

Aus dem Institut für Experimentelle Genetik  
des GSF-Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit, GmbH  
Direktor: Dr. M. Hrabé de Angelis

Anfertigung unter der Leitung von Dr. I.-D. Adler

Vorgelegt über den Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. E. Wolf

**Molekularzytogenetische Untersuchungen in der Spermatogenese der Maus  
zur Erkennung von Aneuploidie-Induktion durch Chemikalien**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Tanja Ruthsatz

aus

Berlin/Deutschland

München 2003

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. R. Stolla  
Referent: Univ.-Prof. Dr. E. Wolf  
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. M. Stangassinger

Tag der Promotion: 18. Juli 2003

Für meine Eltern

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>2 LITERATURÜBERSICHT</b>	<b>2</b>
<b>2.1 Chromosomenaberrationen</b>	<b>2</b>
2.1.1 numerische Chromosomenaberrationen	2
2.1.1.1 Aneuploidie	2
2.1.1.2 Polyploidie	3
2.1.2 strukturelle Chromosomenaberrationen	3
<b>2.2 Entstehung und Folgen von Aneuploidien</b>	<b>5</b>
2.2.1 Mechanismen der Aneuploidie-Entstehung	5
2.2.2 Folgen von Aneuploidien während der Meiose	5
<b>2.3 Zellzyklus und Mitose</b>	<b>7</b>
2.3.1 Mitose	7
2.3.2 Meiose	9
<b>2.4 Angriffspunkte chemischer Substanzen bei der Aneuploidie-Induktion</b>	<b>11</b>
2.4.1 Zentrosomen	11
2.4.2 Der Spindelapparat	12
2.4.3 Zentromere, Kinetochore	15
<b>2.5 Spermatogenese</b>	<b>17</b>
<b>2.6 Testsubstanzen</b>	<b>20</b>
2.6.1 Albendazol	20
2.6.1.1 Bedeutung und Vorkommen	20
2.6.1.2 Biologische Wirkungsweise	21
2.6.2 Genistein	22
2.6.2.1 Bedeutung und Vorkommen	22
2.6.2.2 Biologische Wirkungsweise	23

---

<b>2.7</b>	<b>Testsysteme zur Erkennung von Aneuploidien</b>	<b>23</b>
<b>2.8</b>	<b>Fluoreszenz-<i>in situ</i>-Hybridisierung (FISH)</b>	<b>25</b>
<b>2.8.1</b>	<b>DNA-Sonden</b>	<b>26</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>27</b>
<b>3.1</b>	<b>Versuchstiere</b>	<b>27</b>
<b>3.2</b>	<b>Verwendete Testsubstanzen und Dosierung</b>	<b>27</b>
<b>3.3</b>	<b>Gewinnung und Vorbehandlung des Zellmaterials</b>	<b>28</b>
3.3.1	Präparation der Spermien aus dem Nebenhoden	28
3.3.2	Herstellung der Spermienausstriche	28
3.3.3	Dekondensation des Spermienchromatins	28
<b>3.4</b>	<b>Einfluss der Testsubstanzen auf die Dauer der Meiose</b>	<b>29</b>
3.4.1	Behandlung der Mäuse	29
3.4.2	Immunfluoreszenzfärbung mit Anti-BrdU Antikörpern	30
3.4.3	Auswertung mit dem Laser-Scanning Zytometer (LSC)	30
<b>3.5</b>	<b>Fluoreszenz-<i>in situ</i>-Hybridisierung (FISH)</b>	<b>32</b>
3.5.1	Verwendete DNA-Sonden	33
3.5.2	Isolierung der DNA-Sonden	33
3.5.3	Markierung der DNA-Sonden	33
3.5.4	Herstellung des DNA-Sonden Hybridisierungsansatzes	34
3.5.5	Denaturierung der Mausspermien-DNA	35
3.5.6	Hybridisierung und Waschen der Objektträger	35
3.5.7	Immunodetektion	35
3.5.8	Gegenfärbung des Spermienchromatins	35
<b>3.6</b>	<b>Mikroskopische Auswertung</b>	<b>36</b>
3.6.1	Fluoreszenzmikroskopie	36
3.6.2	Zählkriterien	36
<b>3.7</b>	<b>Zellkultur</b>	<b>37</b>
3.7.1	Zelllinie	37
3.7.2	Zellkulturbedingungen	38

---

3.7.3	Versuchsablauf	38
3.7.3.1	Testlösungen	39
3.7.3.2	Fixierung	39
3.7.3.3	Färbung	39
3.7.4	Auswertung	39
<b>3.8</b>	<b>Statistische Auswertung der Daten</b>	<b>40</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>41</b>
<b>4.1</b>	<b>Effekt der Testsubstanzen auf den zeitlichen Ablauf der Meiose</b>	<b>41</b>
<b>4.2</b>	<b>Mehrfarben FISH an Spermien der Maus</b>	<b>43</b>
4.2.1	Befunde nach einmaliger Behandlung mit Albendazol	45
4.2.2	Befunde nach einmaliger Behandlung mit Genistein	46
4.2.3	Subakute Behandlung	47
4.2.4	Positive Kontrolle	48
<b>4.3</b>	<b>Analyse von Spindelstörungen in V79 MZ Zellen</b>	<b>49</b>
4.3.1	Befunde nach Behandlung mit Albendazol	49
4.3.2	Befunde nach Behandlung mit Genistein	52
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>55</b>
<b>5.1</b>	<b>Bisherige Befunde zur Wirkung der Testchemikalien</b>	<b>55</b>
5.1.1	Albendazol	55
5.1.2	Genistein	56
<b>5.2</b>	<b>Induktion von Spindelstörungen in V79 MZ Zellen</b>	<b>58</b>
5.2.1	Albendazol	58
5.2.2	Genistein	59
<b>5.3</b>	<b>Untersuchungen zum Effekt der Testsubstanzen auf meiotische Verzögerung mit dem Laser-Scanning Zytometer (LSC)</b>	<b>60</b>

---

<b>5.4</b>	<b>Untersuchungen zur Aneuploidie-Induktion an Spermien der Maus</b>	<b>61</b>
5.4.1	Albendazol	62
5.4.2	Genistein	63
<b>5.5</b>	<b>Schlussfolgerung und Ausblick</b>	<b>63</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>66</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>68</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>70</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG</b>	<b>86</b>
9.1	Chemikalien, Verbrauchsmaterial, Kits, Antikörper	86
9.2	Verwendete Lösungen und Puffer für die Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung	87
9.3	Zellkultur	89
<b>10</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>90</b>
<b>11</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>91</b>

---

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ABZ	Albendazol
Abb.	Abbildung
ad	( <i>lat.</i> ) zu, nach
bio	Biotin
BrdU	Bromodeoxyuridin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
COL	Colchizin
cm	Zentimeter
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
dATP	Deoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	Deoxy-Cytidintriphosphat
dGTP	Deoxy-Guanisintriphosphat
dig	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Deoxy-Thymidintriphosphat
dUTP	Deoxy-Uridinphosphat
et al.	( <i>et alteri, lat.</i> ) und andere
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F1	erste Filialgeneration
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
GDP	Guanosindiphosphat
GEN	Genistein
GSF	Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, GmbH
GTP	Guanosintriphosphat
HCl	Salzsäure
Hz	Hertz
i.p.	intraperitoneal
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm

---

LB	Luria Bertani
LIS	Lithiumsalz
LSC	Laser-Scanning Zytometrie
M	molar; molare Masse
mm	Millimeter
mM	millimolar
$\mu$ M	mikromolar
min	Minute
mg	Milligramm
ml	Milliliter
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer
nm	Nanometer
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PI	Propidiumiodid
PN	Phosphatpuffer mit Detergens NP40
RT	Raumtemperatur
s.c.	subcutan
SSC	Saline Sodium Citrat
Std.	Stunden
Tab.	Tabelle
U/min	Umdrehung pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht (Wellenlängen unter 400 nm)
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen (bei chemischen Ansätzen)
Vol.	Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen (bei chemischen Ansätzen)

---

## 1 Einleitung

Verschiedene exogene Einwirkungen wie Rauchen oder der Genuss von Alkohol sowie Chemikalien aus Umwelt und Medizin können auf direkte oder indirekte Weise durch Beeinflussung wichtiger Strukturelemente, die für den fehlerfreien Ablauf der Zellteilung notwendig sind, zu Aneuploidien führen. Ebenso ist bekannt, dass das mütterliche Alter in hohem Maße mit einem erhöhten Risiko für numerische Aberrationen verbunden ist (Hassold et al., 1984). Trotz der ernstzunehmenden Konsequenzen, die Aneuploidie mit sich führen kann, enthalten die international vorgeschriebenen Testmethoden zur Evaluierung der genetischen Aktivität von Chemikalien keine Tests für die Aneuploidie-Induktion. Dies ist z.T. darauf zurückzuführen, dass bisher keine validierten Testsysteme für die routinemäßige Testung auf Aneuploidie existieren. Im Rahmen des von der Europäischen Gemeinschaft (EU) geförderten Forschungsprogrammes „Protection of the European Population from Aneugenic Chemicals“ (PEPFAC) sollen *in vitro* sowie *in vivo* Testmethoden zur Erfassung aneugener Chemikalien entwickelt und optimiert werden. Diese sollen eine Gefahrenidentifikation und eine Risikoeinschätzung von Chemikalien ermöglichen, die in der Lage sind, numerische Chromosomenaberrationen zu induzieren. Das Workpackage 5 des Forschungsprogrammes hat das Ziel, ein *in vivo*- Testsystem zur Erkennung von Aneuploidien in männlichen Keimzellen der Maus zu optimieren und zu validieren. Dazu wurde in den vergangenen Jahren eine Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungsmethode (Mehrfarben-FISH) mit Fluorochrom-markierten, chromosomenspezifischen DNA-Sonden zur Erkennung von Aneuploidien und Polyploidien in Spermien der Maus entwickelt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, mit Hilfe der Mehrfarben-FISH die Aneuploidie-Induktion während der männlichen Meiose der Maus durch Chemikalien am Beispiel von Albendazol (Anthelmintikum) und Genistein (Phytoestrogen) in Spermien der Maus zu untersuchen. Beide Substanzen gehören aufgrund ihrer biologischen Wirkungsweise zu den verdächtigen Substanzen, die von der Leitungsgruppe des EU-Forschungsvorhabens zur Aneuploidie-Testung ausgewählt wurden. Zusätzlich soll bei negativen Befunden im Spermien-FISH-Assay die Wirksamkeit beider Substanzen in einem *in vitro* Test an V79-Zellen überprüft werden.

---

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Chromosomenaberrationen

Bei Veränderungen der Chromosomen unterscheidet man zwischen numerischen und strukturellen Abweichungen vom normalen Chromosomensatz der Zelle.

#### 2.1.1 Numerische Chromosomenaberrationen

Die numerischen Aberrationen können sowohl Autosomen als auch Geschlechtschromosomen (Gonosomen) betreffen. Es handelt sich dabei um Genommutationen, wobei sich die Anzahl einzelner Chromosomen ändert oder der gesamte Chromosomensatz in n-fachen Kopien vorliegt.

##### 2.1.1.1 Aneuploidie

Bei den Aneuploidien ist der Chromosomensatz einer diploiden oder haploiden Zelle um einzelne Chromosomen vermehrt (Hyperploidie) oder vermindert (Hypoploidie). Zu dieser Gruppe gehören Trisomien ( $2n + 1$ ) und Monosomien ( $2n - 1$ ). Aneuploidien treten sowohl in somatischen als auch in Keimzellen auf. In somatischen Zellen führt eine Aneuploidie meist zum Zelltod oder spielt eine Rolle bei der Entwicklung und dem Wachstum von Tumoren (Oshimura und Barrett, 1986; Sen, 2000). In Keimzellen kann das Ergebnis ein aneuploider Embryo sein. Die Mehrzahl der Aneuploidien wirkt sich auf den humanen Embryo letal aus. Einige sind jedoch mit dem Leben vereinbar, darunter die klinisch relevanten Trisomien der autosomalen Chromosomen 13 (Patau-Syndrom), 18 (Edwards Syndrom) und 21 (Down-Syndrom) sowie die Monosomie des Gonosoms X (Turner-Syndrom) und die Geschlechtschromosomenkonstellation XXY (Klinefelter-Syndrom). Bei Mäusen erlaubt neben Aneuploidien der Geschlechtschromosomen lediglich die Trisomie des Chromosoms 19, des kleinsten Chromosoms, eine längere Lebensdauer des Fetus als andere Aneuploidien, sie führt jedoch auch zu Missbildungen und perinatalem Tod (Eichenlaub-Ritter, 1994).

---

### 2.1.1.2 Polyploidie

Unter Polyploidie versteht man die Verdopplung oder Vervielfachung des gesamten Chromosomensatzes ( $3n$ ,  $4n$ , ...). Bisher sind beim Menschen unter Spontanaborten einige Trisomien beschrieben worden, sie sind embryoletal (Vogel und Motulski, 1997).

Im Pflanzenreich ist Polyploidie überraschend häufig vertreten. Viele Pflanzenarten entstehen durch Zufälle bei der Zellteilung, die zu einem zusätzlichen Chromosomensatz führen. Eine besonders häufige Form ist hier die Allopolyploidie, ein polyploider Hybrid, der aus zwei verschiedenen Arten entsteht. Interspezifische Hybriden erweisen sich zwar als steril, sind aber meist robuster als ihre Eltern und können durch ungeschlechtliche Fortpflanzung mittels Ableger vermehrt werden. Viele unserer Nutzpflanzen sind Polyploide, darunter Saatweizen, Hafer, Baumwolle, Kartoffeln und Tabak.

### **2.1.2 Strukturelle Chromosomenaberrationen**

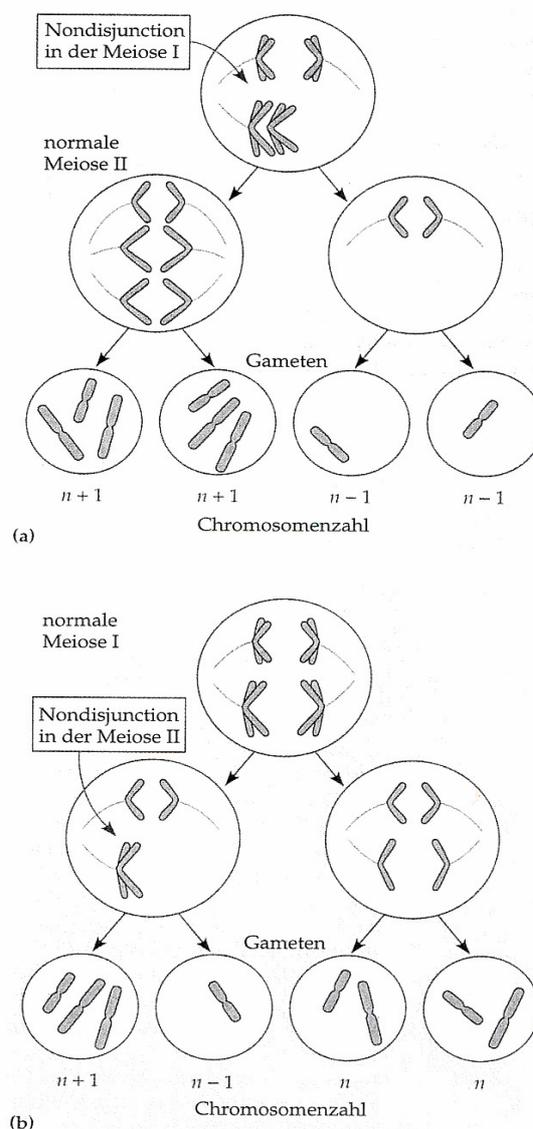
Strukturelle Aberrationen können ebenfalls Autosomen und Gonosomen betreffen. Bei den strukturellen Aberrationen handelt es sich um intrachromosomale oder interchromosomale Umbauten. Die wichtigsten stabilen Strukturveränderungen sind Translokation, Inversion, Deletion, Insertion, Duplikation, Ringchromosom und Isochromosom. Eine strukturelle Chromosomenaberration ist nicht zwangsläufig mit phänotypischen Auswirkungen bei den Trägern verbunden. Liegt allerdings in den elterlichen Keimzellen eine balancierte chromosomale Translokation vor, kann es beim Fötus zu einer unbalancierten Form der Chromosomenanomalie und damit zum Abort kommen. Etwa die Hälfte der strukturellen Aberrationen entsteht durch Neumutation.

## **2.2 Entstehung und Folgen von Aneuploidien**

### **2.2.1 Mechanismen der Aneuploidie-Entstehung**

Als Mechanismen für die Entstehung von Aneuploidien kommen zwei grundlegende Prozesse in Frage: Non-disjunction und der Verlust eines Chromosoms (Bond, 1987). Non-disjunction in der Meiose bezeichnet das Ausbleiben der Trennung gepaarter Chromosomen. Dies kann auf unterschiedliche Art und Weise ablaufen.

Während sich bei einer normal ablaufenden Meiose I die homologen Chromosomen in der Anaphase I gleichmäßig auf beide Tochterzellen aufteilen, werden bei einer Non-disjunction entweder die homologen Chromosomen nicht getrennt und gemeinsam zum selben Pol gezogen oder die Chromosomenpaarung und/oder Rekombination bleibt aus und die Chromosomen wandern unabhängig voneinander zum selben Pol (s. Abb. 1). Non-disjunction in der Mitose ist das Ergebnis einer unterbliebenen Trennung von Schwesterchromatiden zu Beginn der Anaphase.



**Abb. 1:** Meiotische Non-disjunction

(nach Campbell, 1997)

Der Verlust eines Chromosoms kann auf das so genannte „chromosome lagging“ zurückzuführen sein. Dabei wird keines der Kinetochore eines Chromosoms von den Mikrotubuli erfasst und es bleibt bei der Wanderung zu den Polen während der Zellteilung so weit zurück, dass es bei der Ausbildung der neuen Kernmembran nicht mit eingeschlossen wird. Entweder geht dieses Chromosom bei der Teilung verloren oder es bildet eine eigene Kernmembran aus und ist als sogenannter Mikronukleus im Zytoplasma der Zelle erkennbar.

### 2.2.2 Folgen von Aneuploidien während der Meiose

Chromosomenfehlverteilungen während der Meiose führen zu aneuploiden Keimzellen und somit nach der Befruchtung zu aneuploiden Embryonen. Die meisten numerischen chromosomalen Aberrationen, speziell Monosomien, sind mit normaler embryonaler und fetaler Entwicklung nicht kompatibel und enden meist mit dem Abort (Eichenlaub-Ritter, 1994). Die Häufigkeit aneuploider Gameten in der menschlichen Population ist verglichen mit anderen Spezies hoch. So weisen ungefähr 0,3 % aller Neugeborenen Aneuploidien auf, darunter am häufigsten Trisomien des Chromosoms 21 und der Geschlechtschromosomen (47, XXX; 47, XXY; 47, XYY). Bei Totgeburten ab der 20. Schwangerschaftswoche erhöht sich die Häufigkeit der Aneuploidien bereits auf ca. 4 % und steigt bis auf ca. 35 % bei allen erkannten spontanen Aborten zwischen der 6.-8. und 20. Schwangerschaftswoche (Hassold und Hunt, 2001).

**Tab. 1:** Auftreten von Aneuploidien während der Entwicklung (nach: Hassold und Hunt, 2001)

Schwangerschafts- woche	0 ————— 6- 8 ————— 20 ————— 40						
	Spermien	Oozyten	Präimplantations- embryonen	Vorklinische Aborte	Spontane Aborte	Totgeburten	Lebendgeburten
<b>Auftreten von Aneuploidien</b>	1-2 %	~ 20 %	~ 20 %	?	35 %	4 %	0,3 %
<b>Häufigste Aneuploidien</b>	verschiedene	verschiedene	verschiedene	?	45,X;+16; +21; +22	+13;+18; +21	+ 13; +18; +21 XXX;XXY;XYY

Bei Mäusen konnten experimentell erzeugte Trisomien für alle 20 Chromosomen nachgewiesen werden. Von diesen ist die Trisomie 19 die einzige autosomale Trisomie, die bis kurz nach der Geburt lebensfähig ist. Hier konnte eine Überlebenszeit von bis zu 22 Tagen postpartum beobachtet werden (Buselmeier et al., 1988). Alle anderen führten bereits pränatal zum Absterben der Frucht.

