

# Chromosomenaberrationen (CA)

- CA sind Mutationen (**Chromosomenmutationen**).
- CA sind das Ergebnis von Fehlreparaturen (**Misrepair**) chemischer Veränderungen in der DNS.
- CA entstehen aus **Doppelstrangbrüchen (DSB)** in der chromosomalen DNS.
- **DSB** können von wenigen Mutagenen (wie ionisierenden Strahlen und einigen chemischen Agenzien) direkt induziert werden.
- **DSB** können während der DNS-Synthese aus **Schäden in Einzelsträngen der DNS** (Single Strand Lesions: **SSL**) hervorgehen.
- Die weitaus meisten mutagenen Agenzien induzieren **SSL**.

# Zellzyklus und DNS

- Chromosomen bestehen vor der DNS-Synthese in der **G1-Phase** aus jeweils einer **Chromatide mit einem durchgehenden DNS-Molekül**.
- In der **S-Phase** wird die DNS repliziert. Nach der S-Phase enthalten die Chromosomen **zwei Chromatiden mit jeweils einem DNS-Molekül**.
- Der S-Phase folgt eine kurze **G2-Phase** bevor die **Mitose (M-Phase)** beginnt, in deren **Metaphase** die Chromosomen untersucht werden können.

# CA und Zellzyklus

- **DSB in G1** führen zu **CA vom Chromosomentyp** (in M1 sind beide Chromatiden von der Aberration betroffen).
- **DSB in G2** führen zu **CA vom Chromatidentyp** (in M1 ist nur eine Chromatide betroffen).
- **DSB in S** führen zu beiden CA-Typen, abhängig davon, ob der geschädigte DNS Strang bei der Induktion von DSB noch nicht (**Chromosomentyp-CA**) oder schon (**Chromatidtyp-CA**) repliziert war.
- **SSL in G1 oder in S** können während der DNS-Synthese zu **DSB** in einem der replizierenden DNS-Stränge und damit zu **Chromatidentyp-CA** führen. **SSL in G2** führen in M1 nicht zu CA.
- **DSB** führen in dem Zellzyklusstadium zu **CA**, in dem sie induziert wurden. Die Entstehung von CA aus direkt induzierten DSB ist von der S-Phase unabhängig. **SSL** führen nur dann zu **CA** wenn sie in **S** zu **DSB** umgeformt werden. Die Entstehung von CA aus SSL ist von der S-Phase abhängig.
- Die CA-Typen erlauben somit eine Aussage darüber, ob ein Agens **DSB** oder **SSL** induziert.

# CA Typen: Chromatidentyp CA

- **SSL in der G1-Phase** werden effektiv repariert.
- **SSL in der S-Phase** können während der DNS-Replikation zu **DSB** in einem der replizierenden DNS-Stränge führen. Die so entstandenen DSB ergeben in M1 **CA in jeweils einer Chromatide: Chromatidentyp-CA**. Hierher gehören Chromatidentranslokationen und Chromatidenbrüche. Isochromatidenbrüche betreffen beide Chromatiden an morphologisch gleicher Position und können nicht von Chromosomenbrüchen unterschieden werden.

# CA Typen: Chromosomentyp CA

- Werden **DSB vor der S-Phase** des Zellzyklus induziert, entstehen daraus **CA in den noch unreplizierten Chromosomen**. Diese CA werden in der S-Phase repliziert und betreffen in der M1 beide Chromatiden des Metaphasechromosoms, es handelt sich um **CA vom Chromosomentyp**. Hierher gehören **dizentrische Chromosomen, Ringchromosomen, Translokationen und Chromosomenbrüche**.

