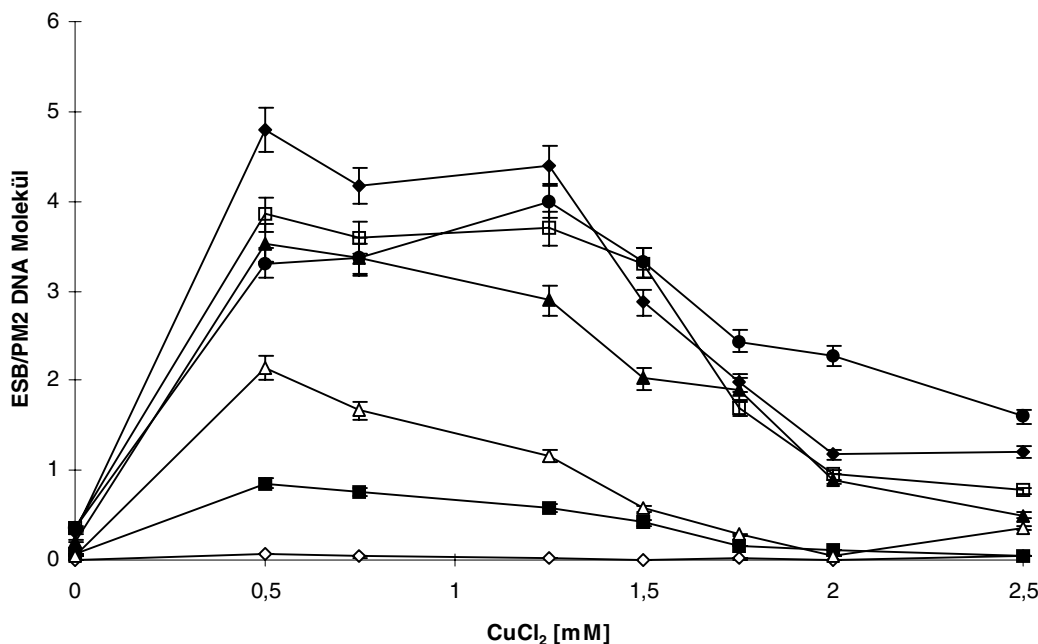


Abb. 3: Induktion von DNA-Einzelstrangbrüchen durch Benzaldehyd/CuCl₂ in Abhängigkeit von der CuCl₂-Konzentration. Die Inkubation erfolgte für 1 Stunde bei 37 °C in Tris•HCl-Puffer (10 mM, pH 7,25) mit unterschiedlichen Aldehydkonzentrationen (0 mM (◇); 0,5 mM (■); 1,0 mM (Δ); 2,5 mM (▲), 5 mM (●); 8 mM (◼); 15 mM (◆)).

Auch bei wesentlich geringeren CuCl₂-Konzentrationen (0,1 mM) wurden Einzelstrangbrüche im Bereich von 0,3-1,5 ESB/PM2 DNA-Molekül induziert (Abb. 4). In diesem Zusammenhang zeigte sich, dass die Strangbruchbildung durch Benzaldehyd/CuCl₂ vom verwendeten Puffersystem abhängig war. Im organischen Tris-Puffer war die Strangbruchinduktion geringer als im anorganischen NaPO₄-Puffer (Abb. 4). Bei CuCl₂-Konzentrationen von 0,1 mM und variabler Benzaldehyd-Konzentration von 0-18 mM war die Anzahl an ESB/PM2 DNA-Molekül in NaPO₄-Puffer ca. zweimal so hoch (Abb. 4).

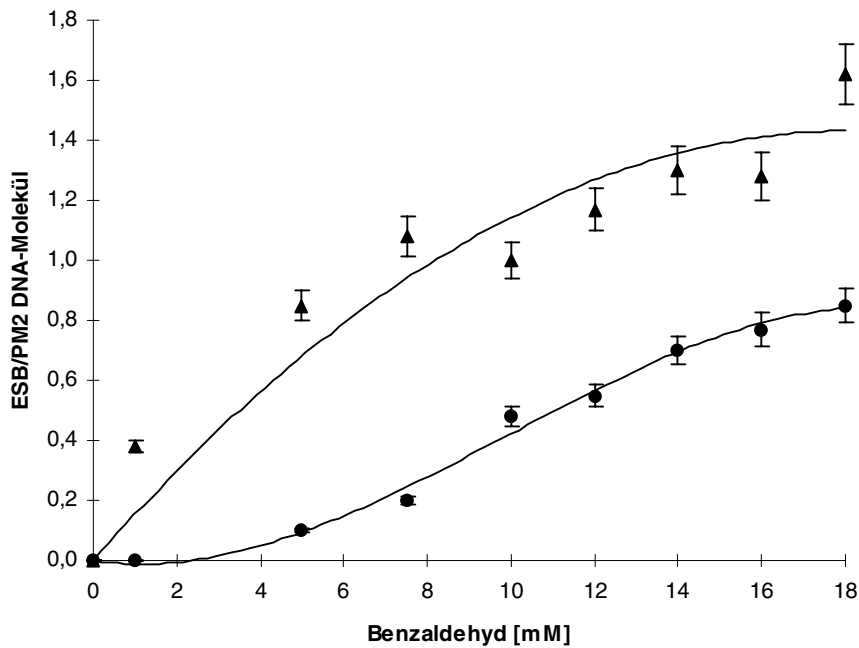


Abb.4: DNA-Strangbruchinduktion durch Benzaldehyd/CuCl₂ in Tris•HCl- (10 mM, pH 7,25; ●) bzw. in NaPO₄-Puffer (100 mM, pH 7,25; ▲). Die Inkubation erfolgte für 1 Stunde bei 37 °C. Die CuCl₂-Konzentration betrug 0,1 mM. Dargestellt sind die Nettostrangbrüche.

CuCl₂-Konzentrationen > 0,1 mM waren nur in Tris•HCl-Puffer einsetzbar, da sich in NaPO₄-Puffer bei CuCl₂-Konzentrationen > 0,1 mM ein schwerlöslicher Kupfer-Phosphat-Komplex bildet. Daher wurden alle weiteren Versuche (soweit möglich) in Tris•HCl-Puffer durchgeführt.

Bei Inkubation der PM2 DNA mit Benzaldehyd und der optimalen CuCl₂-Konzentration traten neben Einzelstrangbrüchen auch Doppelstrangbrüche (DSB) auf. Lineare PM2 DNA, als Produkt eines DSB in nativer DNA, kann in dem angewandten Testsystem als diskrete Bande auf dem Gel detektiert werden und wurde als prozentualer Anteil an der insgesamt eingesetzten DNA dargestellt. Bei diesen Untersuchungen zeigte sich, dass die DSB-Bildung ebenso wie die ESB-Bildung bei einer eingesetzten CuCl₂-Konzentration von 0,5-1,5 mM am stärksten war (Abb. 5), und dass diese Optima auch hier unabhängig von der jeweils eingesetzten Benzaldehyd-Konzentration auftraten. DSB traten schon bei vergleichbar geringer Einzelstrangbruchbildung auf (ca. 0,5 ESB/PM2 DNA-Molekül), die Zunahme erfolgte parallel zur ESB-Bildung (Abb. 6). Mit steigender Benzaldehyd-Konzentration nahm der Anteil linearer PM2 DNA an der insgesamt eingesetzten DNA bis auf ca. 33% zu (Abb. 6).

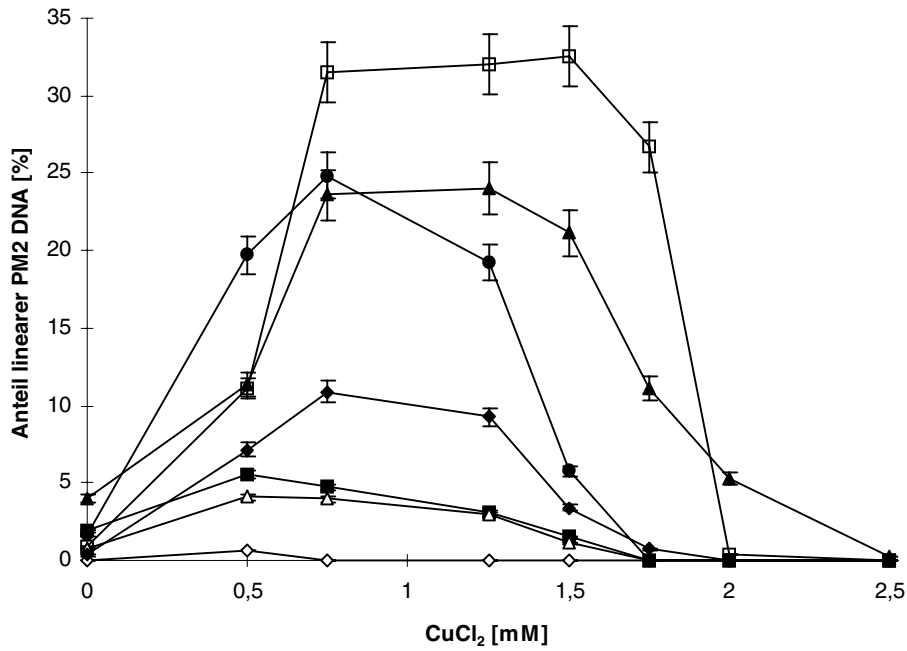


Abb. 5: Bildung linearer PM2 DNA durch Induktion von Doppelstrangbrüchen in Gegenwart von Benzaldehyd in Abhängigkeit von der CuCl_2 -Konzentration. Die Inkubation erfolgte für 1 Stunde bei 37°C in Tris•HCl-Puffer (10 mM, pH 7,25) mit unterschiedlichen Aldehydkonzentrationen (0 mM (◇); 0,5 mM (■); 1,0 mM (△); 2,5 mM (◆); 5 mM (●); 8 mM (▲); 15 mM (□)).

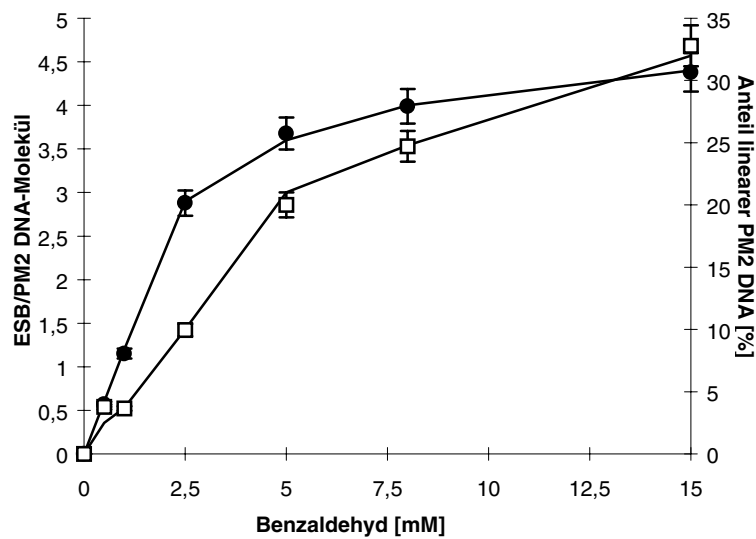


Abb. 6: Induktion von Einzelstrangbrüchen (●) und Doppelstrangbrüchen (Anteil linearer PM2 DNA [%]) (□) durch Benzaldehyd/ CuCl_2 in Abhängigkeit von der Benzaldehyd-Konzentration. Die CuCl_2 -Konzentration betrug 1,25 mM. Die Inkubation der DNA mit den Testsubstanzen erfolgte für 1 Stunde bei 37°C in Tris•HCl-Puffer (10 mM, pH 7,25). Dargestellt sind die Nettostrangbrüche bzw. der Anteil linearer DNA (%), der sich nach Subtraktion der Kontrollen ergab.

3.1.1.3 Induktion von AP-Stellen durch Benzaldehyd/CuCl₂

Zusätzlich zur direkten Strangbruchbildung wurde untersucht, ob das Reaktionsgemisch Benzaldehyd/CuCl₂ Apurin-/Apyrimidinstellen induziert. Solche DNA-Schäden treten häufig als Folge kovalenter Bindungen von Schadstoffen an die DNA-Basen auf. So gebildete Basen-Addukte lockern die N-glykosidische Bindung und werden aus dem DNA-Molekül herausgelöst (Lindahl und Andersson, 1972). Zur Feststellung solcher Schäden wurde die mit Benzaldehyd/CuCl₂ vorbehandelte PM2 DNA mit einem DNA-freien Fibroblastenextrakt mit starker AP-Endonukleaseaktivität inkubiert und die so entstandenen Strangbrüche quantifiziert. In Abbildung 7 sind die enzymatisch erkannten AP-Stellen, die durch Benzaldehyd in Kombination mit CuCl₂ induziert wurden, dargestellt. Die Inkubation mit CuCl₂ allein bzw. Benzaldehyd allein erzeugte nach Zugabe des AP-Endonukleasehaltigen Extraktes keine Strangbrüche.

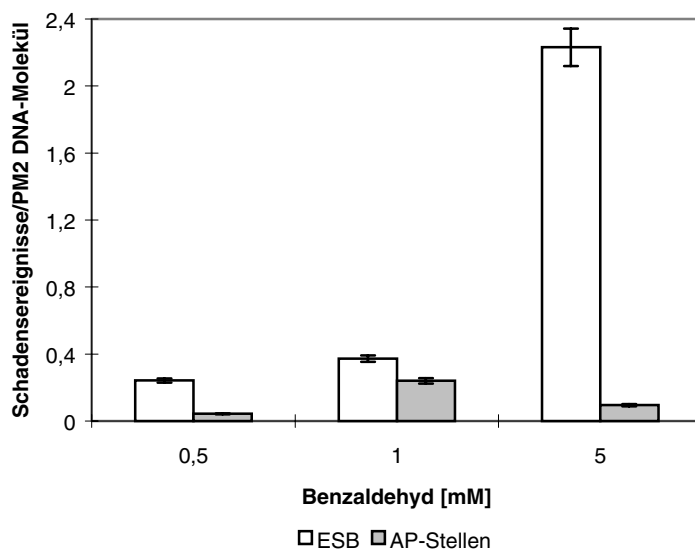


Abb. 7.: DNA-Strangbruchinduktion (ESB), sowie Bildung von AP-Endonukleasesensitiven Stellen (AP-Stellen) durch die Kombination Benzaldehyd (0-5mM) mit CuCl₂ (1,5 mM). Die Inkubation erfolgte für 1 Stunde bei 37 °C in 10 mM Tris•HCl-Puffer, pH 7,25. Jeweils eine Parallele wurde mit Tris•HCl-Puffer für 30 Minuten weiterinkubiert, die andere wurde für 30 Minuten mit einem humanen AP-Endonukleasehaltigen Zellextrakt bei 37 °C weiterinkubiert. Angegeben sind die AP-Stellen nach Subtraktion der unspezifischen AP-Endonukleaseaktivität.

Es zeigte sich, dass Benzaldehyd/CuCl₂ nur sehr geringfügig AP-Stellen induzierte, bei einer Benzaldehyd-Konzentration von 1 mM wurden ca. 0,24 AP-Stellen/PM2 DNA-Molekül gebildet, was bei dieser Konzentration einer Anzahl induzierter Einzelstrangbrüche von ca. 0,4 ESB/PM2 DNA-Molekül entsprach. Bei 5 mM Benzaldehyd in Kombination mit CuCl₂, lag die Anzahl induzierter AP-Stellen weit unter der Anzahl an ESB. Eine Hemmung der AP-Endonuklease durch Benzaldehyd/CuCl₂ konnte ausgeschlossen werden, da durch

Hitze/Säure-Behandlung induzierte AP-Stellen durch den Extrakt auch in Anwesenheit von Benzaldehyd/ CuCl_2 hoch effektiv umgesetzt wurden (Daten nicht gezeigt).

3.1.2 Untersuchungen zum Mechanismus der Strangbruchinduktion von Benzaldehyd/ CuCl_2

Es wurde untersucht, inwieweit mögliche reaktive Zwischenprodukte einer Benzaldehyd/ CuCl_2 -Reaktion nachweisbar waren und welche Faktoren für diese Reaktion notwendig waren. Hierzu wurde zum einen die Sauerstoffabhängigkeit der Strangbruchinduktion, die Cu(I) -Bildung und die Beeinflussung der Strangbruchinduktion durch spezifische Inhibitoren überprüft. Zum anderen wurden Untersuchungen zum direkten Nachweis möglicher reaktiver Zwischenprodukte mit Hilfe der ESR- und HPLC-Technik durchgeführt.

3.1.2.1 Strangbruchinduktion unter aeroben und anaeroben Bedingungen

Um die Sauerstoffabhängigkeit der Strangbruchinduktion durch Benzaldehyd/ CuCl_2 zu testen wurden Parallelversuche in Normalatmosphäre und in sauerstofffreier Argonatmosphäre durchgeführt.

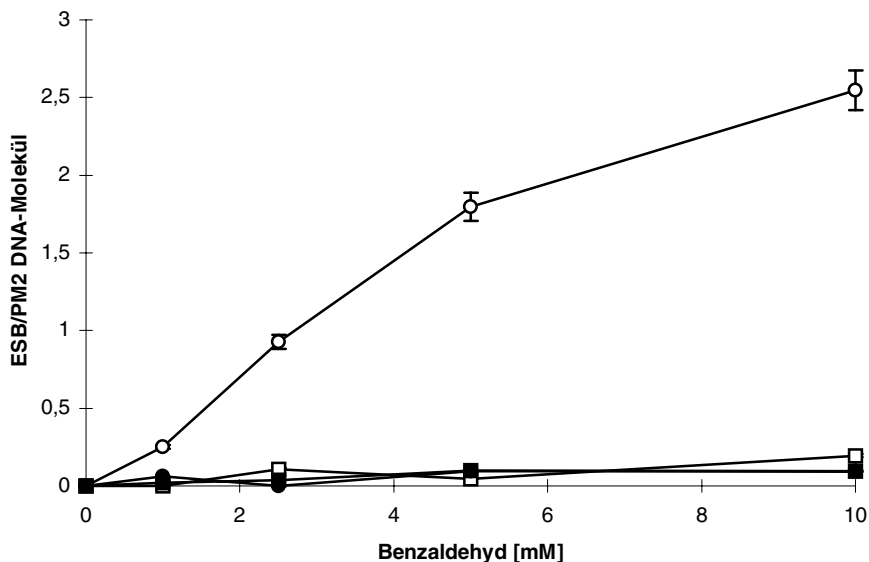


Abb. 8: Einzelstrangbruchinduktion in PM2 DNA durch Benzaldehyd mit (\bullet , \circ) und ohne CuCl_2 (\blacksquare , \square) in Abhängigkeit von der Benzaldehyd-Konzentration unter aeroben (offene Symbole) und anaeroben (geschlossene Symbole) Bedingungen. Die Reaktionsansätze bestanden aus 0-10 mM Benzaldehyd und 0,1 mM CuCl_2 in NaPO_4 -Puffer (100 mM, pH 7,25). Die Inkubation erfolgte für 1 Stunde bei 37 °C im Wasserbad. Die Messwerte wurden aus Dreifachproben aus einem repräsentativen Versuch ermittelt.

Wie Abbildung 8 zeigt, war die Strangbruchinduktion unter Sauerstoffabschluss unabhängig von der Benzaldehyd-Konzentration vollständig unterdrückt.

3.1.2.2 *Cu(I)-Bildung unter aeroben und anaeroben Bedingungen*

Entsprechend der Arbeitshypothese, dass Aldehyde Cu(II) zu Cu(I) reduzieren, konnte die Bildung von Cu(I) im Reaktionsgemisch nachgewiesen werden (Abb. 9). Bathocuproin (BCS) ist ein selektiver und irreversibler Cu(I)-Komplexbildner, dessen Cu(I)-Komplexe bei 480 nm photometrisch nachweisbar sind (Rahman *et al.*, 1989). Mit Hilfe dieser Methode wurde die Bildung von Cu(I) in dem Reaktionsgemisch Benzaldehyd/CuCl₂ unter verschiedenen Bedingungen bestimmt.

Hierzu wurden die Proben zum einen zu Versuchsbeginn mit BCS versetzt und der BCS/Cu(I)-Komplex kontinuierlich in bestimmten Zeitintervallen photometrisch bestimmt, zum anderen wurden Parallelproben jeweils zu bestimmten Zeitpunkten nach Reaktionsbeginn mit BCS versetzt und der aktuelle Cu(I)-Gehalt bestimmt. Um zusätzlich die Sauerstoffabhängigkeit der Cu(I)-Bildung im Reaktionsgemisch Benzaldehyd/CuCl₂ zu testen, wurden Parallelansätze in Normal- und in sauerstofffreier Argonatmosphäre durchgeführt.

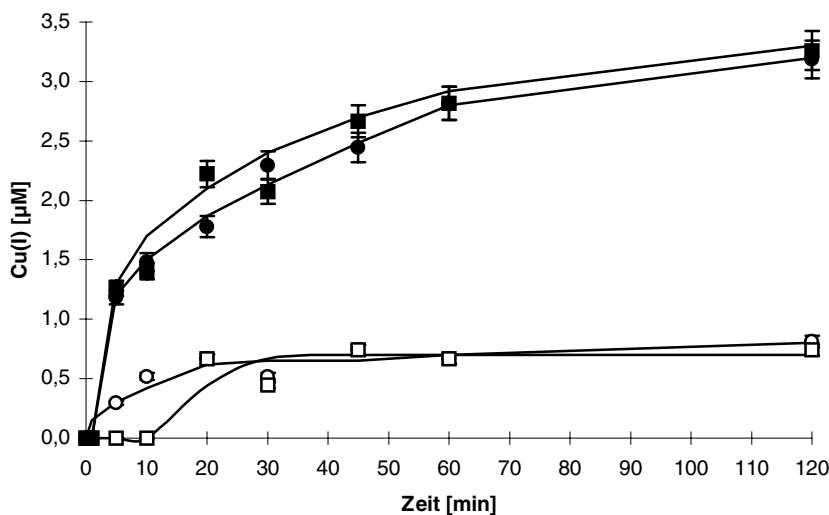


Abb. 9: Cu(I)-Bildung durch die Substanzkombination Benzaldehyd (10 mM) und CuCl₂ (0,01 mM) unter aeroben (○,●) und anaeroben (□,■) Bedingungen. Bei den „kumulativen“ Messungen (geschlossene Symbole) wurden 0,1 mM BCS über einen Zeitraum von 0-120 Minuten mitinkubiert, während bei den Messungen zum „aktuellen“ Cu(I)-Gehalt (offene Symbole) BCS unmittelbar vor der photometrischen Messung zugegeben wurde. Alle Proben wurden in NaPO₄-Puffer (100 mM, pH 7,25) angesetzt.

Es zeigte sich, dass in den Proben, die zu den jeweiligen Messzeiten mit BCS versetzt wurden (aktueller Cu(I)-Gehalt), nur geringe Mengen an Cu(I) gemessen werden konnten (ca. 0,5 μM Cu(I)). Wurde in Anwesenheit von BCS die kumulative Cu(I)-Produktion über den gesamten Versuchszeitraum bestimmt, so konnte eine kontinuierliche Zunahme des Cu(I)-Gehalts in den Lösungen gemessen werden, wobei der Anstieg der Kurve in den ersten 20 Minuten am steilsten war. Der Cu(I)-Gehalt betrug nach einer Inkubationszeit von 120 Minuten etwa 3,2 μM . Die Messung über einen längeren Zeitraum (24 und 48 Stunden) führte nicht zu einer weiteren Erhöhung des Cu(II)-Umsatzes (Daten nicht gezeigt). Wie ebenfalls in Abbildung 9 zu erkennen, ist die Cu(I)-Bildung im Gegensatz zur Strangbruchinduktion sauerstoffunabhängig. Sowohl bei der „kumulativen“ Cu(I)-Bestimmung, als auch bei der „aktuellen“ Cu(I)-Bestimmung (Zugabe von BCS zum jeweiligen Messzeitpunkt) ist der Kurvenverlauf der Ansätze unter aeroben und anaeroben Bedingungen in etwa gleich, lediglich während der ersten 10 Minuten lag der Cu(I)-Gehalt bei der direkten Messung unter anaeroben Bedingungen unterhalb der entsprechenden Bestimmung unter aeroben Bedingungen.

Auch bei den untersuchten hydroxylierten Benzaldehyden, die nur im geringem Umfang DNA-schädigend wirkten, wurde die Bildung von Cu(I) nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

3.1.2.3 Inhibition der durch Benzaldehyd/CuCl₂ induzierten Einzelstrangbrüche durch Katalase, DMSO, Batho- und Neocuproin

Um zu untersuchen, inwieweit Cu(I) und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (insbesondere $\cdot\text{OH}$ -Radikale) an der Strangbruchinduktion beteiligt sind, wurden Versuche mit Neocuproin, Bathocuproin, Katalase, und DMSO zur Strangbruchinhibition durchgeführt. Katalase hemmt die Induktion von DNA-Strangbrüchen durch Inhibition der Fenton-Reaktion. Neocuproin und Bathocuproin komplexieren Cu(I) in einer Weise, die keine Redoxreaktionen mehr zulässt und inhibieren somit ebenfalls die Fenton-Reaktion (Petering und Antholin, 1988). DMSO dient als Hydroxylradikalfänger (Halliwell und Gutteridge, 1989). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tab. 2: Inhibition der durch Benzaldehyd/CuCl₂ erzeugten DNA-Einzelstrangbrüche durch DMSO, Katalase, Bathocuproin oder Neocuproin nach einstündiger Inkubation in NaPO₄-Puffer (100 mM, pH 7,25). Die durch Benzaldehyd/CuCl₂ induzierten Strangbrüche betragen 1,0 -1,25 ESB/PM2 DNA-Molekül. Die CuCl₂-Konzentration betrug 0,1 mM. Die Standardabweichung betrug ca. +/- 5%.

Inhibitor	Konzentration	Inhibition (%)
DMSO	3 (%)	91
	0,1 (%)	54
Katalase	10 (µg/ml)	88
	5 (µg/ml)	71
BSA	10 (µg/ml)	5
	5 (µg/ml)	0
Bathocuproin	1 (mM)	99
	0,4 (mM)	97
Neocuproin	1 (mM)	92
	0,4 (mM)	93

Es zeigte sich, dass die Strangbruchinduktion durch Zusatz von 3% DMSO mit 91% in etwa genauso effektiv gehemmt wurde wie durch Katalase (10 µg/ml) mit 88%. Die Inkubation mit BSA zeigte keine bzw. nur eine geringe Inhibitionswirkung, wodurch gezeigt wurde, dass die Katalasewirkung auf ihre enzymatische Funktion und nicht auf unspezifische Proteinbindungen zurückzuführen ist. Da während der Benzaldehyd/CuCl₂-Reaktion Cu(I) gebildet wurde (s. 3.1.2.1), sollte durch den Einsatz der Cu(I)-Chelatoren Bathocuproin und Neocuproin überprüft werden, inwieweit Cu(I) an der Strangbruchbildung beteiligt ist. Wie aus Tabelle 2 hervorgeht wurde die Strangbruchbildung durch Neo- und Bathocuproin nahezu vollständig gehemmt.

3.1.2.4 Nachweis spezifischer reaktiver Intermediate der Benzaldehyd/CuCl₂-Reaktion

ESR-spektroskopisch konnte weder ein DMPO-[•]OH-Radikaladdukt noch ein C-zentriertes Radikal über die Bildung eines 4-POBN-Adduktes nachgewiesen werden. Ein Verschwinden des durch Cu(II) hervorgerufenen ESR-Signals (vergl. Abb. 42) nach Zugabe von Benzaldehyd konnte beobachtet werden. Mittels HPLC-ECD konnte kein Hydroxylierungsprodukt (8-Hydroxy-2-desoxyguanosin) im Reaktionsgemisch Benzaldehyd mit und ohne CuCl₂ und 2-Desoxyguanosin nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

3.1.3 Untersuchungen zur zytotoxischen Wirkung in Säugerzellkulturen

3.1.3.1 Zytotoxische Einzelwirkung von CuCl_2

Vor den Untersuchungen zur Kombinationswirkung von Benzaldehyd und CuCl_2 in humanen Fibroblasten wurde in Vorversuchen die Einzeltoxizität von CuCl_2 im MTT-Test bestimmt. Diese Versuche sollten Aufschluss über geeignete sub- bis leicht toxische CuCl_2 -Konzentrationen geben. Hierbei wurde die Akute Toxizität (AT_0), sowie in Parallelansätzen die Toxizität 21 Stunden nach der Schadstoffinkubation (AT_{21}) gemessen. Dieses Verfahren wurde angewandt, um einerseits die Zellschäden zu erfassen, die sich, wie dies z.B. bei DNA-Schäden der Fall ist, erst mit Verzögerung und nicht unmittelbar nach der Schadstoffinkubation bemerkbar machen und um andererseits die Reparatur von aufgetretenen Schäden mit einzubeziehen. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 10 dargestellt.

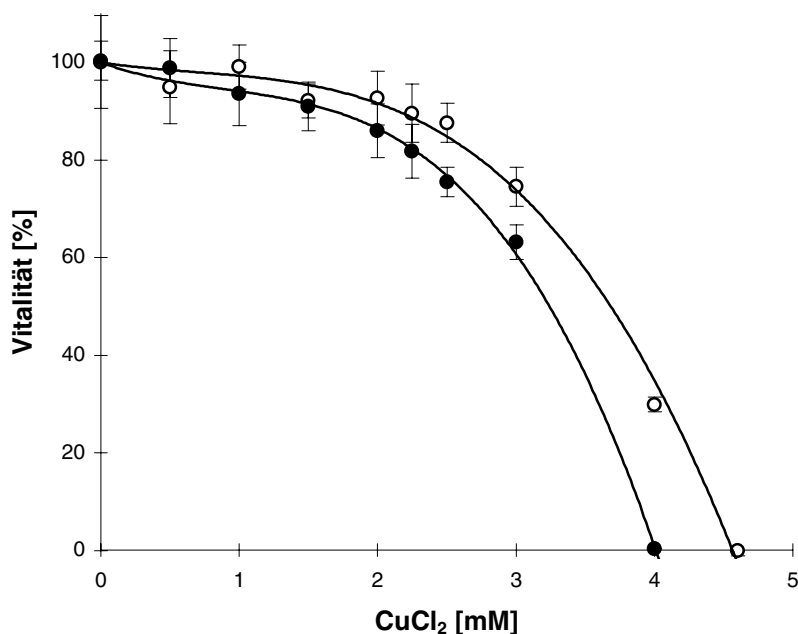


Abb. 10: Toxizität von CuCl_2 auf humane Fibroblasten. Die Messung der Akuten Toxizität (AT_0 (O)) wurde unmittelbar nach 90-minütiger Schadstoffinkubation durchgeführt. In Parallelproben (AT_{21} (●)) wurde die Toxizität 21 Stunden nach der Schadstoffinkubation gemessen.

Bei der AT_{21} lag die zellschädigende Wirkung etwas höher als bei der AT_0 . In den nachfolgenden Zellkulturexperimenten zur Untersuchung der Kombinationswirkung sollte mit einer Cu(II) -Vorschädigung von 0 bis max. 15% gearbeitet werden. Dieser Wert wurde bei der AT_0 mit einer Variabilität von $\pm 4\%$ bei einer Konzentration von 2,5 mM CuCl_2 erreicht. Um eine

Vergleichbarkeit der einzelnen Experimente zu gewährleisten, wurde auch in Versuchen zur AT₂₁, Wachstumshemmung, Koloniebildungsfähigkeit, HPRT, Alkalische Elution und UDS eine CuCl₂-Konzentration von 2,5 mM eingesetzt, wobei eine Einzeltoxizität von 0 bis max.15% beobachtet wurde (Daten nicht gezeigt). Der Cu(II)-Gehalt in humanen Fibroblasten nach neunzigminütiger Inkubation mit 2,5 mM CuCl₂ betrug 37 ng/mg Protein (Hartmann *et al.*, 1995).

3.1.3.2 Bestimmung der Akuten Toxizität von Benzaldehyd/CuCl₂ direkt und 21 Stunden nach der Schadstoffinkubation

Untoxische Konzentrationen an CuCl₂ beeinflussten die akut toxische Wirkung (MTT-Test) von Benzaldehyd nicht bzw. nur sehr schwach. Dies zeigte sich direkt nach einer einstündigen Inkubation mit Benzaldehyd/CuCl₂ sowohl in menschlichen Fibroblasten (N57) als auch in V79 Zellen (Abb. 11). Die Vitalität humaner Fibroblasten wurde durch eine einstündige Inkubation mit Benzaldehyd (0-18 mM) allein als auch in Kombination mit CuCl₂ nicht beeinträchtigt. V79 Zellen reagierten im Vergleich zu N57 Zellen in den höchsten getesteten Konzentrationen etwas empfindlicher. Ihre Vitalität wurde um ca. 20% (15 mM Benzaldehyd allein) bzw. 30% (15 mM Benzaldehyd/CuCl₂) gehemmt. Morphologisch zeigten die Zellen keine Veränderungen.

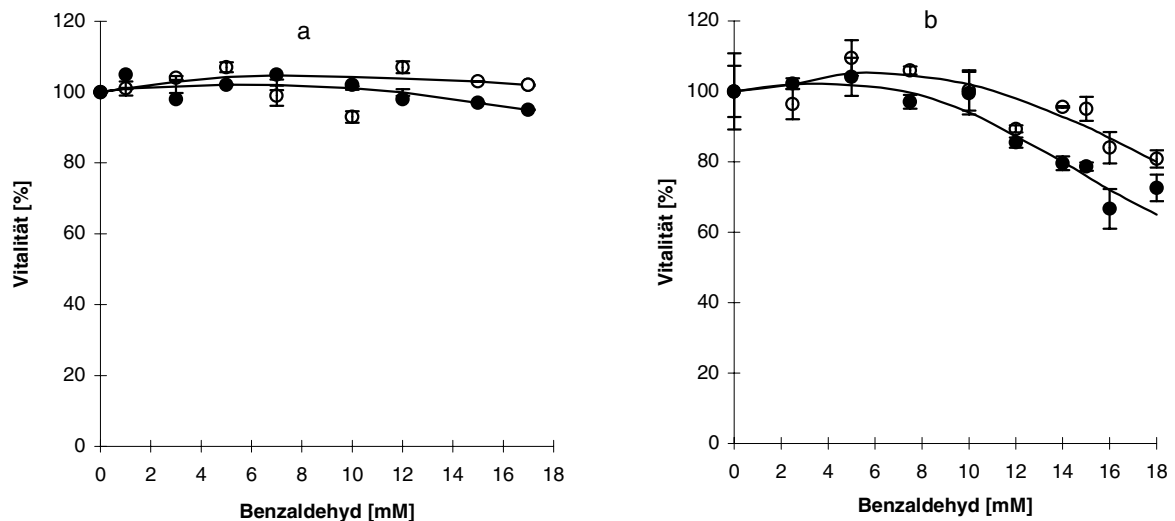


Abb. 11: Toxizität von Benzaldehyd auf humane Fibroblasten (N57) (a) und V79 Zellen (b) nach einstündiger Inkubation mit (●) sowie ohne (○) CuCl₂ (2,5 mM). Die Messungen erfolgten direkt nach der Schadstoffinkubation. Die Behandlung der Fibroblasten nur mit CuCl₂ ergab eine Schädigung von 11% (a) bzw. 9% (b).

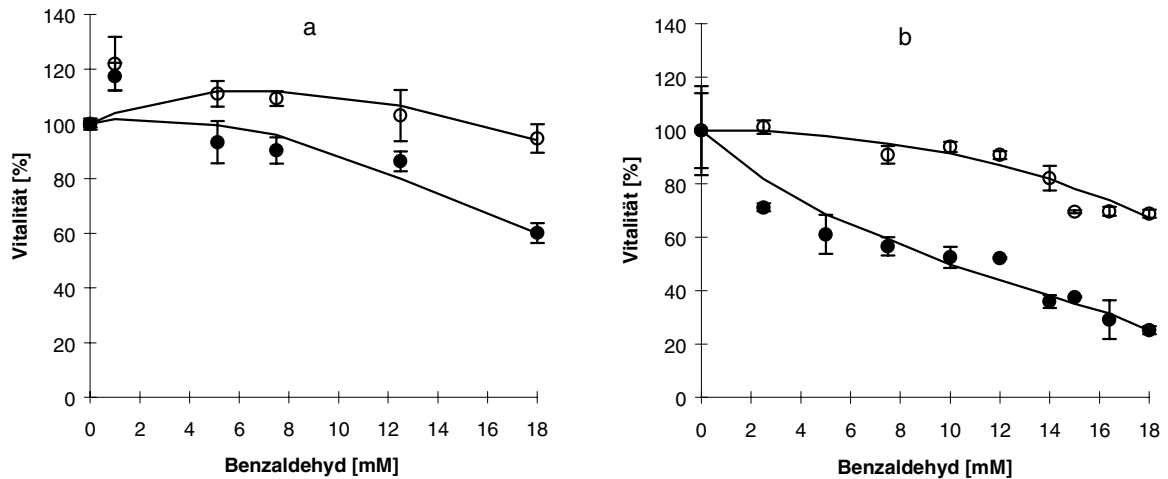


Abb. 12: Toxizität von Benzaldehyd auf humane Fibroblasten (N57) (a) und V79 Zellen (b) nach einstündiger Inkubation mit (●) sowie ohne (○) CuCl₂ (2,5 mM). Die Messungen erfolgten 21 Stunden nach der Schadstoffinkubation. Die Behandlung der Fibroblasten nur mit CuCl₂ ergab eine Schädigung von 3% (a) bzw. 0% (b).

Wurden die Zellen nach der Schadstoffbehandlung für 21 Stunden in serumhaltigem Medium weiterkultiviert, so wirkte die Kombination bei beiden getesteten Zelllinien stärker toxisch als Benzaldehyd allein (Abb. 12). Auch hier reagierten die V79 Zellen empfindlicher als die humanen Fibroblasten. So wurde ihre Vitalität durch die Schadstoffkombination (18 mM Benzaldehyd/CuCl₂) um ca. 75% gehemmt, während die der humanen Fibroblasten um ca. 35% gehemmt wurde.

3.1.3.3 Bestimmung der Wachstumshemmung durch Benzaldehyd/CuCl₂

Die Methodik zur Erfassung des Zellwachstums unterscheidet sich vom MTT-Test dadurch, dass nicht die Zellvitalität anhand der Succinatdehydrogenaseaktivität, sondern die Zellzahl vor und während einer Populationsentwicklung gemessen wird. Der Messzeitpunkt wird hierbei so gelegt, dass die Zellen sich zum Zeitpunkt der Schadstoffinkubation am Beginn der exponentiellen Wachstumsphase befinden. 48 Stunden nach der Schadstoffinkubation hatten sich die Zellen der unbehandelten Kontrolle 1,5-2mal geteilt (Jacobi *et al.*, 1995). Es wird eine Veränderung der Wachstumsgeschwindigkeit in der logarithmischen Wachstumsphase erfasst.

Die Messung des Zellwachstums erwies sich als sensitiver für den Nachweis der Kombinationswirkung von Benzaldehyd/CuCl₂ als die Untersuchungen mit Hilfe des MTT-Tests.

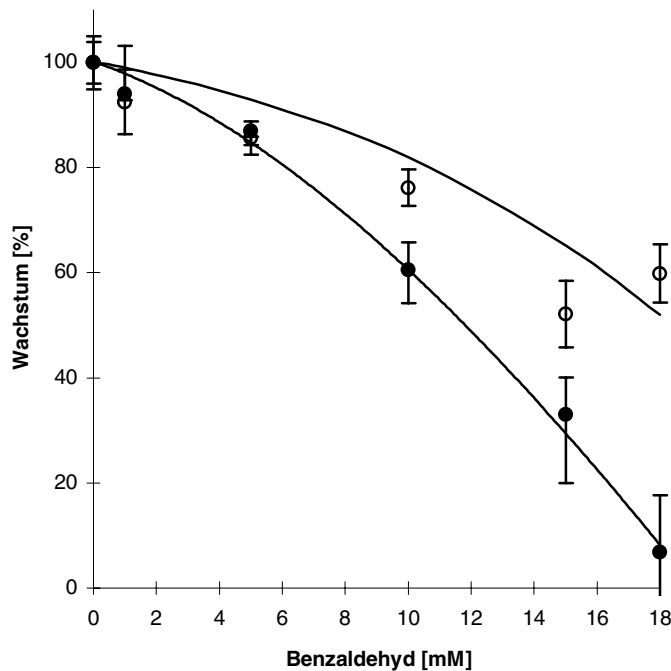


Abb. 13: Wachstumshemmung humaner Fibroblasten durch Benzaldehyd nach einstündiger Inkubation mit (●) sowie ohne (○) CuCl_2 (2,5 mM). Die Messungen erfolgten 48 Stunden nach der Schadstoffinkubation in der logarithmischen Wachstumsphase. Die Behandlung der Fibroblasten nur mit CuCl_2 ergab eine Wachstumshemmung von 1%.

Benzaldehyd zeigte in Kombination mit CuCl_2 eine deutlich erhöhte Toxizität bei Konzentrationen >8 mM (Abb. 13). Während 18 mM Benzaldehyd in Kombination mit CuCl_2 eine Wachstumshemmung von ca. 95% induzierte, lag die Einzelwirkung des Aldehyds bei ca. 40%. Die EC_{10} -, EC_{30} - und EC_{50} -Werte für die Einzelwirkung lagen bei 6,1 mM, 13,2 mM und 18 mM, während die der Kombinationswirkung bei 3,1 mM, 8,1 mM und 11,8 mM lagen.

3.1.3.4 Bestimmung der Hemmung der Koloniebildungsfähigkeit durch Benzaldehyd/ CuCl_2

Der Test zur Hemmung der Koloniebildungsfähigkeit wurde durchgeführt, um den Verlust der Teilungsfähigkeit zu erfassen. Da die Zellen nach der Schadstoffbehandlung trypsiniert und dünn ausgesät werden, wird ihre logarithmische Wachstumsphase unterbrochen. Einerseits besteht in der anschließenden Inkubationsphase die Möglichkeit zur Reparatur von Schäden, andererseits werden auch Schäden erfasst, die sich erst später manifestieren. Daher können durch die Bestimmung der Koloniebildungsfähigkeit weitere Informationen zur längerfristigen toxischen Wirkung von Benzaldehyd/ CuCl_2 gewonnen werden.

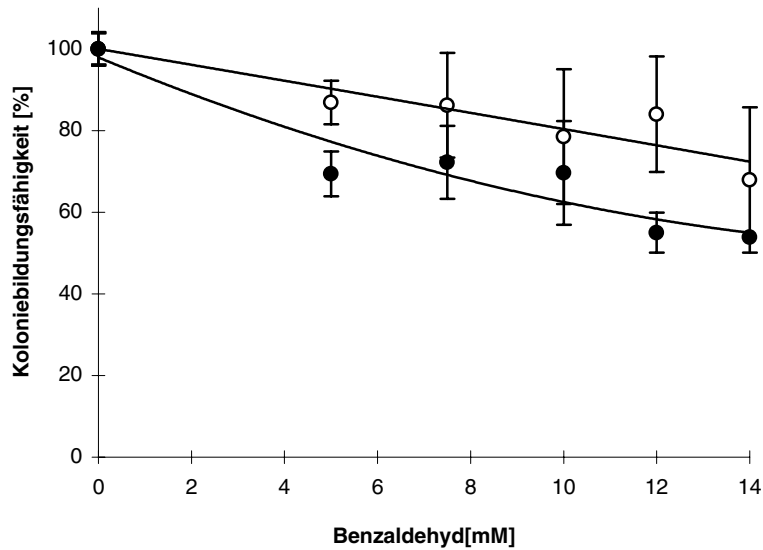


Abb. 14a: Hemmung der Koloniebildungsfähigkeit von V79 Zellen durch Benzaldehyd nach gemeinsamer einstündiger Inkubation mit (●) sowie ohne (○) CuCl₂ (2,5 mM). Die Messungen erfolgten 7 Tage nach Aussaat der Kolonien. Die Behandlung der Zellen nur mit CuCl₂ ergab keine Hemmung der Koloniebildungsfähigkeit.

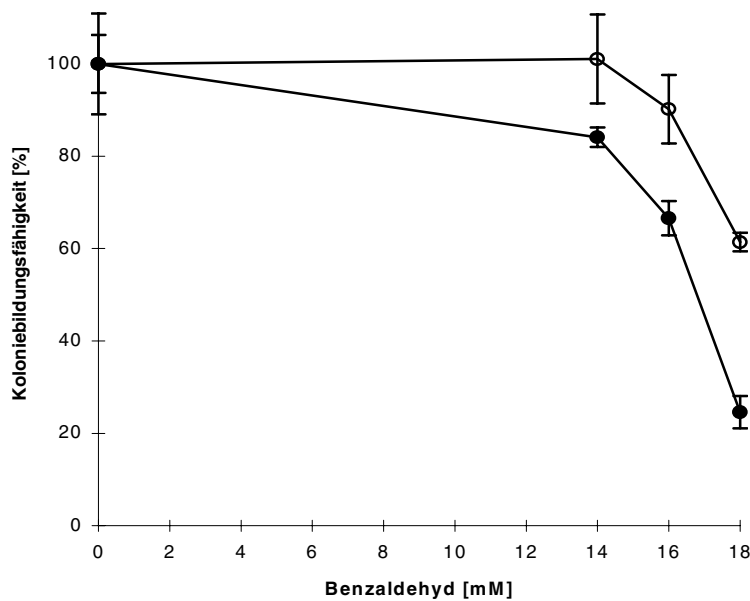


Abb. 14b: Hemmung der Koloniebildungsfähigkeit von V79 Zellen durch Benzaldehyd nach neunzigminütiger Vorinkubation mit (●) sowie ohne (○) CuCl₂ (2,5 mM). Die Messungen erfolgten 6 Tage nach Aussaat der Kolonien. Die Behandlung der Zellen nur mit CuCl₂ ergab eine Hemmung der Koloniebildungsfähigkeit von 4%.

Für die Kombination von Benzaldehyd mit CuCl₂ wurde im Vergleich zu Benzaldehyd allein ein deutlich stärkerer Hemmeffekt festgestellt (Abb. 14b). Benzaldehyd allein hemmte die Koloniebildungsfähigkeit bei 18 mM um ca. 40% (Abb. 14b), während in Kombination mit CuCl₂ ein hemmender Effekt von ca. 75% auftrat. Die EC₁₀-, EC₃₀- und EC₅₀-Werte für die Einzelwirkung lagen bei 16 mM, 17,2 mM und >18 mM, während die der Kombinationswirkung bei 9,6 mM, 15,7 mM und 17,4 mM lagen. Bei einer gleichzeitigen einstündigen Inku-

bation mit Benzaldehyd/CuCl₂ konnte bis 14 mM Benzaldehyd kein signifikanter Unterschied zwischen Einzel- und Kombinationswirkung beobachtet werden (Abb. 14 a).

3.1.4 Untersuchungen zur genotoxischen Wirkung in Säugerzellkulturen

3.1.4.1 Bestimmung der Induktion intrazellulärer DNA-Strangbrüche durch Benzaldehyd/CuCl₂

3.1.4.1.1 DNA-Strangbruchnachweis mit Hilfe der Alkalischen Elution

Die Untersuchung der DNA-Strangbrüche in menschlichen Fibroblasten nach Benzaldehyd/CuCl₂-Behandlung erfolgte mit der Methode der Alkalischen Elution. Dabei lassen sich sowohl chemisch als auch durch Reparaturenendonukleasen enzymatisch erzeugte Strangbrüche nachweisen. Die DNA der Zellen, die zuvor einer einstündigen Inkubation mit Benzaldehyd/CuCl₂ unterzogen wurden, zeigte eine deutlich erhöhte Elutionsrate im Vergleich zur DNA der Zellen, die nur mit Benzaldehyd oder CuCl₂ allein inkubiert wurden (Abb. 15).

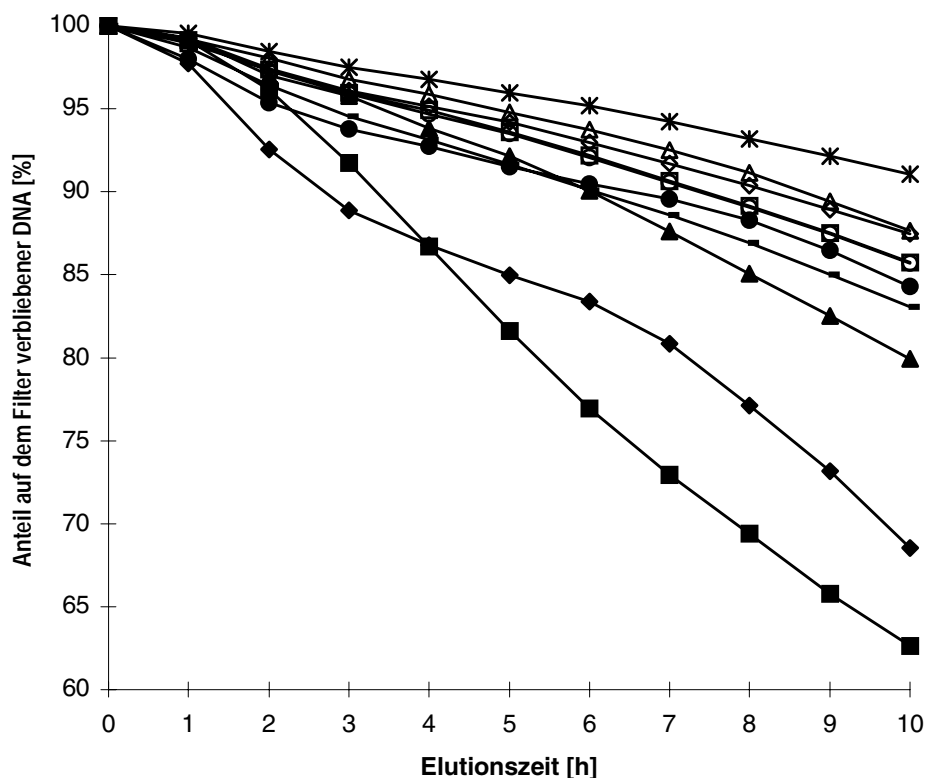


Abb. 15: Profil der Alkalischen Elution von DNA aus mit Benzaldehyd/CuCl₂ inkubierten humanen Fibroblasten (N57). Die Zellen wurden für 1 Stunde mit verschiedenen Benzaldehyd-Konzentrationen (12 mM (Δ,▲); 14 mM (◇,◆); 16 mM (○,●); 20 mM (◻,■)) in Kombination mit 2,5 mM CuCl₂ (-) (geschlossene Symbole) bzw. ohne CuCl₂ (*) (offene Symbole) inkubiert. Die Auftragung auf die Filter erfolgte direkt nach der Schadstoffbehandlung.

Der Zusatz von Proteinase K, ein Enzym, das DNA-Protein-Crosslinks aufhebt, zur Benzaldehyd/CuCl₂-behandelten DNA hatte keinen Einfluss auf die Elutionsrate. Malondialdehyd hingegen, das als positive Kontrollsubstanz eingesetzt wurde, zeigte eine durch Proteinase K-Behandlung erhöhte Elutionsrate (Daten nicht gezeigt).

Zudem wurde untersucht, ob die relativ geringe Strangbruchinduktion in der Zelle die Folge von DNA-DNA-Crosslinks darstellen. Dazu wurden die Zellen mit Methylmethansulfonat (MMS) vorbehandelt und die durch MMS erzeugten Strangbrüche mit den MMS-induzierten Strangbrüchen verglichen, die in Anwesenheit von Benzaldehyd/CuCl₂ erzeugt wurden. Abbildung 16 zeigt, dass die DNA-Elution MMS-behandelter Fibroblasten durch eine nachfolgende Inkubation sowohl mit Benzaldehyd allein als auch mit Benzaldehyd/CuCl₂ vermindert wurde. Die Elution MMS-behandelter Fibroblasten wurde durch 20 mM Benzaldehyd allein und durch 18 mM Benzaldehyd/CuCl₂ um ca. 50% gehemmt.