---

Trisomien zeigen bei Mäusen stammspezifische Unterschiede in der Überlebensfähigkeit. So überlebten Mäuse vom Stamm C57BL/6 mit einer Trisomie des Chromosoms 12 bis zur Geburt, wohingegen Mäuse des Stammes C3H nur bis zum Tag 12 der Embryonalentwicklung (Gropp, 1982) überlebten. Autosomale Monosomien erwiesen sich alle als letal. So sterben Mäuse mit einer Monosomie des Chromosoms 19 bereits spätestens am Tag 4.5 der Embryonalentwicklung.

Aneuploidien, welche mit dem Leben vereinbar sind, zeigen meist schwerwiegende Krankheiten. Diese äußern sich für die jeweiligen an der Aneuploidie beteiligten Chromosomen in charakteristischen Symptomen. Die am häufigsten auftretende Trisomie (0,13 % aller lebend geborenen; Hassold und Hunt, 1984) ist die Trisomie 21 (Down-Syndrom), welche mit Veränderungen des Gesichts („Mongolismus“), kurzer Statur, Herzfehler, höherer Anfälligkeit für Erkrankungen der Atemwege und geistiger Retardierung verbunden ist. Seltener (0,005 %) ist eine Trisomie 13 (Patau-Syndrom) zu finden, welche sich durch schwere Defekte der Augen, des Gehirns und des Kreislaufes sowie eine Gaumenspalte äußert. Das Edwards Syndrom (TS 18; 0,01 %) beeinträchtigt fast jedes Körperorgan und betroffene Kinder werden kaum älter als ein Jahr.

Die meisten Aneuploidien der Geschlechtschromosomen stören die genetische Balance weniger als die der Autosomen. Sie treten bei lebend geborenen Individuen mit einer Häufigkeit von 0,05 % auf (Hassold und Hunt, 1984). Ein zusätzliches X-Chromosom beim männlichen Geschlecht (XXY) äußert sich im so genannten Klinefelter-Syndrom mit einer allgemeinen Feminisierung des großgewachsenen Mannes (nahezu fehlender Bartwuchs, Schmalgliedrigkeit, Gynäkomastie), verkleinertem Hoden und Sterilität. Frauen mit einer X-chromosomal Trisomie (XXX) sind gesund und nur durch ihren Karyotyp von normalen Frauen unterscheidbar. Die einzige menschliche Monosomie, die mit einem Überleben des Trägers vereinbar ist, wird als Turner-Syndrom (X0) bezeichnet. Das Auftreten dieser Aneuploidie ist jedoch sehr selten, da ca. 99% aller Embryonen bereits in utero sterben (Ashworth et al., 1991). Phänotypisch sind die Träger kleinwüchsige Frauen mit dem typischen Pterygium colli und einem schildförmigen Thorax. Sie sind steril und entwickeln keine sekundären Geschlechtsmerkmale.

---

Auch bei Mäusen konnten für Trisomien unterschiedliche Phänotypen definiert werden. Dazu gehören die Hypoplasie von Gehirn, Lunge und Nieren sowie zurückbleibende Entwicklung (TS 19), Holoprosenzephalie (TS 1), Exenzephalie (TS 12, 14, 17, 9), Gaumenspalten (TS 13, 18) (Hongell und Gropp, 1982) und kardiovaskuläre Missbildungen (TS 10, 12, 14, 16, 19). Obwohl beim Menschen gleiche morphologische Ausprägungen bei den verschiedenen Trisomien existieren, konnte nur für die Trisomie 21 des Menschen eine Sequenzen bei der Maus im Chromosom 16 nachgewiesen werden (Pletcher et al., 2001), welche als genetisches Tiermodell verwendet wird (Richtsmeier et al., 2002).

Eine X-chromosomale Monosomie (X0) ist bei Mäusen im Vergleich zum Menschen mit Überlebensfähigkeit und nur leicht reduzierter Fertilität verbunden (Ashworth et al., 1991). Gonosomale Trisomien weisen ähnliche Phänotypen wie beim Menschen auf: XXY-Mäuse sind sterile Männchen mit vollständig fehlender Spermatogenese, wohingegen XYY-Mäuse phänotypisch normale Männchen mit verminderter Spermatogenese sind (Cattanach und Pollard, 1969).

## **2.3 Zellzyklus und Mitose**

### **2.3.1 Mitose**

Der Zellzyklus proliferierender somatischer Zellen wird in verschiedene Phasen unterteilt: Er beginnt mit der Interphase, die sich aus der Gap 1-Phase ( $G_1$ -Phase), der Synthese-Phase (S-Phase) und der Gap 2-Phase ( $G_2$ -Phase) zusammensetzt. Während der Interphase sind die Chromosomen lichtmikroskopisch nicht sichtbar. Sie liegen im Zellkern in Form von locker verpackten DNA-Protein-Komplexen, dem so genannten Chromatin, vor. In der  $G_1$ -Phase werden die meisten Genprodukte gebildet. In der S-Phase erfolgt die DNA-Synthese sowie die Verdopplung der im Zytoplasma liegenden Zentrosomen als Vorbereitung für den Aufbau der Mitosespindel.

Die nächste Phase des Zellzyklus, die Mitose, wird wiederum in mehrere Abschnitte unterteilt: Prophase, (Pro-)Metaphase, Anaphase, Telophase und Zytokinese (Abb. 2). In der Prophase der Mitose verschwinden im Zellkern die Nucleoli, und die Chromatinfasern kondensieren zu abgegrenzten Chromosomen, die nun lichtmikroskopisch erkennbar sind.

Jedes dieser Chromosomen bildet zwei Schwesterchromatiden, die am Zentromer verbunden sind. Die Zentrosomen beginnen in entgegengesetzte Richtungen zu wandern, um am Ende der Prophase die Spindelpole zu bilden. Dabei beginnt die Ausbildung von Spindelfasern, die in der Pro-Metaphase nach Auflösung der Kernmembran mit den Chromosomen in Kontakt treten. Von beiden Spindelpolen bilden sich Mikrotubulus-Bündel bis zum Zelläquator. Jede der beiden Chromatiden eines Chromosoms besitzt ein eigenes Kinetochor, welche im Bereich des Zentromers liegen. Einige Mikrotubulus-Bündel heften sich an die Kinetochore, andere überlappen sich als Polfasern zwischen den gegenüberliegenden Zellpolen.

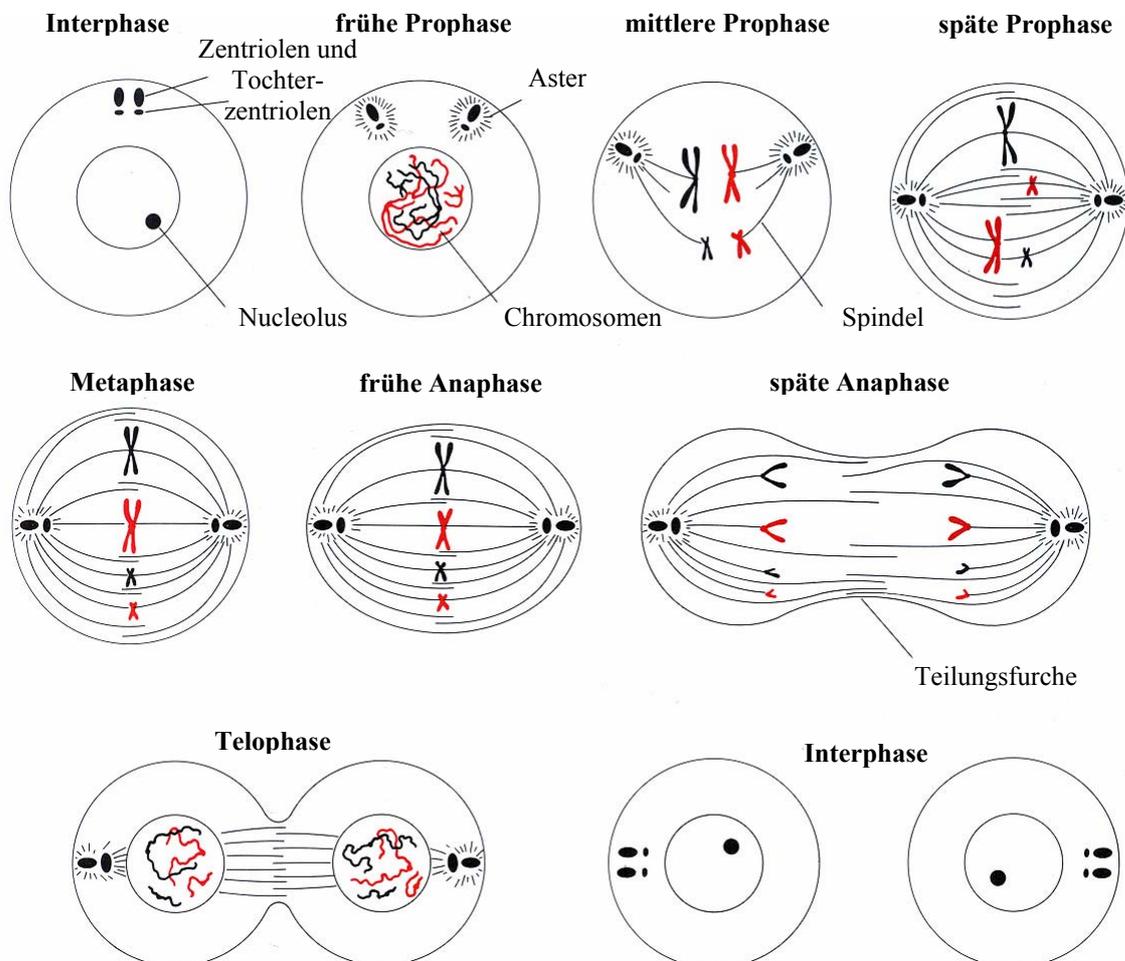


Abb. 2: Mitose (nach Darnell et al., 1986)

---

In der Metaphase haben die Zentrosomen ihre endgültige Lage an beiden Enden der Zelle, den Spindelpolen erreicht, und die Chromosomen ordnen sich im Mittelfeld der Zelle an und bilden so die Äquatorialebene (Metaphaseplatte). Die Zentromere aller Chromosomen liegen auf einer Höhe, und die Schwesterchromatiden befinden sich beiderseits der Metaphaseplatte, wodurch die Kinetochore zu den entgegengesetzten Zellpolen weisen. Während der Anaphase beginnt die Trennung der Schwesterchromatiden an ihrer Kontaktstelle, dem Zentromer. Sie werden in Richtung der Pole gezogen, welche einerseits durch Elongation der Polfasern immer weiter auseinanderrücken und andererseits durch Verkürzen der Kinetochorfasern die Chromatiden zum Pol ziehen. In der Telophase sorgen die Polfasern für eine weitere Verlängerung der Zelle, und an den Polen, wo sich die Chromosomen versammelt haben, beginnt die Neubildung der Zellkerne.

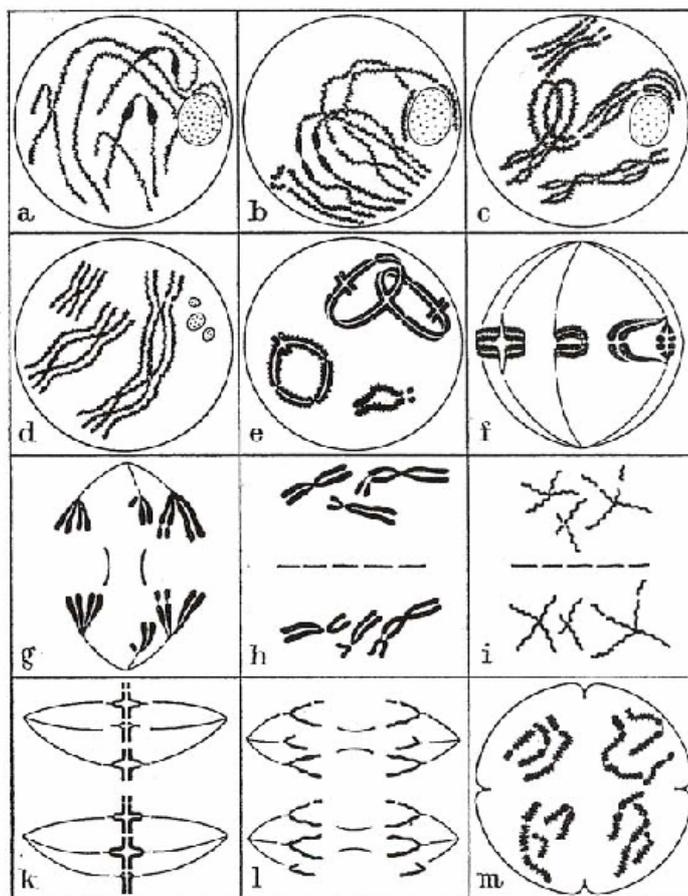
Die Chromosomen beginnen wieder zu dekontensieren, die Nucleoli werden wieder sichtbar, und eine neue Kernmembran wird um die getrennten Chromosomen aufgebaut. Als letzte Phase folgt die Zytokinese, in der das Zytoplasma geteilt wird und somit zwei Tochterzellen entstehen.

### **2.3.2 Meiose**

Die Meiose umfasst zwei Teilungsschritte, Meiose I und Meiose II (1. und 2. Reifeteilung), und resultiert in vier haploiden Keimzellen. Während die Meiose I grundsätzliche Unterschiede zur Mitose aufweist, entspricht die Meiose II im Wesentlichen einer Mitose.

Die Prophase der Meiose I ist die längste Phase und wird in mehrere morphologisch unterscheidbare Stadien (Präleptotän, Leptotän, Zygotän, Pachytän, Diplotän und Diakinese) eingeteilt. Diese Unterteilung beruht auf folgenden lichtmikroskopischen Beobachtungen: Im Präleptotän findet die letzte DNA-Replikation vor der Meiose statt. Im Leptotän beginnen die Chromosomen zu kondensieren. Im Zygotän wird eine reißverschlussartige Proteinstruktur, der synaptonemale Komplex, sichtbar, an deren gegenüberliegenden Seiten die beiden homologen Chromosomen eng zusammenliegen und ein langes, lineares Chromosomenpaar (Bivalent) bilden. Während des Pachytäns bilden sich Chiasmata zwischen den Chromatiden homologer Chromosomen zur Einleitung des Crossing over, welches im Diplotän abgeschlossen wird. Der synaptonemale Komplex hat sich inzwischen aufgelöst, so dass die Verbindung der Chromosomen in der Metaphase I nur noch durch die Chiasmata aufrechterhalten wird.

Diese tragen nach allgemeiner Auffassung zur korrekten Trennung der Chromosomen bei, da sie eine Stabilisierung der Bivalente bewirken und eine vorzeitige Trennung der Chromosomen verhindern (Heyting, 1996). Die Prophase endet in der Diakinese mit der fortschreitenden Kondensation der Chromosomen und dem Beginn der Metaphase I. Nachdem sich die Chromosomen als Homologenpaare in der Äquatorialebene angeordnet haben, setzt die Anaphase I ein, und die Chromosomen wandern in Richtung der entgegengesetzten Pole, ohne dass sich die Zentromere teilen. Der Chromosomensatz der Zelle wird dabei von einem diploiden ( $2n$ ) auf je einen haploiden ( $2 \times n$ ) reduziert, daher wird die Meiose I auch Reduktionsteilung genannt. Nach einer kurzen Interkinese beginnt die Meiose II, welche wie eine normale Mitose abläuft, mit der Ausnahme, dass nur ein haploider Chromosomensatz beteiligt ist. Die Zentromere teilen sich, und die beiden Schwesterchromatiden der Chromosomen werden in der Anaphase zu den entgegengesetzten Spindelpolen gezogen. So entstehen durch die zwei Reifeteilungen vier haploide Keimzellen. (s. Abb. 3).



**Abb. 3:** Meiose (nach Rieger et al., 1976) a) Leptotän, b) Zygotän, c) Pachytän, d) Diplotän, e) Diakinese, f) Metaphase I, g) Anaphase I, h) Telophase I, i) Interkinese, k) Metaphase II, l) Anaphase II, m) Telophase II

---

Obwohl die grundlegenden Abläufe der Meiose in Säugetieren für beide Geschlechter gleich sind, gibt es dennoch zwischen männlicher und weiblicher Meiose Unterschiede im Beginn, der Dauer und der Anzahl der Gameten. Bei männlichen Individuen beginnt die Meiose in der Pubertät und stellt einen kontinuierlichen Prozess dar. Im Hoden durchlaufen die Keimzellen die Meiose von der Prophase zur Metaphase I und weiter zur Metaphase II ohne größere zeitliche Verzögerung und am Ende entstehen aus einer Zelle, die in die Meiose eintritt vier Spermien. Im Gegensatz dazu treten alle Oozyten während der fetalen Entwicklung bereits in die Meiose ein, aber nach der homologen Rekombination verharren die Keimzellen in einem Ruhestadium, ohne weitere Entwicklung. Erst kurz vor der Ovulation beendet jede einzelne Oozyte ihre erste Reifeteilung. Es folgt ein erneuter Arrest in der Metaphase II und erst nach der Befruchtung wird die zweite Reifeteilung beendet. Normalerweise entsteht aus einer weiblichen Keimzelle, die in die Meiose eintritt nur eine Eizelle. Die restlichen drei atrophieren und bilden die sogenannten Polkörperchen.

## **2.4 Angriffspunkte chemischer Substanzen bei der Aneuploidie-Induktion**

### **2.4.1 Zentrosomen**

Die Zentrosomen bilden die Pole des Spindelapparates. Sie bestehen jeweils aus zwei rechtwinklig zueinander liegenden Zentriolen, welche von einem elektronendichten perizentriolären Material (PCM) umgeben sind und einer Vielzahl mit diesen assoziierten Proteinen. Dabei spielt das  $\gamma$ -Tubulin eine wichtige Rolle als Verbindung zwischen Spindelpol und Mikrotubuli (Schiebel, 2000; Zimmerman et al., 1999). In der S-Phase des Zellzyklusses werden die Zentrosomen verdoppelt, so dass jede Zelle zu Beginn der Mitose zwei funktionstüchtige Zentrosomen enthält (Adams und Kilmartin, 2000). Ein Zusammenhang zwischen Störungen der Zentrosomenreplikation und -funktion und der genetischen Instabilität von Tumorzellen wird von verschiedenen Autoren vermutet (Brinkley, 2001; Duesberg, 1999).

Nicht alle Zellarten benötigen jedoch Zentrosomen zur Ausbildung des Spindelapparates. So enthalten viele Pflanzenzellen sowie die Oozyten vieler Säugetierarten keine speziellen Zentrosomen (Champion und Hawley, 2002).

---

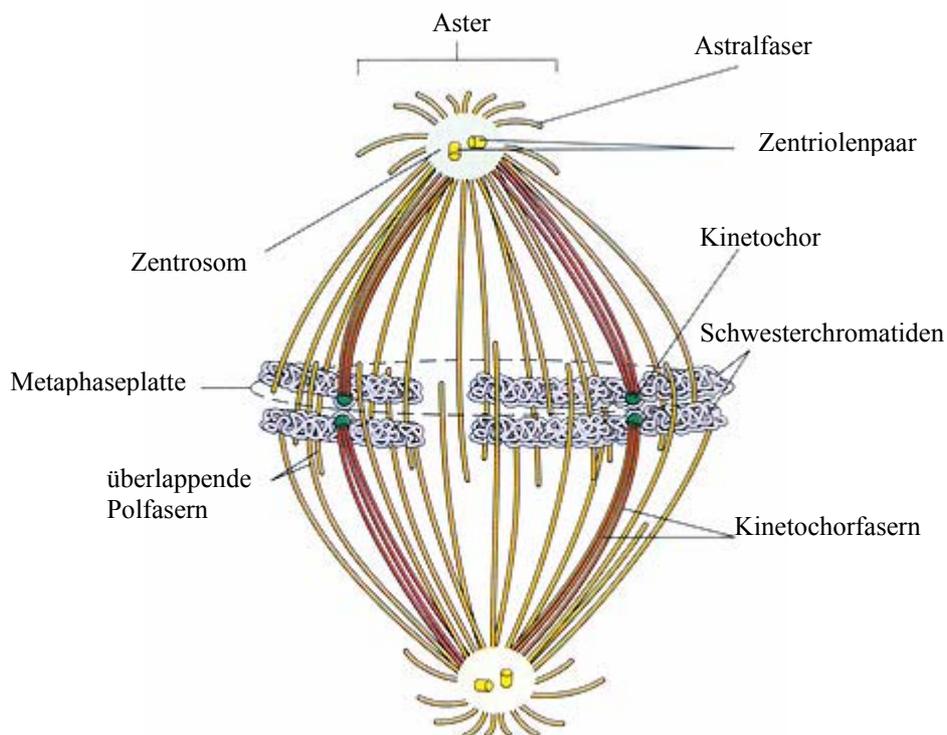
Viele Komponenten, die für die Polymerisation der Mikrotubuli notwendig sind, sind auch in diesen Zellen enthalten, ohne dass sie mit abgrenzbaren Zentrosomen in Verbindung stehen. Die Funktion der Nukleation von Mikrotubuli wird hier von  $\gamma$ -Tubulin Ringkomplexen ( $\gamma$ -TuRC) übernommen, die frei im Zytoplasma liegen (Zheng et al., 1995).