# Zellzyklus

- CA sollten ausschließlich in M1 ausgewertet werden, was die Kontrolle des Zellzyklus notwendig macht.
- Der Zellzyklus ist von vielen Faktoren abhängig wie:
  - Zelltyp und Alter der verwendeten Zellen
  - Kulturmedium, Serum, pH-Wert
  - Temperatur

# CA und Zellzyklus

- CA müssen in M1 ausgewertet werden.
- In späteren Zellteilungen kommt es zu Veränderungen, die verlässliche qualitative und quantitative Aussagen über die CA induzierenden Wirkungen eines Agens nicht mehr erlauben:
  - 1) Zellen mit CA sterben präferenziell ab (Selektion). Nur wenige Zellen mit CA überleben mehrere Zellzyklen.
  - 2) Die Aberrationsmuster in überlebenden Zellen verändern sich. Aus Chromatidentranslokationen können dizentrische Chromosomen entstehen, was zu einer falschen Einschätzung der Wirkungsweise des getesteten Agens führt.

# M1 Zellen

- Der Einbau von **5-Bromdesoxyuridin (B)** statt **Desoxythymidin (T)** in die DNS während der S-Phase führt in **M1** zu Chromosomen deren Chromatiden jeweils in einem DNS Strang **B** statt **T** enthalten (**T-B:T-B**). In **M2** sind die Chromatiden unterschiedlich mit **B** substituiert (**T-B:B-B**). **T-B:B-B** Chromatiden färben sich mit **Giemsa** Farbe unterschiedlich (**B-B Chromatiden hell, T-B Chromatiden dunkel**). Mit dieser Methodik kann festgestellt werden, ob die analysierten Zellen M1- oder M2-Zellen sind.

# Mikrokerne (MN)

- MN sind kleine Kerne, die neben dem Hauptkern in der Zelle sichtbar sind
- **MN die aus CA hervorgehen**, enthalten Bruchstücke von Chromosomen meist **ohne Zentromer** (Spindelfaseransatzstellen). Die aus CA hervorgehenden MN entstehen in **M2** und werden in **zweikernigen Zellen** analysiert, deren Zellteilung, nicht aber deren Kernteilung mit Cytochalasin B blockiert wird.
- MN können auch ungeschädigte Chromosomen enthalten, die während der Anaphase nicht in den Hauptkern gelangt sind.
- **Zentromere können in MN sichtbar gemacht werden.**
- **Zentromer-lose MN** sind ein Hinweis darauf, dass ein Testagens CA induziert hat.
- **Zentromer-haltige MN** sind ein Hinweis darauf, dass ein Testagens zu Fehlverteilungen von Chromosomen führt.

# SCE

- **Sister Chromatid Exchange (SCE)** resultieren aus der **Reparatur von SSL** in der S-Phase. SCE beruhen auf **Austauschen zwischen DNS-Molekülen in den beiden Chromatiden eines replizierten Chromosoms (Schwesterchromatiden)**. SCE können nach **differenzieller Substitution der Chromatiden mit 5-Bromdesoxyuridin (B)** mit spezifischen **Färbetechniken** sichtbar gemacht werden.
- Erhöhte Frequenzen von **SCE** nach Einwirkung eines Agens zeigen, dass induzierte **SSL** repariert wurden. Der **SCE-Test** ist somit ein **Indikator** für die Induktion von **SSL**.
- Die Substitution der chromosomalen **DNS** mit **B** kann das Ergebnis eines SCE-Tests beeinflussen.

# Comet Assay

- **Einzelne Zellen** werden auf Objektträgern in Agarose eingebettet, lysiert und einer **Elektrophorese** unterworfen.
- **DNS Fragmente** wandern aus den Zellkernen heraus, und es entsteht eine Struktur, die einem **Kometen** ähnelt.
- Eine definitive Aussage über die Art der zu den Kometen führenden DNS-Schäden ist mit dem routinemäßig durchgeführten Comet Assay nicht möglich.
- Ein positiver Comet Assay zeigt an, dass ein Testagens **DNS-Schäden** induziert, aber nicht, ob diese Schäden zu Mutationen wie etwa **CA** führen können.