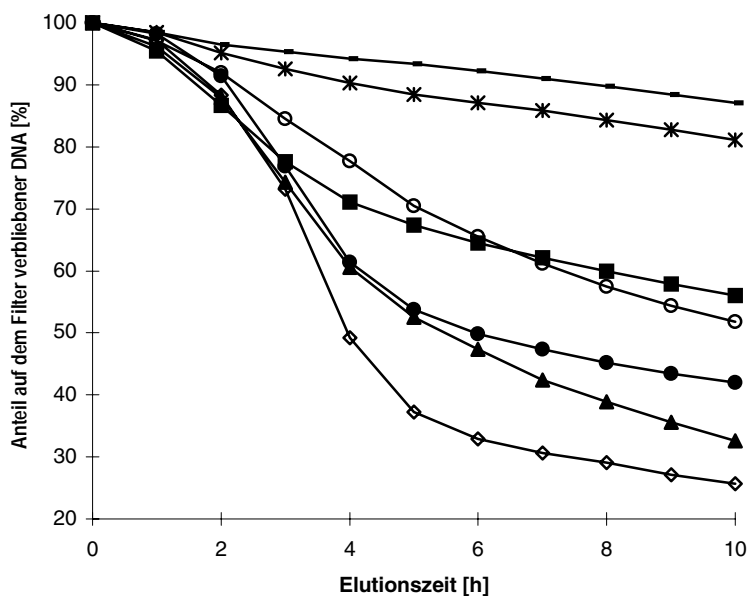


Abb. 16: Profil der Alkalischen Elution von DNA aus humanen Fibroblasten (N57), die 20 Minuten mit MMS (5 mM), nachfolgend 1,5 Stunden mit CuCl₂ (2,5 mM) bzw. ohne CuCl₂ und anschließend 1 Stunde mit bzw. ohne Benzaldehyd inkubiert wurden. Die Auftragung auf die Filter erfolgte direkt nach der Schadstoffbehandlung. ((◇) 5 mM MMS; (*) 2,5 mM CuCl₂; (-) 20 mM Benzaldehyd; (○) 5 mM MMS+ 20 mM Benzaldehyd; (▲) 5 mM MMS+ 16 mM Benzaldehyd+ 2,5 mM CuCl₂; (■) 5 mM MMS+ 18 mM Benzaldehyd+ 2,5 mM CuCl₂, (●) 5 mM MMS+ 20 mM Benzaldehyd+ 2,5 mM CuCl₂)

3.1.4.2 Bestimmung der Induktion der DNA-Reparatur durch Benzaldehyd/CuCl₂

Neben der Induktion von DNA-Strangbrüchen in humanen Fibroblasten wurde die durch Benzaldehyd/CuCl₂ induzierte DNA-Reparatur untersucht. Zur Untersuchung der Reparatur-

Induktion wurden parallel zwei Methoden: die Alkalische Elution und die UDS (unscheduled DNA synthesis) eingesetzt.

3.1.4.2.1 Nachweis der DNA-Reparatur über die Alkalische Elution

Erfolgte der Nachweis der DNA-Reparatur über die Methode der Alkalischen Elution, wurde eine zeitliche Kinetik erstellt. Die DNA der mit Benzaldehyd/CuCl₂ behandelten Fibroblasten wurde zu verschiedenen Zeiten nach erfolgter Schadstoffbehandlung alkalisch eluiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 dargestellt.

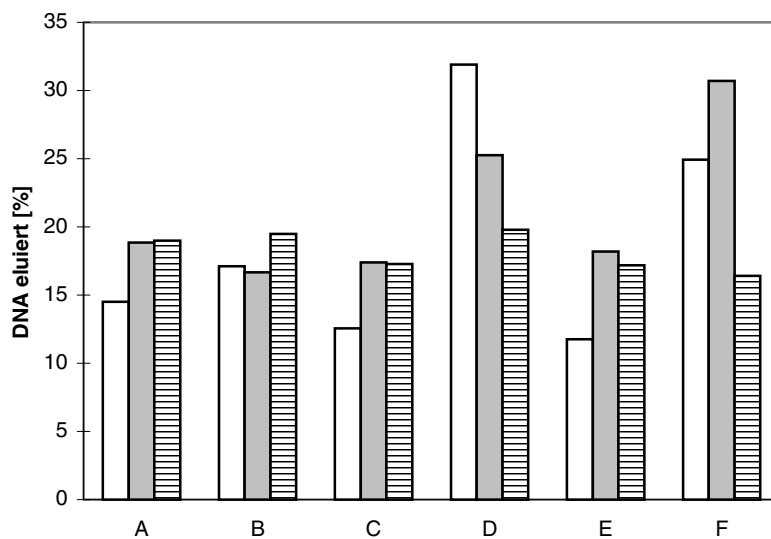


Abb. 17: Elution der DNA aus humanen Fibroblasten (N57), die 1 Stunde mit bzw. ohne (2,5 mM) CuCl₂ in Kombination mit Benzaldehyd (14 und 18 mM) behandelt wurden. Die Messung der Elution erfolgte zu verschiedenen Zeiten nach Behandlung der Zellen mit den Schadstoffen. Die Zellen wurden direkt (offene Säulen) nach der Schadstoffbehandlung auf die Filter aufgetragen, 21 Stunden (geschlossene Säulen) oder 48 Stunden (gemusterte Säulen) vor der Auftragung in Medium weiterinkubiert. Dargestellt ist die eluierte DNA (%) nach zehnstündiger Elutionszeit. A= unbehandelte DNA, B= CuCl₂, C=14 mM Benzaldehyd, D= 14 mM Benzaldehyd/CuCl₂, E= 18 mM Benzaldehyd, F= 18 mM Benzaldehyd/CuCl₂.

Die durch Benzaldehyd/CuCl₂-induzierten DNA-Strangbrüche wurden innerhalb von 48 Stunden nahezu komplett beseitigt. Während für die Kombinationswirkung eine Erhöhung der Elutionsrate gemessen wurde, konnte für Benzaldehyd allein im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle keine Erhöhung der Elutionsrate, weder nach 21 noch nach 48 Stunden beobachtet werden. Die höchste eingesetzte Konzentration von 18 mM Benzaldehyd in Kombination mit CuCl₂ zeigte im Vergleich zur direkt gemessenen Elution eine erhöhte Elution nach einundzwanzigstündiger Weiterinkubation der Zellen.

3.1.4.2.2 Nachweis der DNA-Reparatur über die UDS

Als weiterer Nachweis zur Benzaldehyd/CuCl₂ induzierten DNA-Reparatur wurde die Methode der UDS (unscheduled DNA synthesis) eingesetzt. Treten als Folge chemischer und/oder physikalischer Einwirkungen intrazelluläre DNA-Schäden auf, so können diese in der Regel durch eine Vielzahl verschiedener Enzyme erkannt und behoben werden. Die hier verwendete Methode der UDS erfasst die DNA-Synthese durch Exzisionsreparatur, die außerhalb der Synthesephase (S-Phase) des Zellzykluses auftritt.

Tab. 3: Induktion der DNA-Exzisionsreparatur (UDS) in menschlichen Fibroblasten (N57) durch Benzaldehyd mit und ohne neunzigminütige CuCl₂-Vorinkubation (2,5 mM). Die dargestellten Werte stellen den Mittelwert der Nettosilberkörnchen aus jeweils 50 ausgezählten Zellen \pm der Standardabweichung dar.

Benzaldehyd [mM]	ohne CuCl ₂		mit CuCl ₂	
	NG	\pm SD	NG	\pm SD
0	0	\pm 1,58	-0,02	\pm 0,89
1	-0,04	\pm 1,46	0,04	\pm 1,34
2,5	0,2	\pm 1,44	0,26	\pm 1,26
5	0,1	\pm 1,39	-0,42	\pm 1,67
7,5	0,26	\pm 1,10	0,14	\pm 1,23
10	0,14	\pm 1,05	0,02	\pm 1,13
12,5	0,28	\pm 1,23	-0,36	\pm 1,37
15	0,2	\pm 1,29	-0,16	\pm 1,06
16	0,38	\pm 1,41	0,04	\pm 1,12
18	0,48	\pm 1,39	-0,2	\pm 0,90
UV-Kontrolle 5,5 J/m ²	32,5	\pm 8,58		

Wie in Tabelle 3 dargestellt, konnte weder für Benzaldehyd allein noch für Benzaldehyd in Kombination mit CuCl₂ eine UDS im Sinne der OECD-Richtlinien (OECD, 1986) nachgewiesen werden. Auch bei gleichzeitiger einstündiger Inkubation von Benzaldehyd und CuCl₂ konnte keine UDS gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Die Hydroxybenzaldehyde (2-,3- und 4-Hydroxybenzaldehyd) zeigten ebenfalls keine UDS (Daten nicht gezeigt).

3.1.4.2.3 Untersuchungen zur Hemmung der DNA-Reparatur

Da für Benzaldehyd/CuCl₂ und die hydroxylierten Benzaldehyde/CuCl₂ mit der Methode der UDS keine DNA-Reparatur in menschlichen Fibroblasten nachgewiesen wurde, lag die Vermutung nahe, dass die Ursache des negativen Befundes eine Hemmung der Reparatur sein könnte. Daher wurden Untersuchungen zur Hemmung der DNA-Reparatur von UV- und MMS-induzierten DNA-Schäden durchgeführt. Wie in Tabelle 4 zusammenfassend dargestellt, wurde die UV-induzierte Reparatur weder durch Benzaldehyd allein noch in Kombination mit CuCl₂ in einem nennenswerten Umfang gehemmt.

Tab. 4: Beeinflussung der durch UV-Licht (5,5 J/m²) induzierten DNA-Reparatur durch Benzaldehyd mit und ohne CuCl₂. Die Bestimmung erfolgte über die Methode der UDS. Humane Fibroblasten wurden zunächst mit UV-Licht bestrahlt, 1,5 Stunden mit 2,5 mM bzw. ohne CuCl₂ inkubiert und anschließend 1 Stunde mit unterschiedlichen Konzentrationen an Benzaldehyd bzw. serumfreiem Medium behandelt. Der Anteil reparierender Zellen lag bei 100%. Die dargestellten Werte stellen den Mittelwert der Nettosilberkörnchen aus jeweils 50 ausgezählten Zellen ± der Standardabweichung dar.

UV-induzierte DNA Reparatur						
Benzaldehyd	ohne CuCl ₂			mit CuCl ₂		
(mM)	NG	± SD	DNA-REP. [%]	NG	± SD	DNA-REP. [%]
0	40,96	± 11,84	100	55,58	± 16,01	100
5	53,46	± 15,88	130,52	66,06	± 16,81	118,86
10	38,68	± 13,81	94,43	49,8	± 13,94	89,60
15	36,60	± 12,78	89,36	51,3	± 18,87	92,30

Im Gegensatz zu Benzaldehyd zeigten die hydroxylierten Benzaldehyde eine deutliche Hemmung der UV-induzierten Reparatur bis zu ca. 70%. Während bei 2-Hydroxybenzaldehyd die Hemmwirkung durch CuCl₂ verstärkt wurde, zeigten 3- und 4-Hydroxybenzaldehyd keine nennenswerte Beeinflussung ihrer hemmenden Wirkung durch CuCl₂ (Daten nicht gezeigt).

Durch Benzaldehyd bzw. Benzaldehyd/CuCl₂ wurde auch die MMS-induzierte DNA-Reparatur nicht signifikant beeinflusst (Tabelle 5).

Tab. 5: Beeinflussung der MMS-induzierten DNA-Reparatur durch Benzaldehyd mit und ohne CuCl₂ (2,5 mM). Die Bestimmung erfolgte über die Methode der UDS. Humane Fibroblasten wurden zunächst 20 Minuten mit MMS (5 mM) inkubiert, 1,5 Stunden mit CuCl₂ (2,5 mM) bzw. serumfreiem Medium inkubiert und anschließend 1 Stunde mit unterschiedlichen Konzentrationen an Benzaldehyd (0-15 mM) behandelt. Die dargestellten Werte stellen den Mittelwert der Nettosilberkörnchen aus jeweils 50 ausgezählten Zellen \pm der Standardabweichung dar.

MMS-induzierte DNA Reparatur						
Benzaldehyd	ohne CuCl ₂			mit CuCl ₂		
(mM)	NG	\pm SD	DNA-REP. [%]	NG	\pm SD	DNA-REP. [%]
0	23,53	\pm 5,39	100	23,33	\pm 9,22	100
2	25,59	\pm 7,23	108,75	20,54	\pm 8,14	88,04*
4	24,18	\pm 6,30	102,76	17,38	\pm 5,57	74,5
6	21,32	\pm 6,67	90,61	27,59	\pm 6,16	118,26
8	20,89	\pm 9,51	88,78	21,75	\pm 9,72	93,23
10	27,27	\pm 7,76	115,89	19,94	\pm 4,34	85,47
12,5	21,39	\pm 6,68	90,91	18,14	\pm 4,89	77,75
15	22,27	\pm 8,25	94,65	24	\pm 8,54	102,87

Bei allen gemessenen Konzentrationen befanden sich 100% der Zellen in Reparatur. (*) bei dieser Konzentration befanden sich nur 98% der Zellen in Reparatur.

3.1.4.3 Induktion von Mutationen im HPRT-Test durch Benzaldehyd/CuCl₂

Mit Hilfe des HPRT-Tests (mit V79 Zellen) wurde untersucht, ob Benzaldehyd/CuCl₂ Mutationen induziert.

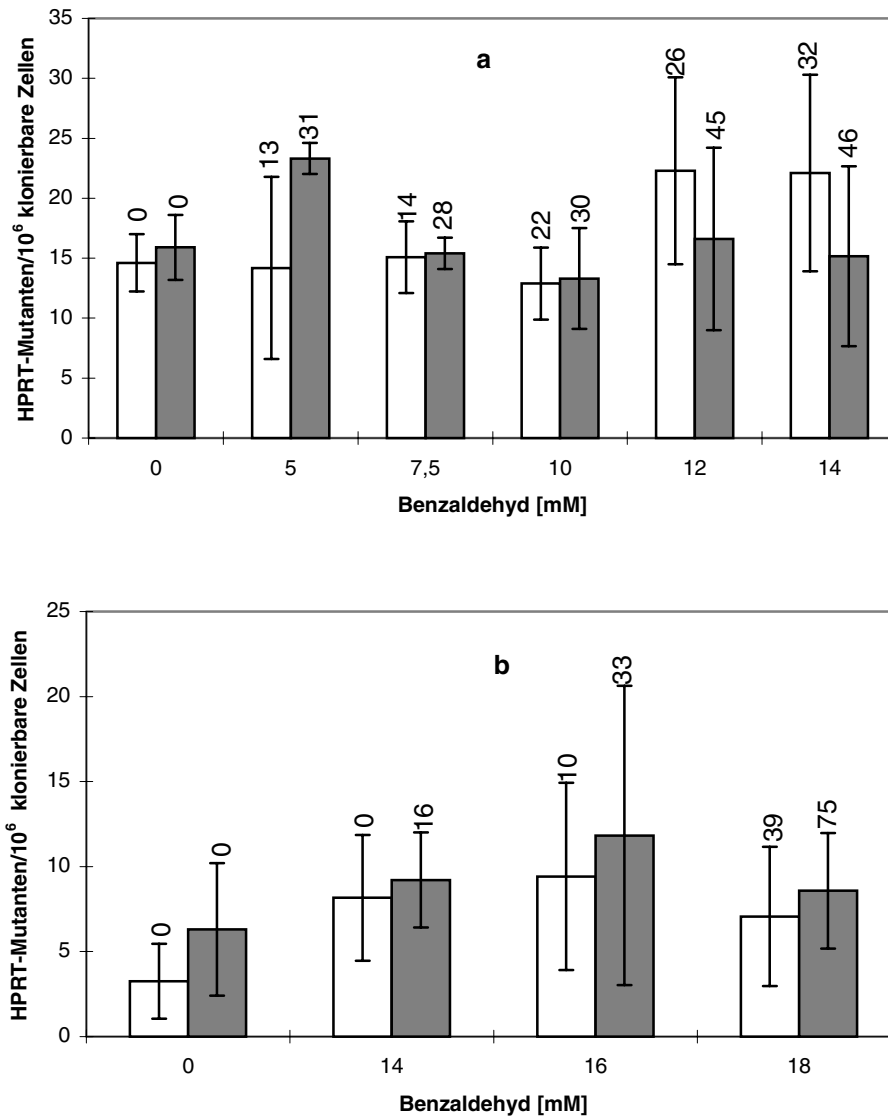


Abb.18: Mutationsfrequenz von V79 Zellen nach Behandlung mit Benzaldehyd in Kombination mit (geschlossene Säulen) und ohne (offene Säulen) CuCl₂ (2,5 mM). Die Zellen wurden gleichzeitig (a) für 1 Stunde mit Benzaldehyd (0-14 mM) und CuCl₂ bzw. (b) zunächst 1,5 Stunden mit bzw. ohne CuCl₂ vorinkubiert und anschließend 1 Stunde mit verschiedenen Benzaldehyd-Konzentrationen (0-20 mM) nachinkubiert. Die Mutagenitätsdaten wurden aus 5×10^5 Zellen/Dosis gewonnen. Die Expressionszeit betrug 7 Tage, die Selektionszeit betrug 8 Tage. Die Mutationsfrequenz der Positivkontrolle EMS (10 mM) lag bei (a) bei 142 und bei (b) bei 147. Die Zahlen über den Säulen geben die Hemmung der Koloniebildungsfähigkeit (%) an.

Nach Bradley *et al.* (1981) gilt im HPRT-Test mit V79 Zellen eine Substanz dann als mutagen, wenn die Spontanmutationsrate um das Dreifache überschritten wird. Wie Abbildung 18 zeigt wurde diese dreifache Erhöhung knapp verfehlt. Bei der gleichzeitig durchgeführten Inkubation (Abb. 18a) konnte sowohl für Benzaldehyd allein als auch für Benzaldehyd/CuCl₂ maximal eine 1,5-fache Erhöhung der Spontanmutationsrate beobachtet werden, während Benzaldehyd allein bei der sequenziell erfolgten Inkubation (Abb. 18b) die Spontanmutationsrate maximal um den Faktor 2,9 und Benzaldehyd/CuCl₂ diese um den Faktor 1,9 erhöhte. Bei der sequenziell erfolgten Inkubation (Abb. 18b) ist jedoch auffällig, dass die Mutationsrate bis zu einer Benzaldehyd-Konzentration von 16 mM kontinuierlich ansteigt und dann bei 18 mM wieder abfällt. Die zugehörigen Toxizitätsdaten sind jeweils oberhalb der Säulen als prozentuale Hemmung der Koloniebildungsfähigkeit angegeben. Nach einer neueren Empfehlung von Aaron *et al.* (1994) sollten toxische Substanzen in einem breiten Konzentrationsbereich mit einer maximalen Konzentration, die noch einem 10-20%igem Überleben entspricht, getestet werden. Diese Kriterien waren erfüllt.

3.2 Kombination p-Anisaldehyd/CuCl₂

3.2.1 Untersuchungen zur Schädigung von PM2 DNA

3.2.1.1 *Strangbruchinduktion durch verschiedene Anisaldehyde/CuCl₂*

Die Inkubation nativer PM2 DNA mit 2-, 3- und 4-Methoxybenzaldehyd (p-Anisaldehyd) allein führte nicht zu DNA-Strangbrüchen. CuCl₂ allein induzierte eine geringe ESB-Bildung von $\leq 0,1$ ESB/PM2 DNA-Molekül. Bei einer Inkubation der PM2 DNA mit den Aldehyden in Kombination mit CuCl₂ hingegen, konnte bei p-Anisaldehyd eine erhöhte Strangbruchinduktion festgestellt werden. Die anderen Methoxybenzaldehyde induzierten in Kombination mit CuCl₂ im Vergleich zu p-Anisaldehyd/CuCl₂ weniger Strangbrüche. Die Strangbruchinduktion lag im Vergleich zu p-Anisaldehyd/CuCl₂ bei maximal 50% (Abb. 19). Für diese Aldehyde konnte auch in Kombination mit 0,5 und 1,5 mM CuCl₂ keine stärkere Strangbruchinduktion nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Daher wurden diese Aldehyde nicht weiter untersucht.

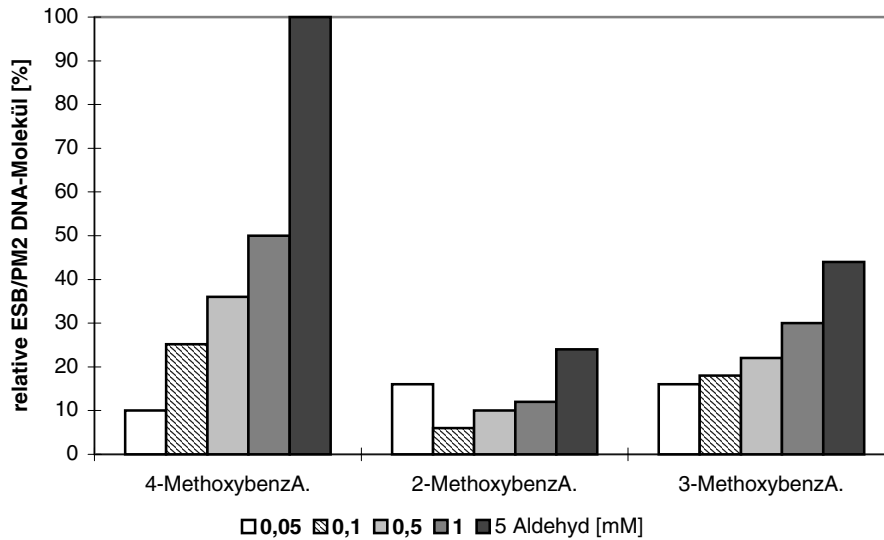


Abb. 19: Induktion von Einzelstrangbrüchen in PM2 DNA durch 2-, 3- und 4-Methoxybenzaldehyd (0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 5 mM) in Kombination mit 1 mM CuCl_2 . Die Inkubation der DNA mit den Testsubstanzen erfolgte für 1 Stunde bei 37 °C in Tris•HCl-Puffer (10 mM, pH 7,25). CuCl_2 allein als auch die getesteten Aldehyde allein verursachten keine Strangbruchbildung.

3.2.1.2 Strangbruchinduktion durch *p*-Anisaldehyd/ CuCl_2

Es wurde die Strangbruchbildung durch *p*-Anisaldehyd/ CuCl_2 in Abhängigkeit von der CuCl_2 -Konzentration untersucht. Bei einer konstanten *p*-Anisaldehyd-Konzentration von 10 mM konnte nach einer Stunde Inkubationszeit bei 37 °C ein eindeutiges Maximum an Strangbrüchen bei 0,05 mM CuCl_2 nachgewiesen werden. Bei CuCl_2 -Konzentrationen von 0-0,05 mM nahm die Strangbruchinduktion kontinuierlich bis ca. 3,5 ESB/PM2 DNA-Molekül zu, fiel dann bei höheren CuCl_2 -Konzentrationen wieder ab und blieb ab einer CuCl_2 -Konzentration von 0,5 mM auf einem Niveau von etwa 0,5 ESB/PM2 DNA-Molekül (Abb. 20).

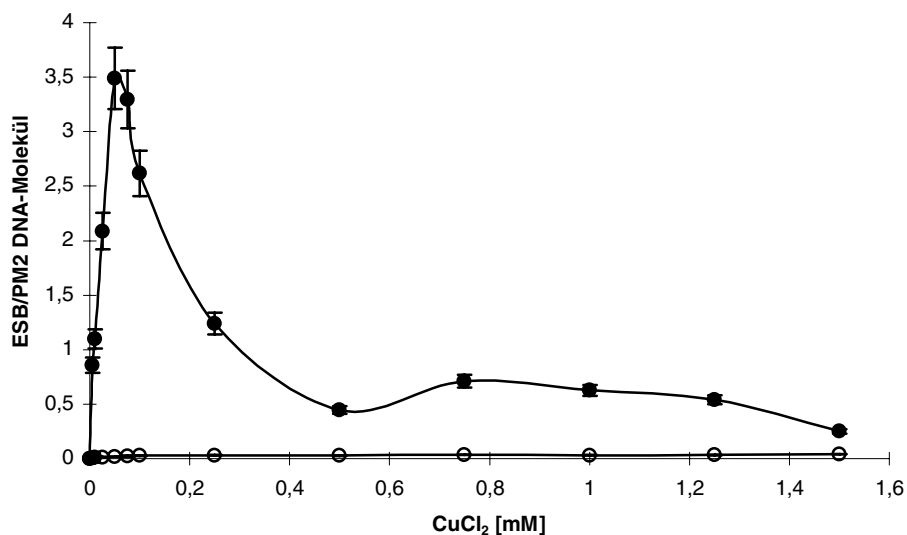


Abb. 20: Einzelstrangbruchinduktion in PM2 DNA in Abhängigkeit von der CuCl_2 -Konzentration mit und ohne p-Anisaldehyd. Die Reaktionsansätze enthielten entweder Kupfer allein (○) oder ein Reaktionsgemisch aus Kupfer und 10 mM p-Anisaldehyd (●). Die Inkubation erfolgte für 1 Stunde bei 37 °C in Tris•HCl-Puffer (10 mM, pH 7,25). Das Aldehyd allein erzeugte keine Strangbrüche.

Ein Vergleich der Strangbruchinduktion in NaPO_4 - mit der in Tris•HCl-Puffer zeigte, dass die Strangbruchinduktion durch p-Anisaldehyd/ CuCl_2 relativ unabhängig vom verwendeten Puffersystem war (Abb. 21).

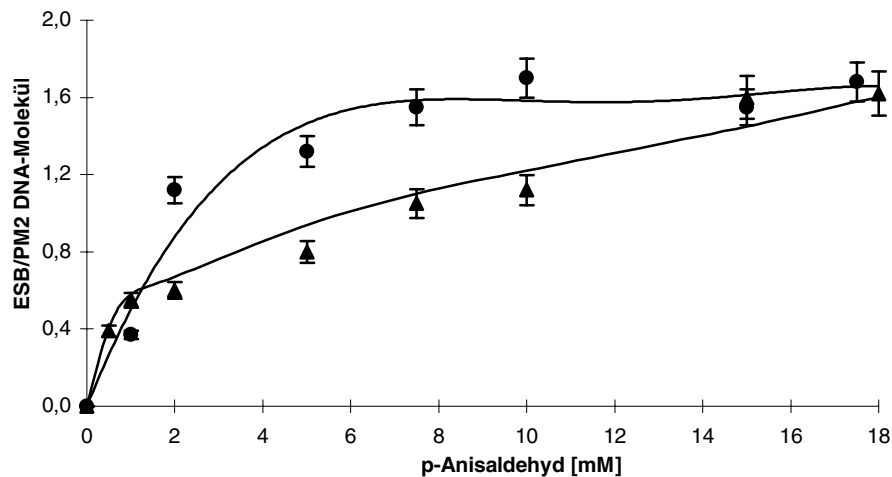


Abb. 21: DNA-Strangbruchinduktion durch die Schadstoffkombination p-Anisaldehyd/ CuCl_2 in Tris•HCl- (10 mM, pH 7,25; ●) bzw. NaPO_4 -Puffer (100 mM, pH 7,25; ▲). Die Inkubation erfolgte für 1 Stunde bei 37 °C. Die CuCl_2 -Konzentration betrug 0,1 mM, die p-Anisaldehyd-Konzentration 5 mM. Bei den dargestellten Werten handelt es sich um die induzierten Nettostrangbrüche.

Wurde die Strangbruchinduktion durch p-Anisaldehyd/CuCl₂ im Kupferoptimum (0,05 mM) bestimmt, traten neben Einzelstrangbrüchen auch Doppelstrangbrüche auf (Abb. 22).

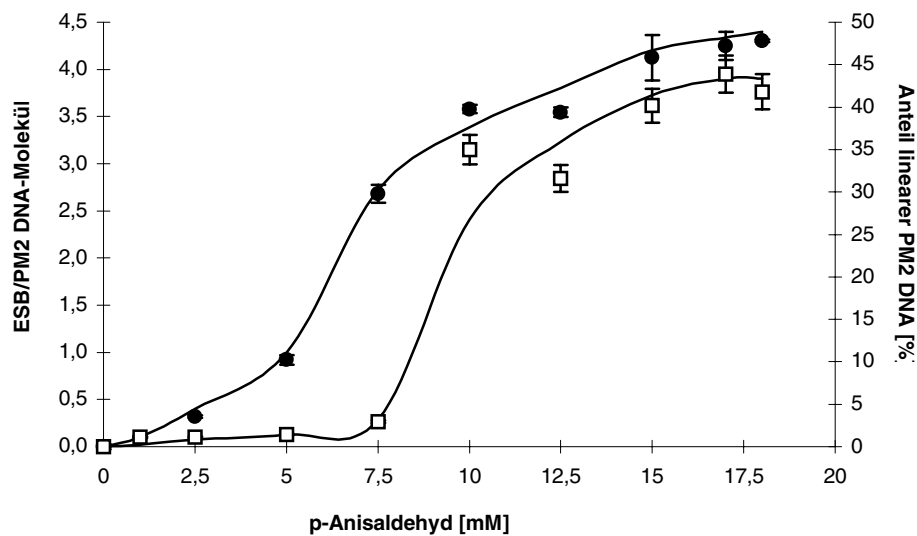


Abb. 22: Induktion von Einzelstrangbrüchen (●) und Doppelstrangbrüchen (Anteil linearer PM2 DNA [%] (□)) in Abhängigkeit von der p-Anisaldehyd-Konzentration (0-18 mM) in Kombination mit CuCl₂ (0,05 mM). Die Inkubation der DNA mit den Testsubstanzen erfolgte für 1 Stunde bei 37 °C in Tris•HCl-Puffer (10 mM, pH 7,25). Dargestellt sind die Nettostrangbrüche bzw. der Anteil linearer DNA, der sich nach Subtraktion der Kontrollen ergab.

Wie in Abbildung 22 zu erkennen traten DSB erst bei höheren p-Anisaldehyd-Konzentrationen auf. Bei einer Kombination von p-Anisaldehyd/CuCl₂, die ca. 1 ESB induzierte, wurde noch keine DSB-Bildung beobachtet. Ab 7,5 mM p-Anisaldehyd in Kombination mit 0,05 mM CuCl₂ konnte ein Anteil linearer DNA von 3% bestimmt werden, wobei die ESB/PM2 DNA-Molekül hier bei ca. 2,6 lagen. Der Anteil linearer DNA an der gesamten eingesetzten DNA nahm mit zunehmender p-Anisaldehyd-Konzentration bis auf ca. 44% zu (17 mM p-Anisaldehyd/CuCl₂). Bei dieser Konzentration wurden ca. 4,2 ESB/PM2 DNA-Molekül induziert.

3.2.1.3 Induktion von AP-Stellen durch p-Anisaldehyd/CuCl₂

In Abbildung 23 sind die enzymatisch erkannten AP-Stellen, die durch p-Anisaldehyd in Kombination mit CuCl₂ induziert wurden, im Vergleich zu den induzierten ESB, dargestellt. Die Inkubation mit CuCl₂ allein erzeugte keine, mit Hilfe des Extraktes detektierbaren, Strangbrüche.

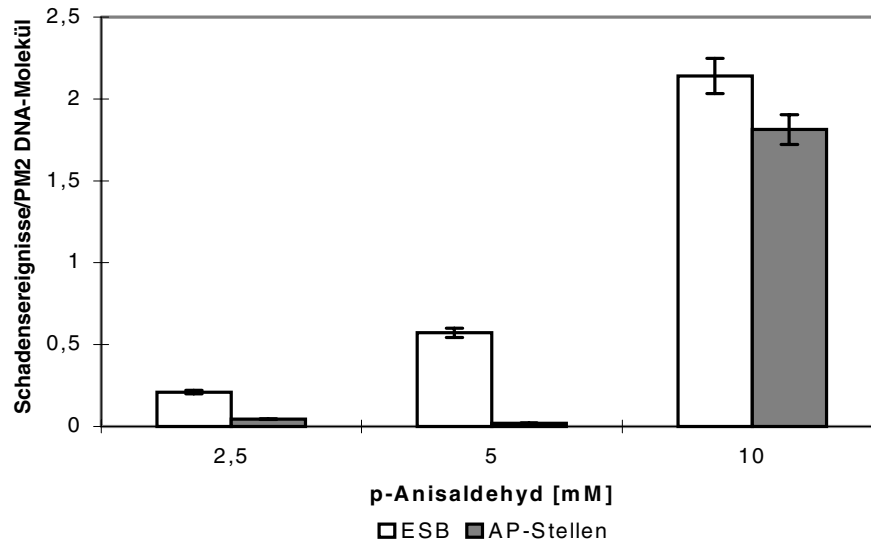


Abb. 23: DNA-Strangbruchinduktion (ESB), sowie Nachweis der Bildung von AP-Endonukleasesensitiven Stellen (AP-Stellen) durch die Kombination p-Anisaldehyd (0-10mM) mit CuCl_2 (0,05 mM). Die Inkubation erfolgte für 1 Stunde bei 37 °C in 10 mM Tris•HCl-Puffer, pH 7,25. Jeweils eine Parallele wurde mit Tris•HCl-Puffer für 30 Minuten weiterinkubiert, die andere wurde für 30 Minuten mit einem humanen AP-haltigen Zellextrakt bei 37 °C weiterinkubiert. Angegeben sind die AP-Stellen nach Subtraktion der unspezifischen AP-Endonukleaseaktivität.

Es zeigte sich, dass mit einem AP-Endonukleasehaltigen Zellextrakt AP-Stellen durch 10 mM p-Anisaldehyd/ CuCl_2 induziert wurden. Hier entsprach die Anzahl induzierter AP-Stellen in etwa der der induzierten ESB/PM2 DNA-Molekül (ESB/AP-Stellen 2,1/1,8). Eine Hemmung der AP-Endonuklease durch p-Anisaldehyd/ CuCl_2 konnte ausgeschlossen werden, da durch Hitze/Säure-induzierte AP-Stellen durch den Extrakt auch in Anwesenheit von p-Anisaldehyd/ CuCl_2 hoch effektiv umgesetzt wurden (Daten nicht gezeigt).

3.2.2 Untersuchungen zum Mechanismus der Strangbruchinduktion von p-Anisaldehyd/ CuCl_2

Es wurde untersucht, inwieweit mögliche reaktive Zwischenprodukte einer p-Anisaldehyd/ CuCl_2 -Reaktion nachweisbar waren. Hierzu wurde zum einen die Sauerstoffabhängigkeit der Strangbruchinduktion, die Cu(I)-Bildung und die Beeinflussung der Strangbruchinduktion durch spezifische Inhibitoren überprüft. Zum anderen wurden Untersuchungen zum direkten Nachweis möglicher reaktiver Zwischenprodukte mit Hilfe der ESR- und HPLC-Technik durchgeführt.

3.2.2.1. *Strangbruchinduktion unter aeroben und anaeroben Bedingungen*

Um die Sauerstoffabhängigkeit der Strangbruchinduktion durch p-Anisaldehyd/CuCl₂ zu testen wurden Parallelversuche in sauerstoffhaltiger Normalatmosphäre und sauerstofffreier Argonatmosphäre durchgeführt.

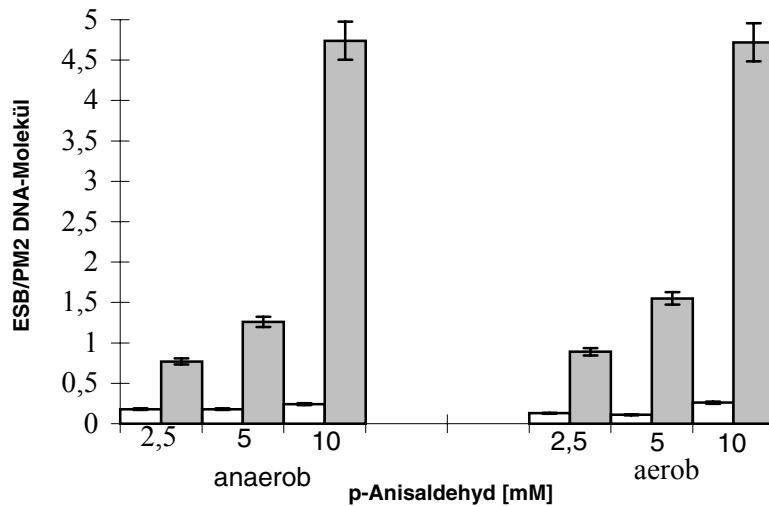


Abb. 24: Strangbruchbildung durch p-Anisaldehyd mit (geschlossene Säulen) und ohne CuCl₂ (offene Säulen) unter aeroben und anaeroben (100%ige Argonatmosphäre) Bedingungen. Die Versuche wurden in 10 mM Tris•HCl-Puffer, pH 7,25 durchgeführt und die Proben 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. CuCl₂ (0,05 mM) allein erzeugte keine Strangbrüche.

Wie in Abbildung 24 zu erkennen ist, war die Strangbruchinduktion durch p-Anisaldehyd/CuCl₂ sauerstoffunabhängig. Alle getesteten Konzentrationen an p-Anisaldehyd (2,5-10 mM) in Kombination mit CuCl₂ zeigten in Sauerstoff- und Argonatmosphäre die gleiche Anzahl an ESB/PM2 DNA-Molekül.

3.2.2.2. *Cu(I)-Bildung unter anaeroben und aeroben Bedingungen*

Mit Hilfe der unter 3.1.2.2 erläuterten Methode wurde die Bildung von Cu(I) in dem Reaktionsgemisch p-Anisaldehyd/CuCl₂ unter verschiedenen Bedingungen bestimmt.

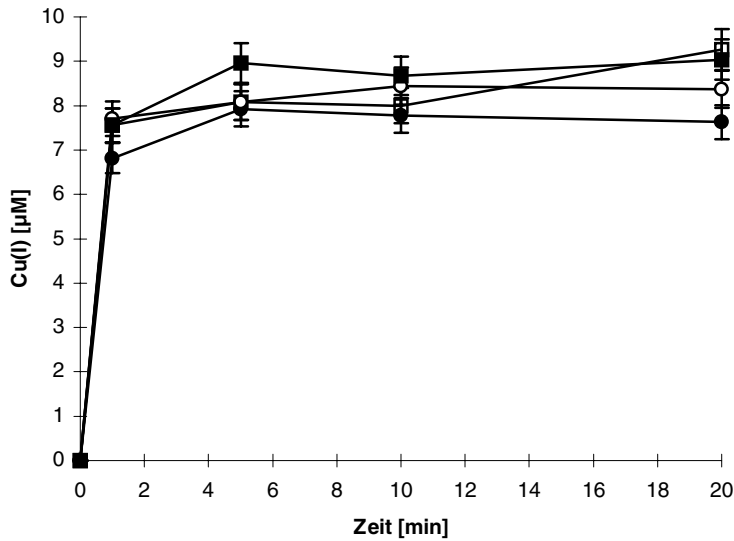


Abb. 25: Cu(I)-Bildung durch die Substanzkombination p-Anisaldehyd (10 mM) und CuCl_2 (0,01 mM) unter aeroben (○, ●) und anaeroben (□, ■) Bedingungen. Bei den „kumulativen“ Messungen (geschlossene Symbole) wurden 0,1 mM BCS über einen Zeitraum von 0-20 Minuten mitinkubiert, während bei den Messungen zum „aktuellen“ Cu(I)-Gehalt (offenen Symbole) BCS unmittelbar vor der photometrischen Messung zugegeben wurde. Alle Proben wurden in NaPO_4 -Puffer (100 mM, pH 7,25) angesetzt.

Sowohl in den Proben, die zu den jeweiligen Messzeiten mit BCS versetzt wurden, als auch in den Proben, in denen die kumulative Cu(I)-Produktion bestimmt wurde, konnte ein Cu(I)-Gehalt von ca. 9 μM bestimmt werden (Abb. 25). Alle Kurven zeigen den Verlauf einer Sättigungskurve, wobei der Cu(I)-Gehalt nach einer einminütigen Inkubationszeit bei ca. 6,8-7,7 μM lag und nach einer ca. fünfminütigen Inkubationszeit bei ca. 7,9-9 μM . Danach war keine weitere Steigerung des Cu(I)-Gehaltes mehr zu beobachten. Auch die Messung über einen längeren Zeitraum (24 und 48 Stunden) führte nicht zu einer weiteren Erhöhung des Cu(I)-Gehaltes (Daten nicht gezeigt). Wie ebenfalls in Abbildung 25 zu erkennen, ist die Cu(I)-Bildung sauerstoffunabhängig. Sowohl bei der „kumulativen“ Messung (Anwesenheit von BCS über den gesamten Versuchszeitraum), als auch bei der Messung des aktuellen Cu(I)-Gehaltes (Zugabe von BCS zum jeweiligen Messzeitpunkt) ist der Kurvenverlauf der Ansätze unter aeroben und anaeroben Bedingungen in etwa gleich.

Auch bei den anderen untersuchten Methoxybenzaldehyden, die unter den Versuchsbedingungen nur im geringen Umfang DNA-schädigend wirkten, wurde die Bildung von Cu(I) nachgewiesen. Das p-Anisaldehydanalogon 2-Methoxybenzaldehyd zeigte eine ähnliche Cu(I)-Bildung wie p-Anisaldehyd, während bei 3-Methoxybenzaldehyd erst nach einer zehnminütigen Inkubationszeit bei der direkten Messmethode ein Cu(I)-Gehalt von nur 2 μM

und bei der kumulativen Methode einer von 4 μM gemessen werden konnte, der sich mit zunehmender Inkubationszeit auch nicht weiter steigerte (Daten nicht gezeigt).

3.2.2.3 *Inhibition der durch p-Anisaldehyd/CuCl₂ induzierten Einzelstrangbrüche durch Katalase, DMSO, Batho- und Neocuproin unter aeroben und anaeroben Bedingungen*

Wie unter 3.1.2.3 näher erläutert, wurde auch für p-Anisaldehyd untersucht, inwieweit Cu(I) und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (insbesondere $\cdot\text{OH}$ -Radikale) an der Strangbruchinduktion beteiligt sind. Die Wirkung von Neocuproin, Bathocuproin, Katalase und DMSO unter aeroben und anaeroben Bedingungen sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tab. 6: Inhibition der durch p-Anisaldehyd/CuCl₂ erzeugten DNA-Einzelstrangbrüche durch DMSO, Katalase, Bathocuproin oder Neocuproin nach einstündiger Inkubation in NaPO₄-Puffer (100 mM, pH 7,25) unter aeroben und anaeroben Bedingungen. Die Standardabweichung zwischen den einzelnen Versuchen betrug ca. $\pm 5\%$. Die Anzahl der durch p-Anisaldehyd/CuCl₂ induzierten Strangbrüche betrug 3,9 und 1,1 ESB/PM2 DNA-Molekül. Die CuCl₂-Konzentration betrug 0,05 mM.

Inhibitor	Konzentration	Inhibition (%)	
		aerob	anaerob
DMSO	3 (%)	41	38
	0,1 (%)	-8	n.b.
Katalase	35 ($\mu\text{g/ml}$)	97	100
	10 ($\mu\text{g/ml}$)	96	n.b.
	5 ($\mu\text{g/ml}$)	98	n.b.
BSA	35 ($\mu\text{g/ml}$)	1	-4
	10 ($\mu\text{g/ml}$)	-15	n.b.
	5 ($\mu\text{g/ml}$)	-14	n.b.
Bathocuproin	1 (mM)	100	n.b.
	0,4 (mM)	100	n.b.
Neocuproin	1 (mM)	93	n.b.
	0,4 (mM)	96	96

n.b. -nicht bestimmt

Alle eingesetzten Inhibitoren zeigten eine O₂-unabhängige Wirkung. Die durch p-Anisaldehyd/CuCl₂ induzierten Strangbrüche wurden durch Batho- und Neocuproin vollständig gehemmt. Neocuproin bewirkte unter anaeroben Bedingungen eine 96%ige Inhibition. Katalase

(35 µg/ml) hemmte die Strangbruchinduktion in Anwesenheit von O₂ zu 97%. Überraschender Weise hemmte Katalase die Strangbruchinduktion auch unter Argonatmosphäre zu 100%. Geringere Katalase-Konzentrationen (10 oder 5 µg/ml) hemmten die durch p-Anisaldehyd/CuCl₂ unter aeroben Verhältnissen induzierten Strangbrüche noch fast vollständig. Eine unspezifische Hemmung durch Katalase konnte durch den Befund mit BSA (35 mg/ml) ausgeschlossen werden. 3% DMSO inhibierte die Strangbruchbildung zu 41% (aerob) bzw. 38% (anaerob), während 0,1% DMSO unter aeroben Versuchsbedingungen keinen hemmenden Effekt mehr zeigte.

3.2.2.4. *Nachweis spezifischer reaktiver Intermediate der p-Anisaldehyd/CuCl₂-Reaktion*

ESR-spektroskopisch konnte weder ein DMPO-[•]OH-Radikaladdukt noch ein C-zentriertes Radikal über die Bildung eines 4-POBN-Adduktes nachgewiesen werden. Das durch Cu(II) hervorgerufene ESR-Signal (vergl. Abb. 42) konnte nach Zugabe von p-Anisaldehyd vollständig unterdrückt werden. Ein Hydroxylierungsprodukt (8-Hydroxy-2-desoxyguanosin) aus dem Reaktionsgemisch aus p-Anisaldehyd/CuCl₂ und 2-Desoxyguanosin konnte mittels HPLC-ECD nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

3.2.3 Untersuchungen zur zytotoxischen Wirkung in Säugerzellkulturen

3.2.3.1 *Bestimmung der Akuten Toxizität von p-Anisaldehyd/CuCl₂ direkt und 21 Stunden nach der Schadstoffinkubation*

Untoxische Konzentrationen an CuCl₂ erhöhten die akut toxische Wirkung (MTT-Test) von p-Anisaldehyd sowohl direkt nach einer sequenziellen Inkubation mit p-Anisaldehyd/CuCl₂ (Abb. 26a) als auch 21 Stunden (Abb. 26b) später. Dabei wurde die Vitalität der Säugerzellen (V79) direkt nach der Inkubation mit p-Anisaldehyd (20 mM) allein nur um ca. 10% und in Kombination mit CuCl₂ um ca. 40% gehemmt. Morphologische Veränderungen zeigten die Zellen nur in der höchsten getesteten Konzentration (20 mM) in Kombination mit CuCl₂. Wurden die Zellen nach der Schadstoffbehandlung für 21 Stunden in serumhaltigem Medium weiterkultiviert (AT₂₁), so war der Unterschied zwischen Einzel- und Kombinationswirkung stärker ausgeprägt (Abb. 26b). Während 15 mM p-Anisaldehyd hierbei kaum einen Effekt zeigte, war die Vitalität bei dieser Konzentration in Kombination mit CuCl₂ um ca. 60% gehemmt. Der E₁₀-, EC₃₀- und der EC₅₀-Wert für p-Anisaldehyd allein lag bei 14 mM,

15,9 mM und 17,1 mM, für p-Anisaldehyd in Kombination mit CuCl_2 lag hingegen bei 5,8 mM, 10,1 mM und 13,8 mM.

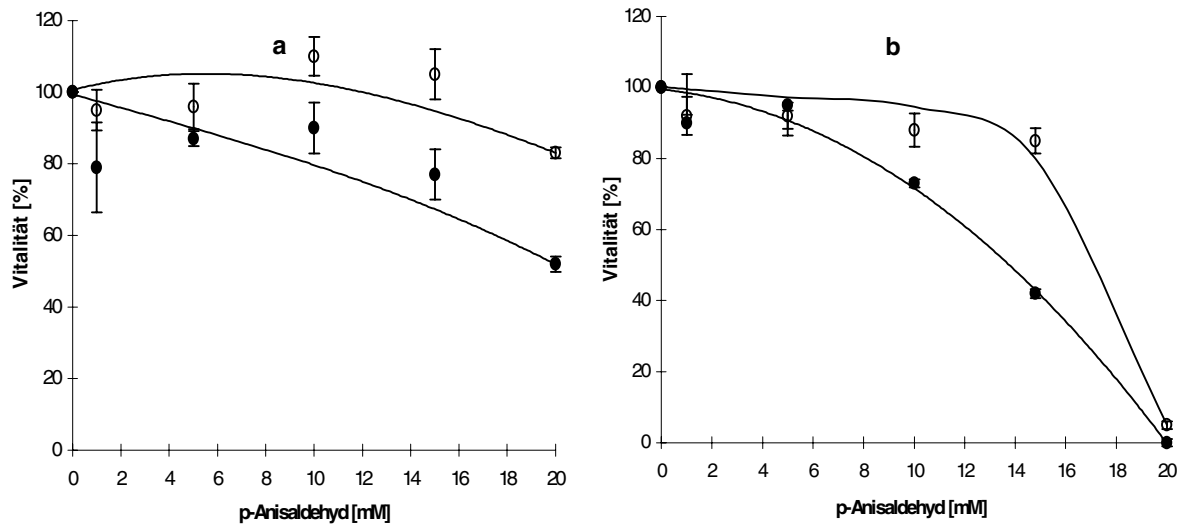


Abb. 26: Toxizität von p-Anisaldehyd auf V79 Zellen nach 90-minütiger Vorinkubation der Zellen mit (●) sowie ohne (○) CuCl_2 (2,5 mM) und anschließender einstündiger Inkubation mit p-Anisaldehyd (0-20 mM). Die Messungen erfolgten direkt (a) oder 21 Stunden nach der Schadstoffinkubation (b). Die Behandlung der Zellen nur mit CuCl_2 allein ergab eine Schädigung von 5% (a) bzw. 9% (b).

3.2.3.2 Bestimmung der Wachstumshemmung durch p-Anisaldehyd / CuCl_2

Auch bei der Messung des Zellwachstums konnte eine Wirkungsverstärkung durch die Kombination p-Anisaldehyd/ CuCl_2 in humanen Fibroblasten nachgewiesen werden (Abb. 27).

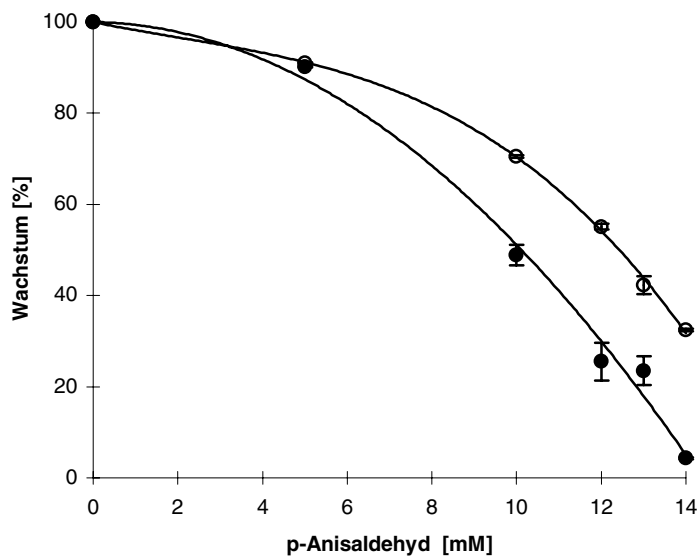


Abb. 27: Wachstumshemmung humaner Fibroblasten durch p-Anisaldehyd nach einstündiger Inkubation mit (●) sowie ohne (○) CuCl_2 (2,5 mM). Die Messungen erfolgten 48 Stunden nach der Schadstoffinkubation, in der logarithmischen Wachstumsphase. Die Behandlung der Fibroblasten nur mit CuCl_2 ergab eine 3%ige Wachstumshemmung.

Wie Abbildung 27 zeigt, wurde das Wachstum der humanen Fibroblasten durch eine gleichzeitige einstündige Inkubation (Abb. 27) mit p-Anisaldehyd in Kombination mit CuCl_2 stärker gehemmt als durch p-Anisaldehyd allein. Bei einer 90-minütigen Vorinkubation der Zellen mit CuCl_2 und einer anschließenden einstündigen Inkubation mit p-Anisaldehyd konnte ebenfalls eine Wirkungsverstärkung durch CuCl_2 beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Bei der gleichzeitigen Inkubation (Abb. 27) lag der EC_{10} -, EC_{30} - und EC_{50} -Wert für die Einzelwirkung bei 6 mM, 10 mM und 12,3 mM, und für die Kombinationswirkung bei 5,1 mM, 8 mM und 10,1 mM.

3.2.3.3 Bestimmung der Hemmung der Koloniebildungsfähigkeit durch p-Anisaldehyd/ CuCl_2

Die Kombination von p-Anisaldehyd mit untoxischen Konzentrationen an CuCl_2 hemmte die Koloniebildungsfähigkeit wesentlich stärker als p-Anisaldehyd allein (Abb. 28). Eine einstündige Inkubation mit p-Anisaldehyd allein beeinflusste die Koloniebildungsfähigkeit von V79 Zellen ab ca. 12 mM.

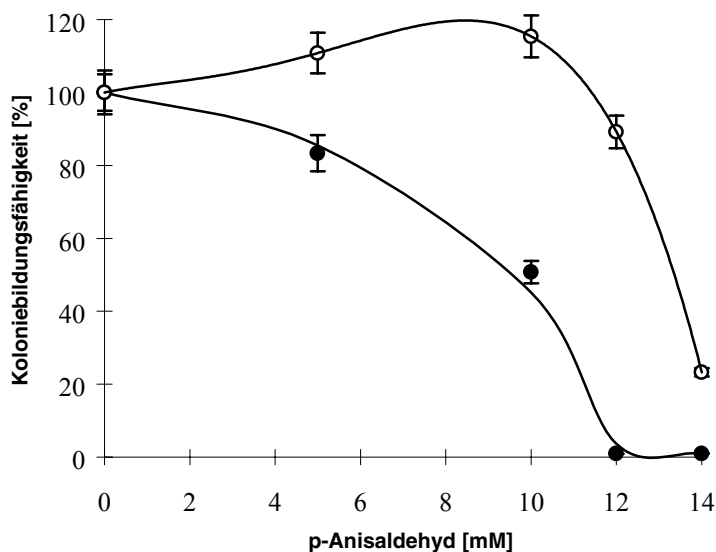


Abb. 28: Hemmung der Koloniebildungsfähigkeit von V79 Zellen durch p-Anisaldehyd in Kombination mit (●) sowie ohne (○) CuCl_2 (2,5 mM). Die Behandlung mit den Schadstoffen erfolgte für 1 Stunde bei 37 °C. Die Messungen erfolgten 6 Tage nach Aussaat der Kolonien. Die Behandlung der V79 Zellen nur mit CuCl_2 ergab eine Hemmung der Koloniebildungsfähigkeit von 4%.