#### **2.4.2 Der Spindelapparat**

Der Spindelapparat ist eine komplexe Proteinstruktur, die für die korrekte Verteilung der Chromosomen während der Mitose und Meiose verantwortlich ist. Er setzt sich aus Mikrotubuli und den Mikrotubuli organisierenden Zentren (MTOC) oder Zentrosomen zusammen. Mikrotubuli sind aus Tubulin, einem globulären Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 50 kDa, und Tubulin-assoziierten Proteinen (MAPs) aufgebaut. Die Grundeinheit bilden das  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin, welche sich zu einem Heterodimer zusammenfügen. Jedes Tubulin-Monomer besitzt ein gebundenes Guanosintriphosphat (GTP), wobei nur das am  $\beta$ -Tubulin austauschbar ist. Die Dimerisierung der beiden Tubulineinheiten erfolgt durch die Hydrolyse des am  $\beta$ -Tubulin gebundenen GTP zu GDP, wodurch das Polymer eine definierte Polarität erhält. Die Heterodimere bilden durch Polymerisation die Protofilamente, von denen wiederum 13 die Wand eines hohlen Mikrotubulus ( $\varnothing$  25 nm) formen. In einer Säugetierzelle sind mehr als 3000 solcher Mikrotubuli am Aufbau des Spindelapparates beteiligt (Compton, 2000). Die Anlagerung und Abspaltung einzelner Tubulin-Dimere erfolgt an beiden Enden des Mikrotubulus in unterschiedlicher Geschwindigkeit und verleiht dem Mikrotubulus dadurch eine strukturelle Polarität. Das schneller wachsende Ende wird als Plus-Ende definiert und exponiert die  $\beta$ -Tubulin-Untereinheit eines jeden Heterodimers, wohingegen das langsamer wachsende Ende als Minus-Ende bezeichnet wird und die  $\alpha$ -Tubulin-Untereinheit exponiert (Cassimeris, 1999). Die MAPs tragen zur Stabilisierung der Mikrotubuli bei. Sie werden in drei Protein-Hauptfamilien eingeteilt: MAP1, MAP2 und tau-Proteine (Avila, 1990).

Ausgangspunkt für die Polymerisation (Nukleation) der Mikrotubuli des Spindelapparates sind die Mikrotubuli organisierenden Zentren (MTOC) oder Zentrosomen. Von den Zentrosomen aus wachsen die Mikrotubuli mit ihrem Plus-Ende in Richtung Äquatorialebene, wo sie entweder mit den Kinetochoren der Chromosomen in Kontakt treten (Kinetochormikrotubuli) oder mit den Mikrotubuli des gegenüberliegenden Zentrosoms antiparallele Verbindungen eingehen (Palmikrotubuli).

Diese bewirken in der Anaphase durch die Polymerisation des in der Äquatorialebene liegenden Plus-Endes die Streckung der Zelle und dienen zusätzlich zur Stabilisierung des Spindelapparates. Eine dritte Klasse von Spindel-Mikrotubuli (Astralmikrotubuli) strahlt in entgegengesetzter Richtung und verankert die Spindel mit dem Zellcortex (Abb. 4).



**Abb. 4:** Die Mitosespindel in der Metaphase (nach Campbell, 1997)

Zu Beginn der Mitose ändert sich die Morphologie und Dynamik der von den Zentrosomen ausgehenden Mikrotubuli. Während in der Interphase die Mikrotubuli ein ausgedehntes Netzwerk durch das Zytoplasma, das Zytoskelett, bilden, werden diese relativ langen und stabilen Mikrotubuli in der frühen Prometaphase durch eine wesentlich kürzere und instabilere Population ersetzt (Compton, 2000). Diese strahlen in hoher Dichte radial von den Zentrosomen aus und bilden sogenannte „Aster“, aus denen später die Teilungsspindel hervorgeht. Diese Astralfasern weisen einen hohen Grad an dynamischer Instabilität auf, d.h. es findet ein ständiger Wechsel zwischen Wachstum und Verkürzung der Mikrotubuli statt. Die Bindung der Mikrotubuli an die Kinetochore der Chromosomen erfolgt per Zufall, wenn die Seitenwand eines Mikrotubulus oder das Plus-Ende ein Kinetochor kontaktiert.

---

Der erste Mikrotubulus, mit dem das Kinetochor eines ungebundenen Chromosoms in Kontakt tritt, dient gleichsam als Schiene für eine rasche Polwärtsbewegung. In der Nähe des Spindelpols nimmt die Dichte der astralen Mikrotubuli zu. Mehrere von ihnen binden zusätzlich an das Kinetochor und bilden die Kinetochorfasern aus. In Abhängigkeit von Wachstum und Verkürzung dieser Fasern unterliegt das einseitig gebundene Chromosom oszillierenden Bewegungen, bis Mikrotubuli des gegenüberliegenden Spindelpols an das „Schwesterkinetochor“ binden. Dadurch wird das Chromosom in Richtung der Äquatorialebene gezogen, geführt von den schrumpfenden Kinetochorfasern des weiter entfernten Pols und gefolgt von den wachsenden Kinetochorfasern des näher liegenden Pols. Ein sensibler Parameter für die Positionsbestimmung der Chromosomen in der Äquatorialebene könnten die Zug- und Druckkräfte sein, die die Mikrotubuli auf Kinetochore und Zentromer ausüben (Ault und Rieder, 1994). Entscheidend sind hier die freien Astralfasern, die dem gesamten Chromosom mit zunehmender Nähe zu den Polen steigenden Widerstand in Form „polarer Abstoßungskräfte“ entgegensetzen.

Die Regulierung der Mikrotubuli-Dynamik während der Mitose wird von einer speziellen Klasse von Proteinen, den sogenannten Motorproteinen, übernommen. Diese sind durch Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) zu einer aktiven Bewegung fähig. Hierzu gehören die mehrheitlich in Richtung des Plus-Endes arbeitenden Kinesine und das in Richtung des Minus-Endes arbeitende zytoplasmatische Dynein (Mountain und Compton, 2000). Eine zentrale Rolle spielen die Motorproteine bei der korrekten Trennung der replizierten Zentrosomen, was ausschlaggebend für den Aufbau eines bipolaren Spindelapparates ist. Der genaue Mechanismus ist bis dato noch ungeklärt, es wurden jedoch mehrere Modelle etabliert. Ein Modell besagt, dass eine Trennung der Zentrosomen allein durch gegenseitiges voneinander Wegdrücken erfolgt. Dabei überlappen sich die Astralfasern in der zukünftigen Äquatorialebene und vermittelt durch das Plus-Enden orientierte Kinesin gleiten die antiparallelen Mikrotubuli auseinander und verlängern sich. Eine andere experimentelle Beobachtung in Säugetierzellen durch Waters et al. (1993) zeigte, dass sich die Zentrosomen bei der Trennung unabhängig voneinander bewegten. Für diese Aktivität ist vermutlich das zytoplasmatische Dynein verantwortlich. Sind alle Chromosomen in der Metaphaseplatte eingeordnet, tritt die Zelle in die Anaphase über. Nach der Trennung der Chromatiden, bei der neben Kinasen, Phosphatasen und Proteinasen die Topoisomerase II eine wichtige Rolle spielt (Corbett und Osheroff, 1993), werden die Druck- und Zugkräfte am Kinetochor der Schwesterchromatide aufgehoben.

Die Chromatiden wandern kontinuierlich auf „ihren“ Pol zu, wobei sich die Kinetochorfasern durch Depolymerisation am Plus-Ende verkürzen. Ein weiteres Auseinanderrücken der Chromatiden wird durch Plus-Enden orientierte Motorproteine an den überlappenden Polmikrotubuli bewerkstelligt.

Spindelgifte greifen in den Aufbau des Spindelapparates ein, indem sie die Polymerisierung der Tubulin-Dimere zu den Mikrotubuli hemmen oder stabilisieren, so dass kein kontinuierlicher Auf- und Abbau der Mikrotubuli, der für die ordnungsgemäße Funktion der Spindel notwendig ist (Cassimeris, 1999), erfolgen kann. Beispiele für Spindelgifte sind in Tabelle 2 aufgelistet.

**Tab. 2:** Beispiele für Angriffspunkte zur Aneuploidie-Induktion verschiedener Substanzen (Parry und Sors, 1993, Liang und Brinkley, 1985)

Angriffspunkt am Spindelapparat	Substanz
Hemmung der Tubulin-Polymerisation	Colchizin/ Colcemid, Benomyl, Diethylstilbestrol, Thiabendazol, Griseofulvin
Zentriolen/ Zentrosomen	Diazepam, Diethylstilbestrol
Zentromere/ Kinetochore	Colchizin, Mitomycin C

### 2.4.3 Zentromere, Kinetochore

Der Zentromer-Kinetochor-Komplex ist ein heterochromatinreicher Locus an der primären Einschnürung des Metaphasechromosoms und stellt eine Ansammlung repetitiver, nicht transkribierender DNA (Satelliten-DNA) und zentromerspezifischer Histone (CEN-Proteine) dar (van Hooser et al., 1999). Das Zentromer ist verantwortlich für die Organisation des Kinetochors und die Bindung und Bewegung von Chromosomen. Das Kinetochor ist eine trilaminare Struktur, bestehend aus einer äußeren elektronendichten Platte auf der eine fibröse Korona aufliegt. Auf die äußere Platte folgen eine mittlere sowie eine innere Platte, welche mit dem darunter liegenden Chromatin des Zentromers assoziiert ist (Brinkley und Stubblefield, 1966). Ein funktionstüchtiges Kinetochor ist notwendig zur Bindung der Kinetochor-Mikrotubuli, Bewegung der Chromosomen und Trennung der Schwesterchromatiden (Choo, 2000).

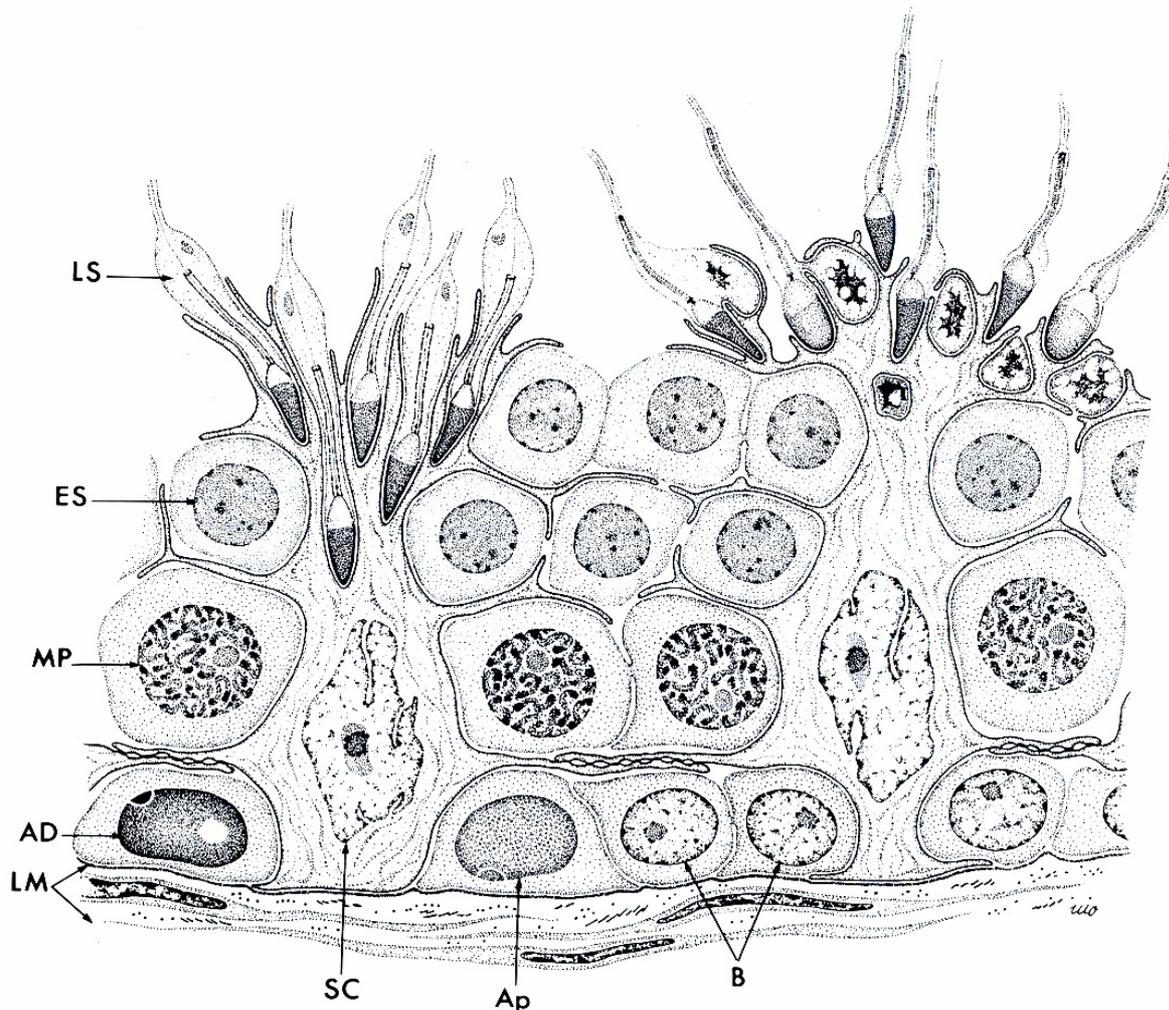
---

Potentielle Angriffspunkte für Chemikalien zur Aneuploidie-Induktion sind hier die Kinetochor-Replikation während der S-Phase und die Kinetochor-Aktivierung in der Prometaphase, sowie die Satelliten-DNA und die CEN-Proteine.

Der Übergang von der Meta- zur Anaphase ist über ein komplexes Zusammenspiel einer Vielzahl von Proteinen kontrolliert (Anaphase-Kontrollpunkt) (Gardner und Burke, 2000). Wenn alle Kinetochore Mikrotubuli gebunden haben, und durch die Anordnung eines Chromosoms zwischen den Kinetochor-Mikrotubuli beider Spindelpole eine gewisse Zugspannung an den Kinetochoren erreicht ist, verschwindet das von den ungebundenen Kinetochoren ausgelöste „Wait-Anaphase-Signal“ und die Anaphase kann beginnen (Rieder et al., 1995). Ist die Funktion des Spindelapparates oder der Kinetochore beeinträchtigt, so dass der Anaphase-Kontrollpunkt nicht überschritten werden kann, kommt es zu einem zahlenmäßigen Anstieg der Zellen, die sich in der Metaphase befinden (Mitose-Arrest, hier genauer: Metaphase-Arrest). Dabei bleiben die Zellen nicht unbegrenzt im Metaphasestadium: Nach einer gewissen Zeit beginnt trotzdem die Anaphase, die Zellen beenden die Zellteilung und können in der Interphase zur Apoptose übergehen (Stewart und Pietsch, 2001). Des Weiteren können lange in der Metaphase arretierte Zellen direkt die morphologischen Merkmale apoptotischer Zellen ausbilden. Aber nicht alle Zellen sterben und bei den überlebenden Zellen kann es zu Chromosomenfehlverteilungen kommen.

## 2.5 Spermatogenese

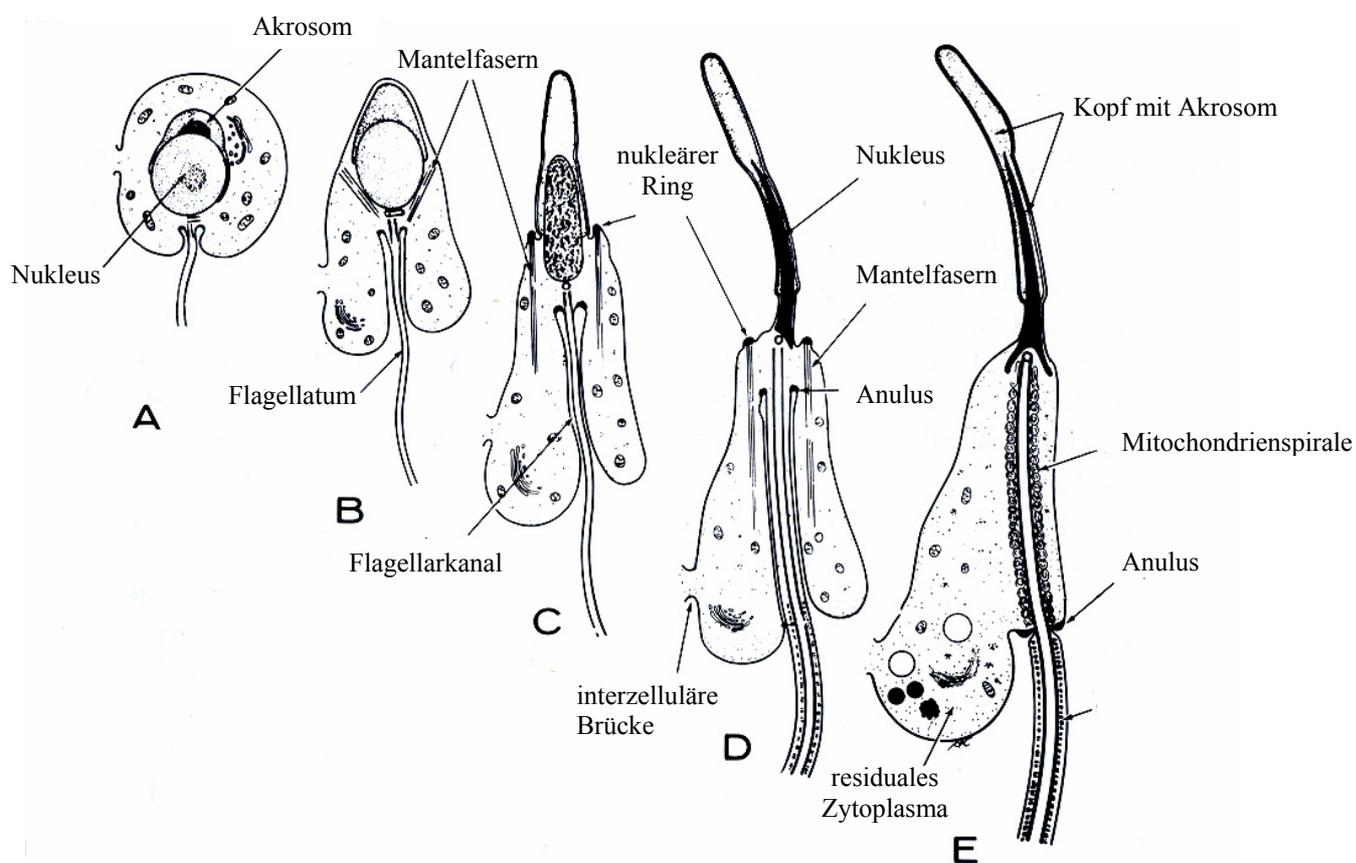
Die Spermatogenese ist der Prozess, in dessen Verlauf aus diploiden männlichen Stammzellen die Spermien hervorgehen. Es handelt sich um einen kontinuierlichen Prozess, der in den Samenkanälchen (Tubuli seminiferi contorti) der Hoden wellenförmig abläuft.