# Durchführung cytogenetischer Tests in vitro

- Kontrolle von Kulturmedium, Serum, Antibiotika, pH-Wert.
- Kontrolle des Alters der verwendeten Zellen (Zelllinien, Fibroblasten, periphere Lymphozyten des Menschen).
- Ausschluss von Infektionen der Testzellen mit Mykoplasmen.
- Kontrolle des Zellzyklus.
- Kontrolle der Temperatur und deren Verteilung in den Kulturschalen während der Exposition (Ausschluss von „Hot Spots“).

# Durchführung cytogenetischer Tests in vitro

- Auswertung: An **verblindeten Präparaten**.
- Kontrollen: **Positiv-, Sham-, unbehandelte Kontrollen**.
- Dosierung: Mindestens **3 Dosen** eines Testagens zum Nachweis einer möglichen **Dosis-Effekt-Beziehung**.
- Zur Einschätzung der **Variabilität** der Ergebnisse müssen mindestens **3 unabhängige Experimente** durchgeführt werden.
- Gleichzeitige Expositionen von mehreren Ansätzen (etwa Kulturschalen) sind **Parallelansätze** und keine unabhängigen Experimente.

# Durchführung cytogenetischer Tests in vivo

- **Tiere:** Exposition (verschiedene Möglichkeiten) und Analysen von: **CA** (Knochenmark, Keimbahn), **MN** (Knochenmark, Blut), **SCE** (Knochenmark, Keimbahn), **Comet Assay** (prinzipiell alle Organe). Vergleich mit nicht exponierten Tieren.
- **Mensch:** Analyse von cytogenetischen Effekten (**CA, MN, SCE**) in **kultivierten Lymphozyten** aus dem peripheren Blut **exponierter Personen**. **Vergleich mit nicht exponierten Personen**.
- Die Quantifizierung von Expositionen beim Menschen ist sehr schwierig und höchstens annähernd möglich.

# Ergebnisse zytogenetischer Experimente

- Ein Vergleich der verschiedenen Endpunkte ist nur dann sinnvoll, wenn die unterschiedlichen Erholungszeiten berücksichtigt werden: **Comet Assay**, kurz nach der Exposition, **CA**: in M1, **MN** in M2, **SCE** in M1 oder M2. Mögliche Ergebnisse sind (+ positives Testergebnis; - negatives Testergebnis):
- **CA +**: Das Testagens induziert **DSB und/oder SSL**.
- **MN+ ohne Zentromere**: Das Testagens induziert **CA**, die zu **MN** führen.
- **MN+ mit Zentromeren**: Das Testagens induziert **keine CA** führt aber zu **Fehlverteilungen ganzer Chromosomen**.
- **SCE+**: Das Testagens induziert **SSL die repariert werden**.
- **Comet+**: Das Testagens induziert **DNS-Läsionen**, die unter Elektrophorese zur Freisetzung von **DNS-Fragmenten** führen.
- **CA-, MN+**: Das Testagens induziert **Fehlverteilungen ganzer Chromosomen**.
- **CA+, MN-**: **Unschlüssig**
- **CA+, SCE+**: Das Testagens induziert **SSL**
- **CA+, SCE-**: Das Testagens induziert **DSB**
- **CA-, SCE+**: Die **Dosis des Testagens** war für den Nachweis von **CA** zu niedrig.
- **Comet+, CA+**: Das Testagens induziert **DNS-Schäden**, die zu **CA** fehlrepariert werden.
- **Comet+, CA-, MN-**: Das Testagens induziert **DNS Schäden**, die nicht zu **CA** und zu **MN** führen.
- **Comet+, CA+, MN ohne Zentromere+**: Das Testagens induziert **DNS Schäden**, die zu **CA** fehlrepariert werden und zu **MN** führen.
- **Comet-, CA, MN und SCE+**: **Unschlüssig**