Wie in Abbildung 28 zu erkennen, wurde durch 10 mM p-Anisaldehyd allein keine Hemmung der Koloniebildungsfähigkeit bewirkt, während in Kombination mit CuCl_2 die Koloniebildungsfähigkeit um ca. 50% gehemmt wurde. Die EC_{10} -, EC_{30} - und EC_{50} -Werte für p-Anisal

dehyd allein betragen 12,5 mM, 12,9 mM und 13,5 mM und für p-Anisaldehyd/CuCl₂ 3,8 mM, 7,2 mM und 10 mM.

3.2.4 Untersuchungen zur genotoxischen Wirkung in Säugerzellkulturen

3.2.4.1 Bestimmung der Induktion intrazellulärer DNA-Strangbrüche durch p-Anisaldehyd /CuCl₂

3.2.4.1.1 DNA-Strangbruchnachweis mit Hilfe der Alkalischen Elution

Es wurde untersucht, ob es durch die Behandlung der Fibroblasten mit p-Anisaldehyd allein und in Kombination mit CuCl₂ zu intrazellulären Strangbrüchen kommt, die sich mit der Methode der Alkalischen Elution nachweisen lassen. Die DNA der Zellen, die 1,5 Stunden mit CuCl₂ vorinkubiert und anschließend 1 Stunde mit p-Anisaldehyd behandelt wurden, zeigte im Vergleich zur DNA der Zellen, die nur mit CuCl₂ oder p-Anisaldehyd inkubiert wurden, eine erhöhte Elutionsrate (Abb. 29).

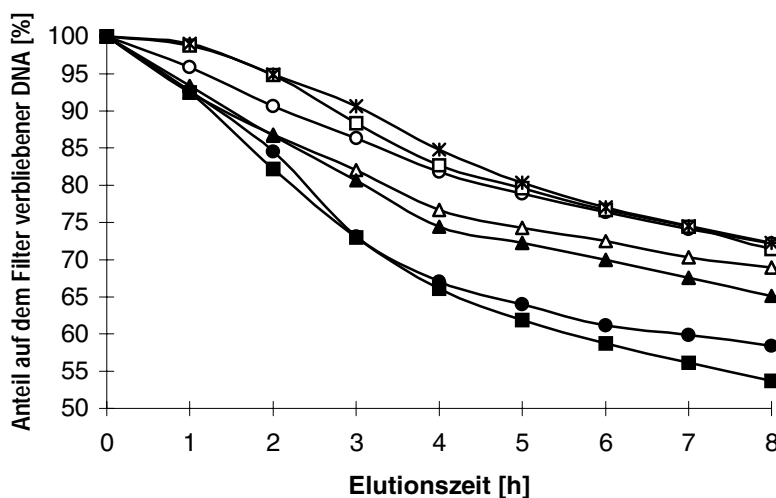


Abb. 29: Profil der Alkalischen Elution von DNA aus humanen Fibroblasten (N57), die 1,5 Stunden mit CuCl₂ (2,5 mM) (*) (geschlossene Symbole) bzw. ohne CuCl₂ (offene Symbole) und anschließend 1 Stunde mit unterschiedlichen p-Anisaldehyd-Konzentrationen (16 mM (Δ,▲); 18 mM (○,●); 20 mM (□,■)) inkubiert wurden. Die Auftragung auf die Filter erfolgte direkt nach der Schadstoffbehandlung.

Eine gemeinsame einstündige Inkubation von p-Anisaldehyd und CuCl₂ erhöhte die Elutionsrate nur leicht (Daten nicht gezeigt). Der Zusatz von Proteinase K zur p-Anisaldehyd/CuCl₂ behandelten DNA hatte keinen Einfluss auf die Elutionsrate (Daten nicht gezeigt). Malondialdehyd hingegen, das als positive Kontrollsubstanz eingesetzt wurde, zeigte durch Proteinase K-Behandlung eine erhöhte Elutionsrate (Daten nicht gezeigt). Es wurde untersucht ob die

relativ geringe Strangbruchinduktion an intrazellulärer DNA auf DNA-DNA-Crosslinks zurückzuführen ist. Dazu wurden die Zellen mit MMS vorbehandelt und die durch MMS erzeugten Strangbrüche mit den MMS-induzierten Strangbrüchen verglichen, die in Anwesenheit von p-Anisaldehyd/CuCl₂ erzeugt wurden. Bei DNA-DNA-Crosslinks wird in Anwesenheit von p-Anisaldehyd/CuCl₂ eine verringerte Elutionsrate der DNA aus MMS-behandelten Zellen erwartet. Tatsächlich wurden jedoch bei MMS/CuCl₂, MMS/p-Anisaldehyd bzw. MMS/p-Anisaldehyd/CuCl₂ behandelten humanen Fibroblasten eine erhöhte Elutionsrate gemessen (Abb. 30a). Wie in Abbildung 30b zu erkennen, ist diese Erhöhung der Elutionsrate auf die Summe der eluierten DNA der einzelnen Komponenten zurückzuführen.

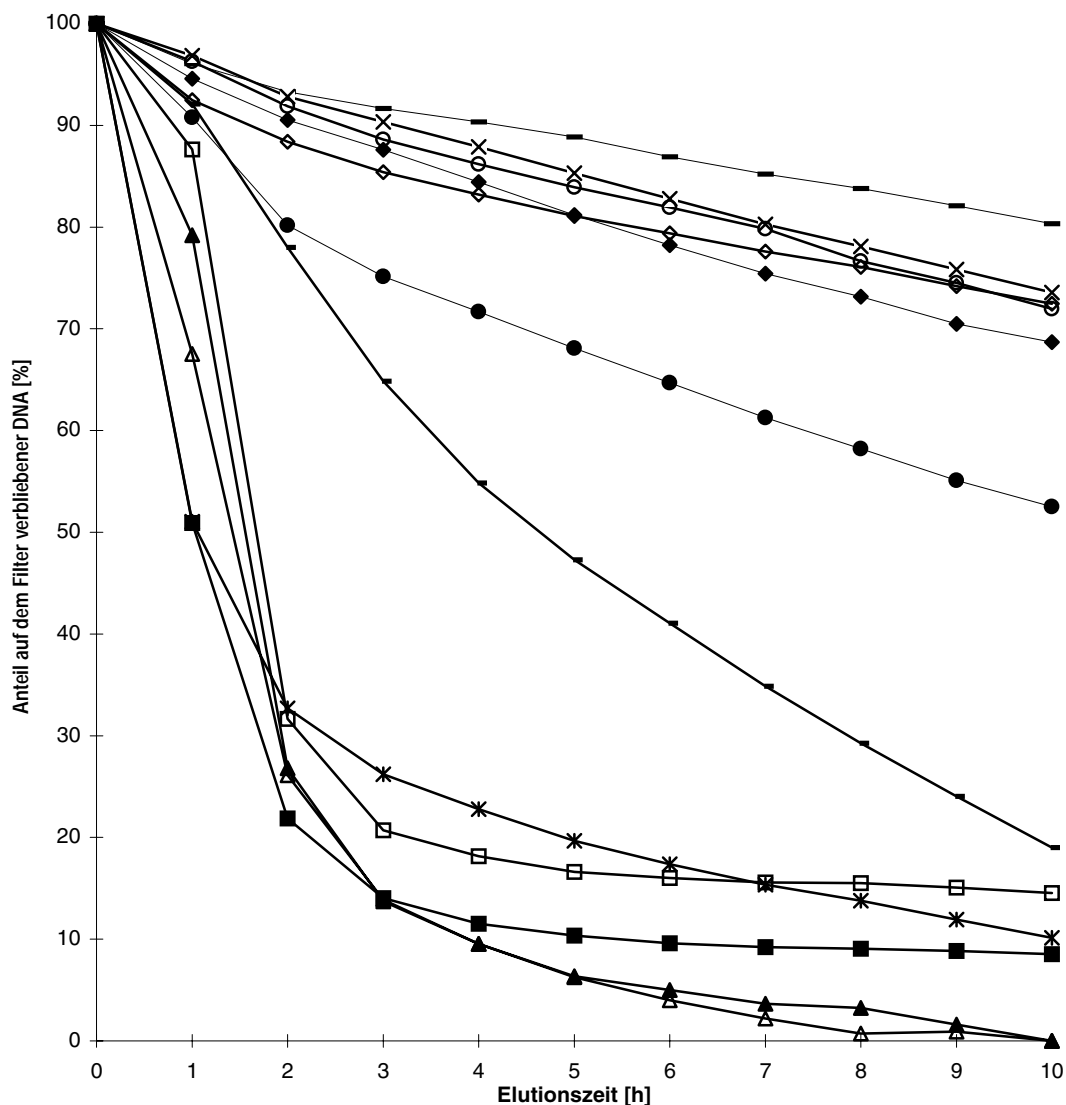


Abb. 30a: Profil der Alkalischen Elution von DNA aus humanen Fibroblasten (N57), die 20 Minuten mit MMS (5 mM), nachfolgend 1 Stunde mit CuCl₂ (2,5 mM) bzw. ohne CuCl₂ und p-Anisaldehyd inkubiert wurden. Die Auftragung auf die Filter erfolgte direkt nach der Schadstoffbehandlung. (-) unbehandelte DNA; (×) 2,5 mM CuCl₂; (-) 5 mM MMS; (*) 5 mM MMS+ 2,5 mM CuCl₂; (Δ) 5 mM MMS+ 18 mM p-Anisaldehyd; (▲) 5 mM MMS+ 18 mM p-Anisaldehyd+ 2,5 mM CuCl₂; (○) 18 mM p-

Anisaldehyd; (●) 18 mM p-Anisaldehyd+ 2,5 mM CuCl₂; (○) 5 mM MMS+ 14 mM p-Anisaldehyd;
 (■) 5 mM MMS+ 14 mM p-Anisaldehyd + 2,5 mM CuCl₂; (◇) 14 mM p-Anisaldehyd; (◆) 14 mM p-Anisaldehyd+ 2,5 mM CuCl₂.

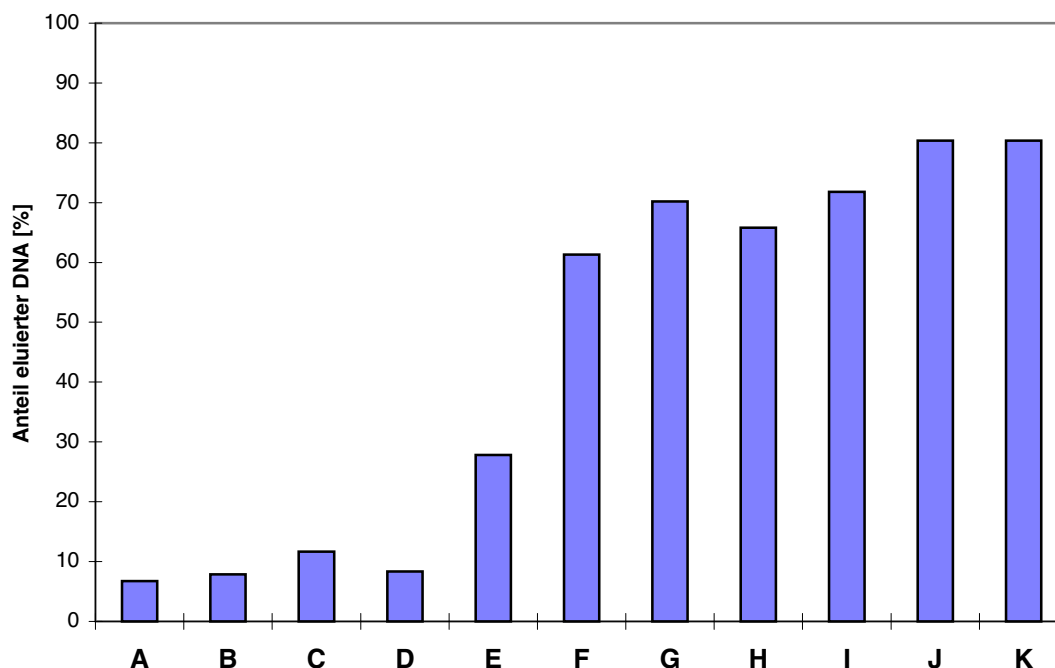


Abb. 30b: Anteil eluierter DNA (%) aus humanen Fibroblasten (N57), die 20 Minuten mit 5 mM MMS, nachfolgend 1,5 Stunden mit CuCl₂ (2,5 mM) bzw. ohne CuCl₂ und anschließend 1 Stunde mit bzw. ohne p-Anisaldehyd inkubiert wurden. Die Auftragung auf die Filter erfolgte direkt nach der Schadstoffbehandlung. Dargestellt ist der Anteil eluierter DNA (%) nach zehnstündiger Elutionszeit abzüglich der unbehandelten Kontrolle, bei der 20% der Gesamt-DNA eluierten.

A=2,5 mM CuCl₂; B=14 mM p-Anisaldehyd; C=14 mM p-Anisaldehyd+2,5 mM CuCl₂; D=18 mM p-Anisaldehyd; E=18 mM p-Anisaldehyd+ 2,5 mM CuCl₂; F=5 mM MMS; G=5 mM MMS+ 2,5 mM CuCl₂; H=5 mM MMS+14 mM p-Anisaldehyd; I= 5 mM MMS+14 mM p-Anisaldehyd+2,5 mM CuCl₂, J=5 mM MMS+18 mM p-Anisaldehyd; K=5 mM MMS+18 mM p-Anisaldehyd+2,5 mM CuCl₂

3.2.4.1.2 DNA-Strangbruchnachweis mit Hilfe des Kometen-Assays

Der Kometen-Assay ist eine außerordentlich empfindliche Methode, in der bereits 0,1 DNA-Brüche pro 10⁹ Dalton detektiert werden können (Gedik *et al.*, 1992). Die im alkalischen Kometen-Assay nachgewiesenen Brüche können verschiedenen Ursprungs sein, es werden direkte Einzelstrangbrüche, AP-Stellen und andere alkalilabile Stellen sowie Intermediate der Exzisionsreparatur erfasst (Anderson und Plewa, 1998).

Die DNA-schädigende Wirkung von p-Anisaldehyd allein und in Kombination mit CuCl₂ wurde mit Hilfe des Kometen-Assays untersucht. Hierzu wurden die Zellen mit bzw. ohne CuCl₂ vorinkubiert und anschließend mit p-Anisaldehyd versetzt. Es konnte festgestellt werden, dass CuCl₂ keine und p-Anisaldehyd allein ab ca. 15 mM (tail moment= 8) gentoxische Effekte hervorrief (Abb. 31).

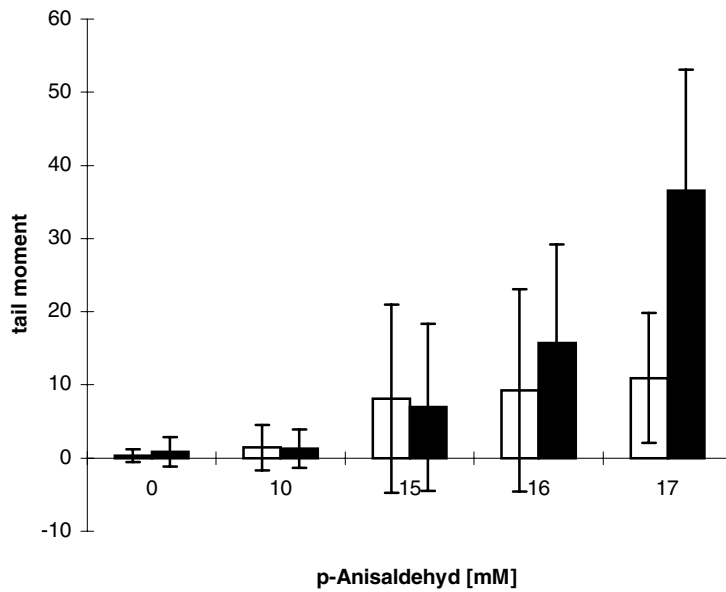


Abb. 31: Darstellung der Kometenbildung nach Behandlung humaner Fibroblasten (N57) mit CuCl₂ und p-Anisaldehyd. Die Zellen wurden 1,5 Stunden mit (geschlossene Säulen) bzw. ohne CuCl₂ (offene Säulen) vorinkubiert und anschließend 1 Stunde mit 0-17 mM p-Anisaldehyd nachinkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus jeweils 50 ausgezählten Zellen.

In Kombination mit CuCl₂ wurde die gentoxische Wirkung von p-Anisaldehyd verstärkt. Dies wurde insbesondere bei der höchsten eingesetzten p-Anisaldehyd-Konzentrationen von 17 mM deutlich, wo das *tail moment* für p-Anisaldehyd allein 11 und für die Kombination 36,5 betrug. Hier war die Schädigung der Kombination so groß, dass 50% der Zellen nicht mehr auswertbar waren.

3.2.4.2 Bestimmung der Induktion der DNA-Reparatur durch p-Anisaldehyd/CuCl₂

3.2.4.2.1 Nachweis der DNA-Reparatur über die UDS

Wie in Tabelle 8 dargestellt, konnte weder für p-Anisaldehyd allein noch für p-Anisaldehyd in Kombination mit CuCl₂ eine UDS im Sinne der OECD-Richtlinien (OECD, 1986) nachgewiesen werden.

Tab. 7: Induktion von DNA-Exzisionsreparatur (UDS) in menschlichen Fibroblasten (N57) durch p-Anisaldehyd mit und ohne neunzigminütige CuCl₂-Vorinkubation (2,5 mM). Die dargestellten Werte stellen den Mittelwert der Nettosilberkörnchen aus jeweils 50 ausgezählten Zellen ± der Standardabweichung dar.

p-Anisaldehyd [mM]	ohne CuCl ₂		mit CuCl ₂	
	NG	± SD	NG	± SD
0	0,88	± 1,69	0,84	± 0,86
1	0,78	± 0,83	1,12	± 0,93
2,5	1,22	± 1,30	0,92	± 0,80
5	0,96	± 0,35	0,82	± 0,77
7,5	1,12	± 0,84	0,96	± 1,00
10	1,26	± 1,09	0,94	± 0,93
12,5	0,96	± 1,08	0,82	± 0,77
15	0,28	± 0,45	0,46	± 0,81
UV-Kontrolle [5,5 J/m ²]	32,5	± 8,58		

Auch bei gleichzeitiger Inkubation mit p-Anisaldehyd und CuCl₂ zeigte sich das gleiche Bild (Daten nicht gezeigt). Bei 2- und 3-Methoxybenzaldehyd konnte unter gleichen Versuchsbedingungen ebenfalls keine UDS nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

3.2.4.2.2 Untersuchungen zur Hemmung der DNA-Reparatur

Um zu überprüfen, ob die Ursache für die nicht nachweisbare UDS eine Hemmung der DNA-Exzisionsreparatur durch p-Anisaldehyd oder p-Anisaldehyd/CuCl₂ ist, wurden Untersuchungen zur Hemmung der DNA-Reparatur von UV- und MMS-induzierten DNA-Schäden durch-

geführt. Wie in Tabelle 8 zusammenfassend dargestellt wurde die UV-induzierte DNA-Reparatur sowohl durch p-Anisaldehyd allein als auch durch p-Anisaldehyd/CuCl₂ gehemmt.

Tab. 8: Beeinflussung der durch UV-Licht (5,5 J/m²) induzierten DNA-Reparatur durch p-Anisaldehyd mit und ohne CuCl₂. Die Bestimmung erfolgte über die Methode der UDS (unscheduled DNA synthesis). Humane Fibroblasten (N57) wurden zunächst mit UV-Licht bestrahlt, 1,5 Stunden mit bzw. ohne 2,5 mM CuCl₂ inkubiert und anschließend 1 Stunde mit unterschiedlichen Konzentrationen an p-Anisaldehyd bzw. serumfreiem Medium behandelt. Die dargestellten Werte stellen den Mittelwert der Nettosilberkörnchen aus jeweils 50 ausgezählten Zellen ± der Standardabweichung dar.

UV induzierte DNA Reparatur						
p-Anisaldehyd [mM]	ohne CuCl ₂			mit CuCl ₂		
	NG	± SD	DNA-REP. [%]	NG	± SD	DNA-REP. [%]
0	68,22	17,96	100	65,82	16,95	100
5	36,08	10,54	52,89	41,26	14,85	62,69
10	28,92	10,09	42,39	20,72	9,16	31,48 *
15	20,90	8,36	30,64	21,7	9,37	32,97 **

Der Anteil reparierender Zellen lag in der Regel bei 100%. [*]98% > 5NNG, [**]96% > 5NNG

p-Anisaldehyd allein hemmte die UV-induzierte Reparatur schon bei 5 mM um ca. 48%, bei 10 mM und 15 mM p-Anisaldehyd konnte eine Hemmung von ca. 60-70% beobachtet werden. Durch die Kombination von p-Anisaldehyd mit CuCl₂ konnte keine signifikante Verstärkung der Hemmung festgestellt werden. Auch die p-Anisaldehydanaloga 2- und 3- Methoxybenzaldehyd hemmten die UV-induzierte DNA-Reparatur in etwa in der gleichen Größenordnung und zeigten ebenfalls keine signifikante Verstärkung der Hemmung durch die Kombination mit CuCl₂ (Daten nicht gezeigt).

Tab. 9: Beeinflussung der durch MMS (5 mM) induzierten DNA-Reparatur durch p-Anisaldehyd mit und ohne CuCl₂ (2,5 mM). Die Bestimmung erfolgte über die Methode der UDS (unscheduled DNA synthesis). Humane Fibroblasten (N57) wurden zunächst 20 Minuten mit MMS (5mM) inkubiert, 1,5 Stunden mit bzw. ohne CuCl₂ (2,5 mM) inkubiert und anschließend 1 Stunde mit unterschiedlichen Konzentrationen an p-Anisaldehyd (0-15 mM) bzw. serumfreiem Medium behandelt. Die dargestellten Werte stellen den Mittelwert der Nettosilberkörnchen aus jeweils 50 ausgezählten Zellen ± der Standardabweichung dar.

MMS induzierte DNA-Reparatur						
p-Anisaldehyd [mM]	ohne CuCl ₂			mit CuCl ₂		
	NG	± SD	DNA-REP. [%]	NG	± SD	DNA-REP. [%]
0	23,53	5,39	100	23,33	9,22	100
2	n.u.	n.u.	n.u.	20,45	7,91	87,66
4	n.u.	n.u.	n.u.	19,82	7,52	84,95
6	n.u.	n.u.	n.u.	16,01	6,54	68,62
8	21,95	8,33	93,29	13,98	5,27	59,92*
10	17,24	5,58	73,27	7,86	2,11	33,69****
12,5	19,99	5,9	84,96	8,66	2,95	37,12**
15	30,66	8,83	130,3	7,04	1,93	30,18****

(*) 94% der Zellen in Reparatur, (**) 90% der Zellen in Reparatur; (***) 80% der Zellen in Reparatur, (****) 56% der Zellen in Reparatur, (n.u. = nicht untersucht)

Bei den Untersuchungen zur Hemmung der MMS-induzierten DNA-Reparatur (Tab. 9) ergab sich ein anderes Bild. Hier zeigte nur die Kombination von p-Anisaldehyd mit CuCl₂ eine signifikante Hemmwirkung, während p-Anisaldehyd allein keinen signifikant hemmenden Einfluss auf die DNA-Reparatur hatte. So wurde im Konzentrationsbereich zwischen 6-15 mM p-Anisaldehyd/CuCl₂ eine Hemmung der MMS-induzierten Reparatur von ca. 31 bis 70% festgestellt, wobei die Zahl der in Reparatur befindlichen Zellen gleichzeitig von 100% (6 mM p-Anisaldehyd/CuCl₂) bis auf 56% (15 mM p-Anisaldehyd/CuCl₂) abnahm.

3.2.4.3 Induktion von Mutationen im HPRT-Test durch p-Anisaldehyd /CuCl₂

Mit Hilfe des HPRT-Tests wurde untersucht, ob die durch p-Anisaldehyd/CuCl₂ induzierten DNA-Schäden mutagene Folgen zeigen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 32 dargestellt.

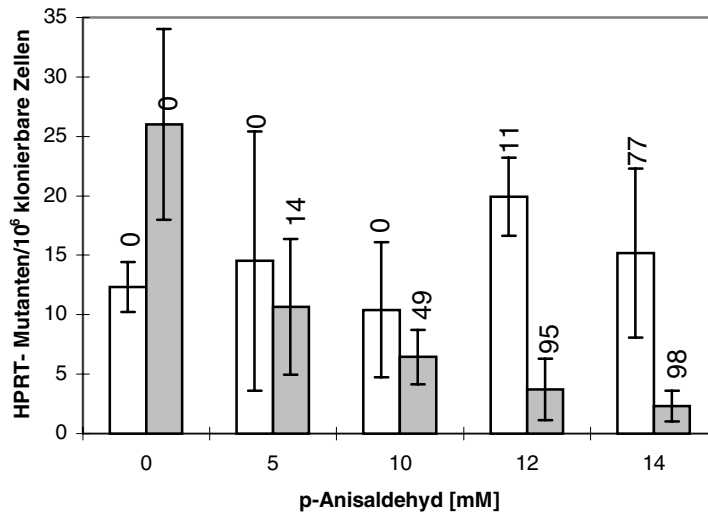


Abb. 32: Mutationsfrequenz von V79 Zellen nach Behandlung mit p-Anisaldehyd in Kombination mit (geschlossene Säulen) und ohne (offene Säulen) CuCl₂ (2,5 mM). Die Zellen wurden gleichzeitig für 1 Stunde mit p-Anisaldehyd (0-14 mM) und CuCl₂ (2,5 mM) inkubiert. Die Mutagenitätsdaten wurden aus 5×10^5 Zellen/Dosis gewonnen. Die Expressionszeit betrug 12 Tage, die Selektionszeit betrug 8 Tage. Die Mutationsfrequenz der Positivkontrolle EMS (10 mM) lag bei 228. Die Zahlen über den Säulen geben die Hemmung der Koloniebildungsfähigkeit an.

Wie Abb. 32 zeigt konnte weder für p-Anisaldehyd allein noch für p-Anisaldehyd/CuCl₂ eine Mutagenität im HPRT-Test nachgewiesen werden. Mit zunehmender Konzentration konnte bei der Substanzkombination mit CuCl₂ eine kontinuierliche Abnahme der Mutationsfrequenz beobachtet werden. Die zugehörigen Toxizitätsdaten sind jeweils oberhalb der Säulen als prozentuale Hemmung der Koloniebildungsfähigkeit angegeben. Die höchsten eingesetzten p-Anisaldehyd-Konzentrationen in Kombination mit CuCl₂ zeigten bereits eine 95-98%ige Hemmung der Koloniebildungsfähigkeit. Damit liegen diese etwas oberhalb der empfohlenen maximal zu testenden Konzentrationen (s. Aaron *et al.*, 1994).

3.3 Kombination Acetophenon/CuCl₂

3.3.1 Untersuchungen zur Schädigung von PM2 DNA

3.3.1.1 Strangbruchinduktion durch Pivalophenon und verschiedene Acetophenone/CuCl₂

Die Strangbruchbildung durch Acetophenon, 3-, 4- Methoxyacetophenon und Pivalophenon (tert.-Butylphenylketon) allein und in Kombination mit CuCl₂ wurde untersucht. CuCl₂ allein zeigte keine Strangbruchbildung und die getesteten Ketone allein induzierten eine minimale ESB-Induktion von ≤ 0,18 ESB/PM2 DNA-Molekül. Acetophenon/CuCl₂ induzierte eine erhöhte Anzahl an Strangbrüchen von bis zu 1,65 ESB/PM2 DNA-Molekül .

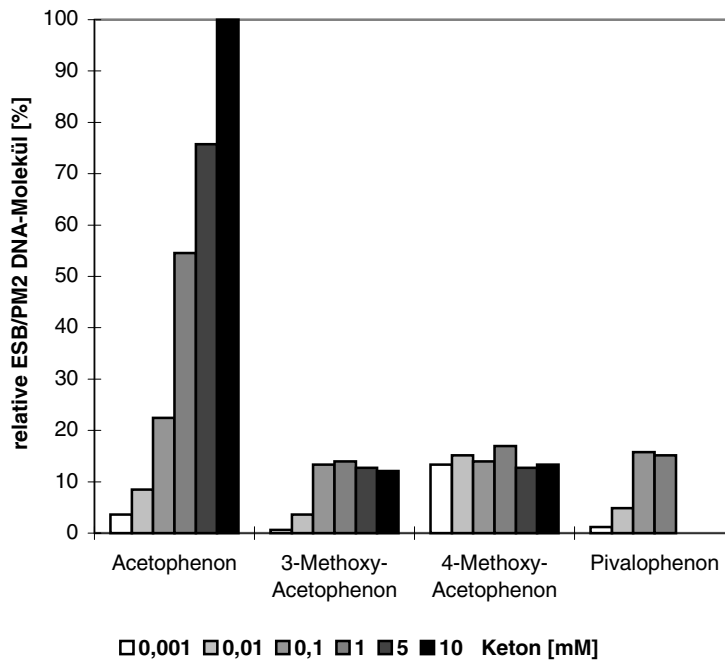


Abb. 33: Induktion von Einzelstrangbrüchen in PM2 DNA durch Acetophenon, 3- und 4- Methoxyacetophenon und Pivalophenon in Kombination mit CuCl₂ (1 mM). Die Inkubation der DNA mit den Testsubstanzen erfolgte für 1 Stunde bei 37 °C in Tris•HCl-Puffer (10 mM, pH 7,25).

Im Vergleich zu Acetophenon/CuCl₂ lag die Strangbruchinduktion bei den anderen getesteten Ketonen in Kombination mit CuCl₂ (1 mM) bei maximal 17% der Strangbruchinduktion von Acetophenon/CuCl₂ lag (= 0,25 ESB/PM2 DNA-Molekül) (Abb. 33). Auch bei CuCl₂-Konzentrationen von 0,5 und 1,5 mM zeigte sich das gleiche Bild (Daten nicht gezeigt). Diese Ketone wurden daher nicht weiter untersucht.

3.3.1.2 Strangbruchinduktion durch Acetophenon/CuCl₂

Es wurde die Strangbruchinduktion durch Acetophenon/CuCl₂ in Abhängigkeit von der CuCl₂-Konzentration untersucht. Wie Abbildung 34 zeigt konnte bis 2,5 mM Acetophenon keine CuCl₂-Konzentrationsabhängigkeit beobachtet werden. Bei 5, 8 und 10 mM Acetophenon nahmen die induzierten Einzelstrangbrüche mit steigender CuCl₂-Konzentration zu.

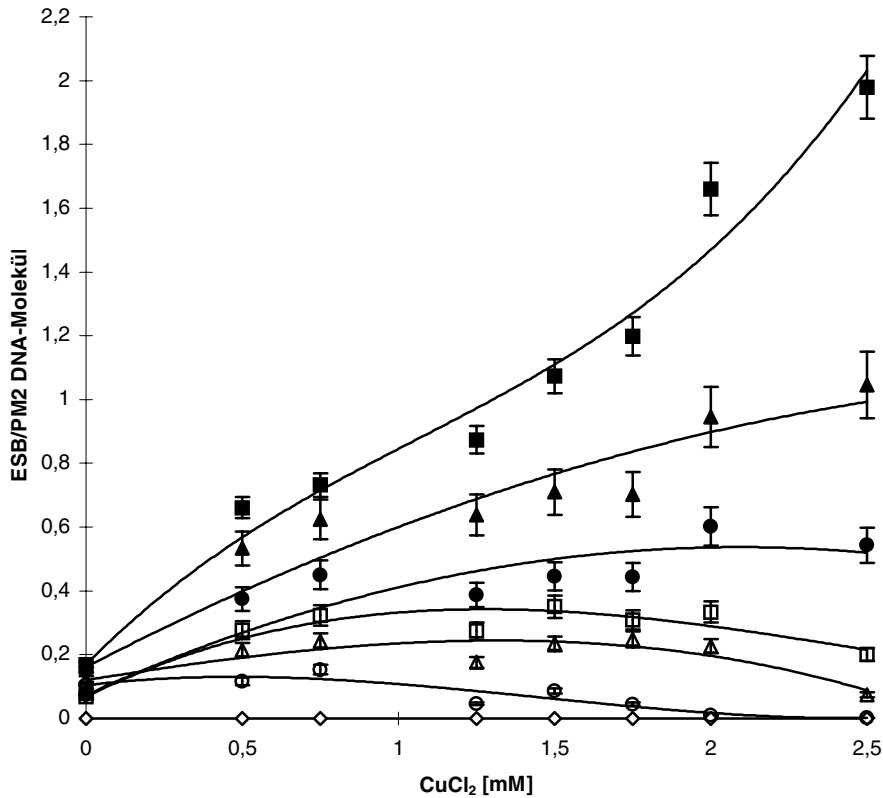


Abb. 34: Einzelstrangbruchinduktion in PM2 DNA in Abhängigkeit von der CuCl₂ Konzentration (0-2,5 mM) und unterschiedlichen Acetophenon-Konzentrationen (0 mM (◇); 0,5 mM (○); 1 mM (△); 2,5 mM (□); 5 mM (●); 8 mM (▲); 12,5 mM (■)). Die Inkubation erfolgte für 1 Stunde bei 37 °C in Tris•HCl-Puffer (10 mM, pH 7,25).

Es konnte beobachtet werden, dass ESB durch Acetophenon/CuCl₂ auch schon bei wesentlich geringeren CuCl₂-Konzentrationen (ab 5 µM CuCl₂) nachweisbar waren (Abb. 35), wobei die Anzahl induzierter Strangbrüche in NaPO₄-Puffer im Vergleich zu Tris•HCl-Puffer ca. dreimal so hoch war.

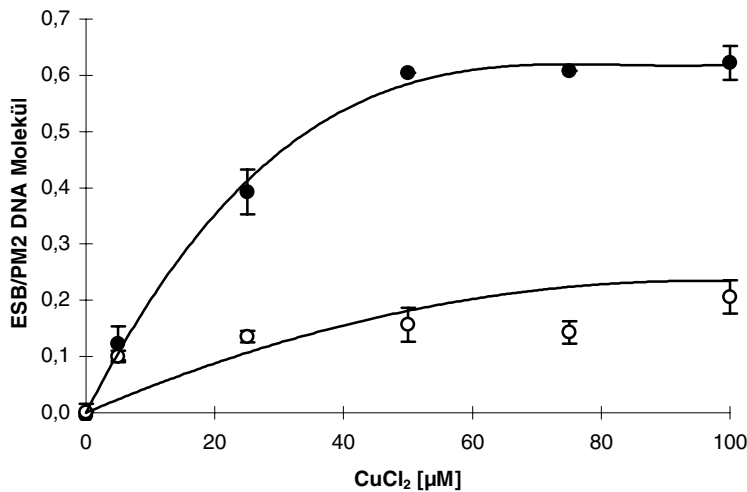


Abb. 35: Einzelstrangbruchinduktion in PM2 DNA durch Acetophenon (8 mM) in Abhängigkeit von der CuCl_2 -Konzentration (0-100 μM). Die Inkubation erfolgte für 1 Stunde bei 37 °C in NaPO_4 -Puffer ((●)100 mM, pH 7,25) und Tris•HCL-Puffer ((○)10 mM, pH 7,25). Bei den dargestellten Werten handelt es sich um die Nettostrangbrüche.

Auch bei konstanter CuCl_2 -Konzentration von 100 μM und variabler Acetophenon-Konzentration (0-18 mM) zeigte die Kombination eine deutlich höhere Strangbruchinduktion im anorganischen NaPO_4 -Puffer (Abb. 36). Bei einer einstündigen Vorinkubation der PM2 DNA mit CuCl_2 und anschließender einstündiger Inkubation mit Acetophenon war die Anzahl der induzierten Strangbrüche ca. dreimal höher (Abb. 37).

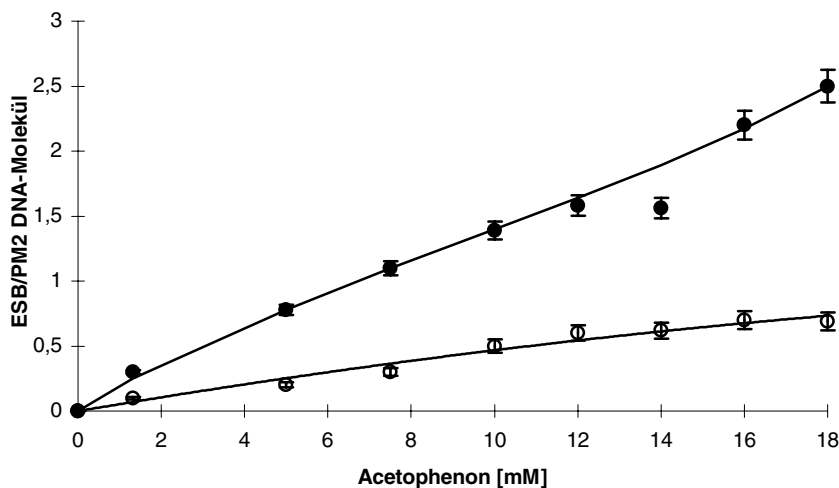


Abb. 36: Vergleich der Einzelstrangbruchinduktion durch die Schadstoffkombination Acetophenon/ CuCl_2 in Tris•HCl-Puffer ((○) 10 mM, pH 7,25); bzw. NaPO_4 -Puffer ((●)100 mM, pH 7,25). Die CuCl_2 -Konzentration betrug 0,1 mM und die Inkubation erfolgte gleichzeitig für 1 Stunde bei 37 °C. Bei den dargestellten Werten handelt es sich um die Nettostrangbrüche.

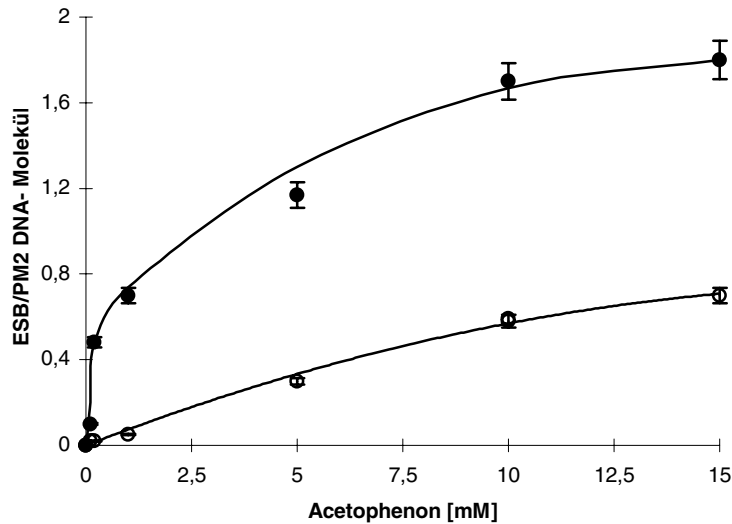


Abb. 37: Vergleich der Einzelstrangbruchinduktion durch die Schadstoffkombination Acetophenon/CuCl₂ mit (●) und ohne (○) einstündige Vorinkubation der PM2 DNA mit 1 mM CuCl₂ in Tris•HCl-Puffer (10 mM, pH 7,25). Die Inkubation erfolgte bei 37 °C. Bei den dargestellten Werten handelt es sich um Nettostrangbrüche.

Die Strangbruchinduktion durch Acetophenon/CuCl₂ in Abhängigkeit von der Zeit ist in Abbildung 38 dargestellt. Die induzierten ESB/PM2 DNA-Molekül nahmen mit zunehmender Inkubationszeit stetig zu, wobei in den ersten 10-15 Minuten ein steiler Anstieg zu beobachten war und die Kurve danach abflachte.

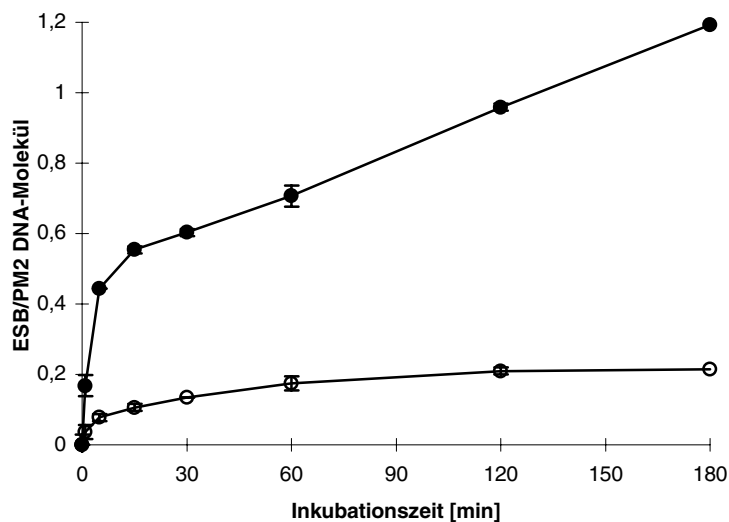


Abb. 38: Zeitabhängige Induktion von DNA-Einzelstrangbrüchen durch Acetophenon (8 mM) mit (●) und ohne (○) CuCl₂ (0,75 mM). Die Inkubation erfolgte bei 37 °C in Tris•HCl-Puffer (10 mM, pH 7,25).

Eine Doppelstrangbruchinduktion durch Acetophenon/CuCl₂ konnte in keinem Fall nachgewiesen werden.

3.3.1.3 Induktion von AP-Stellen durch Acetophenon/CuCl₂

In Abbildung 39 sind die durch Acetophenon in Kombination mit CuCl₂ induzierten enzymatisch erkannten AP-Stellen im Vergleich zu den ESB dargestellt. Die Inkubation mit CuCl₂ bzw. Acetophenon allein erzeugte nach Zugabe des Extraktes keine Strangbrüche.

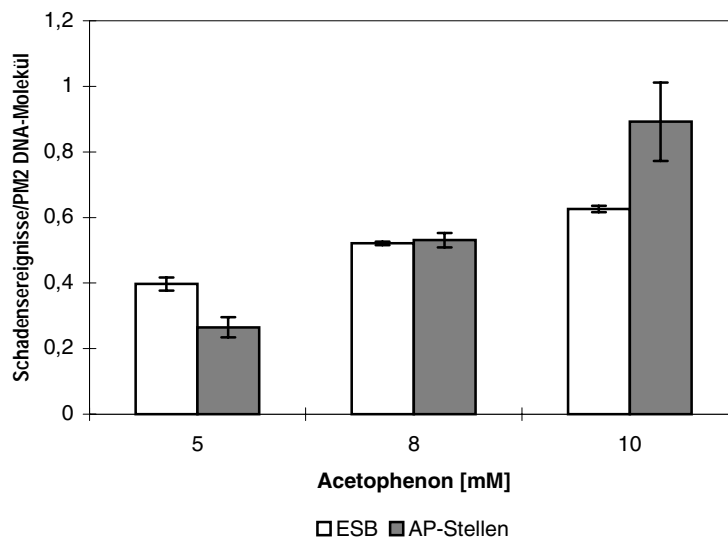


Abb. 39: DNA-Strangbruchinduktion (ESB), sowie Nachweis der Bildung von AP-Endonukleasesensitiven Stellen (AP-Stellen) durch die Kombination Acetophenon (0-10 mM) mit CuCl₂ (1,5 mM). Die Inkubation erfolgte für 1 Stunde bei 37 °C in 10 mM Tris•HCl-Puffer, pH 7,25. Jeweils eine Parallele wurde mit Tris•HCl-Puffer für 30 Minuten weiterinkubiert, die andere wurde für 30 Minuten mit einem humanen AP-Endonukleasehaltigen Zellextrakt bei 37 °C weiterinkubiert. Angegeben sind die Nettostrangbrüche und die AP-Stellen nach Subtraktion der unspezifischen AP-Endonukleaseaktivität.

Es zeigte sich, dass die Anzahl der induzierten Einzelstrangbrüche durch die Inkubation mit einem AP-Endonuklease-haltigen Zellextrakt mit zunehmender Acetophenon-Konzentration anstiegen. Bei der höchsten getesteten Konzentration (10 mM) überstieg die Zahl der AP-Stellen die der ESB, bei den anderen getesteten Konzentrationen entsprach die Anzahl induzierter ESB in etwa der der AP-Stellen. Eine Hemmung der AP-Endonuklease durch Acetophenon/CuCl₂ konnte ausgeschlossen werden, da durch Hitze/Säure induzierte AP-Stellen durch den Extrakt auch in Anwesenheit von Acetophenon/CuCl₂ hoch effektiv umgesetzt wurden (Daten nicht gezeigt).

3.3.2 Untersuchungen zum Mechanismus der Strangbruchinduktion von Acetophenon /CuCl₂

Auch für Acetophenon/CuCl₂ wurde untersucht, inwieweit mögliche reaktive Zwischenprodukte nachweisbar waren. Hierzu wurde zum einen die Sauerstoffabhängigkeit der Strangbruchinduktion, die Cu(I)-Bildung und die Beeinflussung der Strangbruchinduktion durch spezifische Inhibitoren überprüft. Zum anderen wurden Untersuchungen zum direkten Nachweis möglicher reaktiver Zwischenprodukte mit Hilfe der ESR- und HPLC-Technik durchgeführt. Da Acetophenon als „Photosensitizer“ bekannt ist (Epe *et al.*, 1993b), wurde zusätzlich überprüft, ob es während der Acetophenon/CuCl₂-Reaktion zur Bildung eines angeregten Tripletzustandes kommt.

3.3.2.1 Strangbruchinduktion unter aeroben und anaeroben Bedingungen

Um die Sauerstoffabhängigkeit der Strangbruchinduktion durch Acetophenon/CuCl₂ zu testen wurden Parallelversuche in Normalatmosphäre und in sauerstofffreier Argonatmosphäre durchgeführt.

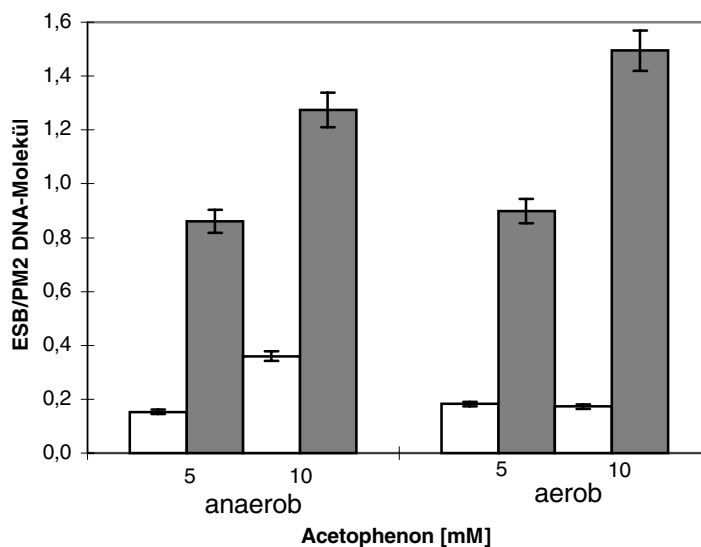


Abb. 40: Einzelstrangbruchbildung in PM2 DNA durch Acetophenon in Kombination mit (geschlossene Säulen) und ohne CuCl₂ (0,1 mM) (offene Säulen) unter aeroben und anaeroben (100%ige Argonatmosphäre) Bedingungen. Die Versuche wurden in 100 mM NaPO₄-Puffer pH 7,25 durchgeführt und die Proben 1 Stunde bei 37 °C inkubiert.

Wie in Abbildung 40 zu erkennen ist, war die Strangbruchinduktion durch Acetophenon/CuCl₂ sauerstoffunabhängig. Die getesteten Konzentrationen an Acetophenon (5; 10 mM) in Kombination mit CuCl₂ zeigten in Normal- und Argonatmosphäre in etwa die gleiche Strangbruchinduktion.

3.3.2.2 *Cu(I)-Bildung unter anaeroben und aeroben Bedingungen*

Es wurde untersucht, ob Acetophenon unter aeroben und anaeroben Bedingungen in der Lage ist, Cu(II) zu Cu(I) zu reduzieren.

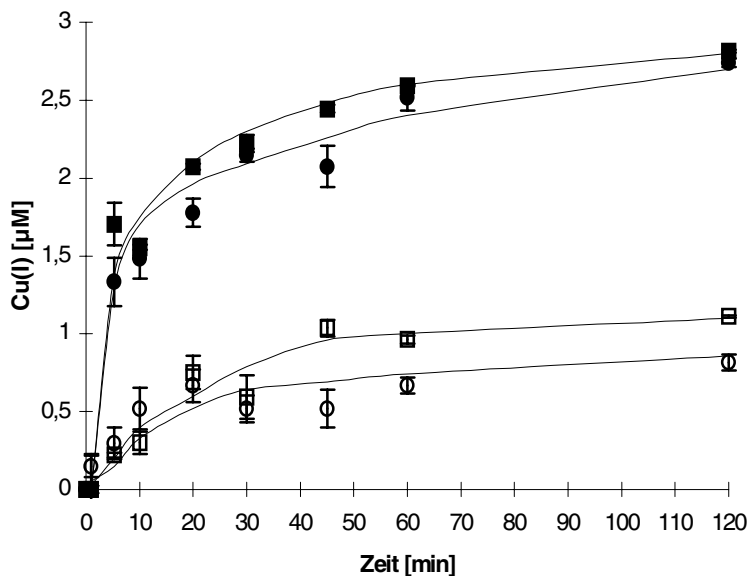


Abb. 41: Cu(I)-Bildung durch die Substanzkombination Acetophenon (10 mM) und CuCl₂ (0,01 mM). Die Messungen geben zum einem den jeweils aktuellen Cu(I)-Gehalt (offene Symbole) zu den Messzeiten, zum anderen die kumulative Bildung von Cu(I) seit Versuchsbeginn in ständiger Anwesenheit von Bathocuproin (0,1 mM) (geschlossene Symbole) wieder. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C in NaPO₄-Puffer (100 mM, pH 7,25) unter aeroben (●, ○) sowie anaeroben (■, □) Bedingungen.

Es zeigte sich, dass in den Proben, die zu den jeweiligen Messzeitpunkten mit BCS versetzt wurden, nur geringe Mengen an Cu(I) ($\leq 1 \mu\text{M}$) gemessen werden konnten, was sich, gemessen am Gesamtkupfergehalt, in einem Umsatz von Cu(II) von ca. 7-8% äußerte. Wurde die kumulative Cu(I)-Produktion über den gesamten Versuchszeitraum bestimmt, so konnte eine kontinuierliche Zunahme des Cu(I)-Gehaltes in den Lösungen gemessen werden, wobei der Cu(I)-Gehalt in den ersten 20 Minuten steil anstieg und der Kurvenverlauf sich danach abflachte. Nach einer Inkubationszeit von 120 Minuten betrug der Cu(I)-Gehalt etwa 2,8 μM . Eine Messung über einen längeren Zeitraum (24 und 48 Stunden) führte zu keiner weiteren Erhöhung des Cu(I)-Gehaltes (Daten nicht gezeigt). Wie in Abbildung 41 zu erkennen, ist die Cu(I)-Bildung sauerstoffunabhängig.

3.3.2.3 *Inhibition der durch Acetophenon/CuCl₂ induzierten Einzelstrangbrüche durch Katalase, DMSO, Batho- und Neocuproin unter aeroben und anaeroben Bedingungen*

Um zu untersuchen, inwieweit das gebildete Cu(I) und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (insbesondere $\cdot\text{OH}$ -Radikale) an der Strangbruchinduktion durch Acetophenon/CuCl₂ beteiligt sind, wurden Versuche mit Neocuproin, Bathocuproin, Katalase, und DMSO zur Strangbruchinhibition unter aeroben und anaeroben Bedingungen durchgeführt.

Tab. 10: Inhibition der durch Acetophenon/CuCl₂ induzierten DNA-Einzelstrangbrüche durch DMSO, Katalase, Bathocuproin oder Neocuproin nach einstündiger Inkubation in NaPO₄-Puffer (100 mM, pH 7,25) unter aeroben und anaeroben Bedingungen. Die Strangbruchinduktion durch Acetophenon/CuCl₂ betrug 2,4 bzw. 1,2 ESB/PM2 DNA-Molekül. Die CuCl₂-Konzentration betrug 0,1 mM. Die Standardabweichung betrug ca. $\pm 5\%$.