**Abb. 5:** Schema der Reifung der einzelnen Spermatogenesestadien an den Sertolizellen. *SC* Sertoli-Zellen, *Ap* Typ A Spermatozyt, *blass*, *AD*, Typ A Spermatozyt, *dunkel*, *B* Typ B Spermatozyt, *MP* Spermatozyt aus dem mittleren Pachytän, *ES* frühe (runde) Spermatozyten, *LS* späte (verlängert und kondensiert) Spermatozyten, *LM* Basalmembran (nach M.A. Handel, 1987)

Die Spermatogenese beginnt mit den Stamm-Spermatozyten, welche peripher an der Basalmembran der Samenkanälchen liegen (s. Abb. 5). Während einige der Spermatozyten mehrere mitotische Zellteilungen durchlaufen und aufgrund ihrer weiteren Differenzierung in Spermatozyten des Typs A, intermediäre Spermatozyten und Spermatozyten des Typs B

unterteilt werden, verbleiben andere weiterhin im Stammzellstadium. Die Stammzellen teilen sich in einem Rhythmus von 6-8 Tagen, die differenzierten Spermatogonien haben eine Zellzyklus-Dauer von 28-36 Stunden. Die Spermatogonien-Entwicklung nimmt bei der Maus ungefähr sechs Tage in Anspruch, währenddessen die Zellen sechs Zyklen mitotischer Teilung durchlaufen. Aus den Spermatogonien des Typs B gehen die primären Spermatozyten hervor, welche in die Prophase I der ersten meiotischen Teilung eintreten. Diese Phase beansprucht im Vergleich zu den nachfolgenden meiotischen Phasen sehr viel Zeit. Bei der Maus dauert sie ca. 13 Tage und die Zelle ist während dieser Zeit besonders empfindlich gegenüber Einflüssen von außen. Während des Präleptotäns erfolgt die letzte DNA-Replikation der Spermatogenese. In den folgenden Stadien Leptotän, Zygotän und Pachytän, findet die Chromosomenpaarung und Rekombination statt. Nach der ersten Reifeteilung entstehen aus einer primären Spermatozyte zwei haploide sekundäre Spermatozyten, die nach einer kurzen Interkinese von nur wenigen Stunden die zweite Reifeteilung durchlaufen. Am Ende entstehen vier haploide Spermatisden, die nun in der Nähe des Lumens der Samenkanälchen liegen.



**Abb. 6:** Spermio-genese (nach M.A. Handel, 1987)

Während des gesamten Entwicklungsprozesses sind Gruppen von Keimzellen durch zytoplasmatische Brücken miteinander verbunden, die die synchrone Entwicklung garantieren. In der letzten Phase der Spermatogenese, der sogenannten Spermiogenese (s. Abb. 6), kommt es zu Umgestaltungsvorgängen, in deren Verlauf aus den runden Spermatiden (A) hochdifferenzierte Spermien (E) entstehen. Dieser Prozess beinhaltet eine zunehmende Kondensation und Verdichtung der DNA (B-D), die Reduktion des Zytoplasmas (E), die Bildung des Akrosoms (A) sowie die Ausdifferenzierung des Flagellatums (A-E). Die Differenzierung der Spermatiden dauert bei der Maus noch mal ungefähr neun Tage.

Die Spermien werden in das Lumen des Samenkanälchens entlassen und beenden ihre Reifung im Nebenhoden, wo sie für etwa sechs Tage gespeichert werden. Somit beträgt die komplette Dauer der Spermatogenese, beginnend mit den Mitosen der Spermatogonien bis zur Reifung der Spermien im Nebenhoden, bei der Maus ca. 35 Tage. Die zeitlichen Unterschiede dieser weitgehend identischen Abläufe zwischen Maus, Ratte und Mensch zeigt Tabelle 3.

**Tab. 3:** Stadien der Spermatogenese und ihre Dauer (in Tagen) bei Maus, Ratte und Mensch nach Adler, 1996

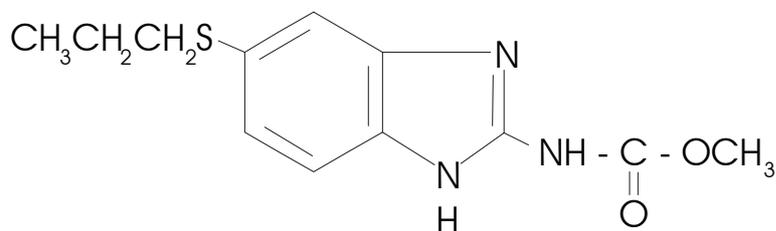
Spezies	Differenzierende Spermatogonien	Spermatozyten (meiotische Teilungsphasen)	Spermatiden (postmeiotische Reifungsphase)	Testikuläre Spermatozyten	Gesamte Spermatogenese	Epididymale Spermien
Maus	6	14	9	6	35	4-6
Ratte	10,5	19	12	8,5	50	7
Mensch	16	25	16	6,5	64	8-17

Umgeben werden die Keimzellen von den Sertolizellen, welche eine unterstützende und ernährende Funktion besitzen. Sertolizellen fußen auf der Basalmembran und durchziehen das gesamte Keimepithel bis zum Lumen des Tubulus (s. Abb. 5). Mit seitlichen Fortsätzen schieben sie sich zwischen die verschiedenen Generationen der Keimzellen und füllen die Zwischenräume vollständig aus. Benachbarte Sertolizellen sind in ihrem basalen Drittel über tight junctions miteinander verbunden und bilden die Blut-Hoden-Schranke, eine effektive Diffusionsbarriere zwischen dem Basalkompartiment und dem Tubulus seminiferus. Diese Barriere schränkt den Stofftransport im interzellulären Raum stark ein und schützt die in der Meiose und Spermiogenese befindlichen Keimzellen.

Eine weitere wichtige Funktion der Sertolizellen ist die Übertragung von hormonellen Stimuli auf die Entwicklung der Keimzellen. Von den Sertolizellen wird u.a. das Protein Inhibin sezerniert, welches die Freisetzung von Follikel-stimulierendem Hormon (FSH) aus dem Hypophysenvorderlappen reguliert. FSH stimuliert seinerseits wiederum die Sertolizellen zur Produktion weiterer spezifischer Proteine, zur Regulation der Differenzierung von Spermatozyten und Spermatiden. Außerdem erhöht es die Anzahl von Rezeptoren für Luteinisierendes Hormon (LH) auf den Leydigzellen, wodurch nach Bindung von LH die Testosteronproduktion gesteigert wird. Testosteron wirkt einerseits zusammen mit FSH stimulierend auf die Proteinproduktion der Sertolizellen, andererseits hemmt es als negatives Feedback die Sekretion von LH aus dem Hypophysenvorderlappen.

## 2.6 Testsubstanzen

### 2.6.1 Albendazol



**Abb. 7:** Strukturformel von Albendazol

#### 2.6.1.1 Bedeutung und Vorkommen

Albendazol (ABZ, Methyl[5-(propylthio)-1-*H*-benzimidazol-2-yl]carbamat) gehört zu der Gruppe der Benzimidazole. Es findet in der Veterinärmedizin Anwendung als Breitspektrum-Anthelmintikum zur Therapie von Leberegel-, Bandwurm-, Lungen- und Rundwurm-Befall (Theodorides et al., 1979). In der Humanmedizin wird es erfolgreich zur Behandlung der Neurocysticercose (Sotelo et al., 1998), Echinokokkose und einiger anderer parasitären Erkrankungen (Venkatesan, 1998) eingesetzt.

---

Eine besondere Bedeutung hat es in den Entwicklungsländern, in denen parasitäre Erkrankungen endemisch verbreitet sind und wo es häufig prophylaktisch und therapeutisch zur Bekämpfung von Parasitenbefall eingesetzt wird (Miller et al., 2000; Idris et al., 2001; Fallah et al., 2002).

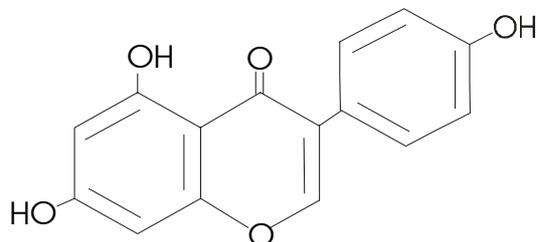
### **2.6.1.2 Biologische Wirkungsweise**

Nach oraler Aufnahme wird Albendazol in der Leber zu einer Reihe von Metaboliten verstoffwechselt (Rolin et al., 1989), von denen das Sulfoxid den wichtigsten darstellt, da es für die hauptsächliche anthelmintische und auch toxische (teratogen, embryotoxisch) Aktivität verantwortlich gemacht wird (Delatour et al., 1981; Barrowman et al., 1984). Die Ausscheidung erfolgt bei Mäusen und Ratten innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Aufnahme vornehmlich über den Urin (Gyurik et al., 1981).

Neben einer Vielzahl von diskutierten Wirkungsmechanismen, wie z.B. der Hemmung der parasitären Fumaratdehydrogenase (Bryant und Bennet, 1983), Monoaminoxidase (Moreno und Barrett, 1979) oder der Acetylcholinesterase (Watts et al., 1982), steht heute fest, dass die Hauptaktivität von Albendazol auf die Bindung an Tubulin und dadurch auf die Hemmung der Tubulin-Polymerisation (Gull et al., 1986; Lacey und Gill, 1994) zurückzuführen ist. Studien haben gezeigt, dass Albendazol und Albendazolsulfoxid eine vergleichbar hohe Affinität zu gereinigten Tubulin-Präparationen von Helminthen und Säugetieren zeigten (Barrowman et al., 1984; Ireland et al., 1979; Lacey und Watson, 1985; Solana et al., 1998). Benzimidazolcarbamate binden ebenso wie Colchizin und Colcemid an die Heterodimere des Tubulin und stören das dynamische Gleichgewicht zwischen der dimeren und der polymeren Form, indem sie das „self-assembly“ der Tubulineinheiten zum wachsenden Mikrotubulus verhindern (Lacey, 1990). Benzimidazolcarbamate erwiesen sich daher als effektiv in der Induktion mitotischer Aneuploidie (Önfelt, 1986).

Aufgrund von beobachteten genotoxischen Effekten (Whittaker und Faustman, 1991; Ramirez et al., 2001) und einer Colchizin-ähnlichen Wirkungsweise von Albendazol, liegt die Vermutung nahe, dass durch Albendazol Aneuploidien erzeugt werden.

## 2.6.2 Genistein



**Abb 8.:** Strukturformel von Genistein

### 2.6.2.1 Bedeutung und Vorkommen

Genistein (GEN, 4', 5, 7-Trihydroxyisoflavon) gehört zu den Isoflavonen, einer der drei großen Klassen von Phytoestrogenen. Diese pflanzlichen, nicht-steroidalen Komponenten zeigen eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu den Steroidhormonen (Kurzer und Xu, 1997).

Genistein ist vorrangig in Sojabohnen zu finden, kommt aber auch in anderen Hülsenfrüchten wie Erbsen und Bohnen sowie in Klee vor (Kurzer und Xu, 1997; Mazur, 1998). Die Phytoestrogene regten bereits Mitte der 40er Jahre Aufsehen, als man herausfand, dass einige von ihnen für die sogenannte „clover disease“, ein Infertilitätsyndrom bei australischen Schafen, verantwortlich waren (Bennetts et al., 1946).

Zahlreiche epidemiologische Studien in den vergangenen Jahren haben zudem gezeigt, dass es bemerkenswerte geographische Unterschiede in der Häufigkeit und Ausbildung bestimmter hormonregulierter Krebsarten wie Brust- und Prostatakrebs gibt (Adlerkreutz, 1995, Thomas, 1999). Im Vergleich zu Nordeuropa und Amerika ist die Häufigkeit derartiger Krankheiten in Asien, wo die Sojabohne zu einem der wichtigsten Nahrungsmittel gehört, deutlich niedriger (Hirayama, 1979; Shimizu et al., 1991). Anhand dieser Studien kann davon ausgegangen werden, dass Umweltfaktoren, d.h. bestimmte Nahrungsbestandteile, auf die entsprechende Krebsentstehung und –entwicklung Einfluss nehmen.

Aufgrund dieser Untersuchungen ist u.a. Genistein in den letzten Jahren in das Interessenfeld der Krebsforschung geraten und es konnte bereits eine präventive Wirkung bei chemisch induziertem Krebs gezeigt werden (Barnes et al., 1990).

---

### **2.6.2.2 Biologische Wirkungsweise**

In Soja liegen etwa zwei Drittel des Genisteins in Form von  $\beta$ -Glykosiden vor. Die über die Nahrung aufgenommenen Konjugate werden im Dünndarm durch Darmbakterien in unkonjugiertes Genistein umgewandelt (Fritz et al., 1998). Eine weitere Metabolisierung erfolgt in der Leber (Kulling et al., 2002) und bereits innerhalb der ersten 24 Stunden nach Aufnahme wird bei Nagetieren der größte Anteil über den Urin wieder ausgeschieden.

Neben einer Einflussnahme auf die Entwicklung hormonabhängiger Krebsarten wurden noch zahlreiche weitere biologische Effekte von Genistein nachgewiesen. Dazu gehören u.a. die Hemmung von Enzymen des Phosphatidylinositolmetabolismus (Polkowski und Mazurek, 2000), die Wirkung als Antioxidant (Wei et al., 1993) sowie die Hemmung der Tyrosinkinase (Akiyama et al., 1987) und der Topoisomerase II (Yamashita et al., 1990; Markovits et al., 1989). Topoisomerase II spielt eine wichtige Rolle bei der DNA-Replikation, Rekombination und wird für die Kondensation/ Dekondensation und Trennung von Chromosomen benötigt (Corbett und Osheroff, 1993). Genistein zählt zu den nicht interkalierenden Topoisomerase II-Hemmern, da die Wirkung auf die Topoisomerase II nicht auf die Bindung an das Enzym beruht, sondern auf die Stabilisierung des DNA-Spaltungskomplexes. Topoisomerase II und Tyrosinkinase sind ebenfalls am korrekten Fortschreiten des Zellzyklusses beteiligt. Für andere Topoisomerase II-Hemmer (Etoposid und Merbaron) konnte eine aneugene Wirkung in somatischen Zellen und in Keimzellen der Maus gezeigt werden (Attia et al., 2002).

## **2.7 Testsysteme zur Erkennung von Aneuploidien**

Zur Identifizierung von Chemikalien mit aneugem Potential wurden verschiedene Testmethoden entwickelt. Bereits 1985 wurde bei einem von der „Environmental Protection Agency“ (EPA) organisierten Workshop versucht, Testmethoden zur Erfassung von Aneuploidie zusammenzutragen, ihre Validierung zu unterstützen und die Notwendigkeit der Aufnahme solcher Testsysteme in Testbatterien für neue Substanzen unterstrichen (Dellarco et al., 1985). Inzwischen existiert eine Vielzahl von Methoden zur Bestimmung von chemisch-induzierter Aneuploidie (Parry et al., 1996).

Die klassischen Aneuploidie-Tests mit Hefen oder mit der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* spielen heute keine große Rolle mehr. Die meisten Tests werden mit Säugerzellen *in vitro* oder *in vivo* durchgeführt. Die molekularzytogenetischen Methoden haben die Erkennung der Aneuploidie-Induktion sehr verbessert. In der folgenden Tabelle sind die gängigsten Testsysteme für die Aneuploidie-Induktion aufgeführt.

Einige dieser Tests werden durch die Arbeiten in dem EU-Forschungsprogramm PEPFAC soweit validiert und standardisiert, dass sie in die Internationalen Testrichtlinien für chemische Substanzen der EU und der OECD (Organization for Economic Co-Operation and Development) aufgenommen werden können, z. B. der *in vitro* Mikronukleus-Test mit Cytochalasin B und molekularzytogenetischer Zentromer-Markierung (Kirsch-Volders et al., 2002).

**Tab. 4:** Testsysteme für die Erkennung von Aneuploidien

<i>in vitro</i> Testsysteme	<i>in vivo</i> Testsysteme
<p><b>Indikatortests:</b></p> <p>Polymerisation/ Depolymerisation von Mikrotubuli und Tubulin-Bindungstests (Parry, 1993)</p> <p>Spindelstörungen (Zellkultur, C-Mitosen) (Warr et al., 1993)</p> <p><b>Tests für Aneuploidie-Nachweis:</b></p> <p>Chromosomen-Zählung in der Metaphase (Zellkultur) (Warr et al., 1993)</p> <p>Mikronukleus-Test + Cytokineseblock (Cytochalasin B) + FISH (Kirsch-Volders et al., 1997)</p> <p>Mikronukleus-Test + CREST oder FISH (de Stoppelaar et al., 1997)</p> <p>FISH mit chromosomenspezifischen DNA-Sonden an Interphase-Kernen (Zellkultur) (Eastmond und Pinkel, 1990)</p>	<p><b>Indikatortests:</b></p> <p>Spindelstörungen (Spermatozyten, Oozyten) (Gassner und Adler, 1995; Eichenlaub-Ritter et al., 1996)</p> <p><b>Tests für Aneuploidie-Nachweis:</b></p> <p><b>Somatische Zellen:</b></p> <p>Mikronukleus-Test (Knochenmark) + CREST oder FISH (Schriever-Schwemmer und Adler, 1994)</p> <p><b>Keimzellen:</b></p> <p>Chromosomen-Zählung in der Metaphase (Spermatogonien oder sekundäre Spermatozyten) (Leopardi et al., 1993)</p> <p>Spermatiden-Mikronukleustest + CREST oder FISH (Kallio und Lähdetie, 1993; 1996)</p> <p>Spermien-FISH-Test mit chromosomenspezifischen DNA-Sonden (Schmid et al., 1999)</p>

---

## 2.8 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

In den vergangenen Jahren wurde mit der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) eine Methode zur Verfügung gestellt, die eine einfache und schnelle Detektion von Chromosomen in Spermien ermöglicht. Mittels Mehrfarben-FISH ist es möglich, bei Verwendung geeigneter DNA-Sonden und passender Filter, ohne weiteres drei Chromosomen gleichzeitig zu detektieren und zu analysieren. Von verschiedenen Gruppen wurden dazu Spermien-FISH-Assays entwickelt, die es erlauben, numerische und auch strukturelle Chromosomenaberrationen in unterschiedlichen Spezies (Mensch, Maus, Ratte) zu untersuchen (Wyrobek und Adler, 1996; Schmid et al., 1999; Lowe et al., 1998).

Die Technik der *in situ* Hybridisierung wurde unabhängig voneinander von mehreren Wissenschaftlern entwickelt (John et al., 1969; Pardue und Gall, 1970). Das Prinzip beruht auf der molekularen Verknüpfung zueinander hochgradig komplementärer DNA- oder RNA-Sequenzen zu einem Doppelstrangmolekül. So kann eine direkte Zuweisung dieser Sequenzen an morphologisch differenzierbaren Strukturen, wie Chromosomen, Zellen oder Zellkernen erfolgen. Grundsätzlich kann durch die Art, wie die als Sonde eingesetzte DNA markiert wurde, die radioaktive *in situ* Hybridisierung, bei der die Sonden-DNA über radioaktive Isotope (z.B.  $^{125}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{32}\text{P}$  oder  $^3\text{H}$ ) markiert wird, von der nicht radioaktiven *in situ* Hybridisierung unterschieden werden. Der Nachweis beim letzteren Verfahren erfolgt über Fluoreszenzfarbstoffe (Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung, FISH), die z.B. an Biotin oder Antikörper-markierten DNA-Sonden ankoppeln.

Bei der FISH kann wiederum eine indirekte von einer direkten Methode unterschieden werden. Beim direkten Verfahren werden Nukleotide direkt mit dem Fluoreszenzfarbstoff (z.B. FITC oder Cy3) markiert. Die Sonden-DNA kann so nach der Hybridisierung sofort mikroskopisch nachgewiesen werden. Die indirekte Methode beruht auf der Bindung von Antikörpern an Reportermoleküle, welche in die DNA eingebaut werden. Als Reportermoleküle können z.B. Digoxigenin oder Biotin dienen. Eine Detektion erfolgt dann nach der Hybridisierung über den Einsatz von Enzymen oder über an Antikörper gebundene Fluorochrome.