# Mutagene und karzinogene Effekte

- **Es besteht eine enge Korrelation zwischen mutagenen und karzinogenen Wirkungen: Mutagene Agenzien sind überwiegend auch karzinogen:** (Kirkland, D., Aardema, M., Henderson, L. Müller, L.(2005) Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens I. Sensitivity, specificity and relative predictivity, Mutation Res. 584, 1-256.
- **Erhöhte Frequenzen chromosomaler Aberrationen in Lymphozyten von gesunden Personen zeigen ein erhöhtes Krebsrisiko an** (Bonassi, S., Chromosomal aberration in peripheral blood lymphocytes of healthy subjects and risk of cancer, In G. Obe, Vijayalaxmi (Eds.) Chromosomal Alterations: Methods, Results and Importance in Human Health, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2007, pp 495-504).
- **Krebszellen weisen chromosomale Aberrationen auf** (Adhvaryu, S.G. Chromosome analysis in cancer patients: application and limitations, In G. Obe, Vijayalaxmi (Eds.) Chromosomal Alterations: Methods, Results and Importance in Human Health, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2007, pp 479-493; Mitelman, F., Johansson, B., Mertens, F. (2007) The impact of translocations and gene fusions on cancer causation, Nature Reviews Cancer, 7, 233-245)

# Mutagene und karzinogene Effekte von RF-EMF

- Studien zur Erbgut schädigenden Wirkungen von RF-EMF sind **überwiegend negativ**. Nicht immer wurden stringente Kriterien der Versuchsdurchführung eingehalten, wie ausreichende **Kontrollen**, Ausschluss möglicher **Temperatureffekte**, **ausreichende Anzahl unabhängiger Experimente**.
- Analysen zu karzinogenen Effekte an Tieren **sind weitgehend negativ**.
- **Epidemiologische Studien** zu karzinogenen Wirkungen beim Menschen **sind weitgehend negativ**.
- **Belastbare Ergebnisse zu mutagenen/karzinogenen Wirkungen von RF-EMF liegen nicht vor**.

# Reviews: Mutagene und karzinogene Effekte von RF-EMF

- [Dasenbrock, C. \(2005\)](#) Animal carcinogenicity studies on radiofrequency fields related to mobile phones and base stations, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 207, S342-S346
- [Heynick, L.N., Johnston, S.A., Mason, P.A. \(2003\)](#) Radio frequency electromagnetic fields: cancer, mutagenesis, and genotoxicity, *Bioelectromagnetics*, Suppl. 6, S74-S100
- [McNamee, J.P. and Bellier, P.V. \(2007\)](#) Cytogenetic and carcinogenic effects of exposure to radiofrequency radiation, In G. Obe, Vijayalaxmi (Eds.) *Chromosomal Alterations: Methods, Results and Importance in Human Health*, Springer-Verlag, Berlin, pp 427-469.
- [Meltz, M.L. \(2003\)](#) Radiofrequency exposure and mammalian cell toxicity, genotoxicity, and transformation, *Bioelectromagnetics*, 24 (Supplement 6) S196-S213.
- [Moulder, J.E., Foster, K.R., Erdreich, L.S., and McNamee, J.P \(2005\)](#) Mobile phones, mobile phone stations and cancer: a review, *Int. J. Radiat. Biol.*, 81, 189-203.
- [Scarfi, M.R. and Bersani, F. \(2007\)](#) Radiofrequency radiation and replication studies, In G. Obe, Vijayalaxmi (Eds.) *Chromosomal Alterations: Methods, Results and Importance in Human Health*, Springer-Verlag, Berlin, pp470-478.
- [Verschaeve, L. \(2005\)](#) Genetic effects of radiofrequency radiation (RFR), *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2007, 336-341.
- [Vijayalaxmi and Obe, G. \(2005\)](#) Controversial cytogenetic observations in mammalian somatic cells exposed to radiofrequency radiation, *Rad. Res.*, 162, 481-496.
- [Vijayalaxmi and Prihoda, T. J. \(2008\)](#) Genetic damage in mammalian somatic cells exposed to radiofrequency radiation: a meta-analysis of data from 63 publications (1990-2005).