Inhibitor	Konzentration	Inhibition (%)	
		aerob	anaerob
DMSO	3 (%)	60	52
	0,1 (%)	52	n.b.
Katalase	35 ($\mu\text{g/ml}$)	95	100
	10 ($\mu\text{g/ml}$)	86	n.b.
BSA	35 ($\mu\text{g/ml}$)	24	-26
	10 ($\mu\text{g/ml}$)	30	n.b.
Bathocuproin	1 (mM)	96	n.b.
	0,4 (mM)	96	n.b.
Neocuproin	0,4 (mM)	93	100

n.b. -nicht bestimmt

In Tabelle 10 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen zusammenfassend dargestellt. Die durch Acetophenon/CuCl₂ induzierte Strangbruchbildung wurde durch Neo- und Bathocuproin nahezu vollständig gehemmt (93 und 96%). Neocuproin bewirkte auch unter anaeroben Verhältnissen eine 100%ige Inhibition. Die Hemmwirkung von Katalase war auch hier überraschender Weise sauerstoffunabhängig. Katalase (35 $\mu\text{g/ml}$) zeigte eine 95%ige (aerob) bzw. 100%ige (anaerob) Inhibition. Auch DMSO (3%) hemmte die Strangbruchbildung zu 60% (aerob) bzw. 52% (anaerob).

3.3.2.4 Nachweis spezifischer reaktiver Intermediate der Acetophenon/CuCl₂-Reaktion

Ob aus der Reaktion Acetophenon/CuCl₂ ein angeregtes Triplettacetophenon entsteht wurde mit Hilfe einer Fluoreszenzmessung überprüft. Es konnten keine angeregten Triplettzustände im Reaktionsgemisch Acetophenon/CuCl₂ nachgewiesen werden. In einem Reaktionsgemisch aus Acetophenon/CuCl₂ und 2-Desoxyguanosin konnte das Hydroxylierungsprodukt 8-Hydroxy-2-desoxyguanosin mittels HPLC-ECD auch nicht nachgewiesen werden. Ebenso konnte ESR-spektroskopisch kein DMPO-•OH-Radikaladdukt detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Das durch Cu²⁺-Ionen erzeugte ESR-Signal (Abb. 42) (0,1 mM CuCl₂ in NaPO₄-Puffer) wurde durch Zugabe von Acetophenon gelöscht.

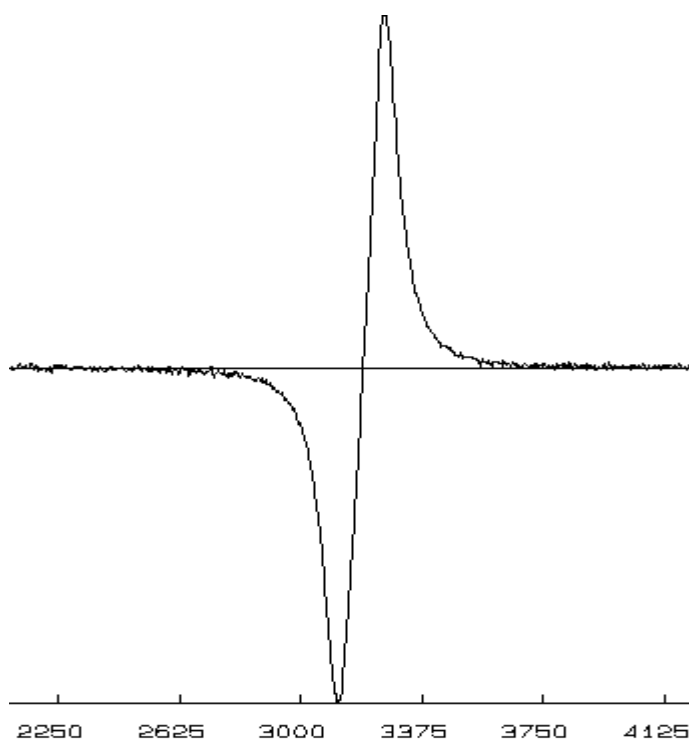


Abb. 42: ESR-Signal des Cu²⁺-Ions in einer Lösung aus 0,1 mM CuCl₂ und 100 mM NaPO₄-Puffer. ESR-Spektrometer-Bedingungen: Mikrowellen-Stärke: 200 mW; Modulations-Amplitude: 5 G; Zeit-Konstante: 200 msec; Scan-Bereich: 3000 G; Scan-Zeit: 5 Minuten.; Verstärkung 5 x 10⁴.

Findet ein Ein-Elektronen-Übergang von Acetophenon auf Cu²⁺ statt, so muss die organische Verbindung zumindest kurzzeitig als Radikal vorliegen. Ohne Zusatz eines Spin-Traps war ein solches Radikal ESR-spektrometrisch nicht nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Es wurde daher untersucht, ob durch Zugabe des Spin-Traps 4-POBN zum Reaktionsansatz Acetophenon/CuCl₂ ein organisches Radikal mit geringer Lebensdauer als stabiles Spin-Addukt abgefangen und ESR-spektrometrisch detektiert werden kann. Wie in Abbildung 43 dargestellt, konnte während der Reaktion von Acetophenon mit CuCl₂ durch den Spin-Trap 4-POBN ein

C-zentriertes-Radikal mit den Kopplungskonstanten $a_H = 2,45$ und $a_N = 15,75$ ESR-spektrometrisch nachgewiesen werden.

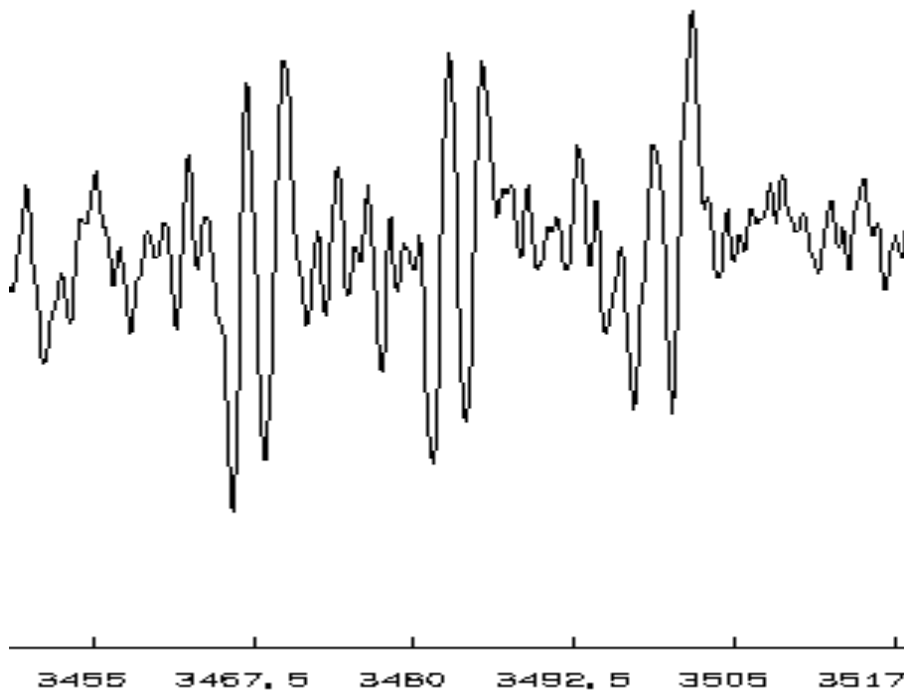


Abb. 43: ESR-Signal eines 4-POBN-Spin-Adduktes aus der Acetophenon/ CuCl_2 -Reaktion, mit den Kopplungskonstanten $a_H = 2,45$ und $a_N = 15,75$. Die ESR-Spektrometer-Bedingungen waren: Mikrowellen-Stärke: 200 mW, Modulationsamplitude: 1G, Zeit-Konstante: 100 msec, Scan-Bereich: 100 G, Scan-Zeit: 120 sec und die Verstärkung betrug 5×10^4 . Es wurden 15 mM Acetophenon mit 0,1 mM CuCl_2 und 240 mM 4-POBN in 100 mM NaPO_4 -Puffer (pH 7,25) für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert.

3.3.3 Untersuchungen zur zytotoxischen Wirkung in Säugerzellkulturen

3.3.3.1 Bestimmung der Akuten Toxizität von Acetophenon / CuCl_2 direkt und 21 Stunden nach der Schadstoffinkubation

Untoxische Konzentrationen an CuCl_2 beeinflussten die akut toxische Wirkung (MTT-Test) von Acetophenon sowohl direkt nach einer einstündigen gemeinsamen Inkubation mit Acetophenon (Abb. 44a) als auch nach einer anschließenden 21-stündigen Erholungsphase (Abb. 44b) in menschlichen Fibroblasten (N57). Die Vitalität humaner Fibroblasten direkt nach der Inkubation mit 17 mM Acetophenon allein wurde um ca. 10% und in Kombination mit CuCl_2 um ca. 30% gehemmt. Morphologisch zeigten die Zellen nur in der höchsten getesteten Konzentration (20 mM) in Kombination mit CuCl_2 Veränderungen. Hier betrug die Hemmung der Vitalität für Acetophenon allein 50% und in Kombination mit CuCl_2 90%. Der EC_{10} -, EC_{30} - und der EC_{50} -Wert bei der direkten Bestimmung der Vitalität für Acetophenon

allein lag bei 17 mM, 18,2 mM und 20 mM und für Acetophenon in Kombination mit CuCl_2 bei 15 mM, 17 mM und 18 mM.

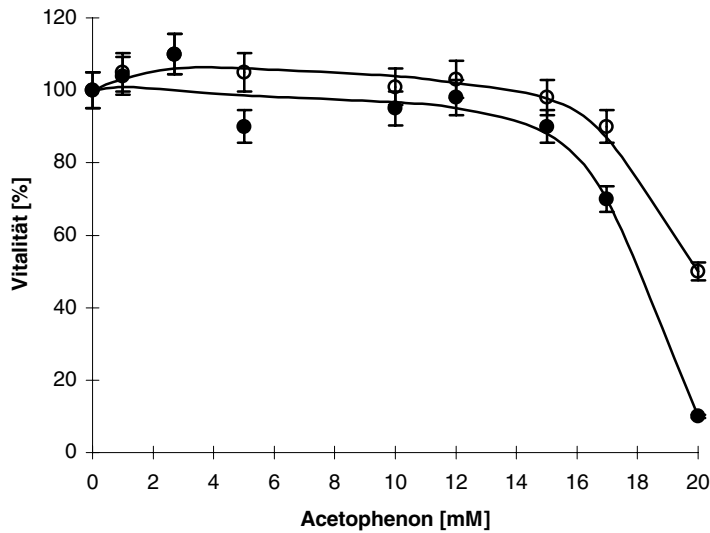


Abb. 44a: Toxizität von Acetophenon in humanen Fibroblasten (N57) nach einstündiger Inkubation mit (●) sowie ohne (○) CuCl_2 (2,5 mM). Die Messungen erfolgten direkt nach der Schadstoffinkubation. Die Behandlung der Fibroblasten nur mit CuCl_2 allein ergab eine Schädigung von 11%.

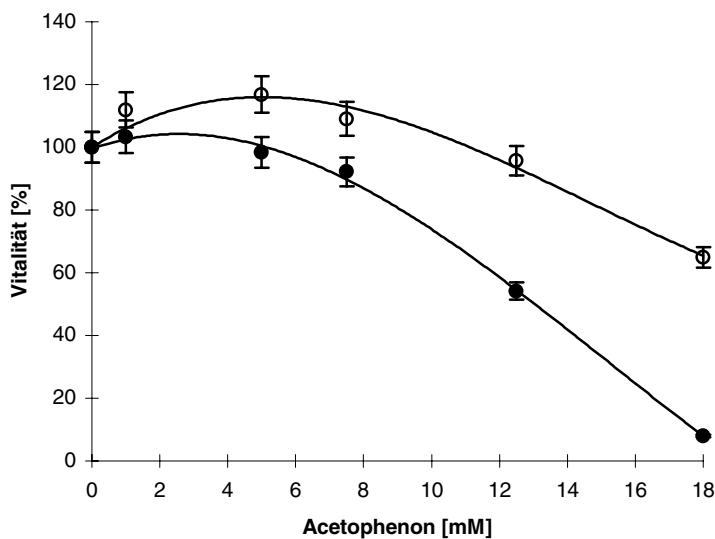


Abb. 44b: Toxizität von Acetophenon in humanen Fibroblasten (N57) nach einstündiger Inkubation mit (●) sowie ohne (○) CuCl_2 (2,5 mM). Die Messungen erfolgten 21 Stunden nach der Schadstoffinkubation. Die Behandlung der Fibroblasten nur mit CuCl_2 allein ergab eine Schädigung von 3%.

Wurden die Zellen nach der Schadstoffbehandlung 21 Stunden in serumhaltigem Medium weiterkultiviert, so verstärkte sich die Toxizität sowohl für Acetophenon allein als auch in Kombination mit CuCl_2 (Abb. 44b). Acetophenon allein wirkte ab 13,8 mM toxisch und die Kombination von Acetophenon/ CuCl_2 ab 7,8 mM. So lag der EC_{10} -, EC_{30} - und der EC_{50} -Wert für Acetophenon allein bei 13,8 mM, 17 mM und >18 mM, für Acetophenon in Kombination mit CuCl_2 hingegen bei 7,4 mM, 10,5 mM und 13,1 mM.

3.3.3.2 Bestimmung der Wachstumshemmung durch Acetophenon/ CuCl_2

Bei der Messung des Zellwachstums konnte auch eine Wirkungsverstärkung durch die Kombination Acetophenon/ CuCl_2 nachgewiesen werden (Abb. 45).

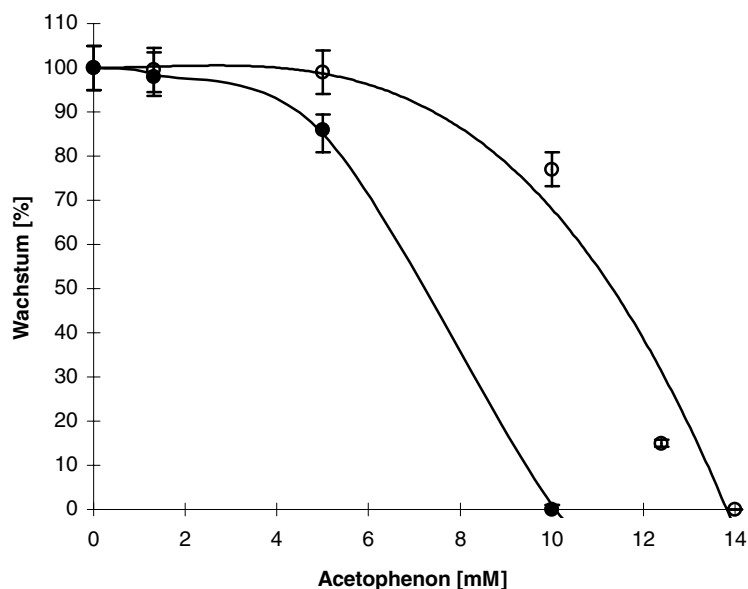


Abb. 45: Wachstumshemmung humaner Fibroblasten (N57) nach 1,5-stündiger Vorinkubation mit (●) bzw. ohne (○) CuCl_2 (2,5 mM) und anschließender einstündiger Inkubation mit Acetophenon. Die Messungen erfolgten 48 Stunden nach der Schadstoffinkubation, in der logarithmischen Wachstumsphase. Die Behandlung der Fibroblasten nur mit CuCl_2 ergab eine Wachstumshemmung von 5%.

Wie in Abbildung 45 zu erkennen lag der EC_{10} -, EC_{30} - und der EC_{50} -Wert für Acetophenon allein bei 7,5 mM, 10 mM und 11,4 mM, für Acetophenon in Kombination mit CuCl_2 hingegen bei 4,6 mM, 6,1 mM und 7,3 mM.

3.3.3.3 Bestimmung der Hemmung der Koloniebildungsfähigkeit durch Acetophenon/ CuCl_2

Die Kombination von Acetophenon mit CuCl_2 hemmte die Koloniebildungsfähigkeit unter allen getesteten Versuchsbedingungen (Abb. 46a-c) stärker als Acetophenon allein.

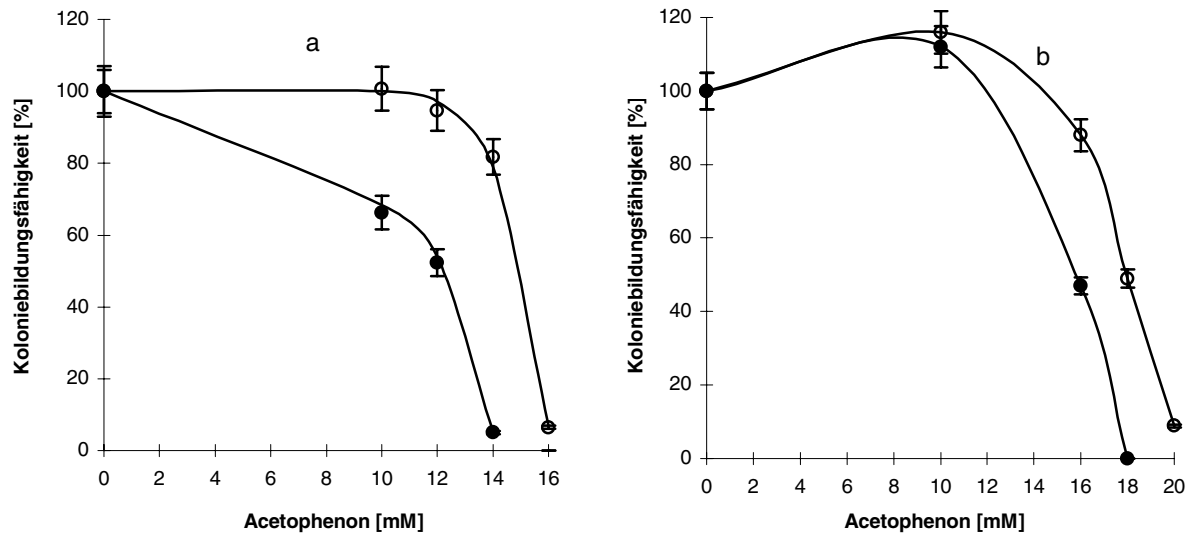


Abb. 46: Hemmung der Koloniebildungsfähigkeit von V79 Zellen nach einer gleichzeitigen einstündigen Inkubation der Zellen mit Acetophenon/CuCl₂ (a) bzw. nach einer 1,5-stündigen Vorinkubation mit CuCl₂ und anschließender Inkubation mit Acetophenon (b). Geschlossene Symbole (●) mit CuCl₂ und offene Symbole (○) ohne CuCl₂. Die Messungen erfolgten 6 Tage nach Aussaat der Kolonien. Die Behandlung nur mit CuCl₂ (2,5 mM) hatte keinen Einfluss auf die Koloniebildungsfähigkeit der Zellen.

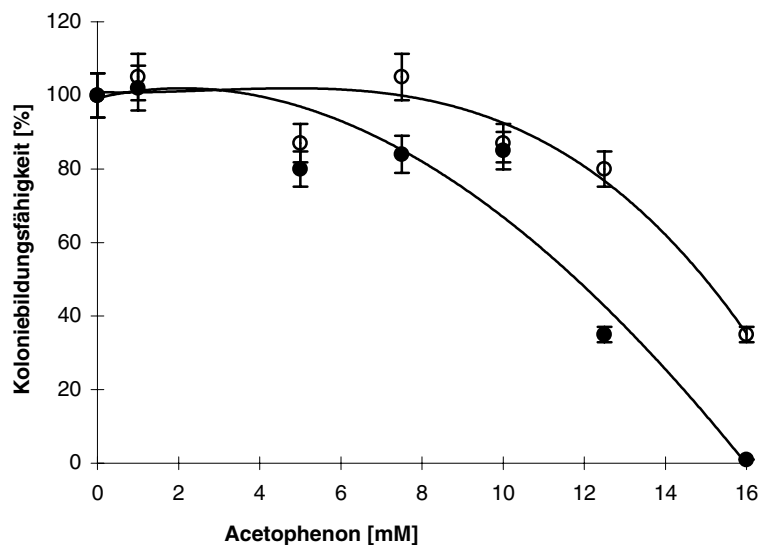


Abb. 46c: Koloniebildungsfähigkeit menschlicher Fibroblasten (N57) nach 1,5-stündiger Vorinkubation der Zellen mit (●) sowie ohne (○) CuCl₂ (2,5 mM) und anschließender Inkubation mit Acetophenon (0-20 mM). Die Messungen erfolgten 12 Tage nach Aussaat der Kolonien. Die Behandlung der Fibroblasten nur mit CuCl₂ (2,5 mM) hatte keinen Einfluss auf die Koloniebildungsfähigkeit der Zellen.

Ein Vergleich von Abbildung 46a mit Abbildung 46b zeigt, dass die V79 Zellen bei einer gleichzeitigen einstündigen Inkubation mit den Schadstoffen (46a) eine höhere Empfindlichkeit aufwiesen, als bei einer neunzigminütigen Vorinkubation mit CuCl₂ und einer einstündigen Nachinkubation mit Acetophenon (Abb. 48b). So betragen die EC₁₀-, EC₃₀- und EC₅₀-

Werte bei einer gleichzeitigen Inkubation für Acetophenon allein 13, 14,3 und 15 mM und für Acetophenon/CuCl₂ 2,9, 9,4 und 12,2 mM. Die Normalfibroblasten (N57) (Abb. 46c) reagierten unter gleichen Versuchsbedingungen (eine neunzigminütige Vorinkubation mit CuCl₂ und eine anschließende einstündige Inkubation mit Acetophenon) empfindlicher als die V79 Zellen (Abb. 46b). Dies traf sowohl für die Einzelwirkung als auch für die Kombinationswirkung zu. So betragen die EC₁₀-, EC₃₀- und EC₅₀-Werte für Acetophenon allein bei N57 10,6, 13,2 und 15 mM, bei V79 15,5, 17,6 und 18,6 mM, für die Kombinationswirkung bei N57 6,6, 9,5 und 12 mM, bei V79 13,1, 14,8 und 16 mM.

3.3.4 Untersuchungen zur gentoxischen Wirkung in Säugerzellkulturen

3.3.4.1 *Bestimmung der Induktion intrazellulärer DNA-Strangbrüche durch Acetophenon /CuCl₂*

3.3.4.1.1 DNA-Strangbruchnachweis mit Hilfe der Alkalischen Elution

Mit Hilfe der Alkalischen Elution konnte eine Strangbruchinduktion durch Acetophenon/CuCl₂ nachgewiesen werden, während weder CuCl₂ allein noch Acetophenon allein effektiv waren. Acetophenon/CuCl₂ erzeugte Strangbrüche in menschlichen Fibroblasten sowohl wenn die Zellen gleichzeitig (Abb. 47a) als auch wenn sie sequenziell (Abb. 47b) mit den Schadstoffen inkubiert wurden. Die Strangbruchinduktion war jedoch im Fall der sequenziell erfolgten Inkubation mit den Substanzen etwas höher.

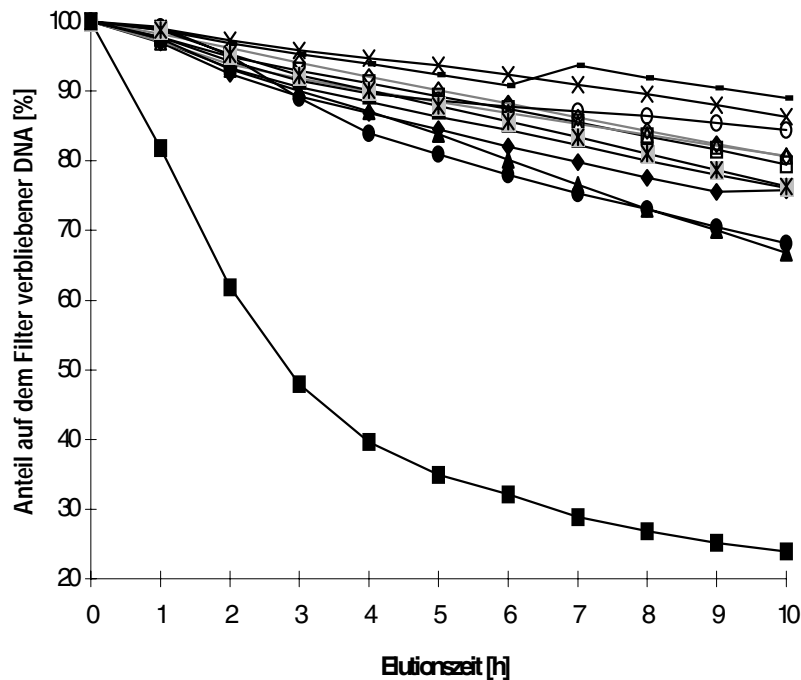


Abb. 47a: Profil der Alkalischen Elution von DNA aus mit Acetophenon bzw. Acetophenon/CuCl₂ inkubierten humanen Fibroblasten (N57). Die Zellen wurden für 1 Stunde mit verschiedenen Acetophenon-Konzentrationen in Kombination mit 2,5 mM CuCl₂ (geschlossene Symbole) bzw. ohne CuCl₂ (offene Symbole) inkubiert. Die Auftragung auf die Filter erfolgte direkt nach der Schadstoffbehandlung. (—) unbehandelte DNA; (x) 2,5 mM CuCl₂; () 8 mM Acetophenon; (—) 8 mM Acetophenon + 2,5 mM CuCl₂; (∅) 10 mM Acetophenon; (◆) 10 mM Acetophenon + 2,5 mM CuCl₂; (Δ) 14 mM Acetophenon; (▲) 14 mM Acetophenon + 2,5 mM CuCl₂; (O) 16 mM Acetophenon; (●) 16 mM Acetophenon + 2,5 mM CuCl₂; (*) 18 mM Acetophenon; (■) 18 mM Acetophenon + 2,5 mM CuCl₂.

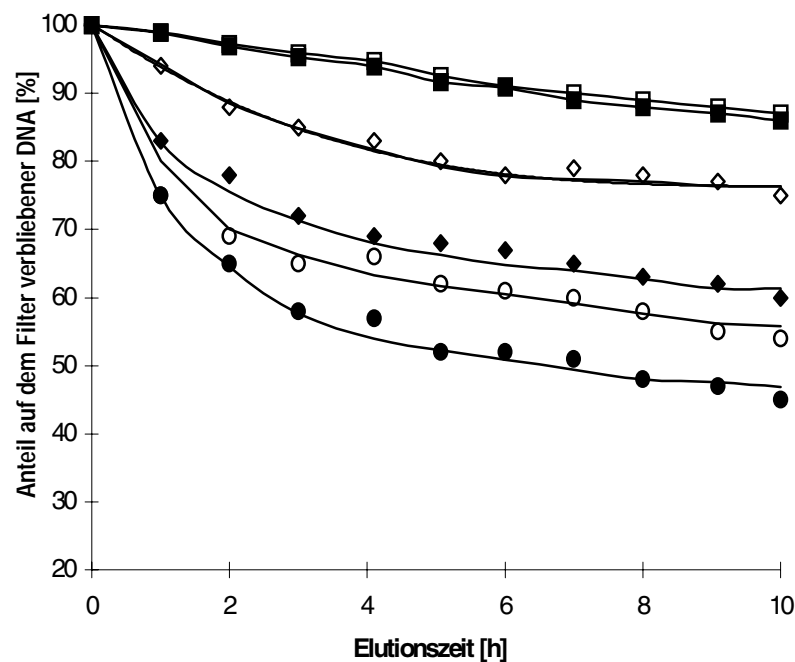


Abb. 47b: Profil der Alkalischen Elution von DNA aus humanen Fibroblasten (N57), die 1,5 Stunden mit (geschlossene Symbole) bzw. ohne (2,5 mM) CuCl₂ (offene Symbole) und anschließend 1 Stunde mit 0 mM (□, ■), 12,5 mM (∅, ◆) und 15 mM (O, ●) Acetophenon nachinkubiert wurden. Die Auftragung auf die Filter erfolgte direkt nach der Schadstoffbehandlung.

Es konnte weder eine DNA-DNA-Crosslink- noch eine DNA-Protein-Crosslink-Bildung durch Acetophenon/CuCl₂ nachgewiesen werden. Dies zeigte sich darin, dass Acetophenon/CuCl₂ keinen Einfluss auf die durch MMS induzierten Strangbrüche in menschlichen Fibroblasten hatte. Der Zusatz von Proteinase K zur Acetophenon/CuCl₂ behandelten DNA zeigte ebenfalls keine Beeinflussung der Elutionsrate.

3.3.4.1.2 DNA-Strangbruchnachweis mit Hilfe des Kometen-Assays

Die gentoxische Wirkung von Acetophenon allein und in Kombination mit CuCl₂ wurde ebenfalls mit Hilfe des Kometen-Assays untersucht. Hierzu wurden die Zellen mit bzw. ohne CuCl₂ vorinkubiert und anschließend mit Acetophenon versetzt. Es konnte festgestellt werden, dass CuCl₂ keine und Acetophenon allein ab ca. 15 mM (tail moment= 5) gentoxische Effekte zeigte (Abb. 48).

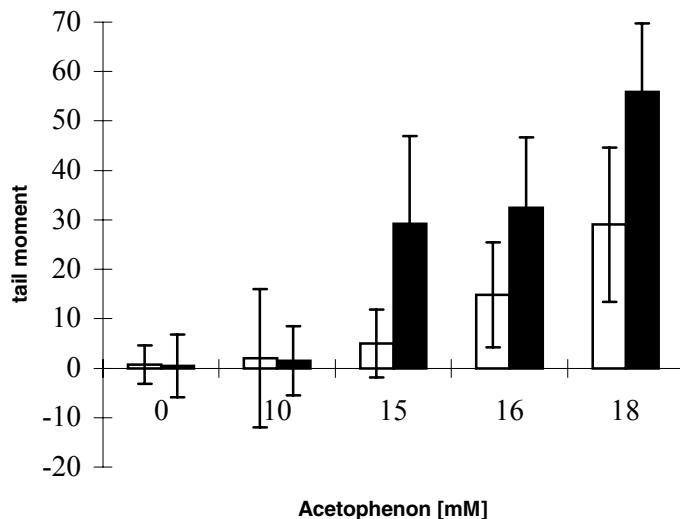


Abb. 48: Darstellung der Kometenbildung nach Behandlung humaner Fibroblasten (N57) mit CuCl₂ (2,5 mM) und Acetophenon. Die Zellen wurden 1,5 Stunden mit (geschlossene Symbole) bzw. ohne CuCl₂ (offene Symbole) vorinkubiert und anschließend 1 Stunde mit 0-18 mM Acetophenon nachinkubiert.

In Kombination mit 2,5 mM CuCl₂ wurde die gentoxische Wirkung von Acetophenon deutlich erhöht. Dies wurde bei den höheren eingesetzten Acetophenon-Konzentrationen von 15, 16 und 18 mM deutlich, wo das *tail moment* für Acetophenon allein 5; 15 und 30 betrug und für die Kombination 29; 32 und 56. Der Anteil nicht auswertbarer Zellen bei 18 mM Acetophenon allein betrug ca. 9% und in Kombination mit CuCl₂ 41%.

3.3.4.2 Bestimmung der Induktion der DNA-Reparatur durch Acetophenon /CuCl₂

3.3.4.2.1 Nachweis der DNA-Reparatur über die Alkalische Elution

Der Nachweis der DNA-Reparatur über die Methode der Alkalischen Elution erfolgte, indem die Elutionsrate zu verschiedenen Zeiten nach Schadstoffbehandlung bestimmt wurde. Die Ergebnisse sind in Abbildung 49 dargestellt.

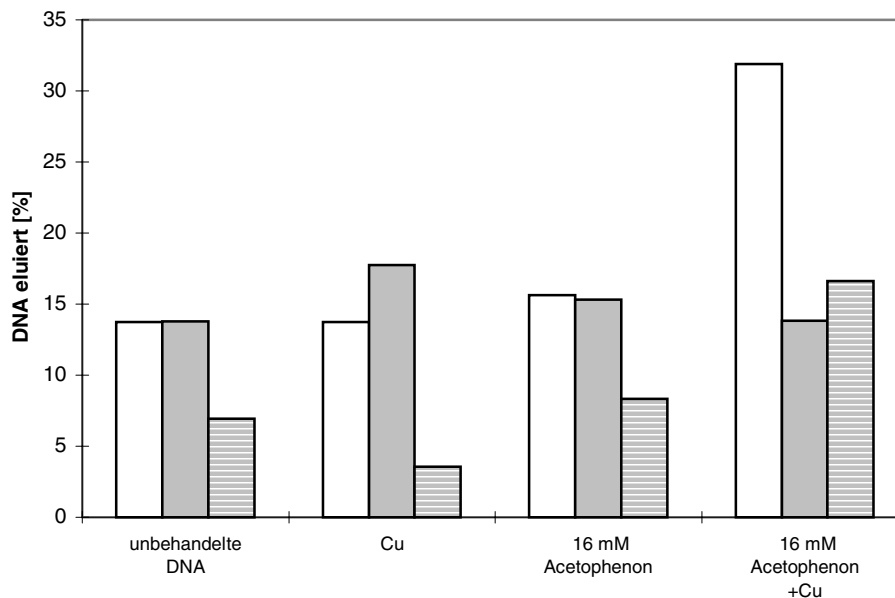


Abb. 49: Elution der DNA aus humanen Fibroblasten (N57), die 1 Stunde mit bzw. ohne (2,5 mM) CuCl₂ in Kombination mit Acetophenon (16 mM) behandelt wurden. Die Messung der Elution erfolgte zu verschiedenen Zeiten nach der Behandlung der Zellen mit den Schadstoffen. Die Zellen wurden direkt (offene Säulen) auf die Filter aufgetragen bzw. 24 Stunden (geschlossene Säulen) oder 48 Stunden (gemusterte Säulen) vor der Auftragung in Medium weiterinkubiert. Dargestellt ist die eluierte DNA (%) nach zehnstündiger Elutionszeit.

Die durch Acetophenon/CuCl₂ induzierten Strangbrüche wurden nach 24 Stunden um die Hälfte reduziert, eine weitere Reduktion nach 48 Stunden wurde nicht beobachtet.

3.3.4.2.2 Nachweis der DNA-Reparatur über die UDS

Wie in Tabelle 11 dargestellt, konnte weder für Acetophenon allein noch für Acetophenon in Kombination mit CuCl₂ eine UDS im Sinne der OECD-Richtlinien (OECD, 1986) nachgewiesen werden. Auch bei gleichzeitiger einstündiger Inkubation von Acetophenon und CuCl₂ konnte keine UDS gemessen werden (Daten nicht gezeigt).

Tab. 11: Induktion der DNA-Exzisionsreparatur (UDS) in menschlichen Fibroblasten (N57) durch Acetophenon mit und ohne neunzigminütiger CuCl₂-Vorinkubation (2,5 mM). Die dargestellten Werte stellen den Mittelwert der Nettosilberkörnchen aus jeweils 50 ausgezählten Zellen \pm der Standardabweichung dar.

Acetophenon [mM]	ohne CuCl ₂		mit CuCl ₂	
	NG	\pm SD	NG	\pm SD
0	-0,44	1,77	-0,38	2,49
1	-0,86	2,0	0,12	1,66
2,5	0,12	3,71	-0,5	1,92
5	-0,94	1,83	-0,16	1,82
7,5	-0,14	1,25	-0,06	3,36
10	-0,44	1,76	0,16	1,58
12,5	-0,12	2,1	-0,34	1,85
15	-0,02	2,44	-0,26	1,01
16	-0,36	1,95	0,14	1,58
18	-0,16	2,87	-0,12	1,51
UV-Kontrolle [5,5 J/m ²]	28,02	\pm 9,22		

3.3.4.2.3 Untersuchungen zur Hemmung der DNA-Reparatur

Um zu überprüfen, ob die Ursache für die nicht nachweisbare UDS eine Hemmung der DNA-Exzisionsreparatur durch Acetophenon oder Acetophenon/CuCl₂ ist, wurden Untersuchungen zur Hemmung der DNA-Reparatur von UV- und MMS-induzierten DNA-Schäden durchgeführt. Wie in Tabelle 12 zusammenfassend dargestellt wurde die UV-induzierte DNA-Reparatur weder durch Acetophenon allein noch durch Acetophenon/CuCl₂ signifikant gehemmt. Auch bei den Untersuchungen zur Hemmung der MMS-induzierten DNA-Reparatur (Tab. 13) ergab sich kein Hinweis auf eine signifikante Hemmung durch Acetophenon bzw. Acetophenon/CuCl₂.

Tab. 12: Beeinflussung der durch UV-Licht ($5,5 \text{ J/m}^2$) induzierten DNA-Reparatur durch Acetophenon bzw. Acetophenon/ CuCl_2 . Die Bestimmung erfolgte über die Methode der UDS. Humane Fibroblasten (N57) wurden zunächst mit UV-Licht bestrahlt, 1,5 Stunden mit bzw. ohne 2,5 mM CuCl_2 inkubiert und anschließend 1 Stunde mit unterschiedlichen Konzentrationen an Acetophenon bzw. serumfreiem Medium behandelt. Der Anteil reparierender Zellen lag bei 100%. Die dargestellten Werte stellen den Mittelwert der Nettosilberkörnchen aus jeweils 50 ausgezählten Zellen \pm der Standardabweichung dar.

UV induzierte DNA Reparatur						
Acetophenon [mM]	ohne CuCl_2			mit CuCl_2		
	NG	\pm SD	DNA-REP. [%]	NG	\pm SD	DNA-REP. [%]
0	45,16	13,52	100	47,86	12,30	100
5	40,10	15,92	89	54,42	12,27	114
10	33,36	12,48	74	38,34	11,41	80
15	41,48	16,47	92	42	12,62	88

Tab. 13: Beeinflussung der MMS-induzierten DNA-Reparatur [%] durch Acetophenon bzw. Acetophenon/ CuCl_2 . Die Bestimmung erfolgte über die Methode der UDS. Humane Fibroblasten wurden zunächst 20 Minuten mit MMS (5 mM) inkubiert, 1,5 Stunden mit bzw. ohne CuCl_2 (2,5 mM) inkubiert und anschließend 1 Stunde mit unterschiedlichen Konzentrationen an Acetophenon (0-15 mM) behandelt. Die dargestellten Werte stellen den Mittelwert der Nettosilberkörnchen aus jeweils 50 ausgezählten Zellen \pm der Standardabweichung dar.

MMS induzierte DNA-Reparatur						
Acetophenon [mM]	ohne CuCl_2			mit CuCl_2		
	NG	\pm SD	DNA-REP. [%]	NG	\pm SD	DNA-REP. [%]
0	20,64	5,18	100	22,18	9,12	100
2	17,75	6,32	86	19,07	7,45	86
4	13,94	4,73	68	25,66	8,52	116
6	19,78	5,02	96	24,61	7,54	111
8	21,33	8,33	103	17,93	5,17	81
10	19,81	5,38	96	22,44	9,11	101
12,5	21,76	8,91	105*	21,67	9,95	98
15	15,76	5,83	76*	14,43	5,93	65

In der Regel befanden sich 100% der Zellen in Reparatur, (*) 98% der Zellen in Reparatur

3.3.4.3 Induktion von Mutationen im HPRT-Test durch Acetophenon /CuCl₂

Mit Hilfe des HPRT-Tests (V79 Zellen) wurde untersucht, ob Acetophenon bzw. Acetophenon/CuCl₂ Mutationen verursacht. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 50 dargestellt.

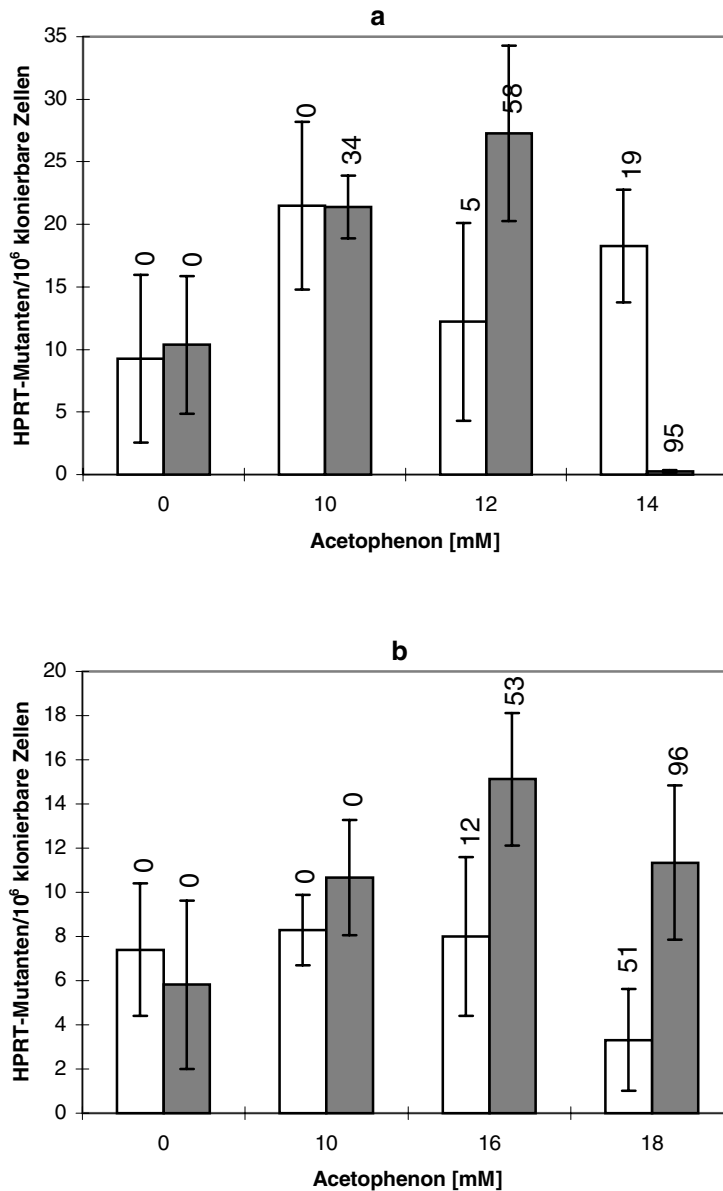


Abb. 50: Mutationsfrequenz von V79 Zellen nach Behandlung mit Acetophenon in Kombination mit (geschlossene Säulen) und ohne (offene Säulen) CuCl₂ (2,5 mM). Die Zellen wurden gleichzeitig (a) für 1 Stunde mit Acetophenon (0-14 mM) und CuCl₂ bzw. zunächst 1,5 Stunden mit bzw. ohne CuCl₂ vorinkubiert und anschließend 1 Stunde mit verschiedenen Acetophenon-Konzentrationen (0-18 mM) nachinkubiert (b). Die Mutagenitätsdaten wurden aus 5×10^5 Zellen/Dosis gewonnen. Die Expressionszeit betrug 7 Tage, die Selektionszeit betrug 8 Tage. Die Mutagenitätsfrequenz der Positivkontrolle lag bei (a) bei 221 und bei (b) bei 147. Die Zahlen über den Säulen geben die Hemmung der Koloniebildungsfähigkeit an.

Wie Abbildung 50 zeigt, ergab sich sowohl bei gleichzeitiger (Abb. 50a) als auch bei sequenzieller Behandlung (Abb. 50b) der Zellen mit Acetophenon und CuCl_2 ein ähnliches Bild. In beiden Fällen erreichte die Kombination bei 12 bzw. 16 mM Acetophenon knapp den dreifachen Wert der Kontrolle und somit einen positiven Befund.

4. DISKUSSION

In dieser Arbeit wurden die zyto- und gentoxischen Eigenschaften von Benzaldehyd, p-Anisaldehyd und Acetophenon und ihrer Kombination mit Cu(II) untersucht und näher charakterisiert. Die gentoxischen Wirkungen von Kupferionen wurden bislang hauptsächlich hinsichtlich ihrer Redoxreaktionen mit O₂ und reduzierenden O₂-Spezies untersucht (s. Einleitung Gleichung I-IV). Die Initiationsreaktion von Carbonylverbindungen (für Aldehyde s. Einleitung Gleichung V) durch redoxaktives Kupfer und weitere mögliche, noch zu diskutierende, Folgereaktionen können zu Radikalkettenreaktionen führen, in denen es neben der Bildung von ROS auch zur Bildung reaktiver Carbonylverbindungen kommt. Daher dürfen bei einer gesamttoxikologischen Beurteilung nicht nur die ROS betrachtet werden, sondern es muss auch die Bedeutung der reaktiven organischen Spezies erfasst werden. Dies ist von besonderem Interesse, da sowohl Aldehyde und Ketone als auch ROS Produkte des normalen Stoffwechsels darstellen (Ceruti, 1985; Halliwell und Gutteridge, 1989; Feron *et al.*, 1991; Sies, 1991; Davies, 1995). In Zellen sind sowohl spezifische Schutz- bzw. Detoxifizierungsmechanismen gegen die Wirkung von Carbonylverbindungen als auch gegen die Wirkung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zu finden, wobei die Schutzmechanismen gegenüber radikalischen und anderen reaktiven C-zentrierten Spezies weniger gut bekannt sind. In dieses Verteidigungssystem sind sowohl enzymatische Aktivitäten, wie Glutathionperoxidase, Superoxiddismutase und Katalase als auch nicht enzymatische Prozesse, wie die Aktivität von Antioxidantien wie z.B. Glutathion, Vitamin C und E involviert (Clark *et al.*, 1986; Vuillaume, 1987; Scandalios, 1990). Die Schutzmechanismen gegenüber ROS werden von Riley (1994) folgendermaßen zusammengefasst: intrazelluläre Kompartimentierung; Bindung von Übergangsmetallen an Proteine (z.B. Ferritin od. Metallothionein); Besitz von Radikalfängern wie Thiolen, die [•]OH-Radikale mit einer hohen Reaktionsrate umsetzen (z.B. Glutathion); Besitz von Antioxidantien, die radikalische Kettenreaktionen beenden (z.B. Ascorbinsäure und α -Tocopherol); Detoxifizierung von ROS über enzymatische Reaktionen (z.B. Superoxiddismutase ($2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$) in Kombination mit Katalase ($2H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_2$) und Peroxidasen ($SH_2 + H_2O_2 \rightarrow S + 2H_2O$)); Inhibition bestimmter Prozesse (z.B. DNA-Replikation); Reparatur von DNA-Schäden und Initiation von Apoptose. Aromatische und aliphatische Aldehyde können beispielsweise durch enzymatische Prozesse unter Beteiligung von Aldehyddehydrogenasen (ALDH) detoxifiziert werden (Sladek *et al.*, 1989). Wie Untersuchungen zur subzellulären Verteilung der ALDH in Hepatozyten zeigen, ist die ALDH

in erster Linie als membrangebundenes Enzym des endoplasmatischen Retikulums und der Mitochondrien, sowie in geringerer Konzentration als zytosolisches Enzym aktiv (Tottmar *et al.*, 1973; Lindahl und Evces, 1984; Senior und Tsai, 1988). Nach Martini und Murray (1996) orientiert sich die Substratspezifität der ALDH vorwiegend an der aldehydischen Carbonylgruppe. Sowohl aliphatische als auch aromatische Aldehyde wurden durch mikrosomale ALDH (mALDH) aus Rattenleber vorwiegend an der aldehydischen Carbonylgruppe zur korrespondierenden Säure umgesetzt, wobei die Umsetzung aromatischer Aldehyde weniger effizient war als die aliphatischer Aldehyde. So wurde Benzaldehyd nach Martini und Murray (1996) nur sehr schwach umgesetzt, was von Rietveld *et al.* (1987) unter anderem auf die relative Lipophilie ($\log P_{OW}$ 1,48) von Benzaldehyd zurückgeführt wird. Für Benzaldehyd wurde ein K_m -Wert von 2911 μM und ein V_{max} von 19,4 $\text{nmol NADH min}^{-1} (\mu\text{g Protein})^{-1}$ bestimmt. *p*-Anisaldehyd hingegen wird durch die mALDH effizienter umgesetzt, der K_m -Wert betrug 856 μM und V_{max} betrug 4,63 $\text{nmol NADH min}^{-1} (\mu\text{g Protein})^{-1}$ (Martini und Murray, 1996). Zur Detoxifizierung von Acetophenon wurde in Ratten die Umsetzung zu Mandelsäure und Benzoesäure beschrieben (Vaz und Coon, 1987).

Durch Aufnahme der zu testenden Substanz in die Zelle kann sowohl die Zellmembran als auch die Substanz selbst derart modifiziert werden, dass die Toxizität verstärkt oder gehemmt wird. Freie Radikale können DNA-Schäden, Lipidperoxidation und oxidative Modifikationen an Proteinen verursachen (Cross *et al.*, 1987; Ames und Saul, 1987; Trush und Kensler, 1991; de Groot, 1994; Davies, 1995). In toxikologischen Zellkulturuntersuchungen werden, im Gegensatz zu Untersuchungen mit isolierten Zellkompartimenten, Aspekte der De- bzw. Toxifizierung erfasst, während Untersuchungen an isolierten Zellkompartimenten wie hier an isolierter PM2 DNA Rückschlüsse auf den Reaktionsmechanismus Aldehyd/Cu(II) bzw. Keton/Cu(II) ermöglichen. Dabei spielen die Versuchsbedingungen eine entscheidende Rolle, so können z.B. unterschiedliche Kombinationswirkungen erwartet werden, wenn Kupfer und Aldehyd bzw. Keton gleichzeitig vorliegen oder das zu testende Target (hier isolierte PM2 DNA oder Zellkulturen) zunächst dem Kupfer und nachfolgend der Carbonylverbindung ausgesetzt wird. Um ebenfalls unterschiedliche Sensitivitäten den Testsubstanzen gegenüber zu erfassen, wurden bei den Untersuchungen in Zellkultur zwei verschiedene Zelllinien, eine primäre (N57) und eine permanente (V79) Zelllinie verwendet.

Die Wirkung von Benzaldehyd/Cu(II), p-Anisaldehyd/Cu(II) und Acetophenon/Cu(II) wird aufgrund der Unterschiede nacheinander diskutiert.

4.1 Kombinationswirkung von Benzaldehyd/Cu(II)

4.1.1 Charakterisierung der DNA-Strangbruchinduktion durch Benzaldehyd/Cu(II) in PM2 DNA

Die Einzelsubstanz Benzaldehyd zeigte im untersuchten Konzentrationsbereich nur eine geringe Einzelstrangbruchinduktion von max. $\leq 0,3$ ESB/PM2 DNA-Molekül. CuCl₂ allein zeigte eine ESB-Induktion von $\leq 0,1$, die konzentrationsunabhängig war. Bei der Kombination beider Reaktionspartner konnte eine konzentrationsabhängige strangbrechende Wirkung beobachtet werden, wobei neben ESB auch DSB nachgewiesen wurden. Die Ergebnisse der Kombinationswirkung von Benzaldehyd/Cu(II) sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Steigende Cu(II)-Konzentrationen in Kombination mit konstanten Benzaldehyd-Konzentrationen zeigten ein Cu(II)-Optimum, sowohl bei der ESB- als auch bei der DSB-Induktion (Abb. 3, 5). Die maximale strangbrechende Wirkung von Benzaldehyd in Kombination mit Cu(II) wurde in Tris•HCl-Puffer in einem Cu(II)-Konzentrationsbereich von 0,5-1,5 mM beobachtet. Die vergleichsweise geringe Strangbruchinduktion der in Vorversuchen getesteten Strukturanaloga (s.Abb. 2) ist in diesem Zusammenhang eventuell darauf zurückzuführen, dass diese in Kombination mit CuCl₂ nicht im optimalen Kupferkonzentrationsbereich getestet wurden. „Metall-Optima“ wurden auch von Bawn *et al.* (1956) bei der Initiation von Radikalketten mit Cu(II) unter unphysiologischen Bedingungen beschrieben. Im physiologischen Milieu wurde von Yang und Schaich (1996) ein Eisenoptimum für die DNA-Schädigung durch Lipidhydroperoxide beobachtet. Die hier beschriebenen Untersuchungen mit Benzaldehyd und p-Anisaldehyd und Untersuchungen mit aliphatischen Aldehyden (Becker *et al.*, 1996; 1998; Tünnemann, 1997) zeigen die Ausbildung eines Cu(II)-Optimums unter physiologischen Bedingungen (pH 7,25) und deuten auf eine große Variabilität der optimalen Cu(II)-Konzentration hin. Die Ursache für die Ausbildung eines Cu(II)-Optimums könnte u.a. in den Cu(II)-Komplexierungseigenschaften der verwendeten DNA und der Affinität von Benzaldehyd zu Cu(II) vermutet werden.