---

Ein Vorteil bei der Anwendung der indirekten Methode ist die Amplifikation des Signals über Antikörperkaskaden, die über eine Signalverstärkung die Detektion erleichtern. Weiterhin sind die schnelle Durchführung, die lange Stabilität der markierten Sonden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  und die Möglichkeit zur Mehrfachmarkierung mit Hilfe mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe und unterschiedlicher Antikörper zu nennen. Die Einführung der FISH mit chromosomenspezifischen Sonden zur Identifizierung individueller Chromosomen in reifen Spermien war ein wichtiger Durchbruch (Wyrobek et al., 1990). Durch die Verwendung dieser Technik kann Information über eine große Anzahl von Spermien leicht gewonnen und Aneuploidien spezifischer Chromosomen in individuellen Spermien schnell erfasst werden. Durch die gleichzeitige Verwendung von mindestens drei chromosomenspezifischen Sonden können disome (hyperhaploide) Spermien von diploiden unterschieden werden.

### **2.8.1 DNA-Sonden**

Die bei den unterschiedlichen Formen der Hybridisierung zum Tragen kommenden DNA-Sequenzen können entsprechend ihren Zielsequenzen eingeteilt werden in:

Chromosomen-Painting-Sonden: Hier handelt es sich um Chromosomen oder Regionenspezifische DNA-Sonden, die einen Nachweis ganzer Chromosomen oder Chromosomenregionen ermöglichen. Diese Sonden eignen sich zur Detektion numerischer Aberrationen und struktureller Veränderungen an Metaphasechromosomen.

Chromosomen-spezifische Sonden: In diesen Sonden werden repetetive Sequenzen genutzt, um sogenannte Tandem-Repeats, die in Zentromer- oder Perizentromerregionen liegen, lokalisieren zu können. Zwar bestehen diese Sonden nur aus einem oder wenigen repetetiven Elementen, die Hybridisierungssignale sind aber sehr kräftig, da die nachzuweisenden Sequenzen in hoher Kopienzahl vorliegen.

Genomische DNA-Sonden: Hierzu zählen die Plasmid-, Cosmid-, BAC-, PAC und YAC-Sonden. Sie enthalten genomische DNA-Fragmente, welche in Vektoren kloniert wurden. Die klonierten Sequenzen kommen nur in einfacher Kopienzahl im Genom vor. Da aber zu einem Teil in diesen Sonden auch repetetive Anteile vorhanden sind, müssen spezielle Hybridisierungsprotokolle zur Unterdrückung dieser Elemente angewandt werden.

---

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Versuchstiere

Die Versuchstiere stammen aus der Zucht der Abteilung für Vergleichende Medizin der GSF. Es handelt sich dabei um F1-Hybriden der beiden Inzuchtstämme 102/EI und C3H/EI ((102/EIxC3H/EI)F1). Verwendet wurden ausschließlich männliche Tiere im Alter von 10-12 Wochen und einem Gewicht von 25-30 g.

Die Tiere wurden in einem entsprechenden Raum unter standardisierten Bedingungen gehalten. Die Raumtemperatur betrug  $22 \pm 1$  °C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55 % und einem hell-dunkel-Zyklus von 12 Stunden (7 Uhr bis 19 Uhr hell). Die Mäuse wurden in Typ 2-Makrolon-Käfigen (26 cm x 20 cm x 14 cm) mit einer Einstreu aus Weichholzfaseren gehalten. Die Besatzdichte lag bei 5 Mäusen pro Käfig. Wasser und Futter erhielten die Tiere ad libitum (pelletierte Standarddiät, Altromin 1314, Ratte/ Maus Zucht). Eine Unterscheidung einzelner Tiere erfolgte mittels Ohrlochmarkierung.

### 3.2 Verwendete Testsubstanzen und Dosierung

Albendazol wurde in einer Dosierung von 2500 mg/kg und 1000 mg/kg einmalig bzw. in einer Dosierung von 100 mg/ kg an fünf aufeinander folgenden Tagen oral per Schlundsonde verabreicht. Aufgrund seiner schlechten Lösbarkeit diente Weizenkeimöl (Mazola<sup>®</sup>) als Trägersubstanz zur oralen Verabreichung.

Genistein wurde den Mäusen in einer Dosierung von 500 mg/ kg und 250 mg/kg subcutan (s.c.) einmalig sowie in einer Dosierung von 250 mg/kg an fünf aufeinander folgenden Tagen injiziert. Genistein wurde zunächst in DMSO gelöst und anschließend mit Ampuwa<sup>®</sup> auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Die Endkonzentration von DMSO war 6%.

Als positive Kontrolle diente Colchizin in einer Dosierung von 3 mg/kg intraperitoneal (i.p.) für die einmalige Verabreichung und 5 x 1 mg/kg i.p. für die Mehrfachgabe.

Alle Testlösungen wurden unmittelbar vor der Applikation angemischt, die Injektionsmenge betrug 0,1 ml/ g Körpergewicht.

---

### **3.3 Gewinnung und Vorbehandlung des Zellmaterials**

#### **3.3.1 Präparation der Spermien aus dem Nebenhoden**

Für die Gewinnung der Spermien aus dem Nebenhoden (Cauda epididymidis) wurden die Tiere zunächst mit CO<sub>2</sub> getötet und anschließend gewogen. Nach Anfeuchten des Fells mit 70 % igem Alkohol wurde mit einer Schere der Hodensack am caudalen Ende eröffnet. Der gesamte Hoden wurde herausgezogen, mit einer Pinzette vorsichtig von seinen Hüllen befreit und die Nebenhoden möglichst frei von Fett präpariert. Mit einer Irisschere wurden die Nebenhoden mehrmals eingeschnitten und in ein mit Fötalem Kälberserum (FKS) gefülltes, auf 32°C angewärmtes Eppendorf-Gefäß überführt, so dass ein aktives Herausschwimmen der Spermien ermöglicht wurde. Die Nebenhoden wurden nach 30 min wieder aus dem Gefäß entfernt und die Zellsuspension zunächst über Nacht bei + 4°C gelagert, um ein Absetzen der Spermien zu erlauben. Wurden die Spermien nicht direkt zur weiteren Verarbeitung verwendet, erfolgte eine Lagerung bei -20°C.

#### **3.3.2 Herstellung der Spermienausstriche**

Es wurden je 8 µl der Spermiesuspension auf ethanolgereinigte Objektträger pipettiert. Mit einem dicken Deckgläschen, welches an diesem Tropfen in einem Winkel von 45° mittig angesetzt wurde, wurden gleichmäßige Ausstriche hergestellt. Die Dichte des Ausstriches wurde anschließend unter einem Phasenkontrastmikroskop überprüft. Zur Fixierung der Spermien auf der Objektträgeroberfläche wurden diese für 5 min auf einer 70°C Wärmeplatte gelegt. Nach der Beschriftung der Objektträger wurden die Ausstriche über Nacht bei Raumtemperatur zum Trocknen stehen gelassen und danach entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -20°C gelagert.

#### **3.3.3 Dekondensation des Spermienchromatins**

Im Verlauf der Spermio-genese wird ein Großteil der im Spermienchromatin eingebauten Histone durch Protamine ersetzt, was durch die Ausbildung von inter- und intramolekularen Disulfidbrücken eine starke Kondensation der DNA in den Spermienköpfen zur Folge hat (Fuentes-Mascorro et al., 2000). Um das Spermienchromatin für die DNA-Sonden zugänglich zu machen, wurden die Spermienausstriche zunächst in einer 10 mM DTT-Lösung für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 30 min in eine raumtemperierte 4 mM LIS-Lösung überführt.

Dadurch erzielte man die Reduktion und Lösung der Disulfidbrücken der Protamine sowie ein leichtes Anschwellen des Spermiennukleus (Wyrobek et al., 1990, Robbins et al., 1993).

### 3.4 Einfluss der Testsubstanzen auf die Dauer der Meiose

Für die Untersuchungen auf chemische Aneuploidie-Induktion ist es notwendig, den optimalen Zeitpunkt für die Gewinnung des Zellmaterials zu wählen. Bei den bisherigen Untersuchungen mit dem Spermien-FISH-Assay wurde, in Anlehnung an den zeitlichen Ablauf der Spermatogenese, ein mittlerer Zeitpunkt von 22 Tagen für die Gewinnung der Spermien gewählt (Schmid et al., 1999). Aneugene Substanzen stehen allerdings im Verdacht, einen Einfluss auf den zeitlichen Ablauf der Meiose zu haben (Miller und Adler, 1992). Aus diesem Grund sollte in einem Vorversuch ermittelt werden, ob die beiden Testsubstanzen eine Auswirkung auf den zeitlichen Ablauf der Meiose haben.

#### 3.4.1 Behandlung der Mäuse

Den Mäusen wurde zunächst 100 mg/kg Bromodeoxyuridin (BrdU) intraperitoneal injiziert. BrdU ist ein Basenanalogen, welches anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut wird. Somit enthalten Spermien, welche sich zum Zeitpunkt der Injektion in der S-Phase des Präleptotäns der Meiose befanden in ihrer DNA das eingebaute BrdU. Der Behandlungszeitpunkt mit der jeweiligen Testsubstanz wurde so gewählt, dass sich die mit BrdU markierten Spermien in ihrem Entwicklungsstadium in der ersten und/oder zweiten meiotischen Teilung befanden, d.h. 13 Tage nach der BrdU-Injektion (Abb. 1). Die Präparation der Nebenhoden erfolgte 19-24 Tage bzw. 20-27 Tage nach der Behandlung.

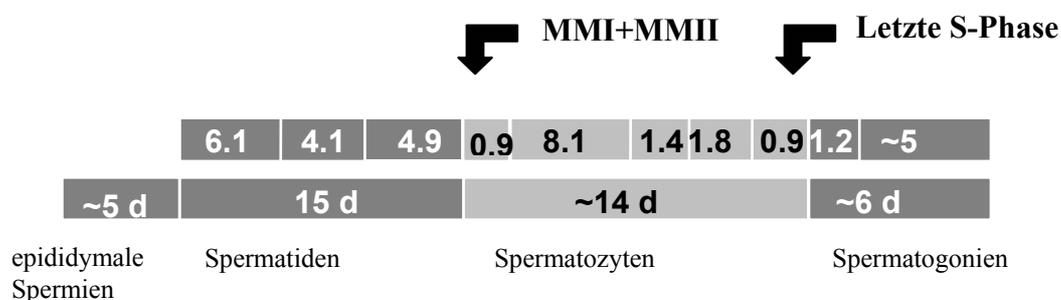


Abb. 1: Zeitlicher Verlauf der Spermatogenese der Maus

---

### 3.4.2 Immunfluoreszenzfärbung mit Anti-BrdU Antikörpern

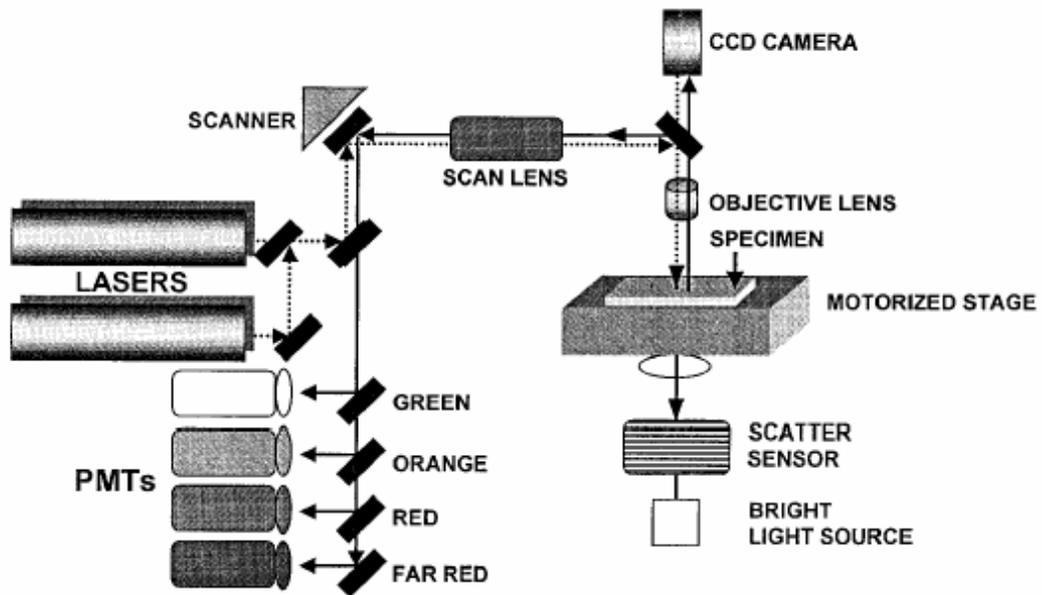
Im nächsten Schritt erfolgte der Nachweis des in die Spermien eingebauten BrdUs anhand einer Immunfluoreszenzfärbung mit BrdU-Antikörpern.

Die Objektträger mit den Spermienausstrichen wurden zunächst in 2 M HCl für 60 min bei Raumtemperatur denaturiert und darauffolgend für 10 min in PBS neutralisiert. Anschließend wurden 40 µl des Ratten-Anti-BrdU-Antikörpers aufpipettiert und die Objektträger für 30 min in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Waschen der Objektträger für 10 min in PN-Puffer bei Raumtemperatur wurden 40 µl eines FITC-konjugierten Anti-Ratten IgG-Antikörpers aufgetragen. Die Inkubationszeit betrug wiederum 30 min. Danach wurden die Objektträger wieder für 10 min in PN-Puffer gewaschen und die Spermienkerne mit 40 µl Propidiumiodid (2µg/ml) gegengefärbt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min wurden die Objektträger kurz in PN-Puffer geschwenkt, Vectashield®-Antifading-Lösung aufpipettiert und mit einem Deckglas (24x50 mm) abgedeckt. Die Objektträger wurden bis zur Auswertung in Dunkelheit bei -20°C gelagert.

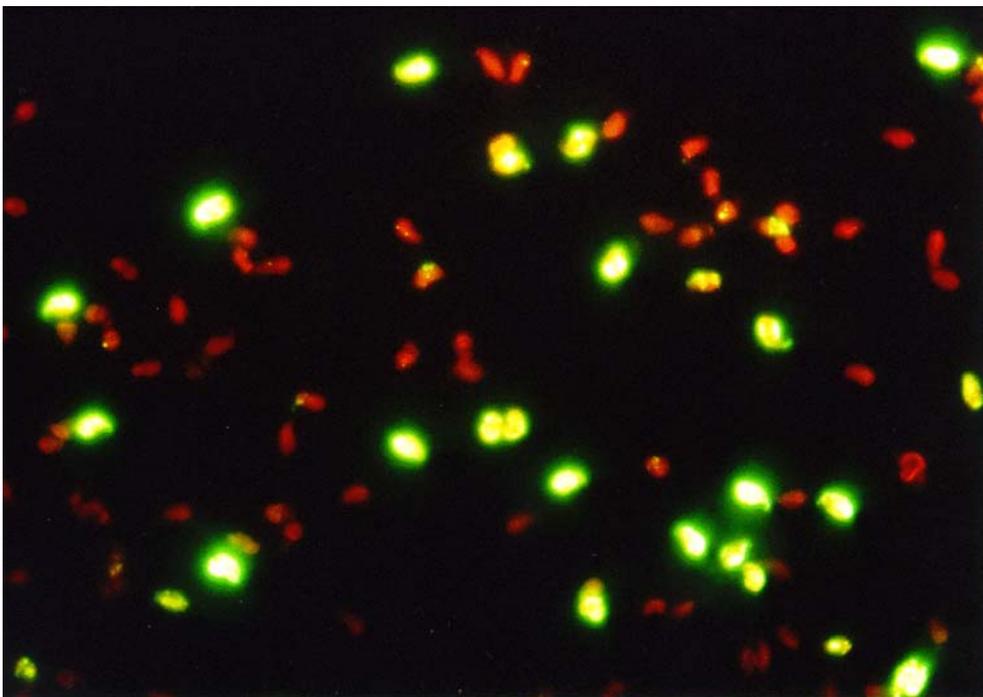
### 3.4.3 Auswertung mit dem Laser-Scanning-Zytometer (LSC)

Der Aufbau des Laser-Scanning-Zytometers (LSC) ist als schematische Übersicht in Abbildung 2 dargestellt. Beim LSC werden ein Fluoreszenzmikroskop, eine Lasereinheit und ein Computer kombiniert (Darzynkiewicz et al., 1999). Dieser Aufbau ermöglicht es, Fluoreszenzsignale einzelner Zellen auf einem Objektträger zu registrieren und ihre genaue Position zu speichern. Der Objektträger liegt dabei auf einem computergesteuerten, beweglichen Objektisch, der mit Positionssensoren ausgestattet ist. Der kombinierte Strahl zweier Laser (Argonionen- und Helium-Neon-Laser) wird über einen computergesteuerten Scanner-Spiegel gelenkt, der eine Sägezahnbewegung von 350 Hz erzeugt und den Strahl nach Durchgang durch eine Scanner- und Objektivlinse über den Objektträger führt (Ø 10-2,5 µm Punkt bei einem 10x – 40x Objektiv). Das von den gefärbten Zellen emittierte Fluoreszenzlicht wird über das Objektiv gesammelt, über einen partiell versilberten Spiegel reflektiert, und über die Scanner Linse und mehrere Spiegel gelenkt, um von bis zu vier Photomultipliern detektiert zu werden, welche mit verschiedenen Filtern ausgestattet sind. Die Sensorensignale werden digitalisiert und können über den angeschlossenen Computer ausgewertet werden.

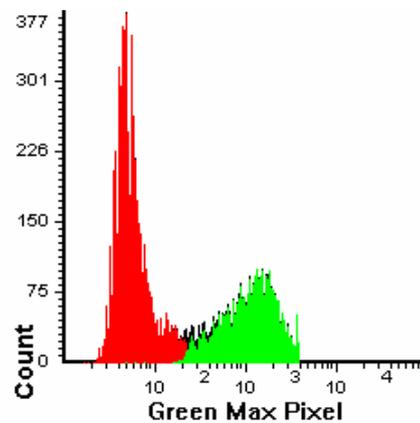
Pro Objektträger wurden 10.000 Spermien ausgezählt, wobei BrdU-positive Spermien grüne Fluoreszenz und BrdU-negative rote Fluoreszenz zeigten.



**Abb. 2:** Schematische Darstellung des Laser-Scanning-Zytometers (Darzynkiewicz et al., 1999)



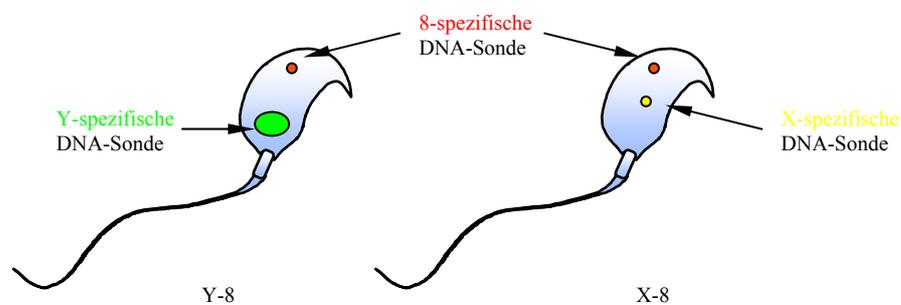
**Abb. 3:** Fluoreszenzmikroskopisches Bild BrdU-positiver und negativer Spermien. Die Spermien wurden mit einem fluoreszierenden BrdU-Antikörper (grün) markiert. Die Gegenfärbung erfolgte mit Propidiumiodid (rot).



**Abb. 4:** Histogramm der grün (FITC) fluoreszierenden BrdU-positiven und rot (PI) fluoreszierenden BrdU-negativen Spermien

### 3.5 Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH)

Zur Anwendung kam ein Dreifarben-FISH-Ansatz, der neben den beiden Geschlechtschromosomen X und Y auch das Chromosom 8 detektierte. Somit war eine gleichzeitige Untersuchung von diploiden und disomen Spermien möglich. Der X-Y-8-Ansatz wurde bereits auf seine spezifische Hybridisierung überprüft und kam schon mehrfach in unserem Labor zum Einsatz (Schmid et al., 1999; Baumgartner et al., 2001a).



**Abb. 5:** Dreifarben-FISH an Mausspermien; X-Y-8 Ansatz

---

### 3.5.1 Verwendete DNA-Sonden

Die chromosomenspezifischen DNA-Sonden wurden aus vier Plasmid-Klonen hergestellt.

#### Chromosom X

Als Sonde für das Chromosom X diente ein 9 kb großes DNA-Fragment als Insert in pBR322 (X-Klon DXWas70, Distech et al., 1985), welches die Bande XA3 nahe der Zentromerregion des Chromosoms markiert.

#### Chromosom Y

Es wurde ein 1,5 kb großes Insert in pUC19 (Y-Klon pY353/B, Bishop und Hatat, 1987) verwendet. Hierbei handelt es sich um eine „Painting“-Sonde, die ein Großteil des Chromosoms Y abdeckt.

#### Chromosom 8

Diese Sonde besteht aus zwei, 4,6 kb und 5,3 kb großen, Inserts aus den Klonen 8-4a und 8-5e (Boyle und Ward, 1990) und markiert die zentromernahe Bande 8A4 auf dem Chromosom 8. Beide Sonden wurden in der FISH in einer 1:1 Mischung eingesetzt.

### 3.5.2 Isolierung der Sonden-DNA

Die Plasmid-Isolierung erfolgte mit Hilfe des Qiagen Plasmid Maxi Kit. Das gewonnene DNA-Pellet wurde in TE-Puffer resuspendiert und anschließend der DNA-Gehalt im Spektralphotometer bei 260 nm gemessen. Zur Überprüfung, ob die isolierten Plasmide das Insert enthalten, wurde die Plasmid-DNA mit EcoR1 für 3 Std. bei 37°C verdaut. Das Aufbringen des Verdau auf ein 1 %iges Agarosegel (Lauf: 2 Std. bei 80 V) ließ zwei Banden, eine für den offenen Vektor und eine für das Insert, sichtbar werden.

### 3.5.3 Markierung der DNA-Sonden

Die Markierung der isolierten Sonden-DNA erfolgte mittels Nick Translation mit Biotin (Biotin-16-dUTP) bzw. Digoxigenin (Digoxigenin-11-dUTP).

Das Prinzip der Nick Translation beruht darauf, dass durch eine DNase Einzelstrangbrüche (sog. „nicks“) in den Doppelstrang der Sonden-DNA erzeugt werden. Diese „nicks“ dienen der DNA-Polymerase als Startpunkt für eine DNA Neusynthese. Hierbei werden aufgrund der Exonukleaseaktivität des Enzyms Nukleotide am freien 3'-Ende des DNA-Stranges entfernt

---

und gleichzeitig mit den vorhandenen Nukleotiden (dATP, dCTP und dUTP) in 5'-3'-Richtung wieder aufgefüllt. Anstelle von dTTP werden die biotin- bzw. digoxigenintragenden Nukleotide eingebaut.

Nach der Inkubation des Ansatzes über Nacht bei 15°C wurde die DNA mit 2,5 Vol. 100 % Ethanol (-20 °C kalt) und 1 µl Glykogen (20mg/ ml) gefällt und für 30 min bei -20°C inkubiert. Nach 30 min Zentrifugation bei 15000 U/min wurde das Pellet in einer Speedvac (Bachofer) für 10 min vakuumgetrocknet und in 20 µl TE-Puffer resuspendiert.

### 3.5.4 Herstellung des DNA-Sonden Hybridisierungsansatzes

Zur Vermeidung unspezifischer Hybridisierungssignale wurde zu der Sonden-DNA Spermien-DNA vom Lachs (10 mg/ml) hinzugemischt. Dieser DNA-Mix wurde zunächst mit Ethanol gefällt (s. 3.5.3), das Pellet in 9 µl Ampuwa<sup>®</sup> resuspendiert und mit MM 2.1 auf ein Endvolumen von 30 µl ergänzt.

Der Hybridisierungsansatz pro Objektträger setzte sich folgendermaßen zusammen:

Spermien-DNA vom Lachs	2 µl
Sonde X-dig	20 µl
Sonde X-bio	10 µl
Sonde Y-dig	20 µl
Sonde 8-bio	10 µl

#### Präzipitation der Sonden-DNA

Resuspension in Ampuwa <sup>®</sup>	9 µl
MM 2.1	21 µl

Im Anschluss folgte die Denaturierung der Sonden-DNA bei 78°C für 8 min im Wasserbad. Danach wurden die Sonden bis zum Aufpipettieren auf Eis gelagert.

---

### 3.5.5 Denaturierung der Mausspermien-DNA

Die Objektträger mit den Spermienausstrichen wurden in eine Küvette mit 70% Formamid in 2xSSC überführt und die DNA für 5 min bei 78°C im Wasserbad denaturiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70% / 90% / 100% Ethanol) jeweils für 2 min bei +4°C dehydriert und anschließend auf einer 37°C Wärmeplatte mit dem Fön getrocknet.

### 3.5.6 Hybridisierung und Waschen der Objektträger

Zur Hybridisierung wurden 30 µl des Hybridisierungsmixes auf einen Objektträger aufgetragen und mit einem 24x50 mm Deckglas luftblasenfrei abgedeckt. Der Rand des Deckgläschens wurde mit Fixogum<sup>®</sup> abgedichtet, um ein Eintrocknen der Sonde zu vermeiden. Die derart versiegelten Objektträger wurden in eine mit feuchten Tüchern ausgelegte Metallbox gelegt und für 24 Std. bei 37°C im Brutschrank hybridisiert.

Zum Waschen wurden die Deckgläschen vorsichtig abgelöst und die Objektträger in eine, auf 45 °C im Wasserbad vorgewärmte, 50% Formamidlösung überführt. In dieser Lösung wurden sie für 30 min und anschließend bei 37°C in PN-Puffer für nochmals 30 min gewaschen, um unspezifisch gebundene Sonden-DNA zu entfernen.

### 3.5.7 Immunodetektion

In einem nächsten Schritt erfolgte die Immunodetektion der indirekt markierten DNA-Sonden. Dazu wurden 40 µl der Detektionslösung 1 (CY3-Streptavidin/ Anti-Dig-FITC) aufpipettiert, die Objektträger mit Parafilm abgedeckt und für 30 min in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem Waschschrift von 20 min in PN-Puffer bei 37°C folgte dann die Signalamplifizierung mit der Detektionslösung 2 (Anti-Streptavidin). Im Anschluss an einen weiteren Waschschrift wurden nochmals 40 µl der Detektionslösung 3 (CY3-Streptavidin/ RAS-FITC) auf den Objektträger pipettiert und für 30 min inkubiert.

### 3.5.8 Gegenfärben des Spermienchromatins

Das Chromatin wurde mit dem Diamidinfarbstoff DAPI (4',6-Diamino-2-phenylindol-dihydrochlorid) gegengefärbt. DAPI bindet selektiv an die DNA und bildet intensiv blau-fluoreszierende Farbkomplexe.

Da ein rasches Ausbleichen der Präparate unter dem Fluoreszenzmikroskop vermieden werden musste, wurden die Objektträger anschließend mit Vectashield<sup>®</sup> eingedeckelt.

Bei einer Lagerung der Objektträger im Kühlschrank konnten noch nach mehreren Monaten Signale gesehen und dokumentiert werden.

### 3.6 Mikroskopische Auswertung

#### 3.6.1 Fluoreszenzmikroskopie

Das Auszählen der Fluoreszenzsignale in den Spermien erfolgte am Fluoreszenzmikroskop AxioPhot von Zeiss. Dieses war folgendermaßen ausgestattet:

Anregung: HBO 100 W Lampe (103/W2, Osram)

Objektive: 20x, 40x Öl, 63x Öl, 100x Öl

Optovar: 1x, 1,25x, 1,6x, 2x

Filtersysteme:

Filterset	Anregungsfilter	Strahlungsteiler	Sperrfilter
DAPI	BP 365	400 DCLP	D 450/50M
FITC	HQ 480/40	Q 505 LP	HQ 535/50
CY3		Q 660 LP	HQ 700/75

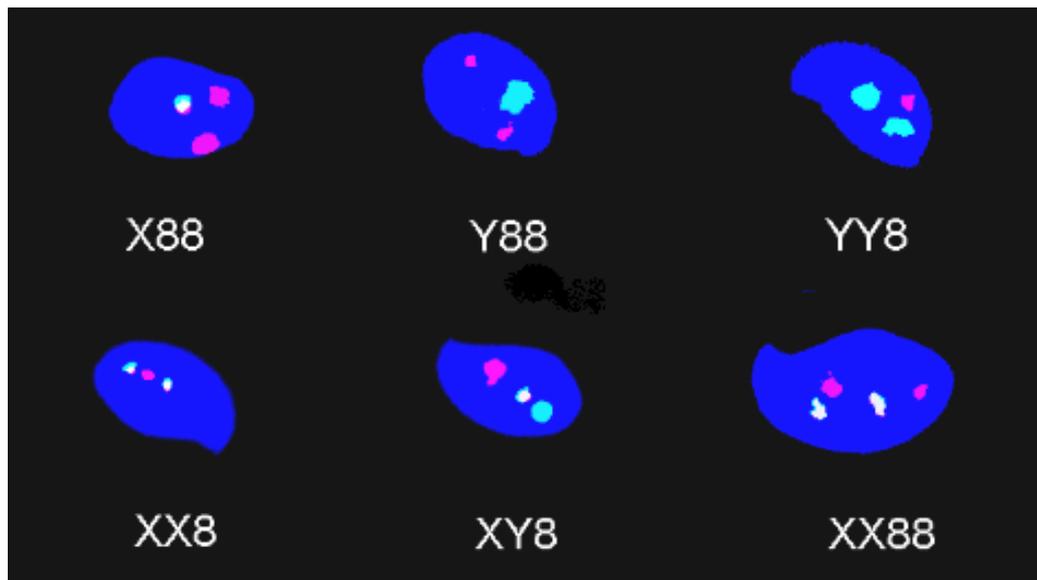
Mit einem Tripelbandpassfilter (Chroma, USA) war es möglich, die Farben Blau, Grün und Rot zusammen zu betrachten.

Zur Dokumentation dienten eine CCD-Kamera (AxioCam, Carl Zeiss, Jena) und die bildverarbeitende Software AxioVision (Version 3.0, Carl Zeiss, Jena).

#### 3.6.2 Zählkriterien

Es wurden 10.000 Spermien pro Objektträger ausgezählt und die Daten mit Hilfe des vom LLNL (Lawrence Livermore National Laboratory, USA) entwickelten Programms Cytoscore<sup>®</sup> erfasst und verarbeitet. Bei allen FISH-Präparaten wurden strikte Zählkriterien verwendet. Ein normales Spermium enthält entweder ein rotes und grünes Signal (Y-8) oder ein rotes und gelbes Signal (X-8). Ein hyperhaploides oder disomes Spermium enthält zwei Signale der gleichen Farbe.

Zwei gleiche Farbsignale in einem Spermium wurden als zwei Chromosomen gezählt, wenn beide Signale gleich groß waren, die gleiche Intensität besaßen und mindestens einen halben Signaldurchmesser voneinander entfernt waren. In der Abbildung 6 sind Beispiele für die verschiedenen Phänotypen anormaler Spermien dargestellt.



**Abb. 6:** Zusammenstellung von verschiedenen Spermienphänotypen: Disomien X-8-8, Y-8-8, Y-Y-8, X-X-8, X-Y-8 und Diploidie X-X-8-8 (digitalisiert mit ISIS3, Metasystems, Deutschland)

## 3.7 Zellkultur

### 3.7.1 Zelllinie

Für die *in vitro* Untersuchungen auf Induktion von Spindelstörungen wurde die Zelllinie V79 MZ verwendet. Dabei handelt es sich um eine Lungenfibroblasten-Linie des chinesischen Hamsters, welche erstmals 1958 von Ford und Yerganian isoliert wurde und die sich durch eine sehr geringe metabolische Aktivität bezüglich der Cytochrome P450 auszeichnet (Glatt et al., 1987). Außerdem eignen sich V79-Zellen für die Präparation direkt auf dem Objektträger (Göggelmann et al., 1996). Die Zelllinie wurde freundlicherweise von Fr. Dr. Göggelmann, Institut für Toxikologie, GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit zur Verfügung gestellt.

---

Die Kultivierung erfolgte in DMEM (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium) mit 10 % [v/v] FKS (Fötale Kälberserum, 45 min bei 56°C inaktiviert) und 1 % [v/v] Penicillin/Streptomycin.

### 3.7.2 Zellkulturbedingungen

Die Stammkulturen von V79 MZ wurden zur Kultivierung aus der portionsweisen Lagerung in flüssigem Stickstoff genommen und aufgetaut. Von dieser Zellsuspension wurden 800 µl zu 10 ml Medium in einer Petrischale (d = 9,4 cm) hinzugefügt und im Brutschrank bei 37°C in einer feuchten Atmosphäre unter Begasung mit 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Nach dreitägiger Kultivierung erfolgte eine Passage der Zellkultur. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zur vollständigen Entfernung des Mediums zweimal mit 5 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden 2 ml Trypsin/ EDTA-Lösung (0,05/ 0,02% [w/v] in PBS) auf die Zellkultur gegeben und gleich wieder bis auf einen Rest von ca. 0,3 ml abgesaugt. Die Petrischale wurde für 3 min bei 37°C inkubiert. Durch seitliches Klopfen der Petrischale erreichte man das Ablösen der Zellen, die dann mit Medium aufgenommen wurden.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 100 µl dieser Zellsuspension mit 100 µl Trypanblau (0,4 %) im Eppendorfcup mittels Vortex gleichmäßig vermischt.

Das Auszählen der Zellen erfolgte in der Neubauer-Zählkammer. Nach der Zellzahlbestimmung wurde ein Aliquot der Zellsuspension in eine neue Petrischale mit Medium gegeben und inkubiert.

### 3.7.3 Versuchsablauf

Am Vortag der Behandlung wurden die einmal passagierten Zellen auf gereinigte, sterilisierte Objektträger eingesät, die in Quadriperm<sup>®</sup>-Schalen lagen. Pro Kammer der Quadriperm<sup>®</sup>-Schalen wurden  $7,5 \times 10^4$  Zellen in 4,5 ml Medium bzw. 5 ml Medium bei den Versuchen mit S9-Mix aufgebracht.

Nach 24-stündiger Kultivierung wurden bei den Versuchen ohne S9-Mix pro Kammer 0,5 ml Medium mit Testlösung in entsprechender Konzentration hinzugefügt und für 2 Stunden inkubiert. Bei den Versuchen mit S9-Mix wurde zunächst das Medium abgesaugt und durch 4 ml frisches Medium ohne Zusatz von FKS ersetzt. Zu diesem Testansatz wurden dann 0,5 ml Medium mit Testlösung sowie 0,5 ml S9-Mix hinzugefügt. Der Proteingehalt betrug 32,3 mg Protein /ml.

---

### 3.7.3.1 Testlösungen

Die Testsubstanzen wurden zunächst in DMSO gelöst und dann in den jeweils gewünschten Konzentrationen mit Medium zu einem Gesamtvolumen von 0,5 ml gemischt, um eine optimale Verteilung zu erreichen. Die Endkonzentration von DMSO im Medium betrug in der Regel  $< 1\%$  [v/v]. Zur Kontrolle wurden Zellen mit  $1\%$  [v/v] DMSO bzw. destilliertem Wasser inkubiert.

Albendazol wurde in Konzentrationen von  $5\ \mu\text{M}$ ,  $10\ \mu\text{M}$ ,  $20\ \mu\text{M}$ ,  $30\ \mu\text{M}$  und  $50\ \mu\text{M}$  pro ml Medium und Genistein in Konzentrationen von  $100\ \mu\text{M}$ ,  $200\ \mu\text{M}$ ,  $300\ \mu\text{M}$ ,  $400\ \mu\text{M}$  und  $500\ \mu\text{M}$  pro ml Medium zu dem Testansatz hinzugegeben.

### 3.7.3.2 Fixierung

Nach Ende der Inkubationszeit wurde das Medium mit den gelösten Testsubstanzen abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Zur Fixierung der Zellen wurden dann  $1/3$  des Puffers durch Fix (Ethanol: Eisessig 3:1 [v/v]) ersetzt und für 15 min stehen gelassen. Diese Prozedur wurde noch zweimal wiederholt, wobei immer mehr Puffer durch Fix ersetzt wurde. Anschließend wurde die Fixierungslösung komplett abgesaugt und die Objektträger über Nacht luftgetrocknet.

### 3.7.3.3 Färbung

Zur Färbung der Zellen wurden die Objektträger für 8-10 min in eine  $2\%$  Orcein-Lösung getaucht und anschließend nacheinander jeweils kurz in  $96\%$  Ethanol, Isopropanol: Xylol 1:1 und reinem Xylol geschwenkt. Danach wurde ein Tropfen Eukitt<sup>®</sup> auf die Präparate pipettiert und die Objektträger mit einem Deckglas (24x50 mm) abgedeckt.

### 3.7.4. Auswertung

Für jede Konzentration der beiden Testsubstanzen sowie für die Kontrollen mit und ohne DMSO wurden je 500 Zellen pro Objektträger von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen gezählt. Bei der Auswertung der Präparate wurde auf anormale Mitosefiguren geachtet. Am auffälligsten ist der nach der Wirkung von Colchizin benannte C-mitotische Effekt. Dabei zeigen sich die Chromosomen im Zellraum verstreut und sind gelegentlich überkontrahiert.

Zellen wurden als initiale C-Mitosen gewertet, wenn eine unsaubere Einordnung der Chromosomen in die Äquatorialebene, eine Zusammenballung der Chromosomen im Zentrum (Ball-Metaphasen) oder Metaphasen bzw. Ana-Telophasen mit in der Chromosomenbewegung zurückgebliebenen Chromatiden oder ganzen Chromosomen beobachtet wurden. Des Weiteren wurde auf Brückenbildung oder Fragmente in der Ana-Telophase geachtet.

Der mitotische Index wurde durch Zählen von 3x1000 Zellen in verschiedenen Bereichen des Objektträgers bestimmt und der prozentuale Anteil von Mitosen an allen Zellen angegeben.

### **3.8. Statistische Auswertung der Daten**

Zur Feststellung signifikanter Unterschiede in den Frequenzen BrdU-positiver Spermien zwischen behandelten Tieren und der entsprechenden Kontrollgruppe wurde der t-Test angewendet. Der Chi-Quadrat Vierfeldertest ( $\chi^2$  Test) nach Pearson und Yates (Sachs, 1984) wurde für die Einschätzung der Signifikanz der Anzahl disomer und diploider Spermien bei der FISH-Analyse herangezogen. Für einen Vergleich auf individueller Basis wurde der Mann-Whitney U-Test verwendet. Die Signifikanzgrenze wurde bei allen Tests auf  $p \leq 0,05$  festgelegt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Effekt der Testsubstanzen auf den zeitlichen Ablauf der Meiose

Vor dem Spermien-FISH-Assay wurde für beide Chemikalien untersucht, ob sie den Ablauf der meiotischen Teilung verzögern. Durch die Verwendung des Laser-Scanning-Zytometers war es möglich, die Zählung weitestgehend automatisiert durchzuführen.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 und 2 dargestellt. Für das Anthelmintikum Albendazol wurden Spermien in einem Zeitraum von 20-27 Tagen nach der Behandlung gewonnen. Am Tag 22 betrug die Häufigkeit BrdU-positiver Spermien bei den behandelten Tieren  $18,6 \pm 10,2$  im Vergleich zu  $15,6 \pm 7,4$  bei den Kontrolltieren. Am Tag 23 war im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $25,9 \pm 5,6$ ) ein signifikanter Rückgang BrdU-positiver Spermien in der behandelten Gruppe zu verzeichnen ( $8,9 \pm 3,7$ ). Für die Gewinnung der Spermien wurde ein Zeitpunkt von 22 Tagen nach der Behandlung gewählt.