Tab. 14: Zusammenfassende Darstellung der *in vitro* Untersuchungen mit PM2 DNA sowie weiterer mechanistischer Aspekte zur Substanzkombination Benzaldehyd/Cu(II)

Untersuchte Parameter		Effekt
DNA-Schäden	Cu(II)-Optimum	+
	ESB-Induktion	+
	DSB-Induktion	+
	Vergleich der DNA-Strangbruchinduktion in verschiedenen Puffern	Tris < NaPO ₄
	AP-Stellen	-/(+)
Inhibition der DNA-Strangbrüche	Katalase	++
	DMSO	+
	Batho-/Neocuproin	+++
weitere Untersuchungen zum Mechanismus	Strangbruchinduktion unter anaeroben Bedingungen	-
	Cu(I)-Produktion (aerob)	+
	Cu(I)-Produktion (anaerob)	+
	Weiterreaktion von Cu(I) (aerob)/(anaerob)	+/+
	Nachweis von 8-OHdG	-
	Radikalnachweis (ESR) DMPO 4-POBN	- - -

-= negativer Effekt, (+)= schwach positiver Effekt, += positiver Effekt, ++= deutlich positiver Effekt, +++= stark positiver Effekt

Kupferionen komplexieren mit hoher Affinität in und an der DNA (Prasal, 1986; Sagripanti und Kraemer, 1989). Die Stabilitätskonstanten für verschiedene Cu(II)/DNA-Komplexe (z.B. bei Cytidin-monophosphat $7 \times 10^2 \text{M}^{-1}$, (Siegel, 1989) bzw. $2,4 \times 10^4 \text{M}^{-1}$ für doppelsträngige DNA (Sagripanti *et al.*, 1991)) zeigen, dass Cu(II) bevorzugt an den DNA-Basen komplexiert. Wobei Cu(II), aufgrund der starken Elektronegativität von Guaninresten bevorzugt zwischen Guanin-Cytosin Basenpaaren (Zimmer *et al.*, 1971, Pezzano und Podo, 1980, Prasal, 1986; Tajmir-Riahi *et al.*, 1988; Agarwal *et al.*, 1989) oder zwischen aufeinanderfolgenden Guaninresten eines Stranges (Prasal, 1986; Sagripanti *et al.* 1991) komplexiert. Da Kupfer auch in DNA-komplexierter Form redoxaktiv vorliegt (Goldstein und Czapski, 1986; Chevion, 1988) ist die Komplexbildung der Kupferionen an und in der DNA (Prasal, 1986) für die Bildung von Strangbrüchen von entscheidender Bedeutung (Goldstein *et al.*, 1993; Lloyd und Phillips, 1999). Zum Beispiel $\cdot\text{OH}$ -Radikale mit einer biologischen Halbwertszeit von

10^{-9} sec (Sies, 1992) und einer Reichweite von <100 nm (Slater, 1976) sind sehr kurzlebige reaktive Radikale. Die Bildung in unmittelbarer Nähe zur DNA ist für eine durch kurzlebige Radikale verursachte DNA-Schädigung notwendig. Eine maximale Strangbruchinduktion wird dadurch erst bei Sättigung der DNA mit Cu(II) möglich. Findet darüber hinaus eine Erhöhung der Kupferkonzentration statt, so entfernt sich der Benzaldehyd/Cu(II) Reaktionsort von der DNA, eine Reduzierung der DNA-Strangbrüche ist die Folge. Hierfür spricht sowohl das Auftreten eines „Cu(II)-Optimums“ unabhängig von der Benzaldehyd-Konzentration, als auch die unterschiedlichen „Cu(II)-Optima“ von Benzaldehyd mit verschiedenen DNA-Chargen (Daten nicht gezeigt), welche aufgrund unterschiedlicher Konzentrationen an Metallionen auch unterschiedliche Cu(II)-Komplexierungskapazitäten aufweisen. Dieses Modell der Cu(II)-Sättigung der DNA kann jedoch nur eine teilweise Erklärung für den beobachteten Effekt der Bildung von „Cu(II)-Optima“ sein. Fragen zu den unterschiedlichen „Cu(II)-Optima“ verschiedener Aldehyde bleiben offen. Sicherlich spielen dabei die Cu(II)-Komplexierungseigenschaften der verschiedenen Carbonylverbindungen und ihrer Produkte eine entscheidende Rolle. Als gesichert kann gelten, dass zur maximalen DNA-Schädigung mit Benzaldehyd Cu(II)-Konzentrationen benötigt werden, die nicht mehr als katalytisch bezeichnet werden können.

Im Kupferoptimum wurden durch Benzaldehyd/Cu(II) neben Einzelstrangbrüchen auch Doppelstrangbrüche induziert (Abb. 5, 6). Für die Zelle sind Doppelstrangbrüche häufig als letale Ereignisse anzusehen, da sie oftmals nicht oder nur fehlerhaft repariert werden (Phillips und Morgan, 1993). Das Auftreten von Doppelstrangbrüchen kann bei der untersuchten Substanzkombination nicht als Folge einer zufälligen Verteilung von Einzelstrangbrüchen erklärt werden. PM2 DNA hat ein Molekulargewicht von ca. 6×10^6 Dalton und eine entsprechende Größe von ca. 10000 Basenpaaren (Espejo *et al.*, 1969). Ein Doppelstrangbruch ereignet sich dann, wenn in den komplementären DNA-Strängen innerhalb von 8 Basenpaaren Einzelstrangbrüche induziert werden (Freifelder *et al.*, 1977). Bei einer zufälligen Verteilung der Einzelstrangbrüche dürfte es im PM2 DNA-Molekül mit 10^5 Basenpaaren erst bei ca. 10^4 ESB zu einem DSB kommen, daher muss bei der DSB-Induktion durch Benzaldehyd/Cu(II) von einer nicht zufälligen Verteilung ausgegangen werden.

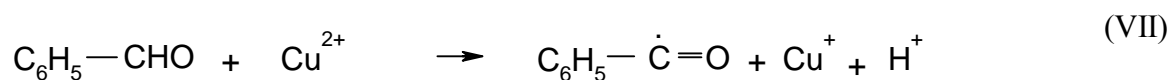
Da DSB durch Benzaldehyd/Cu(II) schon bei einer vergleichbar geringen ESB-Bildung von 0,5 ESB/PM2 DNA auftraten und die weitere Zunahme der DSB parallel zur ESB-Bildung

erfolgte (Abb. 6) ist davon auszugehen, dass die Cu(II)-Benzaldehyd-Reaktion in unmittelbarer Nähe zur DNA bzw. in der DNA stattfindet bzw. das DNA-gebundene Kupfer für Benzaldehyd gut zugänglich ist. Die partielle Öffnung der DNA-Struktur durch komplexierte Kupferionen (Kornilova *et al.*, 1988) ermöglicht so eventuell dem Benzaldehyd den Zugriff auf die DNA. Durch die Komplexierung von Kupferionen mit den Guanin-Cytosin Basenpaaren werden Benzaldehyd/Cu(II)-Reaktionen direkt an der DNA ermöglicht. Solche Radikalreaktionen werden als ortsgebundene oder „site-spezifische“ Mechanismen bezeichnet (Chevion, 1988; Goldstein und Czapski, 1986). Da Kupfer mehrfach Redoxreaktionen durchlaufen kann (Chevion, 1988), in deren Verlauf DNA-reaktive Intermediate entstehen, können diese ortsgebunden durch zwei ESB an den beiden Komplementärsträngen zu einem DSB führen. Da langlebige Intermediate nach ihrer Bildung vom Entstehungsort wegdiffundieren können, muss es sich bei den DSB-induzierenden Spezies aus der Benzaldehyd-Cu(II)-Reaktion um hoch reaktive Intermediate handeln. Diese Intermediate werden möglicherweise in einem Cu-DNA-Komplex stabilisiert. Solche ternären DNA-Cu-Intermediate bzw. DNA-Cu-Produkt-Komplexe wie DNA-Cu-Peroxyradikal-Komplexe (Yamamoto und Kawanishi, 1989), DNA-Cu-Peroxid-Komplexe (Oikawa und Kawanishi, 1998), DNA-Cu-oxo-Komplexe (Ohkuma und Kawanishi, 1999; Yamashita *et al.*, 1999), DNA-Cu-Peroxo-Intermediate (Murata *et al.*, 1999a und b) und DNA- \cdot OH-Radikal-Komplexe (Prütz, 1990) sind verschiedentlich beschrieben worden.

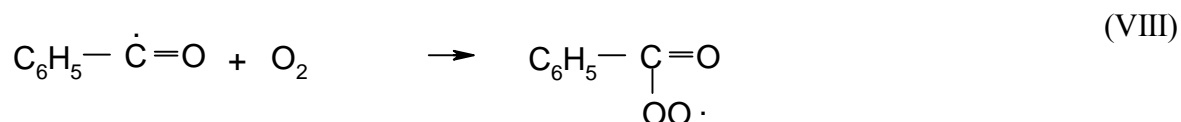
Ein Vergleich der DNA-Strangbruchinduktion durch Benzaldehyd/Cu(II) in Tris•HCl- und NaPO₄-Puffer zeigte eine deutlich höhere ESB-Induktion in NaPO₄-Puffer (Abb. 3). Dies kann einerseits als ein Hinweis auf eine Beteiligung von \cdot OH-Radikalen bei der Strangbruchinduktion durch Benzaldehyd/Cu(II) angesehen werden, da Tris \cdot OH-Radikalfängereigenschaften besitzt (Halliwell und Gutteridge, 1989). Nach Halliwell und Gutteridge (1989) und Shiraishi *et al.* (1993) kann Tris nicht als inertes Medium angesehen werden. Es kann zu einem \cdot OH -Radikal-Verlust aufgrund von Interaktionen von \cdot OH-Radikalen mit Tris, unter Bildung eines Tris-Radikales, kommen. Andererseits könnte die geringere Strangbruchinduktion in Tris•HCl-Puffer aber auch auf eine Konkurrenz von Benzaldehyd und Tris um das vorhandene Cu(II) zurückgeführt werden, da das organische Tris-Molekül in der Lage ist, Kupferionen zu komplexieren. Eine von Li *et al.* (1998) beschriebene Konkurrenzreaktion zwischen Tris¹⁺ und Cu²⁺ um die DNA wäre ebenfalls denkbar.

Zusätzlich zur direkten Strangbruchinduktion wurde untersucht, inwieweit andere DNA-Schäden aus der Benzaldehyd/Cu(II)-Reaktion hervorgehen. Die Induktion von AP-Stellen durch Basenaddukte steht im Zusammenhang mit deren Größe bzw. elektronenziehenden Wirkung, wodurch die N-glykosidische Bindung geschwächt wird. Weder für Cu(II) allein noch für Benzaldehyd konnten AP-Stellen nachgewiesen werden. Die Kombination induzierte innerhalb der einstündigen Inkubationszeit nur sehr geringfügig AP-Stellen (Abb. 7). Bei einer Benzaldehyd-Konzentration von 1 mM in Kombination mit Cu(II) konnte ein Verhältnis von AP-Stellen/ESB von ca. 0,5 beobachtet werden. Ein solches Verhältnis wird von Epe *et al.* (1993a) für freie $\cdot\text{OH}$ -Radikale (induziert durch ionisierende Strahlung) beschrieben. Da bei höheren Benzaldehyd-Konzentrationen in Kombination mit CuCl_2 eine im Vergleich zur Einzelstrangbruchbildung zu vernachlässigende AP-Stellen-Bildung beobachtet wurde, ist eine Interpretation im Hinblick auf $\cdot\text{OH}$ -Radikale fraglich, zudem die absolute Anzahl induzierter AP-Stellen auch bei geringerer Benzaldehyd-Konzentration sehr gering war. Von Kawanishi *et al.* (1999), die eine Untersuchung zur „site-spezifischen“ Oxidation von Benzoylperoxid/Cu(I) durchführten, wird ein Benzoyloxyradikal, das auch als ein mögliches DNA-schädigendes Produkt der Benzaldehyd/Cu(II)-Reaktion angenommen werden kann (s. Gl. X), als weniger oxidierend beschrieben als $\cdot\text{OH}$ -Radikale. Durch eine Steigerung der Inkubationstemperatur kann die AP-Stellenbildung als Folge von Basenmethylierungen gesteigert werden (Lindahl und Nyberg, 1972). Auch durch eine derartige Behandlung der mit Benzaldehyd/Cu(II) behandelten PM2 DNA konnte die Anzahl der AP-Stellen nicht gesteigert werden (Daten nicht gezeigt). Daher müssen die für die Induktion der AP-Stellen verantwortlichen Basenaddukte andere sein als Basenmethylierungen.

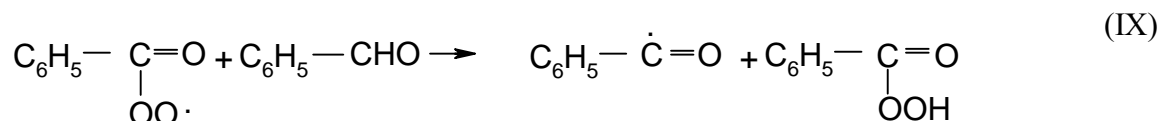
Die Autoxidation von Benzaldehyd unter unphysiologischen Bedingungen wurde wie eingangs beschrieben schon 1931 von Haber und Willstätter und 1956 von Bawn *et al.* beschrieben (Gleichung V). Eine Beschleunigung dieser Reaktion durch Übergangsmetalle und weitere Radikalkettenreaktionen wurden 1972 von Christen postuliert. Diese Reaktionen werden nachfolgend dargestellt (Gleichung VII-XI). Dabei wird in einem ersten Schritt das Carbonyl-C-Atom zum Acylradikal oxidiert:



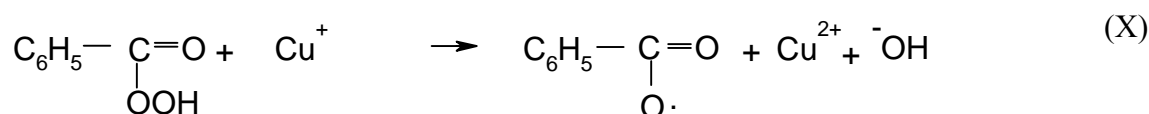
In einem weiteren Schritt erfolgt durch Addition von O_2 an das Acylradikal die Bildung eines Peroxysäureradikal:



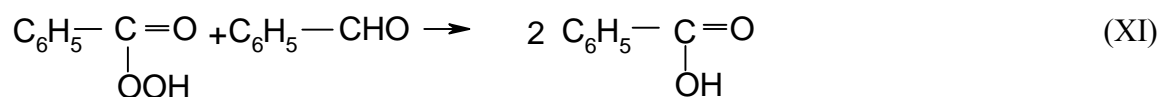
Das Peroxysäureradikal kann seinerseits mit einem weiteren Benzaldehydmolekül reagieren, wobei erneut ein Acylradikal sowie Benzoeperoxysäure entstehen (Kettenpropagation):



Die Benzoeperoxysäure kann entweder durch Cu(I) unter Abspaltung eines Hydroxylions zum Benzoessäureradikal (Benzoyloxyradikal) oxidiert werden:



oder über eine Disproportionierungsreaktion mit einem Benzaldehydmolekül zur Benzoessäure umgesetzt werden:



Weitere radikalische Redoxreaktionen zwischen Benzoessäure und Cu(II) unter Bildung von Cu(I) und CO₂ (Kaeding *et al.*, 1961), sowie die von Kawanishi *et al.* (1999) beschriebene Bildung von Phenylradikalen aus dem möglicherweise gebildeten Benzoyloxyradikalen (s. Gleichung X) unter Abspaltung von CO₂ komplizieren das chemische Geschehen im Reaktionsansatz Benzaldehyd/Cu(II).

Die beobachteten durch Benzaldehyd/Cu(II) induzierten DNA-Schäden könnten somit sowohl durch ROS (*OH-Radikale), wie in der Einleitung in den Gleichungen I-IV dargestellt, als auch durch die oben aufgeführten radikalischen Intermediate (Gleichung VII-XI) verursacht werden. Diese Intermediate stellen hoch reaktive Substanzen dar, die analog zu Intermediaten der Lipidperoxidation DNA-schädigend wirken können (Vaca *et al.*, 1988).

Im Reaktionsgemisch Benzaldehyd/Cu(II) konnte die Bildung eines Cu(I)-Bathocuproin-Komplexes photometrisch nachgewiesen werden. Damit wird die Initiationsreaktion (Gleichung VII) durch Cu(II) unter physiologischen Bedingungen bestätigt. Zusätzlich konnte ESR-spektroskopisch das Signal des paramagnetischen Cu²⁺ Ions (Abb. 42) nach Zugabe von Benzaldehyd nicht mehr detektiert werden, was ein Hinweis darauf ist, dass das radikalische

Cu^{2+} in das nicht radikalische Cu^{1+} überführt wurde. Nach Sheldon und Kochi (1981) ist die „Autoxidation“ von Aldehyden strikt an die Katalyse durch Übergangsmetalle gebunden. Da die Kinetik der Cu(I)-Bildung während der Benzaldehyd/Cu(II) Reaktion unter aeroben und anaeroben Bedingungen identisch verlief (Abb. 9), wird die Sauerstoffunabhängigkeit des ersten Schrittes der radikalischen Oxidation von Benzaldehyd durch Cu(II), wie in Gleichung V vorgeschlagen, bestätigt. Da die DNA-Strangbruchinduktion durch Benzaldehyd/Cu(II) sauerstoffabhängig war, kann aus diesem Versuchsergebnis ebenfalls abgeleitet werden, dass das gebildete primäre organische Radikal (Acyldradikal) und/oder Cu(I) nicht direkt für die gemessenen Strangbrüche verantwortlich sein können. Sonst müsste es auch in Abwesenheit von Sauerstoff zur Strangbruchinduktion kommen. Da die aktuelle Cu(I)-Menge in Abwesenheit von Bathocuproin im Reaktionsansatz über die gesamte Inkubationszeit nur 1/5-1/6 der Cu(I)-Menge betrug, die in Anwesenheit von Bathocuproin gemessen wurde, muss Cu(I) im Reaktionsansatz weiterreagieren. Eine Reoxidation zu Cu(II) unter Reduktion von O_2 scheidet zumindest für den anaeroben Ansatz aus. Hier erscheint eine weitere Reduktion zu Cu(0) möglich (mündliche Mitteilung: Al Shamery, 2000). Wobei dies dann wahrscheinlich über komplex gebundenes Cu(I) erfolgt. Es kann hier allerdings nicht geklärt werden, welche Komplexe dabei möglicherweise von Bedeutung sind. Für die weitere Reduktion von Cu(I) zu Cu(0) sprechen zwei experimentelle Befunde. Erstens betrug die insgesamt nachweisbare Cu(I)-Menge nur 30% und zweitens konnte ESR-spektroskopisch das vollständige Verschwinden des Signals des paramagnetischen Cu^{2+} Ions (Abb. 42) nach Zugabe von Benzaldehyd beobachtet werden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Differenz (70%) möglicherweise als Cu(0) vorliegt.

Da der Kurvenverlauf der Cu(I)-Bildung unter aeroben und anaeroben Bedingungen nahezu identisch verlief, ist damit auch von dem gleichen Reaktionsmechanismus der Cu(II)-Reduktion auszugehen. Welche Bedeutung der geringere aktuelle Cu(I)-Gehalt im Anaeroben während der ersten 10 Minuten im Vergleich zur entsprechenden Messung im Aeroben, für den gesamten Reaktionsmechanismus hat und ob dies ein Indiz für die O_2 -abhängige Strangbruchinduktion von Benzaldehyd/Cu(II) ist, kann hier nicht geklärt werden. Wahrscheinlich ist, dass die O_2 -abhängige DNA-Strangbruchinduktion nicht über ROS erfolgt.

Diese Behauptung wird insbesondere dadurch gestützt, dass bei der Inkubation von Benzaldehyd/Cu(II) mit 2-dG kein 8-OHdG nachgewiesen werden konnte. 8-Hydroxy-2-desoxyguano-

sin (8-OHdG) stellt ein spezifisches Hydroxylierungsprodukt von dG durch $\cdot\text{OH}$ -Radikale (Kasai *et al.*, 1986; Floyd *et al.*, 1988) und/oder Singulett Sauerstoff (Epe, 1991; Sies, 1993) dar. Nach Kasai und Nishimura (1984) verläuft der Mechanismus, der zur Bildung von 8-OHdG aus dG führt, über freie Hydroxylradikale in zwei Schritten. Zuerst wird das Hydroxylradikal an die C8-Position addiert. Darauf folgt die Abgabe eines Elektrons sowie eines Protons von der reaktiven Zwischenstufe, woraus die Bildung von 8-OHdG resultiert. Auch ESR-spektroskopisch konnten keine $\cdot\text{OH}$ -Radikale über die Detektion von DMPO- $\cdot\text{OH}$ -Addukten nachgewiesen werden. Da der hier eingesetzte $\cdot\text{OH}$ -Radikalfänger DMPO (5,5-Dimethylpyrrolin-N-oxid) gleichzeitig auch O_2^- - und Hydroxyethyl-Radikale nachweist, wobei anhand des Spektrums in der Regel eine Unterscheidung dieser Spezies möglich ist und $\cdot\text{OH}$ schneller durch DMPO gebunden wird als O_2^- (Halliwell und Gutteridge, 1989), ist eine Beteiligung dieser Spezies an der Benzaldehyd/Cu(II)-Reaktion ebenfalls auszuschließen.

Die Bildung eines organischen Radikals resultierend aus der Benzaldehyd/Cu(II)-Reaktion konnte weder mit noch ohne den Spin-trap 4-POBN (α -(4-Pyridyl 1-oxid)-N-tert-Butylnitron), der zum Nachweis von C-zentrierten Radikalen und Alkoxyradikalen (Janzen, 1984; Pou *et al.*, 1994) eingesetzt wird, nachgewiesen werden. Da jedoch über die nachgewiesene Cu(I)-Bildung eine radikalische Oxidation von Benzaldehyd bestätigt wurde, ist fraglich, ob 4-POBN in der Lage ist das entstehende Acylradikal (vergl. Gleichung VII) zu addieren. Aufgrund der aromatischen Struktur von Benzaldehyd und 4-POBN muss mit sterischen Behinderungen der beiden aromatischen Ringe gerechnet werden.

Die effektive Hemmung der Strangbruchinduktion durch spezifische Cu(I)-Chelatoren (Tab. 2) wie Neocuproin und Bathocuproin (Wong *et al.*, 1984; Bhat und Hadi, 1994; Gordge *et al.*, 1995; Asad *et al.*, 1999), dessen Cu(I)-Komplexe redoxinaktiv sind (Petering und Antholin, 1988), wenn ein Verhältnis von Neocuproin/Kupfer von ≥ 4 erreicht wird (Mello-Filho und Meneghini, 1991), zeigt dass Cu(I) eine Voraussetzung für die Strangbruchinduktion darstellt. Die primären Produkte der initialen Benzaldehyd/Cu(II)-Reaktion, Cu(I) und das Acylradikal, scheiden als strangbrucherzeugende Agenzien jedoch aus. Cu(I) scheidet aus, da es unter anaeroben und aeroben Bedingungen im gleichen Maße gebildet wird, eine Strangbruchinduktion aber nur unter aeroben Bedingungen erfolgte. Das primäre Acylradikal kann ebenfalls nicht direkt beteiligt sein, da es sonst auch in Anwesenheit von Neo- bzw. Bathocuproin noch zur Strangbruchinduktion kommen müsste. Auch der partielle Schutz durch

DMSO (Tab. 2) kann nicht auf in der Literatur beschriebene spezifische $\cdot\text{OH}$ -Radikalfängereigenschaften (Klein *et al.*, 1981; Rao *et al.*, 1988; DeForge *et al.*, 1993) des DMSO zurückgeführt werden. Untersuchungen mit Tetrachlorhydrochinon, in denen $\cdot\text{OH}$ -Radikale als PM2 DNA-strangbrechende Spezies nachgewiesen wurden, zeigten eine weit höhere Inhibition der DNA-Strangbruchinduktion bei vergleichbaren bzw. niedrigeren DMSO-Konzentrationen (0,1% DMSO zeigte eine 82%ige und 1% DMSO eine 100%ige Hemmung) (Carstens *et al.*, 1990). In einer Untersuchung von Kawanishi *et al.* (1999), in der ein aus der Reaktion Benzoylperoxid/Cu(I) resultierendes Benzoyloxyradikal als mögliches strangbrechendes Agens postuliert wurde, konnte eine Inhibition der DNA-Schäden durch DMSO von 10-50% nachgewiesen werden. Wie in Gleichung X vorgeschlagen könnte auch bei der Reaktion von Benzaldehyd/Cu(II) ein solches Radikal entstehen. Im Einklang mit dieser Interpretation ordneten Halliwell und Gutteridge (1989) DMSO auch Fängereigenschaften gegenüber anderen Radikalen als Hydroxylradikalen zu. Auch von anderen Autoren werden Fängereigenschaften von DMSO gegenüber Radikalspezies beschrieben, die weniger reaktiv sind als Hydroxylradikale (Pryor und Tang, 1978; Youngman und Elstner, 1981; Kawanishi *et al.*, 1999). Die durch Benzaldehyd/Cu(II) induzierten Strangbrüche wurden durch Katalase ebenfalls nur partiell gehemmt (Tab. 2). Katalase verhindert durch die enzymatische Spaltung von H_2O_2 zu H_2O und O_2 die Bildung von $\cdot\text{OH}$ -Radikalen. Da Rinderserumalbumin keinen bzw. nur einen sehr geringen (0-5%) inhibitorischen Effekt zeigte, ist die beobachtete Hemmwirkung der Katalase auf ihre enzymatische Aktivität zurückzuführen. Ein Vergleich mit den oben beschriebenen Untersuchungen von Carstens *et al.* (1990) zeigt auch hier eine geringere inhibitorische Wirkung der Katalase im Benzaldehyd/Cu(II)-Reaktionsgemisch. Dies kann als Hinweis darauf angesehen werden, dass das Substrat für Katalase im System Benzaldehyd/Cu(II) nicht H_2O_2 sondern möglicherweise ein organisches Peroxid ist. Neben Wasserstoffperoxid sind auch Alkylperoxide als Substrate für Katalase beschrieben, wobei die Geschwindigkeit der Peroxidspaltung durch Katalase mit zunehmender Größe des organischen Rests abnimmt (Bergmeyer, 1983). Eine Induktion von Strangbrüchen durch Cu(I) bei Abwesenheit von H_2O_2 wurde von Sagripanti und Kraemer (1989) beschrieben.

4.1.2 Zyto- und gentoxische Wirkung von Benzaldehyd/Cu(II) in Säugerzellkulturen

Zur Bestimmung der Kombinationswirkung von Cu(II) und Benzaldehyd wurden die Zellen bezüglich des zu messenden Parameters mit untoxischen oder nur sehr gering toxischen Cu(II)-Konzentrationen behandelt. Bei der Bestimmung der Akuten Toxizität wurde für Cu(II)

eine NOEC (no observed effect concentration) von 2,5 mM (vergl. Abb. 10) ermittelt. Bei einer 90- minütigen Inkubation der humanen Fibroblasten mit 2,5 mM CuCl₂ entspricht dies einer Cu(II)-Konzentration von 37 ng/mg Protein (Hartmann *et al.*, 1995). Die Ergebnisse zur Zyto- und Genotoxizität von Benzaldehyd bzw. von Benzaldehyd in Kombination mit Cu(II) sind in Tabelle 15 zusammengefasst:

Tab. 15: Zusammenfassende Darstellung der Zellkulturuntersuchungen zur Zyto- und Gentoxizität von Benzaldehyd/Cu(II)

Untersuchte Parameter	Benzaldehyd			Benzaldehyd/Cu(II)			Kombinations-effekt
	EC ₁₀	EC ₃₀	EC ₅₀	EC ₁₀	EC ₃₀	EC ₅₀	
Akute Toxizität							
N57 (AT ₀)*	>18	>18	>18	>18	>18	>18	-
N57 (AT ₂₁)*	>18	>18	>18	9,4	15,8	>18	+
V79 (AT ₀)*	15,2	>18	>18	11	16,2	>18	+
V79 (AT ₂₁)*	11,3	18	>18	1,9	5,2	10,9	+
Wachstumshemmung							
N57*	6,1	13,2	18	3,1	8,1	11,8	+
Hemmung der Koloniebildungsfähigkeit							
V79*	6,5	>14	>14	2	7,2	>14	+
V79**	16	17,2	>18	9,6	15,7	17,4	+
	Alkalische Elution			Alkalische Elution			
DNA-Strangbruchinduktion in der Zelle*	-			+			+
Nachweis von DNA-Protein-Crosslinks*	-			-			
Nachweis von DNA-DNA Crosslinks**	+			(+)			-
	UDS	Alkalische Elution		UDS	Alkalische Elution		
DNA-Reparatur*,**	-	-		-	+		+
Hemmung der UV-induzierten Reparatur**	-	n.u.		-	n.u.		
Hemmung der MMS-induzierten Reparatur**	-	n.u.		-	n.u.		
Nachweis der Mutagenität (HPRT)*,**	-			-			

*= gleichzeitige Inkubation (60 min. Benzaldehyd/Cu(II)), **= Mit Vorinkubation (90-minütige Vorinkubation mit Cu(II) und nachfolgende 60-minütige Inkubation mit Benzaldehyd), (-/+) negativer bis schwacher Effekt, (+)= schwach positiver Effekt, += positiver Effekt, n.u.= nicht untersucht.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zur Zytotoxizität ergaben, dass Benzaldehyd im MTT-Test nur sehr schwach toxisch wirkte. V79 Zellen (transformierte Hamsterlungenfibroblasten) erwiesen sich im MTT-Test im Vergleich zu N57 Zellen (humane Fibroblasten) als empfindlicher. Da im MTT-Test die Aktivität der Succinatdehydrogenase gemessen wird, erweisen sich atlungsaktive Zellen mit entsprechend vielen Mitochondrien im Vergleich zu weniger atlungsaktiven Zellen als sensitiver. Im Zusammenhang mit den Untersuchungen von Wolf *et al.* (1982), die eine Hemmung der Succinatdehydrogenase durch Benzaldehyd (2-20 mM) an isolierten Lebermitochondrien beschrieben, ist die höhere Sensitivität von V79 Zellen hier wahrscheinlich auf einen höheren Anteil an Mitochondrien (bzw. Succinatdehydrogenase) im Vergleich zu den N57 Zellen zurückzuführen. Auch die von Watanuki und Sakaguchi (1980) an SV40-transformierten Zellen beobachtete ATP-Depletion und verminderte Aufnahme von Grundbausteinen (Thymidin, andere Nukleoside und 2-desoxy-d-Glukose), sowie eine von Dornish *et al.* (1984, 1986) postulierte Membranschädigung, durch die Einwirkung von Benzaldehyd können einen Beitrag zur Erklärung der nachgewiesenen höheren Toxizität von Benzaldehyd gegenüber transformierten Zellen im Vergleich zu nicht transformierten Zellen liefern.

Im Vergleich zur Toxizität direkt nach der Schadstoffbehandlung (AT_0) zeigte Benzaldehyd eine erhöhte Toxizität nach 21 Stunden (AT_{21}), sowie bei der Messung der Wachstumshemmung und der Hemmung der Koloniebildungsfähigkeit. In diesen Fällen kann die Toxizität als längerfristige Folge einer Benzaldehydintoxikation gesehen werden. Auch von Nambata *et al.* wurde eine Hemmung des Wachstums von embryonalen Mäusezellen (1980) und von Hela Zellen (1981) durch Benzaldehyd beschrieben, was mit einer von ihnen nachgewiesenen Verzögerung der S- und G2-Zellzyklusphase begründet wurde. Von Pettersen *et al.* (1983b) wurde eine Hemmung der Koloniebildungsfähigkeit humaner Zellen durch Benzaldehyd beschrieben, die hingegen unabhängig war von der G1, S oder G2-Phase, allerdings in mitotischen Zellen stärker war als in Interphasezellen. Die hier nachgewiesene Toxizität von Benzaldehyd nach einer Erholungsphase weist auf eine Schädigung hin, die nach Verbrauch des Zellpools an lebensnotwendigen Molekülen nur noch eine ungenügende Neusynthese erlaubt. Dies kann sowohl einzelne Enzyme als auch komplexe Vorgänge wie die Transkription oder den Energiestoffwechsel betreffen. In Untersuchungen zum Effekt von Benzaldehyd auf den Proteinmetabolismus konnte von Pettersen *et al.* (1983a) beobachtet werden, dass Benzaldehyd die Proteinbiosyntheserate in kultivierten menschlichen Zellen reduzierte, wäh-

rend der Proteinabbau nur geringfügig beeinflusst wurde. Zudem wurde durch Benzaldehyd eine spezifische Mitoseinhibition induziert (Pettersen *et al.*, 1983b). Diese Effekte wurden von Pettersen *et al.* (1983b) auf eine Hemmung der Enzymaktivierung zurückgeführt. Hiermit wäre sowohl die erhöhte Toxizität nach einer 21-stündigen Erholungsphase (AT₂₁), als auch die Hemmung des Wachstums und der Koloniebildungsfähigkeit zu erklären.

In Kombination mit Cu(II) erhöhte sich die zytotoxische Wirkung von Benzaldehyd. Die Kombination mit Cu(II) führte jedoch nicht zu einer direkt nachweisbaren Zellschädigung (AT₀). Bei allen anderen gemessenen Endpunkten, (AT₂₁, Wachstumshemmung und Hemmung der Koloniebildungsfähigkeit), die Stunden bzw. Tage nach erfolgter Inkubation der Zellen mit Benzaldehyd/Cu(II) bestimmt wurden, konnte im Vergleich zur Einzelwirkung eine eindeutig erhöhte Toxizität der Kombination Benzaldehyd/Cu(II) beobachtet werden. So war z.B. die Benzaldehyd-Konzentration, die einen 10%igen bzw. 30%igen Effekt bei der AT₂₁ bewirkte in der Kombination um ca. 80 bzw. 70% geringer als bei der Einzelwirkung. Der erst verzögert auftretende Kombinationsseffekt kann ein Hinweis auf primäre gentoxische Wirkungen mit sekundär auftretenden zytotoxischen Folgen sein.

Eine erhöhte Permeabilität der Zellmembran für Benzaldehyd durch die Einwirkung von Cu(II) als Ursache für die nachgewiesenen Kombinationseffekte ist auszuschließen. Als Folge einer erhöhten Membranpermeabilität muss mit einer verstärkten Aufnahme von Benzaldehyd gerechnet werden, eine erhöhte intrazelluläre Schadstoffkonzentration sollte jedoch zu einer erhöhten Toxizität bei allen Messparametern führen. Auch wurde unter den gewählten Versuchsbedingungen durch CuCl₂ nur eine zu vernachlässigende Lipidperoxidation (LPO) der Fibroblastenmembran, die zu einer Abnahme der Membranfluidität führen könnte, beobachtet (Jacobi *et al.*, 1999). Nach Villacara *et al.* (1989) muss eine Abnahme der Membranfluidität durch LPO nicht zu Permeabilitätsveränderungen führen.

Die verstärkende Wirkung durch Cu(II) war unterschiedlich hoch und zeigte eine Abhängigkeit von der Zeit nach erfolgter Schadstoffinkubation. In Bezug auf den Verstärkereffekt durch Cu(II) bei Betrachtung der EC₁₀-Werte im gleichen Zellsystem kann folgende Sensitivitätsreihe der untersuchten Parameter aufgestellt werden:

AT₂₁ > Hemmung der Koloniebildungsfähigkeit > AT₀ (V79); WT > AT₂₁ > AT₀ (N57)

So war die Benzaldehyd-Konzentration, die bei der AT₂₁ einen 10%igen Effekt in Kombination mit Cu(II) bewirkte um den Faktor 5,9 geringer als bei der Einzelwirkung, die entsprechenden Faktoren bei der Hemmung des Wachstums und der Koloniebildungsfähigkeit betragen 2 und 3,2. Die ermittelte Sensitivitätsreihe ist im Hinblick auf die jeweils erfassbaren Parameter zu interpretieren. Im Gegensatz zur Akuten Toxizität werden bei der Bestimmung des Wachstums und der Koloniebildungsfähigkeit neben akut toxischen Wirkungen zusätzlich zyto- und gentoxische Schäden ermittelt, die nicht unmittelbar zu einer sofortigen Zellschädigung führen. Hierzu gehören neben gentoxischen Ereignissen auch epigenetische Wirkungen, wie Hemmung der DNA-Reparatur oder der Protein- und Nukleinsäuresynthese. Solche Wirkungen sind für Benzaldehyd (Reduktion der Proteinbiosynthese) in einer (Pettersen *et al.*, 1983a) und für kurze aliphatische Aldehyde in zahlreichen Untersuchungen beschrieben (Auerbach *et al.*, 1977; Ma und Harris, 1988; Feron *et al.*, 1991; Grafström *et al.*, 1994). Die höhere Sensitivität der AT₂₁ im Vergleich zur Hemmung des Wachstums und der Koloniebildungsfähigkeit ist eventuell als Hinweis auf eine zumindest teilweise Reparatur der durch Benzaldehyd/Cu(II) induzierten Schäden anzusehen.

Eine gleichzeitige Inkubation der Zellen mit Benzaldehyd/Cu(II) erbrachte einen höheren Kombinationseffekt als wenn die Zellen mit Cu(II) vorinkubiert und anschließend mit Benzaldehyd inkubiert wurden. Wenn die Zellen gleichzeitig mit Kupfer und Benzaldehyd inkubiert werden ist davon auszugehen, dass aus dieser Reaktion resultierende toxische Intermediate im Vergleich zu einer sequenziell erfolgenden Inkubation in größerem Umfang entstehen können und das schädigende Potenzial damit größer ist.

Gentoxische Wirkung von Benzaldehyd/Cu(II)

Wie schon in den Untersuchungen an isolierter PM₂ DNA nachgewiesen, wurden durch Benzaldehyd/Cu(II) auch in der ganzen Zelle DNA-Strangbrüche induziert. Insgesamt betrachtet ist die Anzahl in ganzen Zellen induzierter Strangbrüche als gering anzusehen. Eine Ursache dieser geringen Strangbruchinduktion könnte die Bildung von DNA-DNA-Crosslinks oder/und DNA-Protein-Crosslinks sein, die in Untersuchungen an isolierter PM₂ DNA nicht nachweisbar sind. Von mehreren Autoren wird allgemein die Fähigkeit einiger Aldehyde zur Bildung kovalenter DNA-Protein-Crosslinks beschrieben (Feldman *et al.*, 1977; Ohba *et al.*, 1979; Chaw *et al.*, 1980; Swenberg *et al.*, 1983; Ma und Harris, 1988; Kuyendall und Bogdanffy, 1992; Hengstler *et al.*, 1994), wobei die Aminogruppe das Hauptziel darstellt

(Feron *et al.*, 1991). Namentlich werden insbesondere Acetaldehyd (Grafström *et al.*, 1994), Glutaraldehyd (Schauenstein *et al.*, 1977), Malondialdehyd (Brooks und Klammerth, 1968; Moschel und Leonard, 1976) und Chloracetaldehyd (Van Duuren, 1975; Keller und Heck, 1988) als potente DNA-DNA- und DNA-Protein-vernetzende Substanzen diskutiert. Auch freie Radikale sind in der Lage DNA-Protein-Crosslinks zu induzieren (Schuessler und Jung, 1989; Nackerdien *et al.*, 1991). Derartige Radikale könnten als Intermediate einer Benzaldehyd/Cu(II)-Reaktion auftreten.

Die Bildung von DNA-DNA-Crosslinks konnte sowohl für Benzaldehyd allein, als auch für die Kombination nachgewiesen werden. Zu Benzaldehyd liegen entsprechende Ergebnisse in der Literatur bisher nicht vor. Die MMS-induzierte Elution wurde durch 18 mM Benzaldehyd/Cu(II) und durch 20 mM Benzaldehyd allein um ca. 50% gehemmt. Bei 20 mM Benzaldehyd/Cu(II) war die Elution hingegen wieder erhöht, was durch die starke strangbrechende Wirkung dieser Benzaldehyd-Konzentration in Kombination mit Cu(II) zu erklären ist (vergl. Abb. 15). Aus den beschriebenen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass Benzaldehyd allein DNA-DNA-Crosslinks verursacht, die die durch Benzaldehyd/Cu(II) induzierte Strangbruchrate in der Alkalischen Elution geringer erscheinen lassen als sie tatsächlich ist. Eine zusätzliche Bildung von DNA-Protein-Crosslinks konnte weder für Benzaldehyd allein noch für Benzaldehyd/Cu(II) nachgewiesen werden.

Vergleicht man die schadensrelevanten Benzaldehyd/Cu(II)-Konzentrationen des MTT-Testes (AT_0 , AT_{21}) und der Alkalischen Elution, so fällt auf, dass diese bei der Alkalischen Elution geringer sind als die der Akuten Toxizität. Die nachgewiesene DNA-Schädigung ist daher keine Folge einer hohen Zytotoxizität, sondern die Zytotoxizität ist wie zuvor schon vermutet eine Folge der Genotoxizität.

Die durch Benzaldehyd/Cu(II) induzierten Strangbrüche in der Alkalischen Elution wurden innerhalb von 48 Stunden komplett beseitigt (Abb. 17). Auch 21 Stunden nach der Behandlung war die Elution im Vergleich zur Elution direkt nach der Schadstoffbehandlung verringert, was auf eine Reparatur der induzierten DNA-Schäden zurückgeführt werden kann. Im Gegensatz dazu konnte unter den gewählten Versuchsbedingungen mit Hilfe der UDS (klassischer DNA-Reparaturnachweis) keine Reparatur der durch Benzaldehyd/Cu(II) indu-

zierten Schäden nachgewiesen werden (Tab. 3). Dieser Effekt könnte auf mehrere Ursachen zurückgeführt werden:

1. Die Reparatur ist aufgrund einer zu geringen Sensitivität oder aufgrund anderer mit der UDS nicht erfassbarer Reparaturmechanismen nicht detektierbar.
2. Die mit der UDS gemessene Zeitdauer der Reparatur ist nicht ausreichend für die Eliminierung der durch Benzaldehyd/Cu(II) induzierten DNA-Schäden.
3. Eine reversible Hemmung bzw. Inaktivierung der Reparaturenzyme durch Benzaldehyd bzw. Benzaldehyd/Cu(II) nach dem Einschnitt.

Zu 1:

Bei der mit der UDS nachweisbaren Exzisionsreparatur lassen sich zwei unterschiedliche Reparaturen unterscheiden, die long-patch-repair (LPR) und die short-patch-repair (SPR), wobei die SPR nur in geringem Umfang mit der UDS detektierbar ist. Durch LPR werden etwa 100 Nukleotide pro repariertes Segment ausgeschnitten (Perrino und Loeb, 1990). Ein LPR induzierendes Agens ist z. B. UV-Strahlung, wobei ca. 90 Nukleotide ausgeschnitten werden (Francis *et al.*, 1981). Durch SPR hingegen werden maximal 3-4 Nukleotide in die DNA eingebaut (Friedberg, 1985; Friedberg *et al.* 1995). Die Reparatur von DNA-Schäden, gemessen mit der UDS, ist um so empfindlicher nachweisbar, je größer die neu synthetisierten Polynukleotidstücke sind. Von mehreren Autoren, die Untersuchungen zur UDS-Induktion durch reaktive Sauerstoffspezies durchführten, wurde eine nur geringe Sensitivität der UDS beschrieben (Zheng *et al.*, 1988; Pero *et al.*, 1990). So können nach Williams (1977) SPR induzierende Substanzen nur in geringem Maße in der UDS detektiert werden, da die Anzahl der eingebauten ³H-Thymidine gering ist. Aufgrund der dargestellten Untersuchungen und eigenen Ergebnisse, kann davon ausgegangen werden, dass die durch Benzaldehyd/Cu(II) induzierten DNA-Schäden nicht durch LPR-Exzisionsreparatur beseitigt werden. So könnten Intermediate aus der Benzaldehyd/Cu(II)-Reaktion vorwiegend DNA-Schäden induzieren, die durch SPR oder alternative DNA-Reparaturmechanismen beseitigt werden, die mit der UDS nicht erfassbar sind.

Dass für die Benzaldehyd/Cu(II) bedingten Schäden auch andere Reparaturprozesse denkbar sind, gilt insbesondere für die Reparatur der durch Benzaldehyd induzierten DNA-DNA-Crosslinks. So ist eine Reparatur von DNA-Inter-Strang-Crosslinks nur durch eine Rekombinationsreparatur möglich (Demple und Harrison, 1994). Es sind ebenfalls Reparaturmechanis-

men bekannt, bei denen keine Neusynthese der DNA stattfindet, wie beispielsweise bei der Dealkylierung von DNA-Addukten durch DNA-Alkyltransferasen, und die somit in der UDS auch nicht nachweisbar sind. Die Übertragung der Methylgruppe vom O⁶-Methylguanin auf den Cysteinrest der O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MMT) verläuft z. B. ohne Inzision der DNA (Friedberg, 1985; Friedberg *et al.*, 1995). Hierbei handelt es sich allerdings um sehr spezifische Enzyme, die bei einer Benzaldehyd/Cu(II) induzierten Reparatur wahrscheinlich nicht zum Tragen kommen. Auch die Reparatur von Schäden durch interkalierende Agenzien ist in der UDS nicht nachweisbar (Benigni *et al.*, 1990). Aufgrund der aromatischen Struktur von Benzaldehyd ist eine Interkalation denkbar bzw. nicht auszuschließen. In der Literatur sind entsprechende Untersuchungen für Benzaldehyd nicht beschrieben.

Zu 2:

Der Unterschied zwischen negativer UDS und positivem Reparturnachweis über die Alkalische Elution lässt sich wahrscheinlich u. a. durch die unterschiedlichen Nachinkubationszeiten nach erfolgter Schadstoffbehandlung erklären. Bei der UDS hatten die Zellen lediglich 3 Stunden nach erfolgter Schadstoffbehandlung Zeit zur Reparatur, während eine vollständige Eliminierung der DNA-Schäden mit Hilfe der Alkalischen Elution erst nach 48 Stunden nachweisbar war. Die Tatsache, dass bei Benzaldehyd/Cu(II) keine schnelle Reparatur der DNA-Schäden erfolgt, ist wiederum ein Hinweis darauf, dass [•]OH-Radikale keine bedeutende Rolle bei der DNA-Schädigung spielen, da [•]OH-Radikal-bedingte Schäden bekanntermaßen sehr schnell repariert werden. Die Hälfte der in Lymphozyten durch oxidativen Stress gebildeten Basenmodifikation 8-OHdG werden beispielsweise innerhalb von 50 Minuten repariert (Jaruga und Dizdaroglu, 1996), während z. B. Malondialdehydaddukte mit Guanin in Rattenhepatozyten eine biologische Halbwertszeit von 12,5 Tagen (Kautiainen *et al.*, 1993) haben. Möglicherweise wird die Reparatur von Radikal-erzeugten DNA-Schäden durch Benzaldehyd/Cu(II) durch die gleichzeitig stattfindende Strangvernetzung verzögert, so dass eine Reparatur erst 21 bzw. 48 Stunden nach der Schadstoffbehandlung erfolgt und somit mit der UDS nicht nachgewiesen werden konnte.

Zu 3:

Untersuchungen zur Hemmung einer MMS oder UV-induzierten DNA-Reparatur zeigten keine nennenswerte Beeinflussung, weder durch Benzaldehyd allein noch durch die Kombination mit Cu(II) (Tab. 4 und 5). Ebenso kann eine Hemmung der AP-Endonukleaseaktivität in

den verwendeten menschlichen Fibroblasten durch Benzaldehyd bzw. Benzaldehyd/Cu(II) aufgrund der Untersuchungen an PM2 DNA konkret ausgeschlossen werden. Der Effekt der nicht nachweisbaren Reparatur über die UDS ist daher nicht über eine reversible Hemmung bzw. Inaktivierung der beteiligten Reparaturenzyme erklärbar.

Untersuchungen zur Mutagenität von Benzaldehyd/Cu(II) in V79 Zellen

Das mutagene Potenzial von Substanzen wird neben der DNA-Reaktivität auch von der Stabilität bzw. Persistenz der Reaktionsprodukte bestimmt. Wie in dieser Arbeit gezeigt, hatten die durch Benzaldehyd/Cu(II) induzierten DNA-Schäden eine relativ hohe Persistenz und waren erst nach 48 Stunden komplett repariert, so dass ein mutagenes Potenzial der Schadstoffkombination Benzaldehyd/Cu(II) erwartet werden kann. Für Benzaldehyd allein konnte eine maximale Erhöhung der Spontanmutationsrate um 2,9 und in Kombination mit Kupfer um 1,9 beobachtet werden (Abb. 18), die vorgeschriebene dreifache Erhöhung wurde damit knapp verfehlt. Unter den gewählten Versuchsbedingungen konnte also keine Mutagenität nachgewiesen werden. Benzaldehyd wurde bisher noch nicht im HPRT-Test und auch nicht mit V79 Zellen auf seine Mutagenität hin überprüft. In der Literatur liegen je nach verwendetem Testsystem verschiedene negative und positive Befunde zur Mutagenität von Benzaldehyd vor. Untersuchungen anderer Autoren zeigten ebenfalls einen negativen Effekt für Benzaldehyd in *Salmonella typhimurium* (Sasaki und Endo, 1978; Florin *et al.*, 1980; Kasamaki *et al.*, 1982; Haworth *et al.*, 1983; Nohmi *et al.*, 1985). Benzaldehyd induzierte auch keine geschlechtschromosomal gebundenen Letalmutationen in *Drosophila melanogaster* (Woodruff *et al.*, 1985). Von Brockman *et al.* (1984) wurde hingegen gezeigt, dass Benzaldehyd Rückmutationen in *Neurospora crassa* induzierte. Auch im SCE-Test (Schwesterchromatidenaustausch) induzierte Benzaldehyd eine erhöhte SCE-Rate in Säugerzellkulturen (Galloway *et al.*, 1987) und in humanen Lymphozyten (Jansson *et al.*, 1988). Im L5178Y tk+/tk- Maus-Lymphoma-Test konnte eine erhöhte Mutationsrate für Benzaldehyd nachgewiesen werden (McGregor *et al.*, 1991). Die Untersuchungen zur Induktion von Chromosomenschäden durch Benzaldehyd sind ebenfalls widersprüchlich. Von Kasamaki *et al.* (1982) und Sofuni *et al.* (1985) konnten Chromosomenschäden in CHO Zellen durch die Einwirkung von Benzaldehyd nachgewiesen werden, während Galloway *et al.* (1987) eine solche Wirkung nicht nachweisen konnten. Eine abschließende Beurteilung der Mutagenität von Benzaldehyd allein aufgrund der vorliegenden Datenlage ist schwierig, es ist jedoch nicht auszuschließen, dass Benzaldehyd ein mutagenes Potenzial in Eukaryontenzellen besitzt. Da eine

mutagene Wirkung stark abhängig ist von den gewählten Versuchsbedingungen (z.B. die Abfolge der Behandlung, der gemessene genotoxische Endpunkt, der genetische Hintergrund der Zielzellen) (Ohta, 1993), wobei sich die hier verwendeten V79 Zellen aufgrund der Bildung von Subspezies erheblich in ihrer Mutierbarkeit im HPRT-Test unterscheiden (Rodrigues *et al.*, 1994), ist eine abschließende Beurteilung der Mutagenität von Benzaldehyd allein und in Kombination mit Cu(II) nicht möglich und es bedarf weiterer Untersuchungen in anderen Testsystemen.

4.2 Kombinationswirkung von p-Anisaldehyd/Cu(II)

4.2.1 Charakterisierung und mechanistische Aspekte der DNA-Strangbruchinduktion durch p-Anisaldehyd/Cu(II) in PM2 DNA

Die Ergebnisse zur Wirkung von p-Anisaldehyd/Cu(II) sind in Tabelle 16 zusammengefasst und werden im Folgenden diskutiert.

Tab. 16: Zusammenfassende Darstellung der *in vitro* Untersuchungen mit PM2 DNA sowie weiterer mechanistischer Aspekte zur Substanzkombination p-Anisaldehyd/Cu(II)

Untersuchte Parameter		Effekt
DNA-Schäden	Cu(II)-Optimum	+
	ESB-Induktion	+
	DSB-Induktion	+
	AP-Stellen	+
	Vergleich der DNA-Strangbruchinduktion in TRIS/ NaPO ₄ -Puffer	++/++
Inhibition der DNA-Strangbrüche	Katalase (aerob)	+++
	Katalase (anaerob)	+++
	DMSO (aerob)	-/+
	DMSO (anaerob)	-/+
	Batho-/Neocuproin (aerob)	+++
	Batho-/Neocuproin (anaerob)	+++
weitere Untersuchungen zum Mechanismus	Strangbruchinduktion unter anaeroben Bedingungen	+
	Cu(I)-Produktion (aerob)	+++
	Cu(I)-Produktion (anaerob)	+++
	Weiterreaktion von Cu(I) (aerob/anaerob)	?
	Nachweis von 8-OHdG	-
	Radikalnachweis über ESR DMPO 4-POBN	- - -

-= negativer Effekt, (+)= schwacher Effekt, += positiver Effekt, ++= deutlich positiver Effekt, +++= stark positiver Effekt, n.u.= nicht untersucht, *= Messungen beziehen sich auf Untersuchungen im Kupferoptimum.

Durch die Kombination p-Anisaldehyd/Cu(II) wurden sowohl Einzel- als auch Doppelstrangbrüche in PM2 DNA induziert, wobei p-Anisaldehyd allein keine strangbrechende Wirkung

zeigte. Steigende Cu(II)-Konzentrationen in Kombination mit konstanten p-Anisaldehyd-Konzentrationen zeigten eine maximale Strangbruchinduktion bei einer Cu(II)-Konzentration von 0,05 mM (Abb. 20). Wie schon bei Benzaldehyd/Cu(II) diskutiert, ist die Ausbildung eines „Cu(II)-Optimums“ auch hier u.a. auf die Cu(II)-Komplexierungseigenschaften der verwendeten DNA und der Affinität von p-Anisaldehyd zu Cu(II) zurückzuführen. Insbesondere das ausgeprägte „Cu(II)-Optimum“ als auch die in etwa gleiche Anzahl an ESB/PM2 DNA-Molekül in Tris•HCl- und NaPO₄-Puffer (Abb. 21), trotz der Fähigkeit des organischen Tris-Moleküls Kupferionen zu komplexieren, weisen auf eine erhöhte Affinität von p-Anisaldehyd zu Cu(II) hin.

Wie schon für Benzaldehyd/Cu(II) erläutert, kann das Auftreten von DSB auch bei der Substanzkombination p-Anisaldehyd/Cu(II) nicht als Folge einer zufälligen Verteilung von Einzelstrangbrüchen erklärt werden. Im Cu(II)-Optimum induzierte p-Anisaldehyd ab 2,6 ESB Doppelstrangbrüche (Abb. 22). Es ist auch hier von einem „site-spezifischem“ Mechanismus auszugehen, bei dem das an der DNA gebundene Kupfer durch die Reaktion mit p-Anisaldehyd, das ebenfalls an der DNA komplexiert oder mit der DNA assoziiert sein könnte, ortsgebunden reaktive Intermediate erzeugt, die beide Komplementärstränge der DNA schädigen. Dabei wird, wie von Chevion (1988) beschrieben, vorausgesetzt, dass das an der DNA gebundene Kupfer mehrfach Reaktionen eingehen kann, die zu reaktiven DNA-schädigenden Spezies führen.

p-Anisaldehyd/Cu(II) induzierte sowohl aerob als auch anaerob die gleiche Anzahl an DNA-Strangbrüchen. Die sauerstoffunabhängige Strangbruchinduktion durch p-Anisaldehyd/Cu(II) zeigt, dass eine ROS Bildung über die Fenton Reaktion hier keine Rolle spielen kann. Da die Strangbruchinduktion in beiden Versuchsansätzen nahezu gleich war, ist davon auszugehen, dass die unter aeroben und anaeroben Bedingungen gebildeten DNA-strangbrechenden Spezies identisch sind.

Die Interpretation, dass ROS bzw. freie [•]OH-Radikale auch unter aeroben Bedingungen im Reaktionsansatz p-Anisaldehyd/Cu(II) nicht entstehen, wird durch eine Reihe weiterer hier durchgeführter Untersuchungen bekräftigt.

So gab die relativ hohe Anzahl an AP-Stellen einen ersten Hinweis einer zumindest untergeordneten Rolle von $\cdot\text{OH}$ -Radikalen bei der Strangbruchinduktion durch p-Anisaldehyd/Cu(II). Das für p-Anisaldehyd/Cu(II) bestimmte Verhältnis von AP-Stellen/ESB betrug ≤ 1 , im Gegensatz zu einem durch $\cdot\text{OH}$ -Radikale gebildeten Verhältnis von ca. 0,5 (Epe *et al.*, 1993a). Auch die schon erwähnte pufferunabhängige Strangbruchinduktion in NaPO_4^- - und $\text{Tris}\cdot\text{HCL}$ -Puffer deutet darauf hin, dass freie $\cdot\text{OH}$ -Radikale bei der p-Anisaldehyd/Cu(II)-Reaktion keine Rolle spielen. Da Tris $\cdot\text{OH}$ -Radikalfängereigenschaften besitzt (Halliwell und Gutteridge, 1989, Shiraishi *et al.*, 1993) sollte bei einer Hauptbeteiligung von $\cdot\text{OH}$ -Radikalen an der Strangbruchinduktion, die Anzahl an ESB/PM2 DNA-Molekül in diesem Puffersystem geringer sein.

Das Fehlen freier $\cdot\text{OH}$ -Radikale wurde insbesondere dadurch bestätigt, dass bei der Inkubation von p-Anisaldehyd/Cu(II) mit 2-dG kein 8-OHdG nachgewiesen werden konnte. ESR-spektroskopisch konnte ebenfalls kein DMPO- $\cdot\text{OH}$ -Addukt nachgewiesen werden.

Auch die fehlende bzw. geringe Inhibition der Strangbrüche durch DMSO (vergl. Tab. 6), macht eine Beteiligung von freien $\cdot\text{OH}$ -Radikalen an der Strangbruchbildung unwahrscheinlich (vergl. Diskussion 4.1.1).

Voraussetzung dafür, dass bei der Reaktion p-Anisaldehyd/Cu(II) keine freien $\cdot\text{OH}$ -Radikale entstehen, ist, dass das aus der p-Anisaldehyd/Cu(II) resultierende Cu(I) auch in sauerstoffhaltiger Atmosphäre den molekularen Sauerstoff nicht reduzieren kann. Dementsprechend konnte für p-Anisaldehyd/Cu(II) gezeigt werden, dass neben der Strangbruchbildung auch die Cu(I)-Bildung sauerstoffunabhängig war und unter aeroben wie anaeroben Bedingungen der gleichen Kinetik folgte (Abb. 25). Innerhalb von 1 Minute wurde 70-80% des angebotenen Cu(II) reduziert. Da Cu(I) bei der Reaktion p-Anisaldehyd/Cu(II) entstanden ist, wird es, wie in Gleichung (VII) für Benzaldehyd dargestellt, zur Elektronenübertragung von p-Anisaldehyd auf das Übergangsmetall kommen. Natürlich ist dabei auch eine Beteiligung der Methoxyfunktion nicht ausgeschlossen. Zusätzlich konnte das Signal des paramagnetischen Cu^{2+} -Ions (vergl. Abb. 42) nach Zugabe von p-Anisaldehyd nicht mehr detektiert werden, was ein Hinweis darauf ist, dass das radikalische Cu^{2+} in das nicht radikalische Cu^{1+} überführt wurde. In der Literatur wird neben der Initiationsreaktion (Gl.VII) durch die Aldehydfunktion noch ein weiterer Weg zur Cu(I)-Bildung beschrieben (vergl Gl. VI), der auch für p-Anisalde-

hyd zutreffen könnte. Ausgehend von der Oxidierbarkeit C-zentrierter Radikale durch Cu(II) wird von Sheldon und Kochi (1981) die Bildung eines Carbeniumions postuliert. Voraussetzung, dass diese Reaktion auch unter aeroben Bedingungen stattfindet, ist eine erfolgreiche Konkurrenz des Cu(II) mit O₂ um das C-zentrierte Radikal. Die DNA-strangbrechende Wirkung C-zentrierter Radikale ist in der Literatur mehrfach beschrieben worden (Kato *et al.*, 1992; Griffiths und Murphy, 1992; Augusto, 1993; Hiramoto *et al.*, 1994 und 1993; Justo *et al.*, 1995). C-zentrierte Acylradikale, als auch Carbeniumionen sind in der Lage Basenaddukte, die auch für p-Anisaldehyd/Cu(II) nachgewiesen wurden, zu bilden (Justo *et al.*, 1995; Arnett und Venimadhavan, 1991). Damit wäre auch die hohe Rate an AP-Stellen, die durch p-Anisaldehyd/Cu(II) induziert wurde, zu erklären. ESR-spektroskopisch konnte kein C-zentriertes Radikal weder mit noch ohne Spin-trap 4-POBN nachgewiesen werden. Ebenso wie schon für Benzaldehyd/Cu(II) diskutiert, ist auch hier fraglich ob aufgrund sterischer Behinderungen der beiden aromatischen Ringe von p-Anisaldehyd und 4-POBN eine Bindung des entstehenden Radikals möglich ist. Andererseits wäre es auch möglich, dass das entstehende 4-POBN-Radikal mit Cu(I) so komplexiert, dass es zu einer vollständigen Delokalisierung des einsamen Elektrons kommt und das Radikal damit ESR-spektroskopisch nicht mehr nachweisbar wäre.

Die aktuelle Cu(I)-Konzentration war im Verlauf der p-Anisaldehyd/Cu(II)-Reaktion im Ansatz gleichbleibend hoch (ca. 80% des eingesetzten Cu(II)-Gehaltes) und entsprach in etwa der Menge an Cu(I), die in Anwesenheit des Cu(I)-Chelators Bathocuproin im Reaktionsansatz bestimmt wurde. Dies bedeutet, dass entweder Cu(I) während der Reaktion nicht wieder reoxidiert wird, oder wesentlich stabiler im Ansatz ist als durch Reoxidation entstandenes Cu(II). Die Ursache hierfür könnte eine starke Bindung des Cu(I) an p-Anisaldehyd bzw. an ein Reaktionsprodukt sein, wodurch eine schnelle Reoxidation des Cu(I) zum Cu(II) verhindert wird. Diese Vermutungen werden zusätzlich dadurch bekräftigt, dass der Cu(I)-Gehalt bei den aktuellen Messungen über einen Zeitraum von 120 Minuten (Daten nicht gezeigt) konstant hoch blieb.

Die Tatsache, dass während der p-Anisaldehyd/Cu(II)-Reaktion innerhalb weniger Minuten eine nahezu vollständige Reduktion des Cu(II) stattfand und gleichzeitig eine p-Anisaldehydkonzentrationsabhängige Strangbruchbildung zu beobachten war, könnte so gedeutet werden, dass Cu(II) ausschließlich eine Initiatorfunktion in einer Radikalkettenreaktion besitzt. Dage-

gen spricht erstens, dass vergleichbar hohe Cu(II)-Konzentrationen zur Strangbruchinduktion benötigt werden. Zweitens zeigt die nahezu vollständige Inhibition der Strangbruchinduktion durch Bathocuproin und Neocuproin, dass Cu(I) bzw. Folgereaktionen mit Cu(I) zu ca. 100% an der Strangbruchinduktion beteiligt sein müssen. Die vollständige inhibitorische Wirkung von Neocuproin und Bathocuproin spricht zudem gegen eine Beteiligung des primären Acylradikals bzw. des Carbeniumions an der Strangbruchinduktion. Aufgrund der DSB-Induktion sollte das gebildete Cu(I) in DNA-chelatisierter Form redoxaktiv vorliegen, oder mehrfache ESB-Induktionen führen zur DSB-Induktion. Im Ansatz zur Bestimmung der Cu(I)-Bildung war keine DNA anwesend (DNA störte die photometrische Bestimmung des BCS-Cu(I)-Komplexes). Eine Reoxidation des Cu(I) zum Cu(II) muss aufgrund der identischen O₂-unabhängigen Strangbruchinduktion anders als über molekularen Sauerstoff erfolgen. Eine O₂-unabhängige DNA-Strangbruchinduktion wurde auch von Glutathion(GSH)/Cu(II) beschrieben, wobei hier vorgeschlagen wird, dass eine Reoxidation des Cu(I) zum Cu(II) in diesem System über ein primär gebildetes Thiyl-Radikal (GS[•]) erfolgt (Aparna *et al.*, 1996). Auch für das System p-Anisaldehyd/Cu(II) wäre eine Reoxidation des Cu(I) zum Cu(II) in Anwesenheit von DNA über möglicherweise gebildete radikalische Intermediate denkbar.

Der inhibitorische Effekt der Katalase, der auf den ersten Blick als einziger Befund für eine Beteiligung von [•]OH-Radikalen aus der Fenton-Reaktion spricht, kann im Falle von p-Anisaldehyd/Cu(II) nicht auf der sonst üblichen Basis der Inhibition der Fenton-Reaktion (Mello-Filho und Meneghini, 1984; 1991) verstanden werden. Katalase inhibierte ebenso wie die Cu(I)-Chelatoren die Strangbruchbildung vollständig, sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen (Tab. 6). Da Rinderserumalbumin in gleicher Konzentration keine Hemmwirkung zeigte, ist die Inhibition der Katalase wahrscheinlich auf ihre enzymatische Funktion zurückzuführen. Falls dies auch unter anaeroben Bedingungen zutreffen sollte und die anderen beschriebenen Versuchsergebnisse bei der Interpretation miteinbezogen werden, muss vermutet werden, dass das Substrat unter diesen Bedingungen kein Peroxid sein kann, das aus molekularem Sauerstoff gebildet wurde. Sollte dennoch ein Hydroperoxid als Substrat fungieren, so müsste der Sauerstoff aus der Aldehyd- oder aus der Methoxygruppe des p-Anisaldehyds stammen. Eine Katalaseaktivität unter anaeroben Bedingungen wurde auch bei der Oxidation anderer Carbonylverbindungen wie Acetophenon (s.4.3.1) und Malondialdehyd (Tün-nemann, 1997) nachgewiesen. Von Tün-nemann (1997) wird für Malondialdehyd die Bildung eines Endoperoxides als Substrat für die Katalase postuliert. Die

entsprechende Bildung eines Endoperoxides bei p-Anisaldehyd wäre durch die Reaktion zweier p-Anisaldehydmoleküle unter Beteiligung von Kupfer vorstellbar.

4.2.2 Zyto- und gentoxische Wirkung von p-Anisaldehyd/Cu(II)

In Tabelle 17 sind die Ergebnisse zur Zyto- und Gentoxizität von p-Anisaldehyd/Cu(II) zusammengefasst.

Tab. 17: Zusammenfassende Darstellung der Zellkulturuntersuchungen zur Zyto- und Gentoxizität von p-Anisaldehyd/Cu(II)

Untersuchte Parameter	p-Anisaldehyd			p-Anisaldehyd/Cu(II)			Kombinationseffekt
	EC ₁₀	EC ₃₀	EC ₅₀	EC ₁₀	EC ₃₀	EC ₅₀	
Akute Toxizität							
V79 (AT ₀)**	18,6	>20	>>20	6,0	14,4	20	+
V79 (AT ₂₁)**	14,0	15,9	17,1	5,8	10,1	13,8	+
Wachstumshemmung							
N57*	6,0	10,0	12,3	5,1	8,0	10,1	+
Hemmung der Koloniebildungsfähigkeit							
V79*	12,5	12,9	13,5	3,8	7,0	9,1	+
	Comet-Assay		Alkalische Elution	Comet-Assay		Alkalische Elution	
DNA-Strangbruch-induktion in der Zelle	(+)**		(+)*,**	+++**		+++*,**	+
Nachweis von DNA-Protein-Crosslinks*,**	n.u.		-	n.u.		-	
Nachweis von DNA-DNA Crosslinks*	n.u.		-	n.u.		-	
	UDS			UDS			
DNA-Reparatur*,**	-			-			
Hemmung der UV-induzierten Reparatur**	++			++			-
Hemmung der MMS-induzierten Reparatur**	-			++			+
Nachweis der Mutagenität (HPRT)*	-			-			
Abnahme der Mutationsfrequenz mit zunehmender Konzentration*	-			+			+

*= gleichzeitige Inkubation (60 min. p-Anisaldehyd/Cu(II)), **= Mit Vorinkubation (90-minütige Vorinkubation mit Cu(II) und nachfolgender 60 minütiger Inkubation mit p-Anisaldehyd), -= negativer Effekt, (+)= schwach positiver Effekt, ++= positiver Effekt, +++= deutlich positiver Effekt, ++++= stark positiver Effekt.

Zytotoxische Wirkung von p-Anisaldehyd/Cu(II)

Wie in Tabelle 16 zu erkennen, zeigte p-Anisaldehyd allein, ähnlich wie Benzaldehyd keine akut toxische Wirkung (AT_0) und erwies sich bei den übrigen Untersuchungen zur Zytotoxizität als mäßig toxisch. Daten zur Zytotoxizität von p-Anisaldehyd allein liegen in der Literatur bisher kaum vor. Anhand der vorliegenden Ergebnisse zur Akuten Toxizität konnte eine Hemmung der Succinatdehydrogenase durch p-Anisaldehyd allein unter den gewählten Versuchsbedingungen ausgeschlossen werden. Wolf *et al.* (1982) hingegen beschrieben eine Hemmung der Succinatdehydrogenase durch p-Anisaldehyd (2-20 mM). Da diese Untersuchungen an isolierten Lebermitochondrien durchgeführt wurden, und die Ergebnisse nicht ohne weiteres auf ganze Zellen übertragbar sind, ist dieser Widerspruch verständlich.

Bei allen gemessenen Endpunkten, (AT_0 , AT_{21} , Wachstumshemmung und Hemmung der Koloniebildungsfähigkeit) konnte im Vergleich zur Einzelwirkung eine erhöhte Toxizität der Kombination p-Anisaldehyd/Cu(II) beobachtet werden. Der Kombinationseffekt bei p-Anisaldehyd/Cu(II) war bei den gemessenen Toxizitätsparametern AT_{21} , Wachstumshemmung und Hemmung der Koloniebildungsfähigkeit vergleichbar und stärker als bei AT_0 . Dies bedeutet, dass durch die Kombination hervorgerufene Schäden erst Stunden nach erfolgter Schadstoffinkubation zum Tragen kommen. Dabei könnte es sich sowohl um gentoxische als auch um epigenetische Ereignisse handeln.

Die verstärkende Wirkung durch Cu(II) war bei allen untersuchten Endpunkten signifikant, aber bis auf die Koloniebildungsfähigkeit nicht sehr stark ausgeprägt. Aus diesem Grunde wurde darauf verzichtet, einen Vergleich der Verstärkerwirkung bei Akuter Toxizität, Wachstumshemmung und Koloniebildungsfähigkeit vorzunehmen. Der höhere Kombinationseffekt bei der Hemmung der Koloniebildungsfähigkeit ist ein Hinweis auf irreversible Schäden.

Untersuchungen zur Gentoxizität von p-Anisaldehyd/Cu(II)

Wie in den Untersuchungen an isolierter DNA nachgewiesen, wurden durch p-Anisaldehyd/Cu(II) ebenfalls in der ganzen Zelle, wenn auch in geringerem Ausmaß, DNA-Strangbrüche induziert. Eine DNA-Strangbruchinduktion durch p-Anisaldehyd/Cu(II) konnte sowohl mit Hilfe der Methode der Alkalischen Elution (Abb. 29) als auch mit Hilfe der Methode des Kometen-Assays erbracht werden (Abb. 31). Die DNA-Strangbruchinduktion durch eine gemeinsame einstündige Inkubation der Zellen mit p-Anisaldehyd und Cu(II) entsprach

in etwa der einer sequenziell durchgeführten Inkubation (Daten nicht gezeigt). Dies kann als Hinweis darauf angesehen werden, dass die für die Toxizität verantwortlichen Reaktionen von p-Anisaldehyd/Cu(II) im Gegensatz zu den entsprechenden Reaktionen bei Benzaldehyd/Cu(II) und Acetophenon/Cu(II) innerhalb der Zelle stattfinden.

Ein Vergleich der beiden Methoden zeigt bei hohen Anisaldehyd/Cu(II)-Konzentrationen eine stärkere Sensitivität des Kometen-Assays, was daran gemessen werden kann, dass die DNA eines großen Anteiles an Zellen so stark geschädigt wurde, dass diese nicht mehr auswertbar waren. Das Mitte der 80er Jahre entwickelte Verfahren des Kometen-Assays (Einzelzellgelelektrophorese) gilt als besonders sensitive Methode zum Nachweis von direkten Einzelstrangbrüchen, abasischen Stellen (AP-Stellen) und anderen alkali-labilen Stellen sowie Intermediaten der Exzisionsreparatur in einzelnen Zellen (Anderson und Plewa, 1998). Nach Gedik *et al.* (1992) können bereits 0,1 DNA-Strangbrüche pro 10^9 Dalton nachgewiesen werden. Diese Methode wurde bereits erfolgreich in diversen *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen eingesetzt (Übersichtsartikel s. Tice *et al.*, 1990b ; McKelvey-Martin *et al.*, 1993) und gilt als hoch sensitive Methode zum Nachweis von DNA-Schäden, die durch ionisierende Strahlung, radiomimetische Chemikalien und Sauerstoffradikale induziert werden (Tice *et al.*, 1990a , 1990b; Vijayalaxmi *et al.*, 1992; McKelvey-Martin *et al.*, 1993). Auch von Leroy *et al.* (1996) wird der Kometen-Assay im Vergleich zur Alkalischen Elution als wesentlich sensitiver beschrieben.

p-Anisaldehyd/Cu(II) erzeugte keine DNA-DNA- und/oder DNA-Protein-Crosslinks, wobei die hier verwendete Methode der Alkalischen Filterelution in bezug auf den Nachweis der Bildung und Reparatur von DNA-DNA-Crosslinks sensitiver ist als der Kometen-Assay (Pfuler und Wolf, 1996; Merck und Speit, 1999). Bei DNA-DNA-Crosslinks wird in Anwesenheit von p-Anisaldehyd/Cu(II) eine verringerte Elutionsrate der DNA aus MMS-behandelten Zellen erwartet. Tatsächlich wurde jedoch bei MMS/p-Anisaldehyd bzw. MMS/p-Anisaldehyd/Cu(II) behandelten Fibroblasten eine erhöhte Elutionsrate gemessen (Abb. 30a), die mit der Summe der Strangbrüche der einzelnen Komponenten zu erklären ist (s. Abb. 30b).

Es wurde keine Reparatur der durch p-Anisaldehyd/Cu(II) induzierten Strangbrüche mit Hilfe der UDS beobachtet (Tab. 7). Auch bei gleichzeitiger oder verlängerter Inkubation mit den Schadstoffen konnte keine UDS nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Neben den

schon bei Benzaldehyd diskutierten möglichen Ursachen kann für p-Anisaldehyd eine Hemmung der DNA-Reparatur als Hauptursache für die nicht beobachtete Reparatur vermutet werden. Hinweise dafür liegen in der Literatur für die Aldehyde Formaldehyd und Acrolein vor. Grafstrom *et al.* (1983) beschrieben eine Hemmung der UV- oder Benz(a)pyren-induzierten Reparatur durch Formaldehyd in humanen Bronchialzellen. Snyder und van Houten (1986) führten diese auf eine verminderte Aufnahme von ³H-Thymidin in die Formaldehyd behandelte Zellen zurück. Grafstrom *et al.* (1987) beschrieben eine Hemmung der O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MMT) durch Acrolein und Formaldehyd und Dypbukt *et al.* (1993) beschrieben Acrolein als potenten Inhibitor der Exzisionsreparatur. Für p-Anisaldehyd liegen keine entsprechenden Daten in der Literatur vor. Wie in dieser Arbeit nachgewiesen, konnte sowohl eine relevante Hemmung der UV- als auch der MMS-induzierten Reparatur durch p-Anisaldehyd bzw. p-Anisaldehyd/Cu(II) nachgewiesen werden (Tab. 8 und 9). Cu(II) allein inhibierte die UV-induzierte Reparatur nicht, was auch durch vergleichbare Untersuchungen von Jacobi und Witte (1991) bestätigt wird. Welche Reparaturenzyme im einzelnen gehemmt werden, ist auf Grundlage der durchgeführten Untersuchungen nicht bestimmbar. Es müssen jedoch Enzyme betroffen sein, die vor der Ligation aktiv sind. In jedem Fall müssen mehrere unterschiedliche Enzyme betroffen sein, da im Falle von UV-bedingten Schäden auch p-Anisaldehyd allein wirkte, während bei den MMS-bedingten Schäden nur die Kombination hemmend wirkte. Es ist also davon auszugehen, dass p-Anisaldehyd allein die Nukleotid-exzisionsreparatur (NER), wie sie für UV-bedingte Thymindimere angenommen wird, und p-Anisaldehyd in Kombination mit Cu(II) hingegen die Basenexzisionsreparatur (BER) hemmt, wie sie im Allgemeinen für MMS induzierte Schäden beschrieben wird (Beranek *et al.*, 1980; Blackburn und Gait, 1996). Diese unterschiedliche Hemmbarkeit ist eventuell auf eine Hemmung unterschiedlicher Polymerasen zurückzuführen. Nach Wood und Shivji (1997) sind an der Reparatur MMS bedingter Schäden (BER) die DNA-Polymerasen β , δ oder ϵ beteiligt. Die DNA-Polymerase β ist an der Reparatur von DNA-Schäden, die zu Konformationsänderungen führen, wie durch UV-Bestrahlung verursachte Thymindimere, nicht beteiligt. Die hemmende Wirkung von p-Anisaldehyd allein auf die UV-induzierte DNA-Reparatur, könnte daher auf einer Inhibition der DNA-Polymerasen δ und/oder ϵ durch p-Anisaldehyd beruhen, während die Kombination p-Anisaldehyd/Cu(II) eher mit der DNA-Polymerase β interagieren könnte und so die MMS-induzierte Reparatur hemmt. Aufgrund der ähnlichen Ergebnisse mit den Strukturanaloga 2- und 3- Methoxybenzaldehyd und den hydroxylierten Benzaldehyden zur UV-induzierten Reparatur ist, im Vergleich zu

Benzaldehyd, bei der vorgeschlagenen Hemmung der DNA-Polymerasen δ und/oder ϵ durch p-Anisaldehyd eine Beteiligung des zusätzlichen Sauerstoffes in Form der Methoxygruppe wahrscheinlich. Eine Hemmung der AP-Endonuklease durch p-Anisaldehyd bzw. p-Anisaldehyd/Cu(II) in menschlichen Zellen kann sicher ausgeschlossen werden, da weder der Aldehyd allein noch die Kombination mit Cu(II), wie in den Untersuchungen mit isolierter PM2 DNA nachgewiesen, eine inhibitorische Wirkung auf den AP-Endonukleasehaltigen Extrakt aus humanen Fibroblasten zeigte. Durch die nachgewiesene Hemmung der DNA-Reparatur wird auch der stärkere Kombinationseffekt bei der Bestimmung der Koloniebildungsfähigkeit erklärbar.

Untersuchungen zur Mutagenität von p-Anisaldehyd/Cu(II) in V79 Zellen

Im HPRT-Test konnte keine Mutagenität für p-Anisaldehyd und p-Anisaldehyd/Cu(II) nachgewiesen werden (Abb. 32). In Untersuchungen von Sasaki *et al.* (1987), konnte für p-Anisaldehyd ebenfalls keine erhöhte SCE-Rate in CHO Zellen nachgewiesen werden. In einigen anderen Arbeiten wird eine mutagene bzw. gentoxische Wirkung von p-Anisaldehyd allein beschrieben, wobei diese Untersuchungen mit anderen Testsystemen durchgeführt und andere Endpunkte bestimmt wurden. Nach Wangenheim und Bolcsfoldi (1988) war p-Anisaldehyd positiv im Maus-Lymphoma-Assay mit L5178Y Zellen. In humanen Lymphozyten konnte von Jansson *et al.* (1988) eine erhöhte SCE-Rate (Schwesterchromatidaustausch) und von Garberg *et al.*, (1988) DNA-Schäden in Säugetierlymphozyten nachgewiesen werden. Damit scheint zumindest p-Anisaldehyd allein eine potentiell mutagene Wirkung zu besitzen. Die Kombination von p-Anisaldehyd/Cu(II) erzeugte mit zunehmender p-Anisaldehyd-Konzentration eine kontinuierliche Abnahme der Mutantenfrequenz bis unter die Spontanmutationsrate (Abb. 32). Dies könnte einerseits auf zytotoxische Effekte zurückzuführen sein oder ein Hinweis auf eine antimutagene Wirkung von p-Anisaldehyd/Cu(II) darstellen. Da eine Abnahme der Mutationsfrequenz auch schon bei schwach zytotoxischen Konzentrationen zu beobachten war (vergl. Abb. 32) sind zumindest hier andere als zytotoxische Effekte für die Abnahme der Mutationsfrequenz wahrscheinlich.

Nach Ohta (1993) wird dann von einem antimutagenen Agens gesprochen, wenn dieses die Frequenz spontaner oder induzierter Mutationen reduziert. Auch Imanishi *et al.* (1990) wiesen eine Abnahme der Mutatenfrequenz durch Kombinationen mit p-Anisaldehyd im HPRT Test

mit V79 Zellen nach. Hierbei wurden die Effekte ebenfalls in nicht zytotoxischen Konzentrationen beobachtet. Auch andere Autoren wiesen bei Verwendung anderer Testsysteme sowohl in *Escherichia coli*, in Säugerzellen als auch *in vivo* eine antimutagene Wirkung von p-Anisaldehyd nach (Ohta *et al.*, 1986; Watanabe *et al.*, 1988; Sasaki *et al.*, 1990a, 1990b). Ohta *et al.* (1986) führten die antimutagene Wirkung in *Escherichia coli* auf eine verstärkte Rekombinationsreparatur zurück. Eine Hemmung der Exzisionsreparatur, wie sie hier nachgewiesen wurde ist bislang nicht beschrieben worden. Aufgrund der Hemmung der DNA-Reparatur und des erhöhten Kombinationseffektes bei der Bestimmung der Koloniebildungsfähigkeit wäre eine Mutagenität von p-Anisaldehyd/Cu(II) zu erwarten. Dieser scheinbare Widerspruch ist auf Grundlage der vorliegenden Daten so nicht erklärbar. Das Phänomen der Hemmung der DNA-Reparatur bei gleichzeitiger Reduktion der Mutantenfrequenz ist bei dem Prozess der Apoptose bekannt (Corbet *et al.*, 1999; Oei *et al.*, 1998). Für p-Anisaldehyd sind hierzu in der Literatur bislang keine Daten verfügbar. Neben der antimutagenen Wirkung von p-Anisaldehyd sind auch promutagene Wirkungen nachweisbar (Tamai *et al.*, 1992). Eine antimutagene oder potenzierende Wirkung ist abhängig von den spezifischen Versuchsbedingungen wie: dem Verhältnis von Mutagen/Inhibitor, der Abfolge der Behandlung, dem genetischen Hintergrund der Zielzellen oder dem gemessenen gentoxischen Endpunkt (Ohta, 1993). Die entgegengesetzten Wirkungen von Anti- und Promutagenität sind mit Apoptose vereinbar, da diese nur in einem schmalen Konzentrationsbereich auftritt. Zur Klärung der Frage, ob Apoptoseprozesse bei p-Anisaldehyd/Cu(II) für die genannten Effekte verantwortlich gemacht werden können, sollten Untersuchungen zur Apoptoseinduktion durch p-Anisaldehyd/Cu(II) durchgeführt werden.

4.3 Kombinationswirkung von Acetophenon/Cu(II)

4.3.1 Charakterisierung und mechanistische Aspekte der DNA-Strangbruchinduktion durch Acetophenon/Cu(II) in PM2 DNA

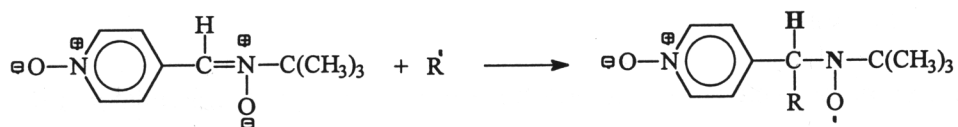
Die Ergebnisse der Kombinationswirkung Acetophenon/Cu(II) sind in Tabelle 18 zusammengefasst. Es wurde gezeigt, dass eine radikalische Reaktion zwischen Acetophenon und Cu(II) unter Bildung von Cu(I) und einem C-zentrierten Radikal (ESR-spektroskopisch nachgewiesen) stattfand. Auch die Abnahme des ESR-spektroskopisch nachgewiesenen Cu(II)-Signals belegt die Ein-Elektronen-Redoxreaktion.

Tab. 18: Zusammenfassende Darstellung der *in vitro* Untersuchungen mit PM2 DNA sowie weiterer mechanistischer Aspekte zur Substanzkombination Acetophenon/Cu(II).

Untersuchte Parameter		Effekt
DNA-Schäden	CuCl ₂ -Optimum	-
	ESB-Induktion	+
	DSB-Induktion	-
	AP-Stellen	+
	Vergleich der DNA-Strangbruchinduktion in Tris/ NaPO ₄ -Puffer	+ / ++
Inhibition der DNA-Strangbrüche	Katalase (aerob)	+++
	Katalase (anaerob)	+++
	DMSO (aerob)	+
	DMSO (anaerob)	+
	Batho-/Neocuproin (aerob)	+++
	Batho-/Neocuproin (anaerob)	+++
weitere Untersuchungen zum Mechanismus	Strangbruchinduktion unter anaeroben Bedingungen	+
	Cu(I)-Produktion (aerob)	++
	Cu(I)-Produktion (anaerob)	++
	Weiterreaktion von Cu(I) (aerob)/(anaerob)	+ / +
	Nachweis angeregter Tripletzustände	-
	Nachweis von 8-OHdG	-
	Radikalnachweis (ESR) DMPO 4-POBN	- +

= negativer Effekt, += positiver Effekt, +++= deutlich positiver Effekt, ++++= stark positiver Effekt, n.u.= nicht untersucht, *= Messwert bezieht auf eine CuCl₂-Konzentration von 2,5 mM.

Das mit Hilfe des Radikalfängers 4-POBN ESR-spektroskopisch nachgewiesene C-zentrierte Radikal war nicht eindeutig identifizierbar. 4-POBN reagiert folgendermaßen mit einem organischen Radikal:



Der Rest R befindet sich im Spin-Addukt in β -Stellung zur Radikalfunktion, so dass die Struktur des Rests keine Auswirkung auf die Aufspaltung des Spektrums hat. Eine Unterscheidung der Radikale ist nur anhand der Kopplungskonstanten möglich. Die Protonen-Kopplungskonstante a_{H} wird mit zunehmend voluminösen Rest kleiner und die Größe der Stickstoff-Kopplungskonstante nimmt mit zunehmender Elektronegativität des Restes ab (Janzen, 1984). Ein Vergleich der Protonenkopplungskonstante a_{H} mit der entsprechenden Konstante, die für ein C-zentriertes Radikal aus der Reaktion Malondialdehyd/Cu(II) (Witte und Krieger, 1997) bestimmt wurde, zeigt, dass die Kopplungskonstante a_{H} für das lineare Malondialdehyd wesentlich höher ist als die des aromatischen Acetophenon, während sich die Stickstoffkopplungskonstanten nicht signifikant unterscheiden. Das für Acetophenon/Cu(II) nachgewiesene organische Radikal lässt sich daher so charakterisieren, dass der Rest R bedeutend voluminöser ist als bei Malondialdehyd/Cu(II) und die Elektronegativität der beiden Radikale als vergleichbar anzusehen ist.

Von Sheldon und Kochi (1981) wurde für Acetophenon eine Mn^{3+} -katalysierte Oxidation beschrieben, die unter Beteiligung von O_2 unter sauren Bedingungen bei 130 °C zur Benzoesäure führte. Da die Strangbruchinduktion durch Acetophenon/Cu(II) sauerstoffunabhängig war, ist davon auszugehen, dass bei der strangbrucherzeugenden Reaktion von Acetophenon mit Cu(II) (unter physiologischen Bedingungen) ein anderer Oxidationsweg eingeschlagen wurde und dass ROS bzw. $\cdot\text{OH}$ -Radikale bei der Strangbruchinduktion keine Rolle spielen. Die Hypothese, dass $\cdot\text{OH}$ -Radikale im Reaktionsansatz Acetophenon/Cu(II) auch unter aeroben Bedingungen nicht entstehen wird durch mehrere mechanistische Untersuchungen bestätigt:

Im Reaktionsansatz Acetophenon/Cu(II) kam es weder zur Bildung von 8-OHdG, noch zur DMPO- $\cdot\text{OH}$ -Adduktenbildung. Die relativ geringe absolute Anzahl an ESB (max. 2 ESB bei 12,5 mM Acetophenon/2,5 mM CuCl_2) und die hohe Induktion von AP-Stellen deutet eben-

falls auf andere als $\cdot\text{OH}$ -induzierte Schädigungsmechanismen hin. Insbesondere das Verhältnis von AP-Stellen/ESB von ca. 1 bei dieser Substanzkombination spricht wie zuvor für p-Anisaldehyd diskutiert gegen eine Hauptbeteiligung von $\cdot\text{OH}$ -Radikalen bei der Strangbruchinduktion. Auch die vergleichsweise geringe Hemmung von DMSO unter aeroben und anaeroben Bedingungen spricht gegen eine Beteiligung von $\cdot\text{OH}$ -Radikalen an der Strangbruchinduktion (Tab. 10). Die um den Faktor 3 erhöhte Strangbruchinduktion durch Acetophenon/Cu(II) in NaPO_4 -Puffer im Vergleich zur Strangbruchinduktion in $\text{Tris}\cdot\text{HCl}$ -Puffer (Abb. 36) ist im Zusammenhang mit den bereits diskutierten Versuchsergebnissen wahrscheinlich nicht auf $\cdot\text{OH}$ -Radikal-Radikalfängereigenschaften des organischen Tris-Moleküls, sondern auf seine Cu(II)-Bindungseigenschaften (Halliwell und Gutteridge, 1989) zurückzuführen.

Die vergleichbare Strangbruchinduktion unter aeroben und anaeroben Bedingungen deutet auf gleiche Schädigungsmechanismen hin. Eine Sauerstoffunabhängigkeit konnte auch für die Cu(I)-Bildung nachgewiesen werden. Die Cu(I)-Bildung war unter anaeroben und aeroben Bedingungen in etwa gleich (Abb. 41) und zeigte den Verlauf einer Sättigung, wobei die Cu(I)-Bildungsrate nach etwa 20 Minuten stagnierte. Die Strangbruchinduktion war nach dieser Zeit jedoch noch nicht abgeschlossen. Dies kann möglicherweise als Hinweis darauf angesehen werden, dass die primären Reaktionsprodukte des Systems Acetophenon/Cu(II) nicht strangbrechend sind. Die Untersuchungen zur Strangbruchinduktion mit und ohne Vorinkubation der DNA mit CuCl_2 zeigen, dass es für die Redoxreaktion von Bedeutung ist in welcher Form Cu(II) vorliegt bzw. chelatiert ist. Die durch Acetophenon/Cu(II) induzierte Strangbruchbildung war bei einer Vorinkubation mit Cu(II) und nachfolgender Acetophenonbehandlung gegenüber einer gleichzeitigen Inkubation ca. dreimal höher (Abb. 37). Es ist bekannt, dass es zwischen Kupferionen und den Guanin-Cytosin-Basenpaaren der DNA *in vitro* (Eichhorn und Shin, 1968; Zimmer *et al.*, 1971; Cullis *et al.*, 1987; Tajmir-Riahi *et al.*, 1988) zu einer stabilen Komplexbildung kommt. Daher ist davon auszugehen, dass durch die Vorinkubation eine stärkere Komplexbildung der DNA mit Cu(II) ermöglicht wurde und Reaktionsprodukte der Acetophenon/Cu(II)-Reaktion bei einer sequenziell durchgeführten Inkubation die DNA stärker schädigen konnten. Dies kann darauf hinweisen, dass die aus der Acetophenon/Cu(II) resultierenden DNA-reaktiven Intermediate sehr kurzlebig sind oder/und bei einer gleichzeitig durchgeführten Inkubation in geringerem Ausmaß gebildet werden.

Die nachgewiesene Zunahme der durch Acetophenon induzierten Strangbrüche mit steigender CuCl_2 -Konzentration (bis zur getesteten Cu(II)-Konzentration von 2,5 mM ohne Ausbildung

eines Maximums (Abb. 34)) zeigt, dass mehr als nur katalytische Cu(II)-Mengen zur Redoxreaktion mit Acetophenon benötigt werden. Eine Kupfer-katalysierte Fenton Reaktion unter Bildung von ROS ist daher auszuschließen. Das Ausbleiben von DSB, selbst bei hohen CuCl₂-Konzentrationen, deutet darauf hin, dass die aus der Acetophenon/Cu(I)-Reaktion stammenden DNA-schädigenden Intermediate weniger reaktiv sind oder/und ihre Bildung nicht innerhalb der DNA stattfindet. Eine weitere Ursache für das Ausbleiben von DSB könnte auch sein, dass ein Redoxzirkel des DNA-gebundenen Cu(I) nicht möglich ist.

Da die aktuelle Cu(I)-Menge in Abwesenheit von Bathocuproin im Reaktionsansatz etwa 1/5 der Cu(I)-Menge betrug, die in Bathocuproin-Anwesenheit bestimmt wurde, muss Kupfer im System Acetophenon/Cu(II) weiterreagieren. Da die Ergebnisse unter aeroben und anaeroben Bedingungen identisch waren, sollten [•]OH-Radikale, die aufgrund der Reduktion von O₂ durch Cu(I) erwartet werden, als DNA-strangbrechende Agenzien der Acetophenon/Cu(II)-Reaktion keine Rolle spielen. Eine sauerstoffunabhängige Weiterreaktion von Cu(I) wäre wie schon bei Benzaldehyd postuliert über die Bildung von Cu(0) denkbar. Diese Vermutung wird durch das schon erwähnte vollständige Verschwinden des ESR-spektroskopischen Signals des paramagnetischen Cu²⁺ Ions (Abb. 42) nach Zugabe von Acetophenon gestützt. Da außerdem die Messungen zur Cu(I)-Bildung zeigten, dass nur ein geringer Teil (max. 27%) des vorhandenen Cu(II) in Cu(I) umgesetzt wurde, liegt auch hier die Differenz (73%) möglicherweise als Cu(0) vor.

Da die Strangbruchinduktion unter aeroben und anaeroben Bedingungen durch BCS und Neocuproin zu 96% (s. Tab. 10) gehemmt wurde, ist Cu(I) essentiell für die Bildung der reaktiven DNA-schädigenden Spezies. Das neben Cu(I) aus der Primärreaktion hervorgehende Produkt kann nicht für die detektierten Strangbrüche verantwortlich sein, da Neocuproin in diesem Fall keine vollständige Hemmwirkung zeigen dürfte.

Die effektive Hemmwirkung durch Katalase scheint auch hier zunächst das einzige Argument für eine Beteiligung von [•]OH-Radikalen zu sein. Aufgrund der bereits diskutierten Ergebnisse und aufgrund der anzunehmenden enzymatischen Katalaseaktivität auch unter anaeroben Bedingungen (BSA zeigte keine Hemmwirkung), kann das Substrat hier ebenfalls kein Peroxid sein, das aus einer Reaktion mit molekularem Sauerstoff resultiert. Wie schon für Benzaldehyd und p-Anisaldehyd angenommen könnte es sich dabei um ein bislang nicht beschriebenes Substrat für Katalase handeln. Falls dieses Substrat eine Peroxidfunktion besitzt, so kann es

sich nur um ein Endoperoxid handeln, das aus einer Reaktion zweier Acetophenonmoleküle hervorgehen könnte.

4.3.2 Zyto- und gentoxische Wirkung von Acetophenon/Cu(II) in Säugerzellkulturen

In Tabelle 19 sind die Ergebnisse zur Zyto- und Gentoxizität von Acetophenon/Cu(II) zusammengefasst.

Tab. 19: Zusammenfassende Darstellung der Untersuchungen zur Zyto- und Gentoxizität von Acetophenon/Cu(II)

Untersuchte Parameter	Acetophenon			Acetophenon/CuCl ₂			Kombinationseffekt
	EC ₁₀	EC ₃₀	EC ₅₀	EC ₁₀	EC ₃₀	EC ₅₀	
Akute Toxizität							
N57 (AT ₀)*	17,0	18,2	20	15,0	17,0	18,0	+
N57 (AT ₂₁)*	13,8	17,0	> 18,0	7,4	10,5	13,1	+
Wachstumshemmung							
N57**	7,5	10,0	11,4	4,6	6,1	7,3	+
Hemmung der Koloniebildungsfähigkeit							
N57**	10,6	13,2	15,0	6,6	9,5	12,0	+
V79**	15,5	17,6	18,6	13,1	14,8	16,0	+
V79*	13,0	14,3	15,0	2,9	9,4	12,2	+
	Comet-Assay	Alkalische Elution		Comet-Assay	Alkalische Elution		
DNA-Strangbruchinduktion in der Zelle	***	(+)*,**		+++**	+++*,**		+
Nachweis von DNA-Protein-Crosslinks*,**	n.u.	-		n.u.	-		
Nachweis von DNA-DNA Crosslinks	n.u.	n.u.		n.u.	n.u.		
	UDS	Alkalische Elution		UDS	Alkalische Elution		
DNA-Reparatur*,**	*,**	+		*,**	+		-
Hemmung der UV-induzierten Reparatur**	-	n.u.		-	n.u.		
Hemmung der MMS-induzierten Reparatur**	-	n.u.		-	n.u.		
Nachweis der Mutagenität (HPRT)	-*/-**			+*,** (12 mM, 16 mM)			+

*= gleichzeitige Inkubation (1 Stunde Acetophenon/CuCl₂), **= Mit Vorinkubation (90-minütige Vorinkubation mit CuCl₂ und nachfolgender 60-minütiger Inkubation mit Acetophenon), = negativer Effekt, (+)= schwacher Effekt, += positiver Effekt, +++= stark positiver Effekt, n.u.= nicht untersucht.

Zytotoxische Wirkung von Acetophenon/Cu(II)

Wie in Tabelle 19 zu erkennen, zeigte Acetophenon allein nur eine schwache direkte Vitalitätseinschränkung (AT_0) und erwies sich bei den übrigen Untersuchungen zur Zytotoxizität als relativ untoxisch. Daten zur Zytotoxizität von Acetophenon liegen in der Literatur bisher nicht vor.

Die Kombination von Acetophenon mit untoxischen Konzentrationen an Cu(II) ergab eine eindeutig verstärkende Wirkung, sowohl bei der Messung der Akuten Toxizität (AT_0 ; AT_{21} ; Abb. 44a, b), der Hemmung des Wachstums (Abb. 45), sowie der Koloniebildungsfähigkeit (Abb. 46a, b). Wie schon für Benzaldehyd/Cu(II) und p-Anisaldehyd/Cu(II) beschrieben konnte auch für Acetophenon/Cu(II) eine erhöhte Toxizität in Abhängigkeit von der Zeit nach erfolgter Schadstoffinkubation festgestellt werden. Bei der Wachstumshemmung und der Hemmung der Koloniebildungsfähigkeit zeigten sich im Vergleich zur Akuten Toxizität gleiche Effekte bei geringeren Acetophenon-Konzentrationen.

Die verstärkende Wirkung durch Cu(II) war bei allen untersuchten Endpunkten signifikant, aber nicht sehr stark ausgeprägt. Aus diesem Grunde wurde darauf verzichtet, einen Vergleich der Verstärkerwirkung bei Akuter Toxizität, Wachstumshemmung und Koloniebildungsfähigkeit vorzunehmen. Der höhere Kombinationseffekt bei der Hemmung des Wachstums und der Koloniebildungsfähigkeit ist ein Hinweis auf eine verzögerte bzw. fehlende Reparatur von durch Acetophenon/Cu(II) induzierten Schäden.

Ein Vergleich der beiden Zellsysteme N57 und V79 (Koloniebildungsfähigkeit) zeigte, dass V79 Zellen eine etwas geringere Empfindlichkeit gegenüber Acetophenon bzw. Acetophenon/Cu(II) aufwiesen (Abb. 46). Dies könnte u.a. durch die unterschiedliche Enzymausstattung fremdstoffmetabolisierender Enzyme in N57 und V79 Zellen begründet sein. Die Expression wichtiger fremdstoffmetabolisierender Enzyme ist, abgesehen von den ersten Stunden von Primärkulturen, in Zellkulturen stark eingeschränkt oder stark vermindert (Glatt *et al.*, 1987). Dies trifft insbesondere für viele Cytochrom P450-Systeme zu, die oft für die ersten Metabolisierungsschritte verantwortlich sind. V79 Zellen nehmen dabei eine Extremstellung ein, da sie unter üblichen Kulturbedingungen gar keine Cytochrome P450 zu exprimieren scheinen (Glatt *et al.*, 1987). Andere Enzyme des Fremdstoffmetabolismus wie Cytochrom P450 Reduktase, mikrosomale Epoxidhydrolasen, Gluthathiontransferase und N-Deacetylase

werden in V79 Zellen im Gegensatz zu primären Zelllinien z.T. in hohen Mengen exprimiert (Glatt *et al.*, 1986, 1987). So könnte es in V79 Zellen zur Detoxifizierung bzw. in N57 Zellen zur Toxifizierung von Acetophenon/Cu(II) oder entstehenden Intermediaten kommen.

Eine gleichzeitige Inkubation der Zellen mit Acetophenon/Cu(II) erbrachte wie bei Benzaldehyd/Cu(II) einen höheren Kombinationseffekt als wenn die Zellen mit Cu(II) vorinkubiert und anschließend mit Acetophenon inkubiert wurden. Wenn die Zellen gleichzeitig mit Kupfer und Acetophenon inkubiert werden ist davon auszugehen, dass aus dieser Reaktion resultierende toxische Intermediate im Vergleich zu einer sequenziell erfolgenden Inkubation im größeren Umfang entstehen und schon außerhalb der Zelle gebildet werden können und das schädigende Potenzial damit größer ist.

Gentoxische Wirkung von Acetophenon/Cu(II)

Literaturdaten zur Gentoxizität von Acetophenon liegen nicht vor. Entsprechend den Untersuchungen an isolierter PM₂ DNA und den zytotoxischen Untersuchungen, die aufgrund der verzögerten Toxizität für eine teilweise Beteiligung von gentoxischen Schäden sprechen, konnte auch in ganzen Zellen eine Strangbruchinduktion durch Acetophenon/Cu(II) nachgewiesen werden. Dies wurde sowohl mit Hilfe der Alkalischen Elution als auch mit Hilfe des Kometen-Assays gezeigt. Wie schon für p-Anisaldehyd/Cu(II) beobachtet und von anderen Autoren für andere Substanzen beschrieben (Murray *et al.*, 1987; Leroy *et al.*, 1995, 1996), zeigte der Kometen-Assay auch bei Acetophenon/Cu(II) im Vergleich zur Alkalischen Elution eine höhere Sensitivität. Mit der Methode der Alkalischen Elution wurde nachgewiesen, dass eine gleichzeitige Inkubation der Zellen mit Acetophenon und Cu(II) weniger wirksam war als eine sequenzielle Inkubation (Abb. 47a, 47b). Als Ursache könnte auch hier, wie zuvor für die entsprechenden Untersuchungen an isolierter PM₂ DNA diskutiert, eine erhöhte Komplexbildung zwischen DNA und Cu(II) vermutet werden, die in der Folgereaktion mit Acetophenon zu einer stärkeren DNA-Schädigung führt. Aufgrund der in beiden Testsystemen nachgewiesenen Strangbruchinduktion auch durch Acetophenon allein, muss von einer, wenn auch nur schwachen gentoxischen Wirkung von Acetophenon ausgegangen werden.

Eine Verminderung der detektierbaren Strangbrüche in ganzen Zellen durch möglicherweise induzierte DNA-Protein- oder/und DNA-DNA-Crosslinks konnte ausgeschlossen werden. Da-

her ist die relativ geringe Strangbruchinduktion in ganzen Zellen wahrscheinlich auf vielfältige Schutzfunktionen der Zelle gegenüber C-zentrierten Radikalen, zu erklären.

Mit Hilfe der Alkalischen Elution konnte für Acetophenon/Cu(II) in höheren Konzentrationen 24 Stunden nach erfolgter Schadstoffbehandlung eine Reduktion der induzierten Strangbrüche um die Hälfte, jedoch keine weitere Reduktion 48 Stunden nach erfolgter Schadstoffbehandlung beobachtet werden (Abb. 49). Diese Ergebnisse deuten auf eine langsame und unvollständige Reparatur der Acetophenon/Cu(II) induzierten DNA-Schäden hin. Da bei einer $\cdot\text{OH}$ -Radikal-bedingten Schädigung von einer schnellen Reparatur auszugehen ist, sprechen diese Befunde auch in der ganzen Zelle gegen eine Beteiligung von $\cdot\text{OH}$ -Radikalen an der Strangbruchbildung.

Im Gegensatz zur Abnahme der DNA-Schäden mit der Zeit (mit Hilfe der Alkalischen Elution nachgewiesen), konnte bei der Messung der Exzisionsreparatur (UDS) unter den gewählten Versuchsbedingungen keine Reparatur beobachtet werden (Tab. 11). Die negativen UDS-Befunde und die hohe Persistenz der DNA-Schäden (Alkalische Elution) könnten so interpretiert werden, dass eine Inkubation von 3 Stunden (längere Messungen sind mit der UDS nicht durchführbar) nach erfolgter Schadstoffbehandlung nicht ausreichend war um eine positive UDS beobachten zu können. Es könnten aber auch wie schon für Benzaldehyd/Cu(II) und p-Anisaldehyd/Cu(II) diskutiert durch Acetophenon/Cu(II) DNA-Schäden induziert werden, die nicht durch eine mit der UDS erfassbaren Exzisionsreparatur beseitigt werden. Da eine signifikante Hemmung der UV- als auch der MMS-induzierten (Tab. 12 und 13) DNA-Reparatur für Acetophenon/Cu(II) ausgeschlossen wurde, scheidet eine Hemmung der DNA-Reparatur durch Acetophenon/Cu(II) als Ursache für die nicht nachweisbare UDS aus.