**Tab. 1:** Häufigkeit BrdU-positiver Spermien nach Behandlung mit Albendazol

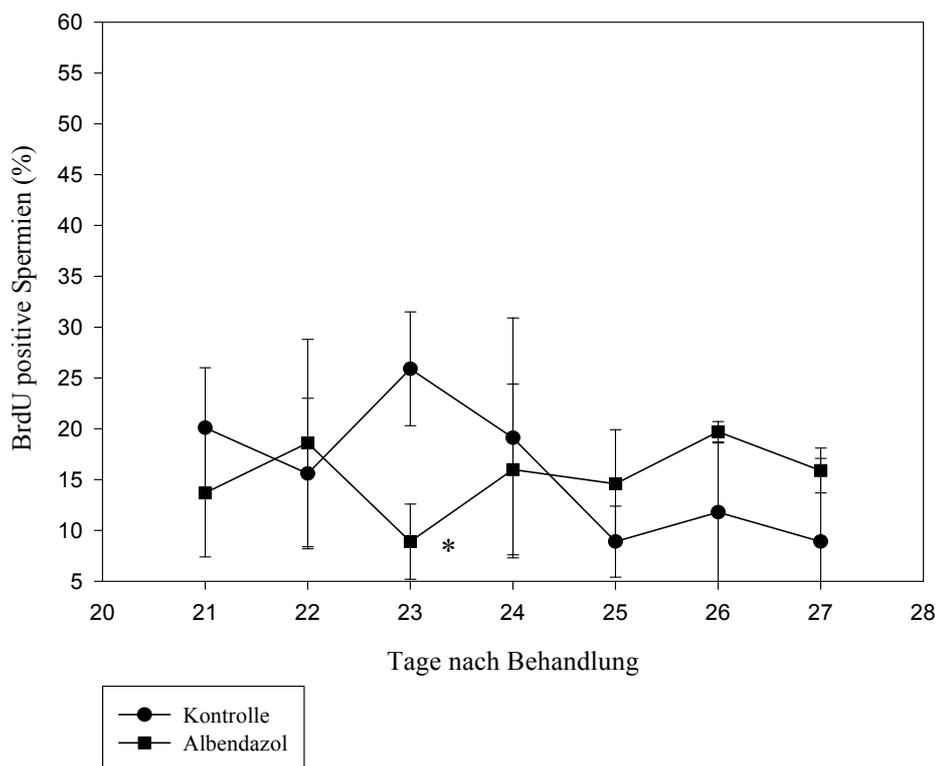
BrdU positive Spermien (%) (Mittelwert $\pm$ SD)							
	Tag 21	Tag 22	Tag 23	Tag 24	Tag 25	Tag 26	Tag 27
Kontrolle (Öl)	$20,1 \pm 5,9$	$15,6 \pm 7,4$	$25,9 \pm 5,6$	$19,1 \pm 11,8$	$8,9 \pm 3,5$	$11,8 \pm 6,8$	$8,9 \pm 8,2$
Albendazol (2500 mg/kg)	$13,7 \pm 6,3$	$18,6 \pm 10,2$	$8,9 \pm 3,7^*$	$16,0 \pm 8,4$	$14,6 \pm 5,3$	$19,7 \pm 1,0$	$15,9 \pm 2,2$

\*  $p < 0,01$  (t-Test)

Für die Behandlung mit 500 mg/kg Genistein zeigte sich ein ähnlicher Kurvenverlauf zwischen den Kontrolltieren und den behandelten Tieren, mit einem Maximum am Tag 22 ( $47,1 \pm 4,8$  zu  $49,1 \pm 11,5$ ). Der optimale Zeitpunkt für die Gewinnung des Spermienmaterials wurde auf 22 Tage nach der Behandlung festgelegt.

**Tab. 2:** Häufigkeiten BrdU-positiver Spermien nach Behandlung mit Genistein

BrdU positive Spermien (%) (Mittelwert $\pm$ SD)					
	Tag 20	Tag 21	Tag 22	Tag 23	Tag 24
Kontrolle (DMSO)	32,5 $\pm$ 4,9	39,3 $\pm$ 11,8	47,1 $\pm$ 4,8	44,9 $\pm$ 4,0	45,5 $\pm$ 12,8
Genistein (500 mg/kg)	35,0 $\pm$ 9,4	35,6 $\pm$ 7,3	49,1 $\pm$ 11,5	46,8 $\pm$ 8,0	41,3 $\pm$ 6,9

**Abb. 1:** Häufigkeit BrdU-positiver Spermien nach Behandlung mit Albendazol (\*  $p < 0,01$ , t-Test)

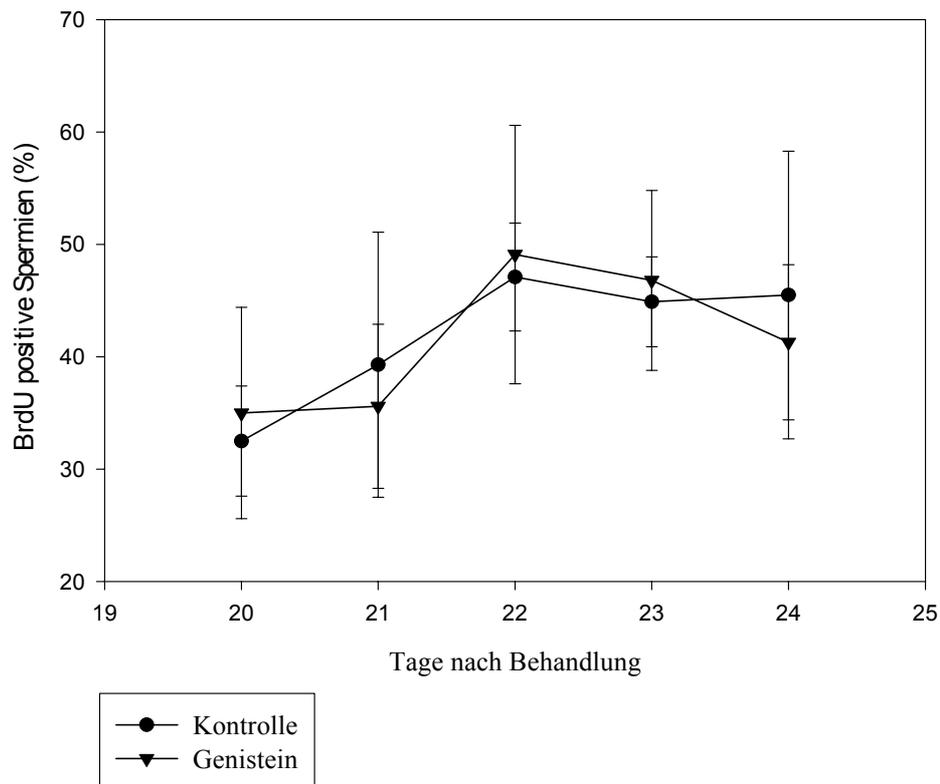


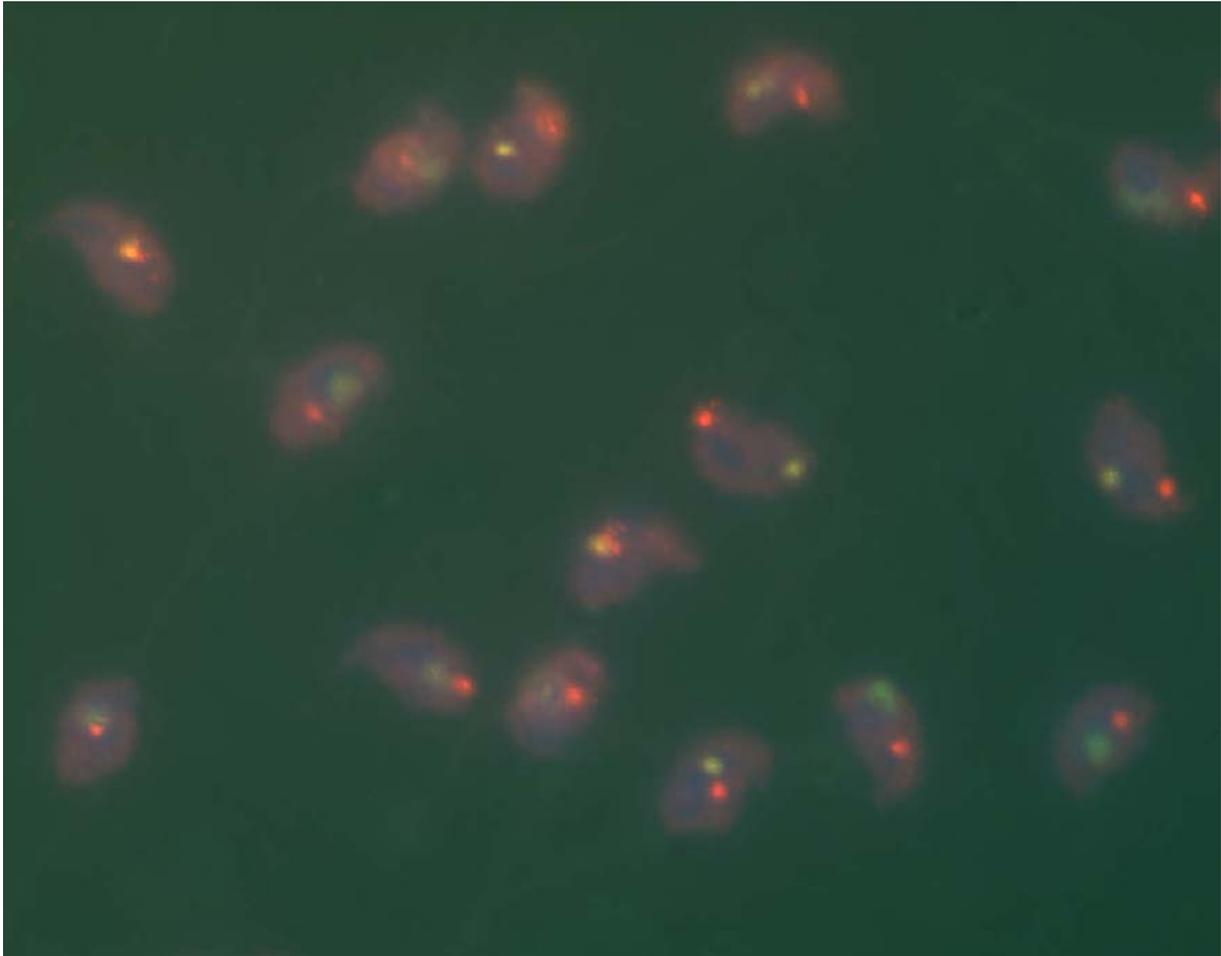
Abb. 2: Häufigkeiten BrdU-positiver Spermien nach Behandlung mit Genistein

## 4.2 Mehrfarben FISH an Spermien der Maus

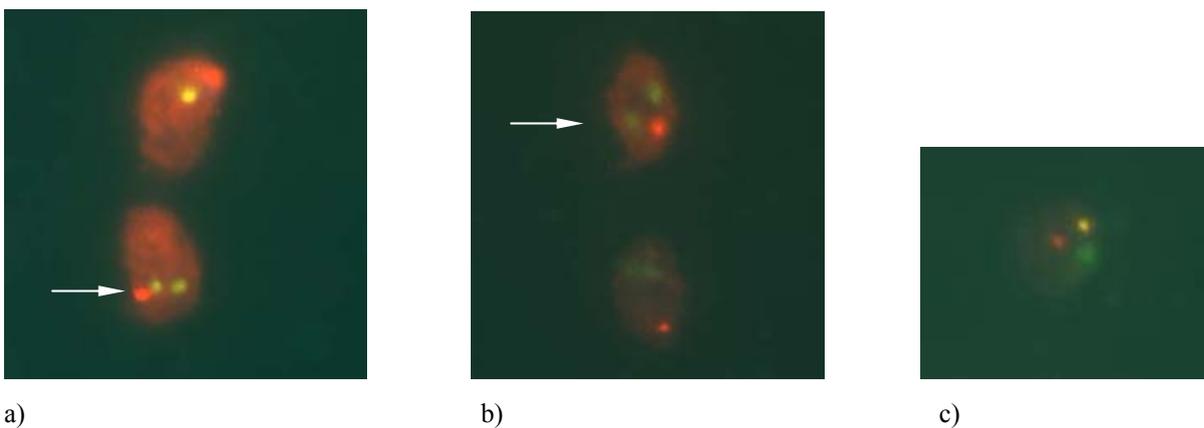
Mit der Mehrfarben FISH wurde am Tiermodell Maus das aneugene Potential von Albendazol und Genistein in Spermien untersucht. Durch den Mehrfarben-Ansatz war es möglich, zwischen der Induktion von disomen und diploiden Spermien zu unterscheiden.

Die Auswertung der FISH-Präparate erfolgte manuell am Fluoreszenzmikroskop, wobei pro Tier eine Anzahl von 10.000 Spermien ausgezählt wurde. Sämtliche Objektträger wurden vor der Auswertung von einer unabhängigen Person kodiert, um eine Beeinflussung beim Zählen auszuschließen. Spermien mit einem hypohaploiden Phänotyp (X0, Y0, 80) wurden in die Auswertung nicht mit aufgenommen, da das Fehlen eines Fluoreszenzsignales auch präparatorisch bedingt sein könnte.

Sowohl bei den behandelten Tieren als auch bei den Kontrolltieren näherte sich das Verhältnis von X- zu Y-tragenden Spermien dem erwarteten Verhältnis 1:1 an.



**Abb. 3:** Fluoreszenzmikroskopisches Bild normaler Spermien nach Mehrfarben-FISH (aufgenommen mit der AxioCam und dem dazugehörigen Computerprogramm AxioVision, Version 3.0 von Zeiss)



**Abb. 4 a-c:** Beispiele für aneuploide Spermien: a) disomes Spermium (X-X-8); b) disomes Spermium (Y-Y-8); c) disomes Spermium (X-Y-8) (aufgenommen mit der AxioCam und dem dazugehörigen Computerprogramm AxioVision, Version 3.0 von Zeiss)

#### 4.2.1 Befunde nach einmaliger Behandlung mit Albendazol

Wie aus Tabelle 3 ersichtlich, zeigt eine einmalige Behandlung mit 2500 mg/kg Albendazol keine signifikante Veränderung der Häufigkeit von disomen oder diploiden Spermien im Vergleich zur unbehandelten Gruppe ( $0,044 \pm 0,003$  bzw.  $0,048 \pm 0,002$ ). Wobei sich bei einer Dosierung von 1000 mg/kg Albendazol die Häufigkeit disomer Spermien um den Faktor 1,5 auf  $0,08 \pm 0,004$  im Vergleich zu  $0,054 \pm 0,003$  signifikant erhöht.

**Tab. 3** : Aneuploidien in Spermien ABZ-exponierter Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe

	Kontrolle I Öl	Albendazol 1000 mg/kg	Kontrolle II Öl	Albendazol 2500 mg/kg
Anzahl der Tiere	5	5	5	5
Ausgezählte Spermien	50107	50042	50131	50143
X/Y	1,0	1,0	1.02	1.04
Y-Y-8-8	0	1	0	0
X-X-8-8	0	2	0	1
X-Y-8-8	1	1	0	1
gesamt	1	4	0	2
<b>% Diploidien <math>\pm</math> SD</b>	<b>0,002 <math>\pm</math> 0,001</b>	<b>0,008 <math>\pm</math> 0,002</b>	<b>0 <math>\pm</math> 0</b>	<b>0,004 <math>\pm</math> 0,001</b>
Y-8-8	4	10	2	1
X-8-8	3	7	3	3
Y-Y-8	7	7	6	7
X-X-8	10	14	6	8
X-Y-8	3	2	5	5
gesamt	27	40	22	24
<b>% Disomien <math>\pm</math> SD</b>	<b>0,054 <math>\pm</math> 0,003</b>	<b>0,080 <math>\pm</math> 0,004*</b>	<b>0,044 <math>\pm</math> 0,003</b>	<b>0,048 <math>\pm</math> 0,002</b>

p=0,05 (Mann-Whitney U-Test)

#### 4.2.2 Befunde nach einmaliger Behandlung mit Genistein

Genistein wurde in einer Dosierung von 500 mg/kg und 250 mg/kg einmalig s.c. verabreicht sowie als fraktionierte Behandlung von 100 mg/kg an fünf aufeinanderfolgenden Tagen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt. Für Genistein zeigte sich kein signifikanter Anstieg disomer oder diploider Spermien im Vergleich zur Kontrollgruppe.

**Tab. 4:** Aneuploidien in Spermien nach Behandlung mit Genistein

	Kontrolle I DMSO	Genistein 250 mg/kg	Kontrolle II DMSO	Genistein 500 mg/kg
Anzahl der Tiere	5	5	5	5
Ausgezählte Spermien	50110	50100	50226	50124
X/Y	1,02	1,03	1,0	1,01
Y-Y-8-8	2	0	1	1
X-X-8-8	0	2	0	0
X-Y-8-8	1	1	0	1
gesamt	3	3	1	2
<b>% Diploidien ± SD</b>	<b>0,005 ± 0,001</b>	<b>0,005 ± 0,001</b>	<b>0,002 ± 0,001</b>	<b>0,004 ± 0,001</b>
Y-8-8	4	7	3	6
X-8-8	4	10	3	3
Y-Y-8	6	9	6	3
X-X-8	11	8	7	3
X-Y-8	2	1	5	3
gesamt	27	35	24	18
<b>% Disomien ± SD</b>	<b>0,054 ± 0,003</b>	<b>0,070 ± 0,004</b>	<b>0,048 ± 0,004</b>	<b>0,036 ± 0,001</b>

### 4.2.3 Subakute Behandlung

In der menschlichen Bevölkerung werden die beiden hier getesteten Substanzen nicht als einmalige akute Exposition vorkommen, sondern über einen längeren Zeitraum und mit sehr viel niedrigeren Dosen. Außerdem sind nicht nur die Spermatozyten in der Metaphase I oder II der Meiose gegenüber aneugenen Substanzen empfindlich. Auch die früheren Stadien der Prophase können beeinträchtigt werden. Darum wurde eine subakute Behandlung an fünf aufeinanderfolgenden Tagen mit je 100 mg/kg/Tag Albendazol und Genistein durchgeführt. Die Ergebnisse sind für beide Substanzen in Tabelle 5 dargestellt.

**Tab. 5:** Aneuploidien in Spermien nach fraktionierter Behandlung mit Albendazol und Genistein

	Kontrolle Öl	Albendazol 5x100 mg/kg	Kontrolle DMSO	Genistein 5x100 mg/kg
Anzahl der Tiere	5	5	5	5
Ausgezählte Spermien	50208	50096	50240	50181
X/Y	1,02	1,00	1,04	1
Y-Y-8-8	0	1	1	2
X-X-8-8	0	1	1	0
X-Y-8-8	0	0	1	0
gesamt	0	2	3	2
<b>% Diploidien ± SD</b>	<b>0,00 ± 0,00</b>	<b>0,004 ± 0,001</b>	<b>0,006 ± 0,001</b>	<b>0,004 ± 0,001</b>
Y-8-8	7	9	3	5
X-8-8	8	4	9	7
Y-Y-8	4	5	4	6
X-X-8	11	8	4	11
X-Y-8	3	2	2	3
gesamt	33	28	22	32
<b>% Disomien ± SD</b>	<b>0,066 ± 0,005</b>	<b>0,056 ± 0,002</b>	<b>0,044 ± 0,006</b>	<b>0,064 ± 0,004</b>

Für die subakute Behandlung ergaben sich vergleichbare Befunde wie im ersten Experiment mit einmaliger Behandlung. Die Häufigkeiten der disomen und diploiden Spermien blieben im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe unverändert.

#### 4.2.4 Positive Kontrolle

Als positive Kontrollsubstanz wurde das bekannte Spindelgift Colchizin in einer Dosierung von 3 mg/kg für die Einzelverabreichung und in einer Dosierung von 1 mg/ kg/ Tag für die subakute Behandlung an 5 Tagen verabreicht. Die Ergebnisse der Versuche sind in Tabelle 6 dargestellt.

**Tab. 6:** Aneuploidien in Spermien nach Behandlung mit Colchizin

	Kontrolle I Öl	Colchizin 3mg/kg	Kontrolle II Öl	Colchizin 5x1mg/kg
Anzahl der Tiere	5	5	5	5
Ausgezählte Spermien	50101	50114	50240	50118
X/Y	1,01	1,01	1,04	1,0
Y-Y-8-8	1	3	1	2
X-X-8-8	0	2	1	1
X-Y-8-8	2	1	1	1
gesamt	3	6	3	4
<b>% Diploidien ± SD</b>	<b>0,006 ± 0,002</b>	<b>0,012 ± 0,002</b>	<b>0,006 ± 0,001</b>	<b>0,008 ± 0,001</b>
Y-8-8	4	7	3	9
X-8-8	2	3	9	9
Y-Y-8	7	9	4	10
X-X-8	6	18	4	7
X-Y-8	4	3	2	3
gesamt	23	40	22	38
<b>% Disomien ± SD</b>	<b>0,046 ± 0,004</b>	<b>0,079 ± 0,007*</b>	<b>0,044 ± 0,006</b>	<b>0,076 ± 0,003*</b>

\*  $p < 0,05$  ( $\chi^2$ -Test, Mann-Whitney U-Test)

Wie erwartet, erhöhte sich sowohl nach einmaliger als auch nach mehrmaliger Behandlung die Häufigkeit disomer Spermien signifikant um den Faktor 1,7 im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe.