Die negativen UDS-Befunde zeigen ebenfalls, dass Acetophenon durch die Kombination mit Cu(II) bzw. durch enzymatische Prozesse auch in der ganzen Zelle nicht in einen angeregten Triplettzustand übergeht. Triplett-angeregte Zustände von Carbonylverbindungen wie Acetophenon könnten in der Zelle auch im Dunkeln, durch Oxidation mit Enzymen und durch den Abbau von Lipidperoxiden, z.B. unter oxidativem Stress gebildet werden (Cilento, 1984; Cadenas, 1984; Baader *et al.*, 1985; Epe *et al.*, 1993b). Gleichzeitig wurde in sehr frühen Arbeiten die Induktion UV-typischer DNA-Schäden (Cyclobutanpyrimidindimere) durch angeregtes Acetophenon und Aceton beschrieben (Lamola und Yamane, 1967; Rahn *et al.*, 1974; Rahn,

1979). Wenn es sich bei den durch Acetophenon/Cu(II) in der ganzen Zelle induzierten DNA-Schäden um solche UV-typische Schäden handeln würde, müssten diese unter den üblichen Versuchsbedingungen über die UDS nachweisbar sein.

Untersuchungen zur Mutagenität von Acetophenon/Cu(II) in V79 Zellen

Da die durch Acetophenon/Cu(II) induzierten DNA-Schäden eine hohe Persistenz aufwiesen, kann ein mutagenes Potenzial für diese Substanzkombination erwartet werden. Mit Hilfe des HPRT-Testes konnte gezeigt werden, dass die durch Acetophenon/Cu(II) gesetzten DNA-Schäden zu Mutationen führten. Sowohl bei gleichzeitiger als auch bei sequenzieller Behandlung der V79 Zellen mit den Schadstoffen (Abb. 50) zeigte sich bei 12 bzw. 16 mM Acetophenon in Kombination mit Cu(II) ein schwach positiver Befund. Bei höheren Konzentrationen konnte keine über der Spontanmutationsrate liegende Mutationsrate nachgewiesen werden. Allerdings wurde hier im hochtoxischen Bereich gemessen und es ist bekannt, dass die Mutagenität von zytotoxischen Effekten beeinflusst wird (Haynes *et al.*, 1985; Rettig *et al.*, 1991). Für Acetophenon allein konnte keine mutagene Wirkung nachgewiesen werden, obwohl Acetophenon in allen Testsystemen gering genotoxisch wirkte. Es kann hier nicht entschieden werden, ob der negative Befund darauf beruht, dass die induzierte Mutationsrate unterhalb der Nachweisgrenze liegt, oder ob die Mutagenität nur aufgrund der Kombination mit Cu(II) auftrat. Sowohl Elliger *et al.* (1984) als auch Leifer *et al.* (1981) konnten ebenfalls keine Mutanteninduktion für Acetophenon allein in mehreren *Salmonella typhimurium* Stämmen bzw. in *Escherichia coli* polA (W3110 vs P3478) nachweisen. Von Sofuni (1985) hingegen wurde Acetophenon als mutagen in Hamsterlungenzellen, also in Fremdstoffmetabolisch-kompetenten Zellen beschrieben.

4.4 Vergleichende Aspekte der Kombinationswirkung der untersuchten Substanzpaare

Die in dieser Arbeit vorgelegten Untersuchungsergebnisse zeigen am Beispiel von Benzaldehyd, p-Anisaldehyd und Acetophenon, dass diese, die allein nicht oder nur schwach DNA-schädigend wirkten, in Kombination mit CuCl₂ DNA-Schäden an isolierter DNA und in ganzen Zellen hervorriefen. Da die Charakteristika der DNA-Schädigung, trotz der Ähnlichkeit der Carbonylverbindungen, unterschiedlich waren, müssen die ultimat DNA-schädigenden Spezies unterschiedlich sein. Die Ergebnisse der vorgelegten Untersuchungen sind in Tabelle 20 und 21 zusammengefasst.

Tab. 20: Zusammenfassung der *in vitro* Untersuchungen mit PM2 DNA sowie mechanistischer Aspekte der untersuchten Substanzpaare

untersuchte Parameter	Benzaldehyd/ Cu(II)	p-Anisaldehyd/ Cu(II)	Acetophenon/ Cu(II)
Cu(I)-Bildung :			
aerob	+	+	+
anaerob	+	+	+
identisch aerob/anaerob	+	+	+
Weiterreaktion von Cu(I)			
aerob	+	?	+
anaerob	+	?	+
ESB-Induktion			
aerob	++	++	+
anaerob	-	++	+
AP-Stellenbildung	-/(+)	+	+
DSB-Induktion	++	+	-
Reaktion innerhalb der DNA	+	+	?
Effekt von •OH-Radikalfängern	+	- (aerob und anaerob)	(+) (aerob und anaerob)
Cu(I)-Fängern	+++	+++ (aerob und anaerob)	+++ (aerob und anaerob)
Katalase	++	+++ (aerob und anaerob)	+++ (aerob und anaerob)
Beteiligung von •OH-Radikalen an der Strangbruchinduktion	-	-	-

-= negativer Effekt, (+)= schwach positiver Effekt, += positiver Effekt, ++= deutlich positiver Effekt, +++= stark positiver Effekt.

Allen in Kombination mit Cu(II) getesteten Substanzen ist gemeinsam, dass sie Einzelstrangbrüche in PM2 DNA induzierten, wobei die absolute Anzahl induzierter ESB in folgender Reihenfolge zunahm, Acetophenon < Benzaldehyd = p-Anisaldehyd. Bei der Oxidation von Carbonylverbindungen ist davon auszugehen, dass Cu(II) zunächst komplexartig an die Sauerstofffunktion bindet. Für die Höhe des DNA-strangbrechenden Potenzials scheint die Art und Stärke der Komplexbindung zwischen Cu(II) und dem zu oxidierenden Molekül (Li und Trush, 1994; Buschfort und Witte, 1994) wichtig zu sein, da diese das Redoxpotenzial entscheidend bestimmen. Dass die Cu(II)-Komplexierungseigenschaften der Carbonylverbindungen und ihrer Produkte eine entscheidende Bedeutung für das DNA-schädigende Potenzial haben, wird auch durch die unterschiedliche DNA-schädigende Wirkung der untersuchten Carbonylverbindungen in Kombination mit Cu(II) deutlich. Da in Naturstoffmolekülen oder in komplexen synthetischen Verbindungen mehrere oxidierbare funktionelle Gruppen vorliegen, ist von verschiedenen Komplexierungsmöglichkeiten mit unterschiedlicher Redoxaktivität auszugehen. Auch die Anwesenheit sonstiger Moleküle wie Puffermoleküle und DNA, die ebenfalls Komplexbildungseigenschaften u. a. für Kupferionen besitzen, kann das Radikalgeschehen beeinflussen (Halliwell und Gutteridge, 1989; Prütz, 1990; Shiraishi *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1998). Ein solcher Einfluss des Puffers konnte in dieser Arbeit anhand der verminderten Anzahl an ESB/PM2 DNA-Molekül in Tris-Puffer im Vergleich zu NaPO₄-Puffer für Benzaldehyd/Cu(II) und Acetophenon/Cu(II) beobachtet werden. Die nahezu identische Strangbruchinduktion in NaPO₄- und Tris-Puffer bei p-Anisaldehyd wurde auf eine vergleichsweise hohe Affinität von p-Anisaldehyd zu Cu(II) zurückgeführt, was auch durch die nahezu vollständige Reduktion von Cu(II) zu Cu(I) bestätigt wird.

In der Literatur wird eine Abhängigkeit des DNA-schädigenden Potenzials diverser Cu(II)-Komplexe von ihrer geometrischen Struktur und dem Typ der Liganden beschrieben (Ueda *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1999). Für das aliphatische Malondialdehyd (MDA) wurde eine DNA-strangbrechende Wirkung beschrieben und die Bildung eines Cu(II)-Komplexes durch die Komplexierung eines Kupferions durch zwei Malondialdehydmoleküle vorgeschlagen (Witte und Krieger, 1997). Solche Cu(II)-Komplexe mit hoher Bindungskonstante sind bereits 1972 von Osman für MDA-Homologe wie Acetylacetonat beschrieben worden, ebenso ihre DNA-schädigende Wirkung (Tünnemann, 1997). Auch für z.B: Tetracyclin (Buschfort und Witte, 1994); Chlorogensäure (Knobbe, 1995), Propylgallat (Becker *et al.*, 1993), Zineb (Hohlen, 1995) und Hydrochinone (Li und Trush, 1993a; Li und Trush, 1994; Vollbrandt *et al.*, 1994;

Zhang *et al.*, 1996; Ahmad *et al.*, 1998), ist das unterschiedliche DNA-schädigende Potenzial wahrscheinlich auf die Bildung unterschiedlich reaktiver Cu(II)-Komplexe zurückzuführen. Die DNA-schädigenden Konzentrationen der genannten Verbindungen in Kombination mit Cu(II) sind im Vergleich zu den in dieser Arbeit untersuchten Carbonylverbindungen wesentlich geringer. So wurde von Buschfort und Witte (1994) gezeigt, dass Tetracyclin, das mehrere Cu(II)-Ionen zu komplexieren vermag (Martin, 1986; Albert, 1985), in einer Konzentration von 1 μ M DNA-Strangbrüche hervorrief, allerdings nur dann, wenn zwei Cu(II)-Ionen an ein Tetracyclin binden konnten.

Auch die Komplexierung der Kupferionen an und in der DNA ist von entscheidender Bedeutung für die Strangbruchinduktion (Goldstein *et al.*, 1993). Kupferionen komplexieren bevorzugt zwischen Guanin-Cytosin Basenpaaren (Zimmer *et al.*, 1971; Pezzano und Podo, 1980; Prasal, 1986; Tajmir-Riahi *et al.*, 1988) oder zwischen aufeinanderfolgenden Guaninresten eines Stranges (Prasal, 1986; Sagripanti *et al.*, 1991). Die durch Kupferionen erzeugte partielle Öffnung der DNA-Struktur (Kornilova *et al.*, 1988) erleichtert möglicherweise den Zugang zur DNA. Dies ist besonders wichtig für sperrige Verbindungen wie die hier untersuchten aromatischen Carbonylverbindungen.

Im Gegensatz zu Acetophenon/Cu(II) konnte für Benzaldehyd/Cu(II) und p-Anisaldehyd/Cu(II) eine Doppelstrangbruch-Induktion nachgewiesen werden. Wie beschrieben ist ein zufälliges Auftreten von DSB bei der Größe des PM₂ DNA-Moleküls mit ca. 10 000 Basenpaaren (Espejo *et al.*, 1969) unwahrscheinlich, vielmehr ist ein „site-spezifischer“ Mechanismus wahrscheinlich. Die für die Strangbrüche verantwortlichen reaktiven Spezies müssen demnach direkt an oder in der DNA gebildet werden, aufgrund der starken Komplexierungseigenschaften von Kupfer liegen die potenziellen Reaktanden räumlich dicht beieinander. Durch mehrfache Reaktionen an der DNA durch DNA-gebundenes Cu(II) können ortsgelungen hochreaktive Radikale gebildet werden (Goldstein und Czapski, 1986), die dann aufgrund der kurzen Reichweite oder/und hohen DNA-Reaktivität über mehrfache Induktion von Einzelstrangbrüchen auch Doppelstrangbrüche hervorrufen können. Eine Voraussetzung für die Induktion von DSB ist dabei die genannte Aufweitung der DNA durch Cu(II) (Kornilova *et al.*, 1988). Da für die Kombination Acetophenon/Cu(II) keine Induktion von Doppelstrangbrüchen beobachtet wurde, kann vermutet werden, dass Acetophenon die in der DNA chelatierten Kupfer-Ionen weniger gut erreicht. Abhängig von der räumlichen Struktur

und der Polarität der Carbonylverbindung kann ein Zusammentreffen mit Cu(II) in der DNA verhindert werden. In diesem Fall findet die Reaktion zwischen Acetophenon und Cu(II) außerhalb der DNA statt und entstehende DNA-schädigende Spezies können die DNA im Vergleich zu Benzaldehyd und p-Anisaldehyd, bei denen eine Reaktion direkt an der DNA angenommen werden kann, weniger häufig erreichen bzw. schädigen. Da die DSB-Induktion bei Benzaldehyd/Cu(II) im Vergleich zu p-Anisaldehyd/Cu(II) schon bei einer wesentlich geringeren ESB-Rate auftrat ist davon auszugehen, dass die aus der Benzaldehyd/Cu(II) hervorgehende DNA-schädigende Spezies reaktiver ist als bei p-Anisaldehyd/Cu(II).

Die DNA-schädigenden Eigenschaften von Cu(II)-Komplexen mit sauerstoff- und stickstoffhaltigen Verbindungen scheint ein verbreitetes Phänomen zu sein. Bislang wurde davon ausgegangen, dass die ultimativ DNA schädigenden Spezies dieser Oxidationen durch Cu(II) ROS darstellen, die aus der Reoxidation von Cu(I) hervorgehen. Dies trifft für die aromatischen Carbonylverbindungen/Cu(I) nicht zu. Eine ROS-Bildung ist nur über einen Redoxzirkel möglich, wobei der erste Schritt der Redoxreaktion von Cu(I) durch die Reduktion von molekularem Sauerstoff erfolgt. Ein derartiger Redoxzirkel wurde für alle drei getesteten Carbonylverbindungen ausgeschlossen. Zwar waren die zur Strangbruchinduktion benötigten Cu(II)-Konzentrationen unterschiedlich, aber bei allen drei Verbindungen so hoch, dass eine katalytische Funktion von Cu(II) auszuschließen ist. Ebenso sprechen diese hohen Cu(II)-Konzentrationen gegen einen Redoxzirkel des Cu(I). In Abwesenheit von DNA konnte für Benzaldehyd/Cu(II) und Acetophenon/Cu(II) im Gegensatz zu p-Anisaldehyd/Cu(II) auf eine Weiterreaktion des gebildeten Cu(I) geschlossen werden. Da diese Reaktionen gleichermaßen unter aeroben und anaeroben Bedingungen erfolgten, konnte eine Oxidation zu Cu(II) durch die Reduktion von O₂ ausgeschlossen werden. Sowohl für Benzaldehyd als auch für Acetophenon wäre eine Reduktion von Cu(I) zu Cu(0) denkbar.

Für alle Substanzkombinationen konnte eine Beteiligung von [•]OH-Radikalen an der Strangbruchinduktion ausgeschlossen werden. Für p-Anisaldehyd und Acetophenon in Kombination mit Cu(II) wurde eine Beteiligung von [•]OH-Radikalen in erster Linie aufgrund der sauerstoffunabhängigen Strangbruchinduktion ausgeschlossen. Dies ist für die in der Literatur beschriebenen Cu(II)-bedingten Oxidationen die Ausnahme. Für aliphatische Aldehyde gibt es Hinweise, dass in Kombination mit Cu(II) Carbeniumionen als ultimativ DNA-schädigende Agenzien gebildet werden (Becker *et al.*, 1998). Für die Reaktionssysteme p-Anisaldehyd/Cu(II)

und Acetophenon/Cu(II) ist davon auszugehen, dass die unter aeroben und anareoben Bedingungen ablaufenden Reaktionen gleich oder zumindest ähnlich sind. Das gebildete Cu(I) aus der Initiationsreaktion geht wahrscheinlich mit dem oxidierten p-Anisaldehyd bzw. Acetophenon einen stabilen Komplex ein, für den eine Reduktion molekularen Sauerstoffes und eine daraus resultierende ROS-Bildung nicht möglich ist. In allen Fällen ist das gebildete Cu(I) als essentiell für die Strangbruchbildung anzusehen, während eine Beteiligung der aus den Initiationsreaktionen stammenden Primärradikalen und möglicherweise gebildeten Carbeniumionen ausgeschlossen wurde. Die Ergebnisse zeigen, dass bei Cu(II) bedingten Oxidationen mit aromatischen Carbonylverbindungen reaktive organische Radikalspezies (wie C-zentrierte Radikale) für die Strangbruchbildung verantwortlich sind. Diese dürfen bei einer gesamttoxikologischen Bewertung nicht außer Acht gelassen werden.

In allen drei Fällen wurde für Katalase ein anderes Substrat als H_2O_2 angenommen. Auch dies zeigt die Sonderrolle der Reaktionen zwischen den getesteten aromatischen Carbonylverbindungen mit Cu(II) im Vergleich zu anderen Cu(II)-oxidierbaren Verbindungen. In Analogie zum aliphatischen Malondialdehyd, wo Katalase ebenfalls unter anaeroben Bedingungen aktiv war (Tünnemann, 1997) wurde vorgeschlagen, dass es sich bei dem Substrat für Katalase in den vorliegenden Untersuchungen um möglicherweise gebildete Endoperoxide handeln könnte.

Die Unterschiede der DNA-Schädigung an isolierter PM₂ DNA durch die drei Kombinationen spiegeln sich in den Untersuchungen mit Säugerzellkulturen nur zum Teil wieder. In Tabelle 21 sind die Ergebnisse zur Gentoxizität der verwendeten Substanzpaare zusammengefasst. Die Übertragung der Ergebnisse zur DNA-schädigenden Wirkung von p-Anisaldehyd/Cu(II), Benzaldehyd/Cu(II) und Acetophenon/Cu(II) an isolierter PM₂ DNA auf die ganze Zelle ist schwierig.

Tab. 21: Zusammenfassung der Untersuchungen zur Gentoxizität der verwendeten Substanzpaare in Säugerzellkulturen

untersuchte Parameter	Benzaldehyd		p-Anisaldehyd		Acetophenon	
	ohne Cu(II)	mit Cu(II)	ohne Cu(II)	mit Cu(II)	ohne Cu(II)	mit Cu(II)
DNA-Strangbruchinduktion	-	++	(+)	+	(+)	+
DNA-DNA-Crosslinks	+	(+)	-	-	-	-
DNA-Protein-Crosslinks	-	-	-	-	-	-
Induktion der DNA-Reparatur (UDS/Alkalische Elution)	-/-	-/+	-/n.u.	-/n.u.	-/+	-/+
Hemmung der DNA-Reparatur						
UV	-	-	++	++	-	-
MMS	-	-	-	++	-	-
Mutanteninduktion	-	-	-	-	-	(+)

n.u.= nicht untersucht, -= negativer Effekt, (+)= schwach positiver Effekt, += positiver Effekt, ++= deutlich positiver Effekt.

Es ist hierbei zu berücksichtigen, dass es sich im Gegensatz zu den Untersuchungen an isolierter PM2 DNA bei den Zellkulturexperimenten um ein komplexes System handelt. Zwischen direkten und indirekten Effekten der gebildeten Radikale bzw. Intermediate zu unterscheiden ist nur bedingt möglich. So können DNA-Schäden in zellulären Systemen die Folge sekundärer reaktiver Spezies sein, wie sie z.B. durch Interaktionen freier Radikale mit Proteinen oder Lipiden entstehen. Alternativ dazu können DNA-Schäden auch aus Wechselwirkungen freier Radikale mit an der DNA-Replikation und/oder DNA-Reparatur beteiligten Enzymen resultieren. Für die drei getesteten Carbonylverbindungen konnte in Kombination mit Cu(II) eine DNA-strangbrechende Wirkung in humanen Fibroblasten nachgewiesen werden. Die DNA-schädigende Wirkung von Benzaldehyd/Cu(II) muss als am stärksten eingestuft werden, da es hier schon in nicht zytotoxischen Bereichen (ab 12 mM) zur Strangbruchinduktion kam. p-Anisaldehyd/Cu(II) und Acetophenon/Cu(II) zeigten erst in höheren Konzentrationen eine strangbrechende Wirkung. Hinzu kommt, dass bei Benzaldehyd allein bzw. bei Benzaldehyd/Cu(II) DNA-DNA-Crosslinks nachgewiesen wurden. Analog zu den Experimenten mit isolierter DNA ist bei Benzaldehyd/Cu(II) im Vergleich zu p-Anisaldehyd/Cu(II) und Aceto-

phenon/Cu(II) auch hier wahrscheinlich von einer stärkeren Strangbruchinduktion aufgrund einer besseren Zugänglichkeit der DNA für Benzaldehyd auszugehen.

Eine schnelle Reparatur der induzierten Strangbrüche konnte in keinem Fall nachgewiesen werden. Da bei einer $\cdot\text{OH}$ -Radikal-bedingten DNA-Schädigung von einer schnellen Reparatur auszugehen ist, spricht dieser Befund entsprechend der Untersuchungen an isolierter PM_{2.5} DNA auch in ganzen Zellen gegen eine Beteiligung von $\cdot\text{OH}$ -Radikalen an der Strangbruchbildung. Eine Inhibition der DNA-Reparatur als mögliche Ursache für die nicht nachweisbare UDS konnte nur für p-Anisaldehyd/Cu(II) festgestellt werden. Die Hemmung der UV-induzierten UDS konnte auf die Einzelwirkung von p-Anisaldehyd zurückgeführt werden und die Hemmung der MMS-induzierten Reparatur konnte nur in der Kombination mit Cu(II) beobachtet werden. Diese Hemmwirkung ist im Vergleich zu Benzaldehyd und Acetophenon wahrscheinlich auf den zusätzlich enthaltenen Sauerstoff in Form der Methoxygruppe zurückzuführen; auch die hydroxylierten Benzaldehyde und die Strukturanaloga von p-Anisaldehyd (Daten nicht gezeigt) hemmten die UV-induzierte DNA-Reparatur. Die über die UDS nicht nachweisbare DNA-Reparatur für Benzaldehyd/Cu(II) und Acetophenon/Cu(II) wurde in erster Linie auf DNA-Schäden, wie z.B. die für Benzaldehyd nachgewiesenen DNA-DNA-Crosslinks zurückgeführt, die nicht über eine mit der UDS erfassbare Exzisionsreparatur eliminiert werden (Dempfle und Harrison, 1994).

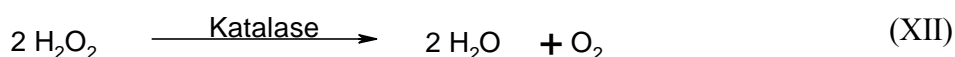
Die durch Acetophenon/Cu(II) und Benzaldehyd/Cu(II) induzierten DNA-Strangbrüche wiesen eine vergleichbar hohe Persistenz auf (24 - \geq 48 Stunden). Diese hohe Persistenz äußerte sich jedoch nur in einer geringen Mutagenität. p-Anisaldehyd bzw. p-Anisaldehyd/Cu(II) zeigte keine Mutagenität im HPRT-Test. Für beide Aldehyde allein gibt es in der Literatur auf Grundlage anderer Mutagenitätstests positive Befunde. Es könnte u. a. vermutet werden, dass es durch die untersuchten Carbonylverbindungen in Kombination mit Cu(II) zu einer p53-Gen abhängigen Apoptoseinduktion kommt, die zu einer verminderten Mutantenfrequenz im HPRT-Gen führt. So ist insbesondere für p-Anisaldehyd (Abb. 32) und Acetophenon (Abb. 50) in zytotoxischen Konzentrationen eine Abnahme der Mutantenfrequenz zum Teil unter die Spontanmutationsrate zu verzeichnen (Abb. 32). Corbet *et al.* (1999) beschrieben, dass das p53-Genprodukt die HPRT-Mutantenfrequenz in ES-Zellen (embryonale Stammzellen), die einen durch UV- bzw. ionisierende Strahlung induzierten DNA-Schaden überlebten, verminderte. Nach Lindahl *et al.* (1995) induziert ein hoher Grad der DNA-Schädigung Apoptoseprozesse. Natürlich kann auch, wie für Benzaldehyd und p-Anisaldehyd bereits diskutiert,

ein antimutagenes Potenzial für den negativen bzw. grenzständigen HPRT-Test verantwortlich sein. Diese Hypothesen müssten durch weitere Untersuchungen wie Untersuchungen zur p53-Gen abhängigen Apoptoseinduktion und antimutagenen Wirkung abgeklärt werden.

Sowohl bei den gentoxischen als auch bei den Untersuchungen zur Zytotoxizität zeigten sich deutliche Effekte erst in vergleichbar hohen Konzentrationen, die keine reale Belastungssituation widerspiegeln. Die untersuchten Verbindungen können jedoch als Modellverbindungen angesehen werden und damit einen Beitrag zur Risikoabschätzung anderer Cu(II)-Kombinationen leisten. So soll z.B. das in jüngster Zeit in die Schlagzeilen geratene Tributylzinn (TBT), das bisher insbesondere als Antifoulingmittel eingesetzt wurde, durch Substanzkombinationen mit Cu(II) ersetzt werden (Terramare, 2000).

4.5 Funktion der Katalase bei den untersuchten Redoxreaktionen

Da Katalase in allen untersuchten Redoxreaktionen zwischen Carbonylverbindung und Cu(II) ein unerwartetes Verhalten zeigte, soll hier eine gesonderte Diskussion angeschlossen werden. Die Umsetzung von Wasserstoffperoxid wird als Schlüsselfunktion der Katalase beschrieben (Schonbaum und Chance, 1976; Enzyme Handbook, 1994) (vergl Gl. XII)



Katalase verhindert durch die enzymatische Spaltung von H_2O_2 zu H_2O und O_2 die Bildung von $\cdot\text{OH}$ -Radikalen und wird, in mit dieser Arbeit vergleichbaren mechanistischen Untersuchungen, als Inhibitor der Fenton-Reaktion (Mello-Filho und Meneghini, 1984; 1991) eingesetzt. Die Verhinderung der Fentonreaktion wurde trotz nachgewiesener inhibitorischer Wirkung der Katalase für die untersuchten Kombinationen: Benzaldehyd/Cu(II), p-Anisaldehyd/Cu(II) und Acetophenon/Cu(II) als unwahrscheinlich erachtet.

Zur Überprüfung, ob die, auch unter anaeroben Bedingungen nachgewiesene, inhibitorische Wirkung der Katalase auf ihre Enzymaktivität zurückzuführen ist, wurde, wie allgemein üblich, Rinderserumalbumin als Vergleichssubstanz eingesetzt. Rinderserumalbumin hatte keinen bzw. nur einen sehr geringen hemmenden Effekt auf die Strangbruchinduktion durch die Kombination der jeweiligen Carbonylverbindung mit Cu(II). Eine Inhibitionswirkung der Katalase aufgrund unspezifischer Proteinbindungen wurde daher ausgeschlossen.

Wenn die inhibitorische Wirkung der Katalase, wie in dieser Arbeit für p-Anisaldehyd/Cu(II) und Acetophenon/Cu(II) auch unter anaeroben Bedingungen nachgewiesen, auf ihre Enzymaktivität zurückzuführen ist und die anderen beschriebenen Versuchsergebnisse bei der Interpretation miteinbezogen werden, muss vermutet werden, dass das Substrat für Katalase unter diesen Bedingungen wahrscheinlich kein Hydroperoxid sein kann, das über die Reduktion von molekularem Sauerstoff gebildet wurde. Es ist allerdings nicht völlig auszuschließen, dass unter den gewählten anaeroben Bedingungen noch Spuren molekularen Sauerstoffes vorhanden sind, die mit Hilfe von Sauerstoffelektroden nicht mehr detektierbar sind und die zur H_2O_2 -Bildung beitragen könnten. Oxidative Reaktionen können auch unter extremer Sauerstofflimitierung stattfinden (Berthe-Corti, 2000). Andererseits ist zu beachten, dass für die komplette Umsetzung von H_2O_2 durch Katalase recht hohe H_2O_2 -Konzentrationen erforderlich sind. Pro aktivem Zentrum werden 2 Moleküle H_2O_2 benötigt, was mit sinkender H_2O_2 -

Konzentration weniger wahrscheinlich wird (Halliwell und Gutteridge, 1989). Die nachgewiesene vollständige Unterdrückung der DNA-strangbruchinduzierenden Reaktion von Benzaldehyd/Cu(II) unter den hier gewählten anaeroben Versuchsbedingungen deutet ebenfalls darauf hin, dass der möglicherweise vorhandene Restsauerstoff im Ansatz nicht ausreicht, um oxische Reaktionen nachweisen zu können.

Sollte bei den beschriebenen Reaktionen der Katalase unter den gewählten anaeroben Versuchsbedingungen dennoch ein Peroxid als Substrat fungieren, so müsste der Sauerstoff aus der Aldehyd-oder Ketogruppe stammen. Bei p-Anisaldehyd wäre auch eine Beteiligung des Sauerstoffes aus der Methoxygruppe denkbar.

In Analogie zum aliphatischen Malondialdehyd, wo Katalase ebenfalls unter anaeroben Bedingungen aktiv war (Tünnemann, 1997) wurde vorgeschlagen, dass es sich bei dem Substrat für Katalase um Endoperoxide handeln könnte. Die entsprechende Bildung eines Endoperoxides bei p-Anisaldehyd bzw. Acetophenon wäre durch die Reaktion zweier p-Anisaldehyd- bzw. zweier Acetophenonmoleküle unter Beteiligung von Kupfer vorstellbar. Der chemisch-analytische Nachweis eines solchen Endoperoxides wäre für die Bestätigung dieser Hypothese unerlässlich.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Gegenstand der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen waren die zyto- und genotoxischen Kombinationswirkungen der aromatischen Carbonylverbindungen Benzaldehyd, p-Anisaldehyd und Acetophenon mit Cu(II). Im Vordergrund dieser Untersuchungen standen zwei Themenkomplexe.

1. Nachweis, Charakterisierung und Interpretation der DNA-Schädigung *in vitro* durch die Carbonylverbindungen allein und in Kombination mit Cu(II).
2. Zyto- und genotoxische Wirkungen der getesteten Carbonylverbindungen allein und in Kombination mit Cu(II) auf primäre humane Fibroblasten (N57) und permanente Hamsterlungenfibroblasten (V79).

Zu 1:

Benzaldehyd, p-Anisaldehyd und Acetophenon induzierten in Kombination mit Cu(II) unter Bildung von Cu(I) DNA-Schäden. Die Einzelsubstanzen wiesen keine oder nur eine sehr schwache DNA-Reaktivität auf. Das Schadensmuster war bei allen drei Kombinationen unterschiedlich. Bei den durch die Kombination der Carbonylverbindungen mit Cu(II) induzierten DNA-Schäden handelte es sich um Einzelstrangbrüche (ESB), Doppelstrangbrüche (DSB) und Apurin- bzw. Apyrimidin-Stellen (AP-Stellen), wobei für Acetophenon/Cu(II) keine Doppelstrangbrüche und für Benzaldehyd/Cu(II) nur eine minimale AP-Stellen-Induktion nachgewiesen wurde. Die DSB-Induktion durch die beiden aromatischen Aldehyde in Kombination mit Cu(II) zeigte, dass es sich hierbei um einen Reaktionsmechanismus handelt, der ortsgebunden direkt an der DNA stattfindet. Durch den Einsatz spezifischer Strangbruchinhibitoren sowie durch den Nachweis verschiedener Intermediate wurden für alle drei Carbonylverbindungen/Cu(II)-Reaktionen unterschiedliche DNA-schädigende Reaktionsmechanismen angenommen. Für alle getesteten Kombinationen wurde eine sauerstoffunabhängige Reduktion von Cu(II) zu Cu(I) nachgewiesen. Bei p-Anisaldehyd/Cu(II) und Acetophenon/Cu(II) erfolgte zudem eine sauerstoffunabhängige Strangbruchbildung. Die häufig beschriebene Reoxidation von Cu(I) zu Cu(II) mit molekularem Sauerstoff und eine Bildung von $\cdot\text{OH}$ -Radikalen über die Kupfer-Fenton Reaktion fand bei diesen Substanzkombinationen nicht statt. Auch für die Kombination Benzaldehyd/Cu(II), die eine sauerstoffabhängige Strangbruchinduktion zeigte, wurde die Bildung von $\cdot\text{OH}$ -Radikalen über die Kupfer-Fenton Reaktion ausgeschlossen, da die Cu(I)-Bildung bzw. der Cu(II)-Verbrauch unter anaeroben

und aeroben Bedingungen identisch war. Als ultimater DNA-schädigende Agenzien konnten aufgrund der inhibitorischen Wirkung der Cu(I)-Chelatoren Neocuproin bzw. Bathocuproin reaktive Intermediate angenommen werden, die unter Beteiligung von Cu(I) und des primär erzeugten Carboxyradikals gebildet wurden. Für das Stoffgemisch Acetophenon/Cu(II) konnte ESR-spektroskopisch über ein 4-POBN-Addukt ein C-zentriertes Radikal nachgewiesen werden. Obwohl die Bildung von H₂O₂ aus molekularem Sauerstoff für alle drei Kombinationen ausgeschlossen werden konnte, hemmte Katalase die Strangbruchbildung vollständig. Im Falle von p-Anisaldehyd/Cu(II) und Acetophenon/Cu(II) wurde die Strangbruchbildung durch Katalase auch unter anaeroben Bedingungen gehemmt. Für Katalase wurde ein anderes Substrat als H₂O₂ angenommen.

Zu 2:

Alle drei getesteten Substanzkombinationen zeigten analog zu den Untersuchungen an isolierter PM2 DNA eine strangbrechende Wirkung in menschlichen Fibroblasten. Für Benzaldehyd wurde zusätzlich die Bildung von DNA-DNA-Interstrangvernetzungen nachgewiesen. Mit Hilfe der Alkalischen Elution konnte für Benzaldehyd/Cu(II) und Acetophenon/Cu(II) eine teilweise Reduktion nach 21 Stunden und eine nahezu vollständige Reduktion der Strangbrüche nach 48 Stunden festgestellt werden. Im Vergleich erwies sich die Schädigung durch Acetophenon/Cu(II) als persistenter. Eine Exzisionsreparatur gemessen über die autoradiographische Methode der UDS wurde für alle drei Kombinationspaare ausgeschlossen. Damit ist auch in den Untersuchungen an Zellkulturen eine Beteiligung von [•]OH-Radikalen, für die eine schnelle Reparatur angenommen wird, eher ausgeschlossen. Acetophenon/Cu(II) wirkte schwach mutagen auf das HPRT-Gen in V79-Zellen. Benzaldehyd/Cu(II) überschritt die Spontanmutationsrate um den Faktor 1,9, während p-Anisaldehyd/Cu(II) keine erhöhte Mutagenität aufwies.

Die zytotoxische Wirkung der Carbonylverbindungen auf Fibroblasten wurde durch un-toxische CuCl₂-Konzentrationen bei den gemessenen Toxizitätsparametern (Akute Toxizität, Toxizität 21 Stunden nach der Schadstoffbehandlung, Hemmung des Wachstums und der Koloniebildungsfähigkeit) erhöht. Entsprechend der Untersuchungen an isolierter PM2 DNA war die Verstärkerwirkung von CuCl₂ bei Benzaldehyd am größten und bei Acetophenon am geringsten.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Aaron C.S., Bolcsfoldi G., Glatt H., Moore M., Nishi Y., Stankowski L., Theiss J. and Thompson E. (1994): Mammalian cell gene mutation assays working group report. *Mutat. Res.*, **312** (3), 235-239
- Agarwal K., Sharma A. and Talukder G. (1989): Effects of copper on mammalian cell components. *Chem.-Biol. Interact.*, **65** (1), 1-16
- Ahmad S., Murthy R.C. and Rao G.S. (1998): Role of iron and copper during benzene toxicity. *Indian J. Exp. Biol.*, **36** (3), 283-286
- Ahsan H. and Hadi S.M. (1998): Strand scission in DNA induced by curcumin in the presence of Cu(II). *Cancer Lett.*, **124** (1), 23-30
- Albert A. (1985): Selective toxicity. Chapman and Hall, London
- Alt E.R., Sternlieb I. and Goldfischer S. (1990): The cytopathology of metal overload. *Int. Rev. Experimental Pathology*, **31**, 165-193
- Ames B.N. and Saul R.L. (1987): Oxidative DNA damage, cancer, and aging. *Ann. Intern. Med.*, **107**, 526-545
- Anderson D. and Plewa M.J. (1998): The international comet assay workshop. *Mutagenesis*, **13**, 67-73
- Aparna J., Alvi N.K., Parish J.H. and Hadi S.M. (1996): Oxygen is not required for degeneration of DNA by glutathione and Cu(II). *Mutat. Res.*, **357**, 83-88
- Appel K.E. (1990): „Risk assessment“ in der Toxikologie. *Bundesgesundheitsblatt*, **6**, 240-247
- Arnett E.M. und Venimadhavan S. (1991): Heats of reaction of resonance-stabilized carbenium ions with nitrogen bases. *J. Org. Chem.*, **56**, 2742-2745
- Aruoma O.I., Halliwell B., Gajewski E. and Dizdaroglu M. (1991): Copper-ion-dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide. *Biochem. J.*, **273**, 601-604
- Asad S.F., Singh S., Ahmad A. and Hadi S.M. (1999): Bilirubin-Cu(II) complex degrades DNA. *Biochim. Biophys.*, **1428** (2-3), 201-208
- Aubourg S.P. (1993): Review: Interaction of malondialdehyde with biological molecules - New trends about reactivity and significance. *Int. J. Food Sci and Technol.*, **28**, 323-335

- Auerbach C., Moutschen-Dahmen M. and Moutschen J. (1977): Genetic and cytogenetical effects of formaldehyde and related compounds. *Mutat. Res.*, **39** (3-4), 317-362
- Augusto O. (1993): Alkylation and cleavage of DNA by carbon-centered radical metabolites. *Free Radical Biol. Med.*, **15**, 329-336
- Aujard C. and Trincal G. (1985): The effect of MNNG on KB cells. Cell sensitivity to lethal effect of the drug as a function of the cell age and of the nature of the culture medium. *Chem.-Biol. Interact.*, **54**, 349-361
- Baader W.J., Bohne C., Cilento G., and Dunford H.B. (1985): Peroxidase-catalyzed formation of triplet acetone and chemiluminescence from isobutyraldehyde and molecular oxygen. *J Biol Chem.*, **260** (18), 10217-10225
- Basu A.K. and Marnett L.J. (1984): Molecular requirements for the mutagenicity of malondialdehyde and related acroleins. *Cancer Res.*, **44**, 2848-2854
- Bawn C.E.H., F.R.S., Hobin T.P. and Raphael L. (1956): The metal-salt-catalysed oxidation of acetaldehyde. *Proc. R. Soc. London, Ser. A* **237**, 313-324
- Bawn M.K. and Friedovich I. (1981): DNA strand scission by enzymically generated oxygen radicals. *Arch. Biochem. Biophys.*, **206**, 414-419
- Bayreuther K., Rodemann H.P., Hommel R., Dittmann K., Albiez M. and Franz I. (1988): Human skin fibroblasts *in vitro* differentiate along a terminal cell lineage. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **85**, 5112-5116
- Becker T.W., Eicke B., Jacobi H. and Witte I. (1993): DNA strand break formation and inhibition of cell growth by butyraldehyde, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and propylgallate in combination with the electron acceptor Cu(II). Intern. Conference on critical aspects of free radicals in chemistry, biochemistry and medicine, 14-17. Febr. Wien (abstract)
- Becker T.W., Krieger G. and Witte I. (1996): DNA single and double strand breaks induced by aliphatic and aromatic aldehydes in combination with copper(II). *Free. Rad. Res.*, **24** (5), 325-332
- Becker T.W., Krieger G. and Witte I. (1998): Different DNA damaging species as a result of oxidation of n-butyraldehyde and iso-butyraldehyde by copper(II). *Free. Rad. Res.*, **29**, 25-34
- Benigni R., Calcagnile A., Giuliani A., Leopardi P. (1990): Inhibition of replicative DNA synthesis and induction of DNA repair in Human fibroblasts by the intercalating drugs proflavine and 9-aminoacridine. *J. Toxicol. Environ. Health*, **31** (2), 117-124

- Beranek D.T., Weis C.C. and Swenson D.H. (1980): A comprehensive quantitative analysis of methylated and ethylated DNA using high pressure liquid chromatography. *Carcinogenesis*, **1**, 595-606
- Berenbaum M.C. (1985): The expected effect of a combination of agents: the general solution. *J. Theor. Biol.*, **114** (3), 413-431
- Bergmeyer J. (1983): Reagents for enzymatic analysis; enzymes. In: Bergmeyer J. and Graßl M. (Hrsg.): *Methods of enzymatic analysis*, 3. Auflage, Verlag Chemie, Weinheim-Deerfield-Florida-Basel
- Berthe-Corti L. (2000): Alkanabbau durch bakterielle Gemeinschaften unter extremer Sauerstofflimitierung. Habilitationsschrift an der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg
- Bhat R. and Hadi S.M. (1994): DNA breakage by tannic acid and Cu(II): sequence specificity of the reaction and involvement of active oxygen species. *Mutat Res.*, **313** (1), 39-48
- Birkinshaw J.H. and Chaplen P. (1955): Biochemistry of wood-rotting fungi. Volatile metabolic products of *Daedalea Juniperina* Murr. *Biochem. J.*, **60**, 255-261
- Birkinshaw J.H., Morgan E.N. and Findlay W.P.K. (1952): Biochemistry of wood-rotting fungi. Metabolic products of *Polyporus Benzonius* (Wahl.) Fr.. *Biochem. J.*, **50**, 509-517
- Blackburn G.M. and Gait M.J. (1996): *Nucleic acids in chemistry and biology*. 2. Auflage, Oxford University Press, New York
- Bohrenfreund E., Babich H. and Martin-Alguach N. (1988): Comparisons of two *in vitro* cytotoxicity assays - the neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxicol. in Vitro*, **2** (1), 1-6
- Bourne L.C. and Rice-Evans C.A. (1997): The effect of the phenolic antioxidant ferulic acid on the oxidation of low density lipoprotein depends on the pro-oxidant used. *Free Radical Res.*, **27**, 337-344
- Bradley M.O., Bhuyan B., Francis M.C., Langenbach R., Peterson A. and Huberman E. (1981): Mutagenesis by chemical agents in V79 chinese hamster cells: A review and analysis of the literature. *Mutat. Res.*, **87** (2), 81-142
- Brambilla G., Sciabà L., Faggin P., Finollo R., Bassi A.M., Ferro M. and Marinari U.M. (1985): Methylglyoxal-induced DNA-protein cross-links and cytotoxicity in chinese hamster ovary cells. *Carcinogenesis*, **6** (5), 683-686

- Brockman H.E., de Serres F.J., Ong T.M., DeMarini D.M., Katz A.J., Griffiths A.J. and Stafford R.S. (1984): Mutation tests in *Neurospora crassa*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.*, **133** (2), 87-134.
- Brooks B.R. and Klammerth (1968): Interaction of DNA with bifunctional aldehydes. *Eur. J. Biochem.*, **5**, 178-182
- Brunetti I.L., Cilento G. and Nassi I. (1983): Energy transfer from enzymically-generated triplet species to acceptors in micelles. *Photochem. Photobiol.*, **38** (5), 511-519
- Bull P.C. and Cox D.W. (1994): Wilson disease and Menkes disease: a new handles on heavy-metal transport. *Trends Genet.*, **10**, 246-252
- Bull P.C., Thomas G.R., Rommens J.M., Forbe J.R. and Cox D.W. (1993): The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. *Nat. Genet.*, **5**, 327-337
- Buschfort C. and Witte I. (1994): Induction and mechanism of DNA single and double strand breaks by tetracyclin/Cu(II) in the absence of light. *Carcinogenesis*, **15**, 2927-2930
- Butterworth J.A., Bermudez E., Caseiano P., Miralis J., Probst G. and Williams G. (1988): A protocol guide for the in vitro rat hepatocyte DNA repair assay. *Mutat. Res.*, **189**, 113-123
- Cadenas E. (1984): Biological chemiluminescence. *Photochem. Photobiol.*, **40** (6), 823-30
- Cadet J., Delatour T., Douki T., Gasparutto D., Pouget J.P. Ravanat J.L. and Sauvaigo S. (1999): Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat. Res.*, **424** (1-2), 9-21
- Carstens C.P., Blum K. and Witte I. (1990): The role of hydroxyl radicals in tetrachloro-hydroquinone induced DNA strand break formation in PM2 DNA and human fibroblasts. *Chem. Biol. Interactions*, **74**, 305-314
- Cassee F.R., Groten J.P., van Bladeren P.J. and Feron V.J. (1998): Toxicological evaluation and risk assessment of chemical mixtures. *Crit. Rev. Toxicol.*, **28** (1), 73-101
- Ceruti P.A. (1985): Prooxidant states and tumor promotion. *Science*, **227** (4685), 375-381
- Chaw Y.M., Crane L.E., Lange P. and Shapiro R. (1980): Isolation and identification of cross-links from formaldehyde treated nucleic acids. *Biochemistry*, **19**, 5525-5531
- Chelly J., Tumer Z., Tonnesen T., Petterson A., Ishikawa-Brush Y., Tommerup N. and Monaco A.P. (1993): Isolation of a candidate gene for Menkes disease that encodes a potential heavy metal binding protein. *Nat. Genet.*, **3**, 14-19
- Chevion M. (1988): A site-specific mechanism for free radical induced biological damage: the essential role of redox-active transition metals. *Free Radical Biol. Med.*, **5**, 27-37

- Christen H.R. (1972): Grundlagen der organischen Chemie, Verlag Sauerlander, Arans, Diesterweg, Sahle, Frankfurt/M
- Cilento G. (1984): Generation of electronically excited triplet species in biochemical systems. *Pure Appl. Chem.*, **56**, 1179-1190
- Clark I.A., Hunt N.H. and Cowden W.B. (1986): Oxygen-derived free radicals in pathogenesis of parasitic disease. *Adv. Parasitol.*, **25**, 1-29
- Cleaver J.E. and Thomas G.H. (1981): Measurement of unscheduled DNA-synthesis by autoradiography. In: Friedberg E.C. and Hanawalt P.C. (Hrsg.): DNA repair, **1b**, Marcel Dekker Inc., New York, 277-288
- Corbet S.W., Clarke A.R., Gledhill S. and Wyllie A.H. (1999): P53-dependent and independent links between DNA-damage, apoptosis and mutation frequency in ES cells. *Oncogene*, **18** (8), 1537-1544
- Cross C.E., Halliwell B., Borish E.T., Pryor W.A., Ames B.N., Saul R.L., McCord J.M. and Haman D. (1987): Oxygen radicals and human disease. *Ann. Intern. Med.*, **107**, 526-545
- Cullis P.M., McClymont J.D., Bartlett M.N.O. and Symons M.C.R. (1987): Copper-DNA complexes and their modification by ionising radiation. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **631**, 1859-1861
- Davies K.J.A. (1995): Oxidative Stress: the paradox of aerobic life. In: Rice-Evans C., Halliwell B. and Lunt G.G. (Hrsg.): Free radicals and oxidative stress: Environment, drugs and food additives. London, Portland Press, 1-31
- de Groot H. (1994): Reactive oxygen species in tissue injury. *Hepato-Gastroenterol.*, **41**, 328-332
- DeForge L.E., Preston A.M., Takeuchi E., Kenney J., Boxer L.A. and Remick D.G. (1993): Regulation of interleukin 8 gene expression by oxidant stress. *J Biol Chem.*, **268** (34), 25568-25576.
- de Groot H. and Rauen U. (1998): Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundam.. Clin. Pharmacol.*, **12**, 249-255
- Demple B. and Harrison L. (1994): Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Annu. Rev. Biochem.*, **63**, 915-948
- Dieter H.H. (1995): Ist Kupfer giftig? Ist Kupfer gesund? *Bundesgesundheitsblatt*, **1**, 1

- Dieter H.H., Schimmelpfennig W., Meyer E. and Tabert M. (1999): Early childhood cirrhotoses (ECC) in Germany between 1982-1994 with special consideration of copper etiology. *Eur. J. Med. Res.*, **4** (6), 233-242
- Doerjter G., Buchholz U., Kreuzer K. and Oesch F. (1988): Biomonitoring of DNA damage by alkaline filter elution. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **60**, 169-174
- Dornish J.M., Melvik J.E. and Petterson E.O. (1986): Reduced cellular uptake of cis-dichlorodiammine-platinum by benzaldehyde. *Anticancer Res.*, **6** (4), 583-588
- Dornish J.M.; Petterson E.O., Oftebro R. and Melvik J.E. (1984): Reduction of cis-dichlorodiammineplatinum induced cell inactivation by benzaldehyde. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, **20** (10), 1287-1293
- Dyrbukt J.M., Atzori L., Edman C.C. and Grafstrom R.C. (1993): Thiol status and cytopathological effects of acrolein in normal and xeroderma pigmentosum skin fibroblasts. *Carcinogenesis*, **14** (5), 975-980
- Ehrenfeld G.M., Shipley J.B., Heimbrook D.C., Sigiyama H., Long E.C., van Boom J.H., van der Marel G.H., Oppenheimer N.J. and Hecht S.M. (1987): Copper-dependent cleavage of DNA by bleomycin. *Biochem.*, **26**, 931-942
- Eichhorn G.L. and Shin Y.A. (1968): Interaction of metal ions with polynucleotides and related compounds. XII: The relative effect of various metal ions on DNA Helicity. *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 73237-73328
- Eliot H., Gianni L. and Myers C. (1984): Oxidative destruction of DNA by adriamycin-iron complex. *Biochemistry*, **23**, 928-936
- Elliger C.A., Henika P.R. and MacGregor J.T. (1984): Mutagenicity of flavones, chromones and acetophenones in *Salmonella typhimurium*: new structure-activity relationships. *Mutat. Res.* **135** (2), 77-86
- Emerit I. (1994): Reactive oxygen species, chromosome mutation and cancer: possible role of clastogenic factors in carcinogenesis. *Free Radical Biol. Med.*, **16**, 99-109
- Enzyme Handbook : Class 1.5-1.12: Oxidoreductases 7. Schomburg D., Salzmann M. and Stephan D. (Hrsg.), GBF-Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg (1994)
- EPA (Environmental Protection Agency) (1986): Guidelines for mutagenicity risk assessment, Federal Register, 51, No. 185, 34006-34012
- Epe B. (1991): Genotoxicity of singlet oxygen. *Chem.-Biol. Interact.*, **80**, 239-266

- Epe B., Henzl H., Adam W. and Saha-Möller C. R. (1993b): Endonuclease-sensitive DNA modifications induced by acetone and acetophenone as photosensitisers. *Nucl. Acids Res.*, **21** (4), 863-869
- Epe B., Pflaum M., Häring M., Hegler J. and Rüdiger H. (1993a): Use of repair endonucleases to characterize DNA damage induced by reactive oxygen species in cellular and cell-free systems. *Toxicol. Lett.*, **67**, 57-72
- Espejo R.T. and Canelo E.A. (1968): Properties of bacteriophage PM2: a lipid containing bacterial virus. *Virology*, **34**, 738-747
- Espejo R.T., Canelo E.A. and Sinsheimer R.L. (1969): DNA of bacteriophage PM2: a closed circular doublestranded molecule. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **63**, 1164-1168
- Esterbauer H. (1993): Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. *Am. J. Clin. Nutr.*, **57** (suppl), 779-786
- Esterbauer H., Schaur R.J. and Zollner H. (1991): Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biol. Med.*, **11**, 81-128
- Esterbauer H., Zollner H. and Schaur R.J. (1988): Hydroxyalkenals: cytotoxic products of lipid peroxidation. *ISI Atlas of Science: Biochemistry*, **0894 - 3753**, 311-317
- EWG-Direktive (1986), 79-831: Anlage V: Toxikologische Methoden für Anlage VIII, Kommission der Europäischen Gemeinschaften, Luxemburg, 104-107
- Facchinetti F., Dawson V.L. and Dawson T.M. (1998): Free radicals as mediators of neuronal injury. *Cell Mol. Neurobiol.*, **18** (6), 667-682
- Fairbairn D.W., Olive P.L. and O'Neill K.L. (1995): The comet assay: a comprehensive review. *Mutat. Res.*, **339** (1), 37-59
- Feig D.I., Reid T.M. and Loeb L.A. (1994): Reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Res. (suppl)*, **54**, 1890-1894
- Feldman M.Y., Balabanova H., Bachrach U. and Pyshnov M. (1977): Effect of hydrolysed formaldehyde treated DNA on neoplastic and normal human cells. *Cancer Res.*, **37**, 501-506
- Fenaroli's Handbook of Flavour Ingredients. Volume 2. Edited, translated and revised by Furia T.E. and Bellanca N. (1975). 2 nd ed. Cleveland: The Chemical Rubber Co.
- Fenton H.J.H. (1894): Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J. Chem. Soc.*, **65**, 899-910

- Feron V.J., Cassee F.R. and Groten J.P. (1998): Toxicology of chemical mixtures: International perspective. *Environ. Health Perspect.*, **106** (6), 1281-1289
- Feron V.J., Til H.P., de Vrijer F., Wouterson R.A., Cassee F.R. and van Bladeren P.J. (1991): Aldehydes: occurrence, carcinogenic potential, mechanism of action and risk assessment. *Mutat. Res.*, **259** (3-4), 363-385
- Florin I., Rutberg L., Curvail M. and Enzell C.R. (1980): Screening of tobacco smoke constituents for mutagenicity using the Ames test. *Toxicol.*, **18**, 219-232
- Floyd R.A. (1990): The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. *Carcinogenesis*, **11** (9), 1447-1450
- Floyd R.A., Watson J.J., Wong P.K., Altmiller D.H. and Richard R.C. (1986b): Hydroxyl free radical adduct of deoxyguanosine: Sensitive detection and mechanisms of detection. *Free Radical Res. Commun.*, **1**, 163-172
- Floyd R.W., West M.S., Eneff K.L., Hogsett W.E. and Tingey D.T. (1988): Hydroxyl free radical mediated formation of 8-hydroxyguanine in isolated DNA. *Arch. Biochem. Biophys.*, **262** (1), 266-272
- Francis A.A., Snyder R.D., Dunn W.C. and Regan J. D. (1981): Classification of chemical agents to their ability to induce long- or short-patch DNA repair in human cells. *Mutat. Res.*, **83** (2), 159-169
- Freifelder D., Baran A. and Bromlow N. (1977): Position of single strand-breaks in DNA. *Biochim. Biophys. Acta*, **474**, 44-48
- Friedberg E.C. (1985): DNA Repair. 1. Aufl., W.H. Freeman and Company, New York
- Friedberg E.C., Walker G.C. und Siede W. (1995): DNA Repair and mutagenesis, ASM, Washington D. C.
- Fuciarelli A.F., Wegher B.J., Blakely W.F. and Dizdaroglu M. (1990): Yields of radiation-induced base products in DNA: Effects of DNA conformation and gassing conditions. *Int. J. Radiat. Biol.*, **58**, 397-415
- Galloway S.M., Armstrong M.J., Reuben C., Colman S., Brown B., Cannon C., Bloom A.D., Nakamura F., Ahmed M., Duk S. *et al.* (1987): Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: evaluations of 108 chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.*, **10** (10), 1-175
- Garberg P., Akerblom E.L. and Bolcsfoldi G. (1988): Evaluation of a genotoxicity test measuring DNA-strand breaks in mouse lymphoma cells by alkaline unwinding and hydroxyapatite elution. *Mutat Res.*, **203** (3), 155-176

- Gedik C.M., Ewen S.W.B. and Collins A.R. (1992): Single cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells. *Int. J. Radiat. Biol.*, **62**, 313-320
- Glatt H. (1993): HPRT-Genmutationstest in V79-Zellen des chinesischen Hamsters. In: Fahrig R. (Hrsg.): Mutationsforschung und genetische Toxikologie, Wissenschaftliche Buchgesellschaft, Darmstadt, 243-262
- Glatt H.R., Gemperlein J., Turchi G., Heinritz H., Doehmer J. and Oesch F. (1987): Search for cell culture systems with diverse xenobiotic-metabolizing activities and their use in toxicological studies. *Mol. Toxicol.*, **1**, 313-334
- Glatt H.R., Oesch F. and Neumann H.-G. (1986): V79 Chinese hamster cells deacetylate trans-N-acetoxy-4-acetylaminostilbene and trans-N-hydroxy-4-acetyl-aminostilbene to mutagenic and cytotoxic metabolites. *Cell Biol. Toxicol.*, **2**, 213-221
- Glickman B. and Ostrosky P. (1996): Future directions in mutation research. *Mutat. Res. Forum*, **1**, 2-4
- Goldenberg G.J., Lyons R.M., Lepp J.A. and Vanstone C.L. (1971): Sensitivity to nitrogen mustard as a function of transport activity and proliferative rate in L5178Y lymphoblasts. *Cancer Res.*, **31**, 1616-1619
- Goldstein S. and Czapski G. (1986): The role and mechanism of metal ions and their complexes in enhancing damage in biological systems or in protecting these systems from the toxicity of O_2^- . *J. Free Radicals Biol. Med.*, **2**, 3-11
- Goldstein S., Meyerstein D. and Czapski G. (1993): The fenton reagents. *Free Radical Biol. Med.*, **15** (2), 435-445
- Gollan J.L. (1990): Wilson's disease and hepatic copper toxicosis. In: Zakim D. and Boyer T.D. (Hrsg.): Hepatology: A textbook of liver disease. Philadelphia. W.B. Saunders, 1249-1272
- Gordge M.P., Meyer D.J., Hothersall J., Neild G.H., Payne N.N. and Noronha-Dutra A. (1995): copper chelation-induced reduction of the biological activity of S-nitrosothiols. *Br. J Pharmacol.*, **114** (5), 1083-1089
- Graedel T.E. (1976): Chemical compounds in the atmosphere. New York, Academic Press.
- Grafström R.C., Dypbukt J.M., Sundqvist K., Atzori L., Nielsen I., Curren R.D. and Harris C.C. (1994): Pathobiological effects of acetaldehyde in cultured human epithelial cells and fibroblasts. *Carcinogenesis*, **15** (5), 985-990

- Grafstrom R.C., Fornace A.J. Jr., Autrup H., Lechner J. F. and Harris C.C. (1983): Formaldehyde damage to DNA and inhibition of DNA repair in human bronchial cells. *Science*, **220** (4593), 216-218
- Graftstrom R.C., Sundquist K., Dypbykt J.M. and Harris C.C. (1987): Pathobiological effects of aldehydes in cultured human bronchial cells. *IARC Sci. Publ.*, **84**, 443-445
- Griffiths J. and Murphy J.A. (1992): Cleavage of DNA resulting from exposure to phenyl radicals. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1**, 24-26
- Grosjean D. (1985): Atmospheric reactions of styrenes and peroxybenzoyl nitrate. *Sci. Total Environ.*, **46** (0), 41-59
- Haber F. and Willstätter R. (1931): Unpaarigkeit und Radikalketten im Reaktionsmechanismus organischer und enzymatischer Vorgänge. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **64**, 2844-2856
- Haegele A.D., Briggs S.P. and Thompson H.J. (1994): Antioxidant status and dietary lipid unsaturation modulate oxidative DNA damage. *Free Radical Biol. Med.*, **16**, 111-115
- Halliwell B. (1995): How to characterise an antioxidant: an update. In: Rice-Evans C., Halliwell B. and Lunt G.G. (Hrsg.): Free radicals and oxidative stress: Environment, drugs and food additives. London. Portland Press, 73-101
- Halliwell B. and Chirico S. (1993): Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr.*, **57** (suppl), 715-725
- Halliwell B. and Gutteridge J.M.C. (1989): Free radicals in biology and medicine, second edition. Clarendon Press, Oxford
- Hansen M.B., Nielsen S.E. and Berg K. (1989): Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Methods*, **119**, 203-210
- Hartmann A., Wess D. and Witte I. (1995): Enhanced cyto- and genotoxicity of tetracycline in Wilson disease fibroblasts. *Mutat. Res.*, **348**, 7-12
- Haworth S., Lawlor T., Mortelsman K., Speck W. and Zeiger E. (1983): Salmonella mutagenicity test results for 250 chemicals. *Environ. Mutagen.*, **5** (1), 3-142
- Haynes R.H., Eckhardt F. and Kunz B.A. (1985): Analysis of non-linearities in mutation frequency curves. *Mutat. Res.*, **150** (1-2), 51-59
- Hecht R. and Thielmann H.W. (1978): Purification and characterization of an endonuclease from *micrococcus luteus* that acts on depurinated and carcinogen modified DNA. *Eur. J. Biochem.*, **89** (2), 607-618

- Hengstler J.G., Fuchs J., Gebhard S. and Oesch F. (1994): Glycolaldehyde causes DNA-protein crosslinks: a new aspect of ethylene oxide genotoxicity. *Mutat. Res.*, **304** (2), 229-234
- Hessling J.J., Miller S.E. and Levy N.L. (1980): A direct comparison of procedures for the detection of mycoplasma in tissue-culture. *J. Immunol. Methods*, **38** (3-4), 315-328
- Hiramoto K., Kato T. and Kikugawa K. (1994): Mechanisms of the DNA breaking activity of mutagenic 5-Diazouracil. *Mutat. Res.*, **306** (2), 153-163
- Hohlen B. (1995): DNA-schädigende Wirkung von Zineb (Zink-ethylenbis(dithiocarbamat)). Diplomarbeit an der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg
- Horton J.W. and Walker P.B. (1993): Oxygen radicals, lipid peroxidation, and permeability changes after intestinal ischemia and reperfusion. *J. Appl. Physiol.*, **74** (4), 1515-1520
- HSDB (1998): The Hazardous Substances Data Bank. The National Library of Medicine (NLM)
- Husøy T., Syversen T. and Jenssen J. (1993): Comparison of four *in vitro* cytotoxicity tests: The MTT assay, NR assay, uridine incorporation and protein measurements. *Toxic. in Vitro*, **7** (2), 149-154
- Imanishi H., Sasaki Y. F., Matsumoto K., Watanabe M., Ohta T., Shirasu Y. and Tutikawa K. (1990): Suppression of 6-TG-resistant mutations in V 79 cells and recessive spot formations in mice by vanillin. *Mutat Res.*, **243** (2), 151-158
- Inoue S., Ito K., Yamamoto K. and Kawanishi S. (1992): Caffeic acid causes metal-dependant damage to cellular and isolated DNA through H₂O₂ formation. *Carcinogenesis*, **13**, 1497-1502
- Jacobi H. and Witte I. (1991): Synergistic effects of U46 D Fluid (dimethylammonium salt of 2,4-D) and CuCl₂ on cytotoxicity and DNA repair in human fibroblasts. *Toxicol. Lett.*, **58**, 159-167
- Jacobi H., Eicke B. and Witte I. (1998): DNA strand break induction and enhanced cytotoxicity of propyl gallate in the presence of copper(II). *Free Radical Biol. Med.*, **24** (6), 972-978
- Jacobi H., Hinrichsen M.-L., Weiß D. and Witte I. (1999): Induction of lipid peroxidation in human fibroblasts by the antioxidant propylgallate in combination with copper(II). *Toxicol. Lett.*, **110**, 183-190
- Jacobi H., Krieger G. and Witte I. (1995): Characterization and applicability of a cytotoxicity assay determining growth inhibition after a 1-hour treatment with xenobiotics in human cell culture. *Toxicol. in Vitro*, **9** (5), 751-756

- Jacobson M.D. (1996): Reactive oxygen species and programmed cell death. *TIBS*, **March**, 83-86
- Jansson T., Curvall M., Hedin A. and Enzell C.R. (1988): *In vitro* studies of the biological effects of cigarette smoke condensate. III. Induction of SCE by some phenolic and related constituents derived from cigarette smoke. A study of structure-activity relationships, *Mutat. Res.*, **206** (1), 17-24
- Janzen E.G. (1984): Spin Trapping. In: Packer L. (Hrsg.): Oxygen radicals in biological systems, methods in enzymology. Academic Press, Inc., New York, **105**, 188-198
- Jaruga P. and Dizdaroglu M. (1996): Repair of products of oxidative DNA base damage in human cells. *Nucl. Acid. Res.*, **24** (8), 1389-1394
- Justo G.Z., Livotto P.R. and Duràn N. (1995): Chemical and photochemical generated carbon-centered radical intermediate and its reaction with desoxyribonucleic acid. *Free Radical Biol. Med.*, **19** (4), 431-440
- Kaeding W.W., Lindblom R.O. and Temple R.G. (1961): Air oxidation of aromatic acids, *Ind. Eng. Chem.*, **53**, 805
- Kasai H. and Nishimura S. (1984): Hydroxylation of desoxyguanosine at the C-8 position by polyphenols and aminopolyphenols in presence of hydrogenperoxide and ferric ion. *Gann*, **75**, 565-566
- Kasai H., Crain P.F., Kuchino Y., Nishimura S., Ootsuyama A. and Tanooka H. (1986): Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair. *Carcinogenesis*, **7** (11), 1849-1851
- Kasamaki A., Takahashi H., Tsumura N., Niwa J., Fujita T. and Urasawa S. (1982): Genotoxicity of flavouring agents. *Mutat. Res.*, **105** (6):387-392
- Kato T., Kojima K., Hiramoto K. and Kikugawa K. (1992): DNA strand breakage by hydroxyphenyl radicals generated from mutagenic diaziquinonen compounds. *Mutat. Res.*, **268**, 105-114
- Kautiainen A., Törnqvist M., Anderstam B. and Vaca C.E. (1991): *In vivo* haemoglobin dosimetry of malonaldehyde and ethene in mice after induction of lipid peroxidation. Effects of membrane lipid fatty acid composition. *Carcinogenesis*, **12** (6), 1097-1102
- Kautiainen A., Vaca C.E. and Granath F. (1993): Studies on the relationship between haemoglobin and DNA adducts of malonaldehyde and their stability *in vivo*. *Carcinogenesis*, **14** (4), 705-708

- Kawanishi S., Oikawa S., Murata M., Tsukitome H. and Saito I. (1999): Site-specific oxidation at GG and GGG sequences in double-stranded DNA by benzoyl peroxid as a tumor promoter. *Biochem.*, **38**, 16733-16739
- Keller D.A. and Heck H. d'A. (1988): Mechanistic studies on chloral toxicity: relationship to trichloroethylene carcinogenesis. *Toxicol. Lett.*, **42**, 183-191
- Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology (1978). 3rd. ed., Volume 1-26. New York, NY: John Wiley and sons, 1978-1984
- Klaunig J.E., Xu Y., Isenberg J.S., Bachowski S., Kolaja K.L., Jiang J., Stevenson D.E. and Walborg E.F.Jr. (1998): The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.*, **106** (1), 289-295
- Klein S.M., Cohen G. and Cederbaum A.I. (1981): Production of formaldehyde during metabolism of dimethyl sulfoxide by hydroxyl radical generating systems. *Biochemistry*, **20**, 6006-6012
- Knobbe G. (1993): Die Bedeutung von Kupfer(II) für die Toxizität und DNA-schädigende Wirkung von Chlorogensäure. Diplomarbeit an der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg
- Kochi J.K. (1978): Organometallic mechanisms and catalysis. Academic Press, New York, San Francisco, London
- Kohn K.W. (1991): Principles and practise of DNA filter elution. *Pharmacol. Ther.*, **49**, 55-77
- Kontush A., Finckh B., Karten B., Kohlschütter A. and Beisiegel U. (1996): Antioxidant and prooxidant activity of α -tocopherol in human plasma and low density lipoprotein. *J. Lipid Res.*, **37**, 1436-1448
- Kornilova S.V., Blagoi Y.P., Moskalenko I.P., Nikiforova N.A. and Gladchenko N.A. (1988): Effect of metal ions on DNA conformation and their biological action on genetic structures of cells. *Stud. Biophys.*, **123** (2), 77-84
- Kühn-Birett: Merkblätter Gefährliche Arbeitsstoffe. 46. erg. Lfg. 12/89
- Kuyendall J.R. and Bogdanffy M.S. (1992): Efficiency of DNA-histone crosslinking induced by saturated and unsaturated aldehydes in vitro. *Mutat. Res.*, **283**, 131-136
- Lamola A.A. and Yamane T. (1967): Sensitised photodimerization of thymine in DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **58** (2), 443-446

- Leifer Z., Kada T., Mandel M., Zeiger E., Stafford R. and Rosenkranz H.S. (1981): An evaluation of tests using DNA repair-deficient bacteria for predicting genotoxicity and carcinogenicity. A report of the U.S. EPA's Gene-TOX Program. *Mutat. Res.*, **87** (3):211-297
- Leroy T., Lison D. and Lauwerys R. (1995): Preliminary *in vitro* investigation into the use of alkaline elution assay for biomonitoring of humans exposed to genotoxic agents. *Hum. Exp. Toxicol.*, **14**, 61-68
- Leroy T., Van Hummelen P., Anard D., Castelain P., Kirsch-Volders M., Lauwerys R. and Lison D. (1996): Evaluation of three methods for detection of DNA single-strand breaks in human lymphocytes: Alkaline elution, Nick translation, and Single-Cell Gel Electrophoresis. *J Toxicol. Environ. Health*, **47**, 409-422
- Lesko S.A., Lorentzen R.J. and Ts'o P. (1980): Role of superoxide in DNA strand scission. *Biochemistry*, **19**, 3023-3028
- Li A.Z., Huang H., Re X., Qi L.J. and Marx K.A. (1998): A gel electrophoresis study of competitive effects of monovalent counter ion on the extent of divalent counter ions binding to DNA. *Biophys. J.*, **74** (2), 964-973
- Li Y. and Trush M.A. (1993a): DNA damage resulting from the oxidation of hydroquinone by copper: role for a Cu(II)/Cu(I) redox cycle and reactive oxygen generation. *Carcinogenesis*, **14**, 1303-1311
- Li Y. and Trush M.A. (1993b): Oxidation of hydroquinone by copper: Chemical mechanism and biological effects. *Arch. Biochem. Biophys.*, **300**, 346-355
- Li Y. and Trush M.A. (1994): Reactive oxygen-dependant DNA damage resulting from the oxidation of phenolic compounds by a copper-redox cycle mechanism. *Cancer Res.*, **54**, 1895-1898
- Li Y., Trush M.A. and Yager J.D. (1994): DNA damage caused by reactive oxygen species originating from a copper-dependent oxidation of the 2-hydroxy catechol of estradiol. *Carcinogenesis*, **15** (7), 1421-1427
- Lindahl R. and Evces S. (1984): Comparative subcellular distribution of aldehyde dehydrogenase in rat, mouse and rabbit liver. *Biochem. Pharmacol.*, **33** (21), 3383-3389
- Lindahl T. and Andersson A. (1972): Rate of chain breakage at apurinic sites in double-stranded deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*, **11** (19), 3618-3623
- Lindahl T. and Karlström O. (1973): Heat-induced depyrimidination of DNA in neutral solution. *Biochemistry*, **12** (25), 5151-5154

- Lindahl T. and Nyberg B. (1972): Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*, **11** (19), 3610-3618
- Lindahl T., Satoh M.S. and Dianov G. (1995): Enzymes acting at strand interruptions in DNA. *Philos. Trans. R. Soc. B. Biol. Sci.*, **347**, 57-62
- Linder M.C. (1991): Biochemistry of copper. Plenum Press, New York
- Linder M.C. and Hazegh-Azam M. (1996): Copper biochemistry and molecular biology. *Am. J. Clin. Nutr.*, **63**, 797S-811S
- Liu C., Zhou J., Li Q., Wang L., Liao Z. and Xu H. (1999): DNA damage by copper (II) complexes: coordination-structural dependence of reactivities. *J. Inorg. Biochem.*, **75** (3), 233-240
- Lloyd D.R. and Phillips D.H. (1999): Oxidative DNA damage mediated by copper (II), iron (II) and nickel fenton reactions: evidence for site-specific mechanisms in the formation of double-strand breaks, 8-hydroxydeoxyguanosine and putative intrastrand cross-links. *Mutat. Res.*, **424** (1-2), 23-36
- Ma T.-H. and Harris M.M. (1988): Review of the genotoxicity of formaldehyde. *Mutat. Res.*, **196** (1), 37-59
- Magee P.N. (1980): Metabolism of nitrosamines: an overview. In: Coon M.J., Conney A.H., Estabrook R.W., Gelbein H.V., Gillette J.R. and O'Brien P.J. (Hrsg.): Microsomes, drug oxidations, and chemical carcinogenesis. Academic Press, New York, London, 1081-1092
- Marinari U.M., Ferro M., Sciaba L., Finollo R., Bassi A.M. and Brambilla G. (1984): DNA-damaging activity of biotic and xenobiotic aldehydes in chinese hamster ovary cells. *Cell Biochem. Func.*, **2**, 243-248
- Martin R.B. (1986): Tetracyclines and daunorubicin. In: Sigel H. (Hrsg.): Metal ions in biological systems: antibiotics and their complexes. Marcel Dekker, New York, **19**, 19-52
- Martini R. and Murray M. (1996): Rat hepatic microsomal aldehyde dehydrogenase. Identification of 3- and 4-substituted aromatic aldehydes as substrate of the enzyme. *Chem. Res. Toxicol.*, **9**, 268-276
- Martucci C.P. and Fishman J. (1993): P450 enzymes of estrogen metabolism. *Pharmacol. Ther.*, **57**, 237-257

- Mason R.P. and Chignell C.F. (1994): Free radicals in toxicology with an emphasis on electron spin resonance investigations. In: Rice-Evans C.A. and Burdon R.H. (Hrsg.): Free radical damage and its control. Elsevier; Amsterdam, London, New York, Tokyo
- McGregor D.B., Brown A.G., Howgate S., McBride D., Riach C. and Caspary W.J. (1991): Response of the L5178Y mouse Lymphoma cell forward mutation assay. V: 27 coded chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.*, **17** (3), 196-219
- McKelvey-Martin V.J., Green M.H.L., Schmezer P., Pool-Zobel B.L., De Meo M.P. and Collins A. (1993): The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay): a european review. *Mutat. Res.*, **288**, 7-63
- McMurry J. (1984): Organic chemistry. Brooks/Cole, Monterey, CA
- Mello-Filho A.C. and Meneghini R. (1984): *In vivo* formation of single-strand breaks in DNA by hydrogen peroxide is mediated by the Haber-Weiss reaction. *Biochim. Biophys. Acta*, **781**, 56-63
- Mello-Filho A.C. and Meneghini R. (1991): Iron is the intracellular metal involved in the production of DNA damage by oxygen radicals. *Mutat. Res.*, **251** (1), 109-113
- Mercer J.F.B., Livingston J., Hall B., Paynter J.A., Begy C., Chandrasekharappa S., Lochhart P., Grimes A., Bhave M., Siemieniak D. and Glover T.W. (1993): Isolation of a candidate gene for Menkes disease that encodes a potential heavy metal binding protein. *Nat. Genet.*, **3**, 20-25
- Merck Index (1989): Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals. Budavari S. (Hrsg.), Rahway N.J.: Merck and Co., Inc.
- Merk O. and Speit G. (1999): Detection of crosslinks with the comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity. *Environ. Mol. Mutagen.*, **33**, 167-172
- Moschel R.C. and Leonard N.J. (1976): Fluorescent modification of guanine. Reaction with substituted malondialdehydes. *J. Org. Chem.*, **41**, 294-300
- Mumatz M.M., Spies I.G., Clewell H.J. and Yang R.S.H. (1994): Symposium overview: risk assessment of chemical mixtures: biologic and toxicologic issue. *Fundam. Appl. Toxicol.*, **21**, 258-269
- Murata M., Kobayashi M. and Kawanishi S. (1999a): Mechanism of oxidative DNA damage induced by heterocyclic amine, 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5 f] quinoxaline. *Jpn. J. Cancer Res.*, **90** (3), 268-275

- Murata M., Kobayashi M. and Kawanishi S. (1999b): Nonenzymatic reduction of nitro derivative of heterocyclic amine IQ by NADH and Cu (II) leads to oxidative DNA damage. *Biochemistry*, **38** (24), 7624-7629
- Murray D., van Akeren S.C. and Meyn R.E. (1987): Applicability of the alkaline elution procedure as modified the measurement of DNA damage and its repair in nonradioactively labelled cells. *Anal. Biochem.*, **160**, 149-159
- Nackerdien Z., Rao G., Cacciuttolo M.A., Gajewski E. and Dizdaroglu M. (1991): Chemical nature of DNA-Protein cross-links produced in mammalian chromatin by hydrogen peroxide in the presence of iron or copper ions. *Biochemistry*, **30**, 4873-4879
- Nakano J. (1975): Insect attractants, Japan Kokai Patent Number: 75 42053 04/16/75 (YAMABUN YUKA KK)
- Nambata T., Terada N. and Takeuchi S. (1981): Effect of benzaldehyde on the proliferation of Hela cells. *Gann (Jpn. J. Cancer res.)*, **72** (2), 289-292
- Nambata T., Terada N., Mitzutani T. and Takeuchi S. (1980): Effect of benzaldehyde on mouse embryo cells in vitro. *Gann (Jpn. J. Cancer res.)*, **71**, 572-573
- Nicholas H.J. (1971): Photochemistry, Vol II, New York, NY: Van Nostrand Reinhold Co
- Nohmi T., Miyata R., Yoshikawa K. and Ishidate M. Jr. (1985): Mutagenicity tests on organic chemical contaminants in city water and related compounds. Bacterial mutagenicity tests. *Eisei Shikenjo Hokoku*, **103**, 60-64
- NRC (National Research Council) (1982): Formaldehyde and other aldehydes, USEPA-600/6-82-002 (NTIS PB 82-180498)
- OECD guideline for testing of chemicals (1986): Genetic toxicology: DNA damage and repair/unscheduled DNA synthesis in mammalian cells *in vitro*. No. **482**
- OECD guidelines for testing of chemicals (1983): Genetic Toxicology, Micronucleus test, No. **474**
- Oei S.L., Griesenbeck J., Ziegler M. and Schweiger M. (1998): A novel function of Poly(ADP-ribose)ylation: Silencing of RNA polymerase II-dependent transcription. *Biochemistry*, **37** (6), 1465-1469
- Ohba Y., Morimitsu Y. and Watarai A. (1979): Reaction of formaldehyde with calf-thymus nucleohistone. *Eur. J. Biochem.*, **100**, 285-293
- Ohkuma Y. and Kawanishi S. (1999): Oxidative DNA damage by a metabolite of carcinogenic and reproductive toxic nitrobenzene in the presence of NADH and Cu (II). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **257** (2), 555-560

- Ohta T. (1993): Modification of genotoxicity by naturally occurring flavourings and their derivatives. *Critical Rev. in Toxicol.*, **23** (2), 127-146
- Ohta T., Watanabe M., Watanabe K., Shirasu Y. and Kada T. (1986): Inhibitory effects of flavourings on mutagenesis induced by chemicals in bacteria. *Food Chem. Toxicol.*, **24** (1), 51-54
- Oikawa S. and Kawanishi S. (1998): Distinct mechanisms of site-specific DNA damage induced by endogenous reductants in the presence of iron (III) and copper (II). *Biochim. Biophys. Acta*, **1399** (1), 19-30
- Olanow C.W. and Arendash G.W. (1994): Metals and free radicals in neurodegeneration. *Curr. Opin. Neurol.*, **7** (6), 548-558
- Opdyke D.L.J. (Hrsg.) (1979): Monographs on Fragrance Raw Materials. New York, Pergamon Press, 116
- Osman M.M. (1972): The acidity of malondialdehyde and the stability of its complexes with nickel(II) and copper(II). *Helv. Chim. Acta*, **55**, 239-244
- Östling O. and Johanson K.J. (1984): Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **123**, 291-298
- Peña M.M.O., Lee J. and Thiele D.J. (2000): A delicate balance: Homeostatic control of copper uptake and distribution. *J. Nutr.*, **130** (1S), 1251-1260
- Pero R.W., Roush G.C., Markowitz M.M. and Miller D.G. (1990): Oxidative stress, DNA repair and cancer susceptibility. *Cancer Detect. Prev.*, **14**, 555-559
- Perrino F.W. and Loeb L.A. (1990): Animal cell DNA polymerase in DNA repair. *Mutat. Res.*, **236** (2-3), 289-300
- Petering D.H. and Antholin W.E. (1988): Copper toxicity: speciation and reactions of copper in biological systems. *Rev. Biochem. Toxicol.*, **9**, 225-270
- Pettersen E.O., Nome O., Ronnig O.W. and Oftebro R. (1983b): Effects of benzaldehyde on survival and cell-cycle kinetics of human cells cultivated *in vitro*. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, **19** (4), 507-514
- Pettersen E.O., Ronnig O.W., Nome O. and Oftebro R. (1983a): Effects of benzaldehyde on protein metabolism of human cells cultivated *in vitro*. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, **19** (7), 935-940
- Pezzano H. and Podo F. (1980): Structure of binary complexes of mono- and polynucleotides with metal ions of the first transition group. *Chem. Rev.*, **80**, 365-401

- Phillips J.W. and Morgan W.F. (1993): DNA double-strand breaks and mutagenesis. *Environ. Mol. Mutagen.*, **22**, 214-217
- Pfuler S. and Wolf U. (1996): Detection of DNA-crosslinking agents with alkaline comet assay. *Environ. Mol. Mutagen.*, **27**, 196-201
- Plaa G.L. and Witschi H. (1976): Chemical drugs, and lipid peroxidation. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **16**, 125-141
- Pou S., Ramos C.L., Gladwell T., Renks E., Centra M., Young D., Cohen M.S. and Rosen G.M. (1994): A kinetic approach to selection of a sensitive spin trapping system for detection of hydroxyl radical. *Anal. Biochem.*, **217**, 76-83
- Prasal Z. (1986): Structural organization of copper (II) ions in complexes with DNA. *Acta Biochim. Pol.*, **33** (3), 153-167
- Proudfoot J.M., Croft K.D., Puddey I.B. and Beilin L.J. (1997): The role of copper reduction by α -tocopherol in low density-lipoprotein oxidation. *Free Rad. Biol. Med.*, **23**, 720-728
- Prütz W.A. (1984): Inhibition of DNA-Ethidium bromide intercalation due to free radical attack upon DNA; II. Copper(II)-catalysed DNA damage by O_2^- . *Radiat. Environ. Biophys.*, **23**, 7-18
- Prütz W.A. (1990): The interaction between hydrogen peroxide and the DNA-Cu(I) complex: Effects of pH and buffers. *Z. Naturforsch.*, **45c**, 1197-1206
- Pryor W.A. (1988): Why is the hydroxyl radical the only radical that commonly adds to DNA? Hypothesis: It has a rare combination of high electrophilicity, high thermochemical reactivity, and a mode of production that can occur near DNA. *Free Radical Biol. Med.*, **4**, 219-223
- Pryor W.A. and Tang R.H. (1978): Ethylene formation from methional. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **81** (2), 498-503
- Rahman A., Shahabudin, Hadi S.M., Parish J.H. and Ainley K. (1989): Strand scission in DNA induced by quercetin and Cu(II): role of Cu(I) and oxygen free radicals. *Carcinogenesis*, **10** (10), 1833-1839
- Rahn R.O. (1979): Triplet sensitization of DNA. *Acta Biol. Med. Ger.*, **38** (9), 1225-1231
- Rahn R.O., Landry L.C. and Carrier W.L. (1974): Formation of chain breaks and thymine dimers in DNA upon photosensitization at 313 nm with acetophenone, acetone, or benzophenone. *Photochem. Photobiol.*, **19** (1), 75-78
- Ranke J. and Jastorff B. (1999): Multidimensional risk analysis of antifouling biocides. *ESPR-Environ. Sci. and Pollut Res.*, **6** (4), 1-10

- Rao P.S., Luber J.M., Milinowicz J., Lalezari P., Mueller H.S. (1988): Specificity of oxygen radical scavengers and assessment of free radical scavenger efficiency using luminol enhanced chemiluminescence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **150**, 39-44
- Rettig S., Lehn J. and Miltenburger H.G. (1991): A statistical analysis of HPRGT-test data by means of computer simulations. *Lecture Note in Medical Informatics*, **43**, 25-34
- Rietveld E.C., deZwart M., Cox P.G.F. and Seutter-Berlage F. (1987): Substituent effects during the rat liver aldehyde dehydrogenase catalysed oxidation of aromatic aldehydes. *Biochim. Biophys. Acta*, **914**, 162-169
- Riley P.A. (1994): Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, **65** (1), 27-33
- Rodrigues A.S., Silva I.D., Caria M.H., Laires A., Chaveca T., Glatt H.R. and Rueff J. (1994): Genotoxicity assessment of aromatic amines and amides in genetically engineered V79 cells. *Mutat. Res.*, **341** (2):93-100.
- Rosen G.M. and Rauckman E.J. (1981): The spin trapping of biologically generated free radicals. In: Pryor W.A. (Hrsg.): Oxygen and oxy-radicals in chemistry and biology, 97-108
- Sagripanti J.-L. and Kraemer K.H. (1989): Site-specific oxidative DNA damage at polyguanosines by copper plus hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.*, **264** (3), 1729-1734
- Sagripanti J.-L., Goering P.L. and Lamanna A. (1991): Interaction of copper with DNA and antagonism by other metals. *Toxic. Appl. Pharm.*, **110**, 477-485
- Sahu S.C. and Gray G.C. (1993): Interaction of flavonoids, trace metals, and oxygen: nuclear DNA damage and lipid peroxidation induced by myricetin. *Cancer Lett.*, **70**, 73-79
- Said Ahmad M., Fazal F., Rahman A., Hadi S.M. and Parish J.H. (1992): Activities of flavonoids for the cleavage of DNA in the presence of Cu(II): correlation with the generation of active oxygen species. *Carcinogenesis*, **13** (4), 605-608
- Samuni A., Aronovich J., Godinger D., Chevion M. and Czapski G. (1983): On the cytotoxicity of vitamin C and metal ions. - a site-specific Fenton mechanism. *Eur. J. Biochem.*, **137**, 119-124
- Sasaki Y.F. and Endo R. (1978): Mutagenicity of aldehydes in Salmonella. *Mutat. Res.*, **54**, 251-252
- Sasaki Y.F., Imanishi H., Ohta T. and Shirasu Y. (1987): Effects of antimutagenic flavourings on SCEs induced by chemical mutagens in cultured Chinese hamster cells. *Mutat. Res.*, **189** (3), 313-318

- Sasaki Y.F., Imanishi H., Watanabe M., Ohta T. and Shirasu Y. (1990a): Suppressing effects of antimutagenic flavourings on chromosome aberrations induced by UV-light or X-rays in cultured Chinese hamster cells. *Mutat Res.*, **229** (1), 1-10
- Sasaki Y.F., Ohta T., Imanishi H., Watanabe M., Matsumoto K., Kata T. and Shirasu Y. (1990b): Suppressing effects of vanillin, cinnamaldehyde, and anisaldehyde on chromosome aberrations induced by X-rays in mice. *Mutat. Res.*, **243** (4), 299-302
- Sato M., Tanaka A., Tsuchiya T., Yamaha T., Nakamura S. and Tanaka S. (1988): Excretion, distribution and metabolic fate of sodium o-phenylphenate and o-phenylphenol in the rat. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.*, **29**, 7-12
- Satoh K. and Sakagami H. (1997): Effect of copper and iron ions on cytotoxicity induced by ascorbate, gallate and caffeate. *Anticancer Res.*, **17** (3C), 2181-2184
- Scandalios J.G. (1990): Response of plant antioxidant defence genes to environmental stress. *Adv. Genet.*, **28**, 1-41
- Schaaper R.M., Koplitz R.M., Tkeshelashivilli L.K. and Loeb L.A. (1987): Metal-induced lethality and mutagenesis: possible role of apurinic intermediates. *Mutat. Res.*, **177** (2), 179-188
- Schauenstein E.H., Estenbauer H. and Zollner H. (1977): Aldehydes in biological systems. Their natural occurrence and biological activities. Pion, London, 205pp
- Schimmelpfennig W. and Dieter H.H. (1995): Kupfer und frühkindliche Leberzirrhose. *Bundesgesundheitsblatt*, **1**, 2-10
- Schimmelpfennig W., Dieter H.H. and Tabert M. (1996): Cirrhosis of the liver in early childhood and copper content of drinking and well water, respectively. Multi-centric retrospective clinical study on frequency, distribution and etiology in Germany (supported by the University of Leeds; UK-The Environment Center). Federal Environmental Agency. Institute for Water, Soil and Air Hygiene. D-14191 Berlin
- Schimmelpfennig W., Dieter H.H., Tabert M. and Meyer E. (1997): Frühkindliche Leberzirrhose (FKZ) und Kupferexposition über das Leitungswasser. *Umweltmed. Forsch. Prax.*, **2**, 63-79
- Schonbaum G.R. and Chance B. (1976): Catalase. In: Boyer P.D. (Hrsg.): The Enzymes, 3rd Ed., Volume XIII, Part C, Dehydrogenases (II), Oxidases (II), Hydrogen Peroxide cleavage, Academic Press, New York, San Francisco, London, 363-408
- Schuessler H. and Jung E. (1989): Protein-DNA crosslinks induced by primary and secondary radicals. *Int. J. Radiat. Biol.*, **56**, 423-435

- Senior D.J. and Tsai C.S. (1988): Purification and characterization of aldehyd dehydrogenase from rat liver mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.*, **262**, 211-220
- Sheldon R.A. and Kochi J.K. (1981): Metal-catalysed oxidation of organic compounds. Academic Press, New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco
- Shigenaga M.K. and Ames B.N. (1991): Assays for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: A biomarker of *in vivo* oxidative DNA damage. *Free Radical Biol. Med.*, **10**, 211-216
- Shiraishi H., Ktaoka M., Morita Y. and Umemoto J. (1993): Interactions of hydroxyl radicals with tris (Hydroxymethyl) aminomethane and Good's buffers containing Hydroxymethyl residues produce formaldehyde. *Free Radic. Res. Commun.*, **19** (5), 315-321
- Siegel H. (1989): Metal nucleotide interactions. In: Metal DNA Chemistry, *Am. Chem. Soc.*, 158-203
- Sies H. (1991): Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. New York. Academic Press
- Sies H. (1992): Oxidativer Streß: von der Grundlagenforschung zur klinischen Anwendung. In: Crystal R.G. & Nolte D. (Hrsg.): Das Glutathionsystem und seine Bedeutung in der antioxidativen Abwehr, *Excerpta Medica*, Amsterdam, Hongkong, Princeton, Sydney, Tokio, 38-56
- Sies H. (1993): Damage to plasmid DNA by singulet oxygen and its protection. *Mutat. Res.*, **299** (3-4), 183-191
- Singer B. and Grunberger D. (1983): Molecular biology of mutagens and carcinogens. Plenum Press, New York, London
- Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R. and Schneider E.L. (1988): A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.*, **175**, 184-191
- Sladek N.E., Manthey P.A., Maki P.A., Zang Z. and Landkamer G.J. (1989): Xenobiotic oxidation catalysed by aldehyde dehydrogenase. *Drug. Metab. Rev.*, **20**, 697-720
- Slater T.F. (1976): In: Dianzani M.U., Ugazio G. and Sena L.M. (Hrsg.): Recent advances in biochemical pathology: toxic liver injury. *Minerva Medica*, Turin, 99-108
- Slater T.F., Sawyer B. and Sträuli U. (1963): Studies on succinate-tetrazolium reductase systems; III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biochim. Biophys. Acta*, **77**, 383-393
- Snyder R.D. and Van Houten B. (1986): Genotoxicity of formaldehyde and an evaluation of its effects on DNA repair process in human diploid fibroblasts. *Mutat. Res.*, **165** (1), 21-30

- Sofuni T., Hayashi M., Matsuoka A., Sawada M., Hatanaka M. and Ishidate M. Jr. (1985): Mutagenicity tests on organic chemical contaminants in city water and related compounds. II. Chromosome aberration tests in cultured mammalian cells. *Eisei Shikenjo Hokoku*, **103**, 64-75
- Stavrakis G.N. and Wright R.N. (1974): Molecular vibration and insect attraction-*Dacus-Oleae* (Diptera-Tephritidae). *Can. Entomol.*, **106** (3), 333-335
- Sternlieb I. (1994): Copper and zinc. In: Arias I.M., Boyer J.L., Fausto N. *et al.* (Hrsg.): The liver. Biology and pathology. 3rd ed., New York, Raven Press, 585-596
- Sugiura Y., Kuwahara J. and Suzuki T. (1984): DNA interaction and nucleotide sequence cleavage of copper-streptonigrin. *Biochim. Biophys. Acta*, **782** (3), 254-261
- Suzuki J., Inoue Y. and Suzuki S. (1995): Changes in the urinary excretion level of 8-hydroxy-guanine by exposure to reactive oxygen-generating substances. *Free Radical Biol. Med.*, **18** (3), 431-436
- Swenberg J.A., Cross C.A., Martin J. and Pop J.A. (1983): Mechanisms of formaldehyde toxicity. In: Gibson J.E. (Hrsg.): Formaldehyde toxicity, Hemisphere, New York, 132-147
- Tajmir-Riahi H.A., Langlais M. and Savoie J. (1988): A laser Raman spectroscopic study of the interaction of calf thymus DNA with Cu(II) and Pb(II) ions: metal ion binding and DNA conformational changes. *Nucl. Acids Res.*, **16**, 751-762
- Tamai K., Tezuka H. and Kuroda Y. (1992): Different modifications by vanillin in cytotoxicity and genetic changes induced by EMS and H₂O₂ in cultured Chinese hamster cells. *Mutat. Res.*, **268** (2), 231-237
- Terramare (2000): Antifouling ohne Gift-Zukunft oder Illusion. Workshop der AG Biofilm, Forschungszentrum Terramare, Wilhelmhaven, 19.05.2000
- Tice R.R., Andrews P.W. and Singh N.P. (1990b): The single cell gel assay: a sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair. In: Sutherland B.M. and Woodhead A.D. (Hrsg.): DNA damage and repair in human tissue. Plenum Press, New York, 291-301
- Tice R.R., Andrews P.W., Hirai O. and Singh N.P. (1990a): The single cell gel (SCG) assay: an electrophoresis technique for the detection of DNA damage in individual cells. In: Witmer C.M., Snyder R.R., Jollow D.J., Kalf G.F., Kocsis J.J. and Sipes I.G. (Hrsg.): Biologically reactive Intermediates, IV. Molecular and cellular effects and their impact on human health. Plenum Press, New York, 157-164

- Tottmar S.O.C., Pettersson H. and Kiessling K.-H. (1973): The subcellular distribution and properties of aldehyde dehydrogenase in rat liver. *Biochem. J.*, **135**, 577-586
- Toyokuni S. (1999). Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathol. Int.*, **49** (2), 91-102
- Trush M.A. and Kensler T.W. (1991): An overview of the relationship between oxidative stress and chemical carcinogenesis. *Free. Radical Biol. Med.*, **10**, 201-209
- Tünnemann G. (1997): Bedeutung radikalischer Spezies bei der DNA-Schädigung durch MDA/Cu(II). Diplomarbeit an der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg
- UBA (1993): Kombinationswirkungen, Symposium Okt. 1993, Berlin
- Ueda J., Takai M., Shimazu Y. and Ozawa T. (1998): Reactive oxygen species generated from reaction of copper (II) complexes with biological reductants cause DNA strand scission. *Arch. Biochem. Biophys.*, **357** (2); 231-239
- Vaca C.E., Wilhelm J. and Harms-Ringdahl M. (1988): Interaction of lipid peroxidation products with DNA. A review. *Mutat. Res.*, **195** (2), 137-149
- Vainio H., Sorsa M. and McMichael A.J. (Hrsg.) (1990): Complex mixtures and cancer risk, *IARC*, Lyon
- Van Duuren B.J (1975): Carcinogenic action of vinyl chloride. In: Selikoff I.J. and Hammond E.C. (Hrsg.): Toxicity of vinyl chloride-polyvinyl chloride, *Ann. NY Acad. Sci.*, **246**, 258-267
- Vaz A.D.N. and Coon M.J. (1987): Hydrocarbon formation in reductive cleavage of hydroperoxides by Cytochrome P-450. *Proc. of the Nat. Acad. of Sci.*, **84** (5), 1172-1176
- Venugopal B. and Luckey T.P. (1975): Toxicology of non-radioactive heavy metals and their salts. In: Luckey T.P., Venugopal B. and Hutcheson D. (Hrsg.): Heavy metal toxicity, safety and hormology. *Thieme Verlag*, Stuttgart
- Verschueren K. (1983): Handbook of Environmental Data of Organic Chemicals. 2nd. ed. New York, NY: Van Nostrand Reinhold Co
- Vijayalaxmi L., Tice R.R. and Strauss G.H.S. (1992): Assessment of radiation induced DNA damage in human blood lymphocytes using the single-cell gel electrophoresis technique. *Mutat. Res.*, **271** (3), 243-252
- Villacara A., Spatz M., Dodson R.F., Corn C. and Bembry J. (1989): Effect of arachidonic acid on cultured cerebromicrovascular endothelium: permeability, lipid peroxidation and membrane "fluidity". *Acta Neuropathol.*, **78**, 310-316

- Vinograd J., Lebowitz J., Radloff R., Watson R. and Paipis R. (1965): The twisted circular form of polyoma viral DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **53**, 1104-1111
- Vöhringer M.-L., Becker T.W., Krieger G. and Witte I. (1998): Synergistic DNA damaging effects of malondialdehyde/Cu(II) in PM2 DNA and human fibroblasts. *Toxicol. Lett.*, **94**, 159-166
- Volatile Compounds in Food (1989): Qualitative and Quantitative Data, Volumes I, II and III, TNO-Civo Food Analysis Institute, Zeist
- Vollbrandt T., Juhl U. and Witte I. (1994): The role of Cu(II) in the *in vitro* DNA damage and cytotoxicity of selected hydroquinones. 14. Tagung der GUM: DNA Schäden und ihre Reparatur. Universität Göttingen, März 1994
- Vuillaume M. (1987): Reduced oxygen species, mutation induction and cancer initiation. *Mutat. Res.*, **186** (1), 43-72
- Vulpe C.D., Levison B.W.S., Packman S. and Gitschier J. (1993): Isolation of a candidate gene for Menkes disease and evidence that it encodes a copper transporting ATPase. *Nat. Genet.*, **3**, 7-13
- Wangenheim J. and Bolesfoldi G. (1988): Mouse lymphoma L5178 S5178Y thymidine kinase locus assay of 50 compounds. *Mutagenesis*, **3** (3), 193-205
- Ward J.F. (1988): DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: Identities, mechanism of formation, and reparability. *Proc. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **35**, 95-125
- Ward J.F. and Kuo I. (1978): Radiation damage to DNA in aqueous solution: A comparison of the response of the single stranded form with that of the double stranded form. *Radiat. Res.*, **75**, 278-285
- Watanabe K., Ohta T. and Shirasu Y. (1988): Antimutagenic effects of benzaldehyde and its derivatives on mutagenesis induced by 4-Nitroquinolin 1-Oxid in *Escherichia coli*. *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1041-1045
- Watanuki M. and Sakaguchi K. (1980): Selective inhibition by benzaldehyde of the uptake of nucleosides and sugars into simian virus 40-transformed cells. *Cancer Res.*, **40** (7), 2574-2579
- Williams G.M. (1977): Detection of chemical carcinogens by unscheduled DNA-synthesis in rat liver primary cell cultures. *Cancer Res.*, **37**, 1845-1851
- Willoughby O.H. (1992): Farm Chemical Handbook, Meister Publishing Co.

- Witte I. and Krieger G. (1997): Genotoxische Wirkungen durch Redoxreaktionen sauerstoffhaltiger organischer Verbindungen mit Kupfer(II) *in vitro* und in Zellkultur. Abschlußbericht (Wi 1117/1-1 bis 1-6). Gefördert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft
- Wolf C.R., Harmon H. and Schiller C.M. (1982): Interaction of aromatic aldehydes with isolated rat liver mitochondria. *Biochem. Pharmacol.*, **31** (11), 2025-2029
- Wong A., Huang C.H., Crooke S.T. (1984): Mechanism of deoxyribonucleic acid breakage induced by 4'-(9-acridinylamino)methanesulfon-m-anisidide and copper: role for cuprous ion and oxygen free radicals. *Biochemistry*, **23** (13), 2946-2952
- Wood R.D. and Shivji M.K.K. (1997): Which DNA polymerases are used for DNA-repair in eucaryotes? *Carcinogenesis*, **18**, 605-610
- Woodruff R.C., Mason J.M., Valencia R. and Zimmering S. (1985): Chemical mutagenesis testing in *Drosophila*. V. Results of 53 coded compounds tested for the National Toxicology Program. *Environ. Mutagen.*, **7** (5), 677-702
- Yamaguchi Y., Heiny M.E. and Gitlin J.D. (1993): Isolation and characterization of a human liver cDNA as a candidate gene for Wilson disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **197**, 271-277
- Yamamoto K. and Kawanishi S. (1989): Hydroxyl free radical is not the main active species in site-specific DNA damage induced by copper (II) ion and hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.*, **264** (26), 15435-15440
- Yamanaka N., Oda O. and Nagao S. (1997): Prooxidant activity of caffeic acid, dietary non-flavonoid phenolic acid, on Cu²⁺-induced low density lipoprotein oxidation. *FEBS Lett.*, **405**, 186-190
- Yamashita N., Murata M., Inoue S., Burkitt M.J., Milne L. and Kawanishi S. (1998): Alpha-tocopherol induces oxidative damage to DNA in the presence of copper(II) ions. *Chem. Res. Toxicol.*, **11** (8), 855-862
- Yamashita N., Tanemura H. and Kawanishi S. (1999): Mechanism of oxidative DNA damage induced by quercetin in the presence of Cu(II). *Mutat. Res.*, **425** (1), 107-115
- Yang M.-H. and Schaich K.M. (1996): Factors affecting DNA damage caused by lipid hydroperoxides and aldehydes. *Free Radical Biol. Med.*, **20** (2), 225-236
- Yang R.S.H., Hang H.L. and Boorman G.A. (1989): Toxicology of chemical mixtures: experimental approaches, underlying concepts, and some results. *Toxicol. Lett.*, **49**, 183-197

-
- Youngman R.J. and Elstner E.F. (1981): Oxygen species in paraquat toxicity: the crypto-OH radical. *FEBS Lett.*, **129** (2), 265-268
- Zhang L., Bandy B. and Davison A.J. (1996): Effects of metals, ligands and antioxidants on the reaction of oxygen with 1,2,4-benzenetriol. *Free Radical Biol. Med.*, **20** (4), 495-505
- Zheng R.L., Lesko S.A. and Ts'o P.O. (1988): DNA damage induced in mammalian cells by active oxygen species. *Sci. Sin. [B]*, **31** (6), 676-686
- Zimmer Ch., Luck G., Fritzsche H. and Triebel H. (1971): DNA-copper(II) complex and DNA conformation. *Biopolymers*, **10**, 441-463

Danksagung:

An dieser Stelle möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Irene Witte für ihre stets motivierende Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, ihr Interesse und ihre Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit sowie für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes bedanken. Herrn Prof. Dr. Thomas Höpner gilt mein Dank für die kritischen wissenschaftlichen Anregungen.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. Karlheinz Maier für seine Unterstützung bei den Chemolumineszenzmessungen und Herrn Peter Kanje, sowie Herrn Dr. Peter Jaros, die mir ein sicheres und angenehmes Arbeiten im Isotopenlabor ermöglichten.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Irene Witte möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit, die Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken. Mein Dank gilt insbesondere Frau Elke Frahmann und Frau Marita Weerts-Eden für die freundschaftliche Zusammenarbeit und die tatkräftige Unterstützung bei den Zellkulturuntersuchungen. Danken möchte ich auch Frau Dr. Heike Jacobi und Frau Dr. Ursula Juhl-Strauss für ihr stetes Interesse am Fortgang meiner Arbeiten. Frau Dr. Heike Jacobi danke ich außerdem für die Bereitschaft, diese Arbeit zu lesen und Korrekturen vorzunehmen. Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dipl. Biol. Marie-Luise Hinrichsen für ihre stete tatkräftige Hilfsbereitschaft.

Mein spezieller Dank für die hervorragende Zusammenarbeit, die über einen langen Zeitraum wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat, richtet sich an Herrn Dr. Thomas Becker.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Mann Hannes „Danke für alles“!

Meiner Tochter danke ich für ihr Lachen und ihre Liebe, die mir insbesondere über die letzte schwere Zeit hinweggeholfen haben. Meinen Eltern möchte ich für ihre Geduld und Unterstützung während meines Studiums und der Promotion danken.

Diese Arbeit wurde im Rahmen des DFG-Projekts “Genotoxische Wirkungen durch Redoxreaktionen sauerstoffhaltiger organischer Verbindungen mit Kupfer(II) *in vitro* und in Zellkulturen“ (Wi 1171/1-4) gefördert.

Der Lebenslauf der Promovendin wurde mit folgender Begründung des behördlichen Datenschutzbeauftragten der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg am 19. Juni 2019 aus dieser Datei entfernt.

„[...] Recherchen haben ergeben, dass es nach früheren Promotionsordnungen verpflichtend war, der Dissertation einen Lebenslauf beizufügen (vgl. § 8 Abs. 2 S. 3 Promotionsordnung der Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg vom 11.12.2003). Da ein Lebenslauf zur Bewertung der Prüfungsleistung in keiner Weise erforderlich ist, stellt(e) die vorbenannte Norm eine Verletzung des Grundrechts auf informationelle Selbstbestimmung dar und war bzw. ist mithin nichtig. Dies führte dazu, dass die Norm in die jetzige Fassung geändert wurde.

Hinsichtlich Erhebung und Speicherung des Lebenslaufes ist festzustellen, dass es hierfür keine (wirksame) Rechtsgrundlage gibt bzw. gab und die hierin liegende Verarbeitung somit rechtswidrig erfolgte bzw. erfolgt. Rechtswidrig verarbeitete Daten sind gem. Art. 17 Abs. 1 lit. d. DSGVO unverzüglich zu löschen.“

Oldenburg, 19.6.2019

Hiermit versichere ich, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Oldenburg, den _____

(Gabriele Krieger)