---

### 4.3 Analyse von Spindelstörungen in V79 MZ Zellen

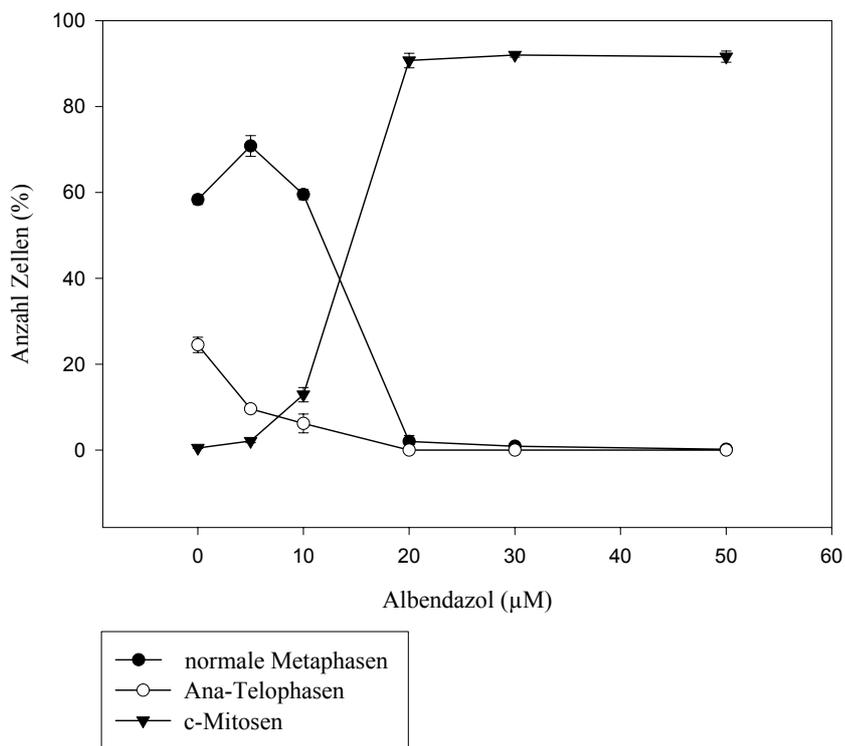
Die unerwarteten negativen Ergebnisse im Spermien Test führten dazu, die Wirksamkeit der Substanzchargen mit einem schnellen *in vitro* Test zu überprüfen. Die Induktion von Spindelstörungen in V79 MZ Zellen durch die beiden Testsubstanzen wurde zunächst in Abwesenheit eines metabolischen Aktivierungssystems untersucht. Da beide Substanzen *in vivo* einer ausführlichen Metabolisierung in der Leber ausgesetzt sind und die Zelllinie V79 MZ keine Cytochrom P450-Aktivität besitzt (Glatt et al., 1987), wurden die Experimente unter Zugabe eines metabolischen Aktivierungssystems (S9-Mix) wiederholt.

#### 4.3.1 Befunde nach Behandlung mit Albendazol

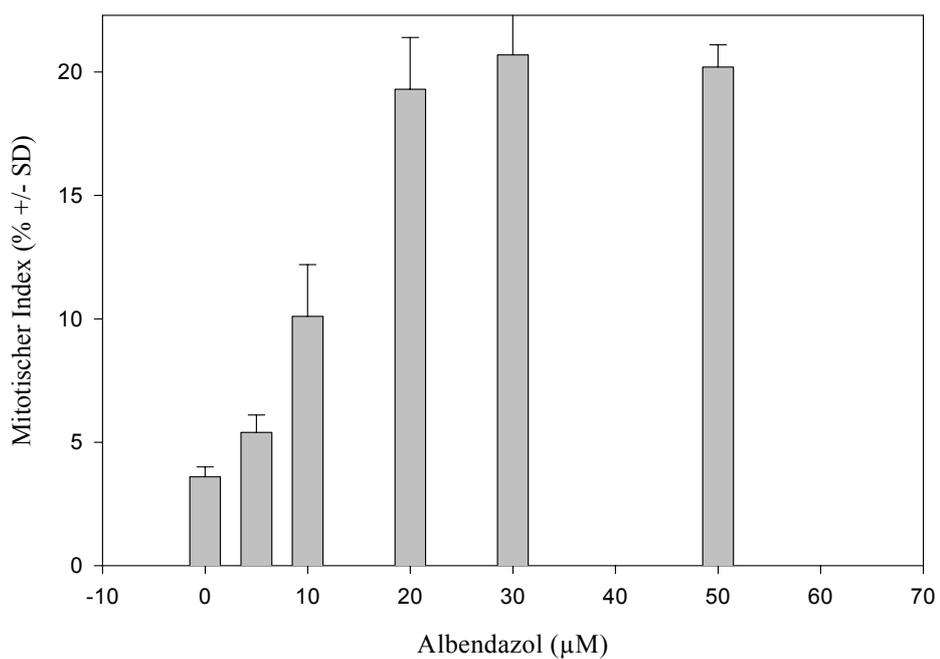
Das Anthelmintikum Albendazol wurde in Konzentrationen von 5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 20 $\mu$ M, 30 $\mu$ M und 50 $\mu$ M zu dem Testsystem hinzugegeben. Die Ergebnisse zeigen, dass Albendazol einen konzentrationsabhängigen Anstieg gestörter Mitosefiguren bewirkte. Bei einer Konzentration von 20 $\mu$ M zeigten bereits 93,7 % aller gezählten Mitosen Spindelstörungen. Die Mehrheit dieser Spindelstörungen konnte als vollständige C-Mitose charakterisiert werden. Dabei zeigten sich im gesamten Zellraum verteilte und zum größten Teil überkontrahierte Chromosomen. Initiale C-Mitosen, wie die unsaubere Anordnung eines oder mehrerer Chromosomen in die Metaphaseplatte oder die Zusammenballung der Chromosomen im Zentrum (Ball-Metaphasen) der Zelle konnten weniger häufig beobachtet werden. Gleichzeitig verringerte sich jedoch die Anzahl der beobachteten Ana-Telophasen. Zellen mit Anaphase- oder Telophasebrücken und/ oder -fragmenten waren nicht signifikant erhöht

Der mitotische Index verzeichnete ebenso einen deutlichen Anstieg im Vergleich zur Kontrolle. Die Erhöhung von Zellen mit Spindelstörungen und die gleichzeitige Verminderung des Ana-Telophasenanteils deutet zusammen mit dem Anstieg des mitotischen Indexes auf einen Metaphaseblock, verursacht durch Albendazol hin.

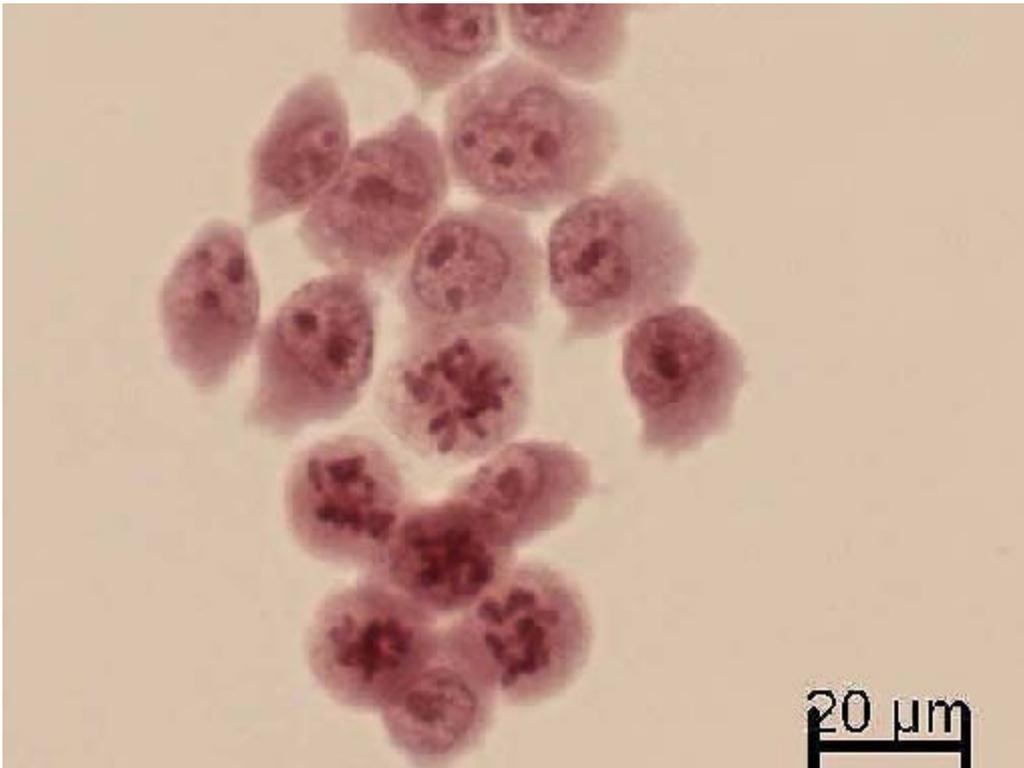
Nach Zugabe von S9 wurde ein starker zytotoxischer Effekt mit erhöhtem Anteil pyknotischer Zellen beobachtet (s. Tab. 7).



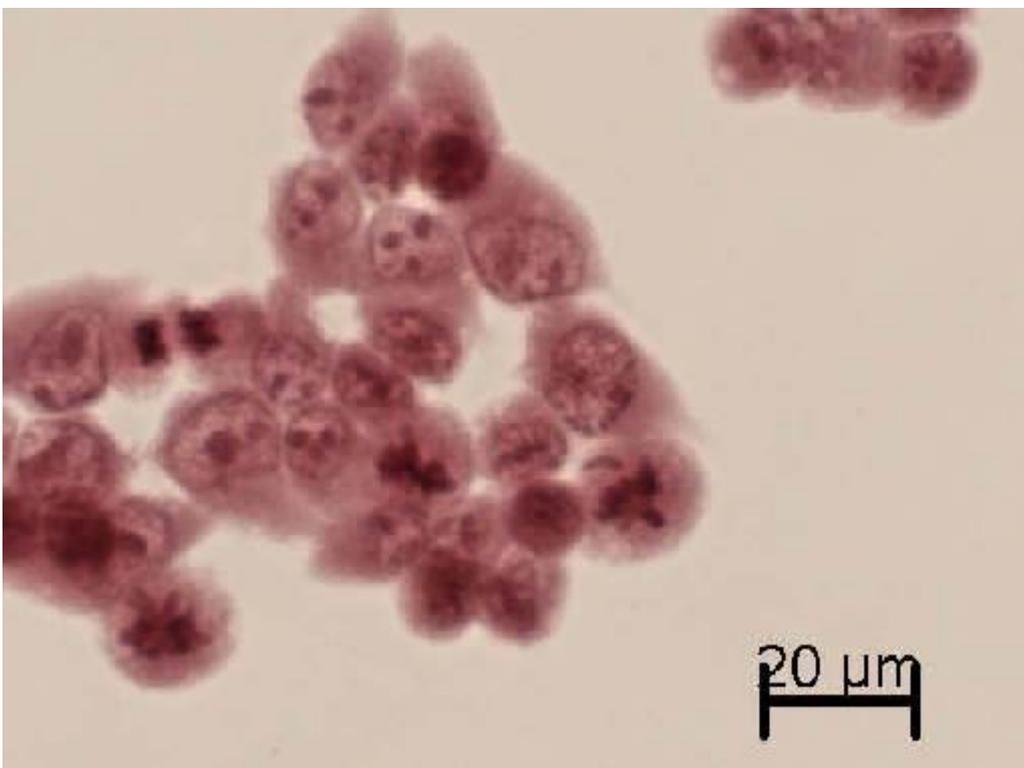
**Abb. 5:** Spindelstörungen in V79 MZ nach Behandlung mit Albendazol



**Abb. 6:** Mitotischer Index in V79 MZ nach Behandlung mit Albendazol



**Abb. 7:** vollständige C-Mitose: Die Chromosomen sind im Zellraum verstreut und überkontrahiert.

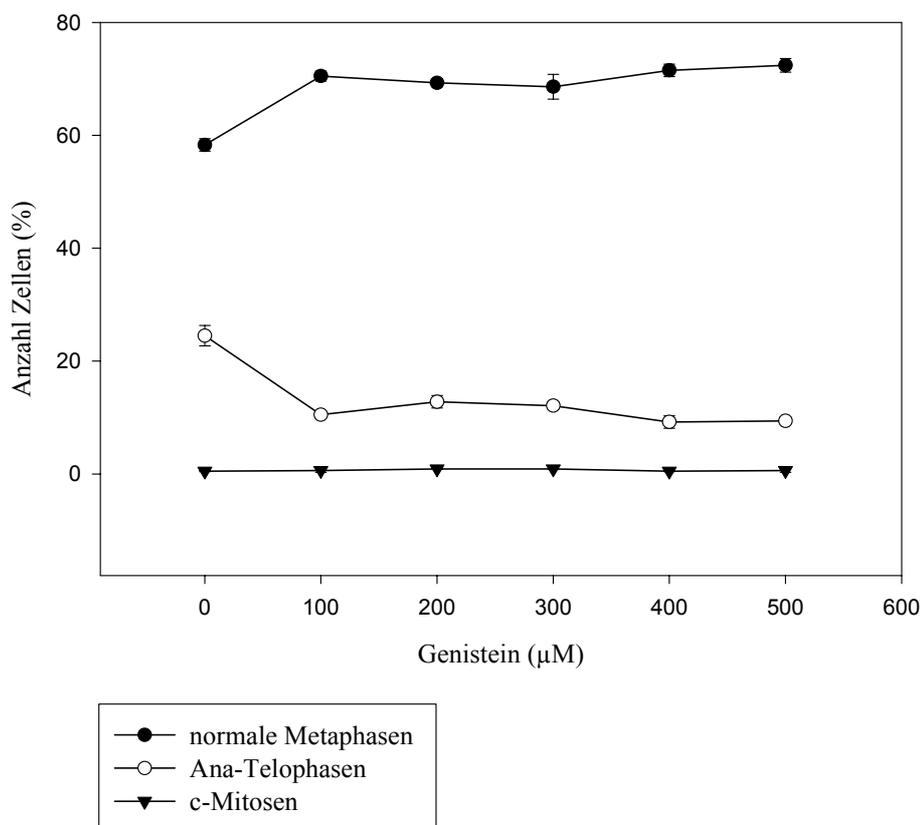


**Abb. 8:** initiale C-Mitose: Die Chromosomen sind unsauber in der Äquatorialebene eingeordnet und ein Chromosom ist in der Zellperipherie zurückgeblieben.

### 4.3.2 Befunde nach Behandlung mit Genistein

In Tabelle 6 ist der Einfluss der Exposition von V79 MZ Zellen mit Genistein im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle dargestellt. Genistein wurde in Konzentrationen von 100 $\mu$ M, 200 $\mu$ M, 300 $\mu$ M, 400 $\mu$ M und 500 $\mu$ M zum Testsystem hinzugegeben. Nach einer Expositionszeit von 2 Stunden zeigten sich keine Hinweise auf die Induktion von Spindelstörungen. Ebenso konnte eine erhöhte Anzahl von Anaphase- oder Telophasebrücken und/oder -fragmenten nicht beobachtet werden. Lediglich der Anstieg normaler Metaphasen mit gleichzeitiger Verminderung des Ana-Telophasenanteils bereits bei der geringsten Konzentration kann als leichter Metaphaseblock interpretiert werden.

Auch nach Zugabe von S9 wurde kein von den Befunden ohne S9 abweichender Effekt beobachtet (s. Tab. 8).



**Abb. 9:** Spindelstörungen in V79 MZ nach Behandlung mit Genistein

**Tab. 5 und 6 :** Spindelstörungen in V79 MZ nach Behandlung mit Albendazol und Genistein (ohne S9-Mix) (Mittelwert  $\pm$  SD)

<b>Albendazol</b> Konzentration ( $\mu$ M)	0	0	5	10	20	30	50
DMSO (+/-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Normale mitotische Zellen (% $\pm$ SD)	97,9 $\pm$ 0,6	96,9 $\pm$ 1,1	91,5 $\pm$ 0,6	74,4 $\pm$ 0,3	5,6 $\pm$ 1,1	4,8 $\pm$ 0,4	4,3 $\pm$ 0,1
Prophasen	14,1 $\pm$ 2,6	13,7 $\pm$ 2,2	11,0 $\pm$ 2,3	8,8 $\pm$ 3,1	3,6 $\pm$ 0,4	3,8 $\pm$ 0,5	4,3 $\pm$ 0,2
Metaphasen	63,1 $\pm$ 3,3	58,3 $\pm$ 1,1	70,8 $\pm$ 2,4	59,5 $\pm$ 1,2	2 $\pm$ 1,4	0,9 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1
Ana-Telophasen	20,3 $\pm$ 0	24,5 $\pm$ 1,8	9,6 $\pm$ 0,5	6,2 $\pm$ 2,2	0	0	0
Mitosen mit Spindelstörungen (% $\pm$ SD)	1,9 $\pm$ 0,5	2,8 $\pm$ 1,0	7,2 $\pm$ 0,2	23,9 $\pm$ 1,1	93,7 $\pm$ 0,9	93,8 $\pm$ 0,8	93,0 $\pm$ 0,7
Initiale C-Mitosen	1,5 $\pm$ 0,1	2,1 $\pm$ 1,0	4,5 $\pm$ 0,4	10,8 $\pm$ 0,3	3,0 $\pm$ 1	1,8 $\pm$ 0,4	1,4 $\pm$ 0,6
C-Mitosen	0,2 $\pm$ 0,3	0,5 $\pm$ 0,1	2,1 $\pm$ 0,4	12,9 $\pm$ 1,7	90,7 $\pm$ 1,7	92,0 $\pm$ 0,5	91,6 $\pm$ 1,3
Ana-Telophasen mit Brücken und/oder Fragmenten (% $\pm$ SD)	0,2 $\pm$ 0	0,3 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,3	0,2 $\pm$ 0,2	0	0	0
Pyknosen (% $\pm$ SD)	0,7 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,5	1,7 $\pm$ 0,8	0,7 $\pm$ 0,2	1,4 $\pm$ 0,4	2,7 $\pm$ 0,6
Mitotischer Index (% $\pm$ SD)	4,3 $\pm$ 1,4	3,6 $\pm$ 0,4	5,4 $\pm$ 0,7	10,1 $\pm$ 2,1	19,3 $\pm$ 2,1	20,7 $\pm$ 1,6	20,2 $\pm$ 0,9
<b>Genistein</b> Konzentration ( $\mu$ M)	0	0	100	200	300	400	500
DMSO (+/-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Normale mitotische Zellen (% $\pm$ SD)	97,9 $\pm$ 0,6	96,9 $\pm$ 1,1	94,8 $\pm$ 0,2	95,0 $\pm$ 0,7	94,2 $\pm$ 0,7	95,8 $\pm$ 0,4	95,4 $\pm$ 0,6
Prophasen	14,1 $\pm$ 2,6	13,7 $\pm$ 2,2	13,9 $\pm$ 0,6	13,0 $\pm$ 0,3	13,5 $\pm$ 2,3	14,8 $\pm$ 0,1	13,6 $\pm$ 0,6
Metaphasen	63,1 $\pm$ 3,3	58,3 $\pm$ 1,1	70,5 $\pm$ 0,9	69,3 $\pm$ 0,7	68,6 $\pm$ 2,2	71,5 $\pm$ 1,1	72,4 $\pm$ 1,2
Ana-Telophasen	20,3 $\pm$ 0	24,5 $\pm$ 1,8	10,5 $\pm$ 0,1	12,8 $\pm$ 1,1	12,1 $\pm$ 0,6	9,2 $\pm$ 1,1	9,4 $\pm$ 0
Mitosen mit Spindelstörungen (% $\pm$ SD)	1,9 $\pm$ 0,5	2,8 $\pm$ 1,0	4,4 $\pm$ 0,1	4,4 $\pm$ 0,1	4,8 $\pm$ 0,7	3,5 $\pm$ 0,3	4,3 $\pm$ 0,5
Initiale C-Mitosen	1,5 $\pm$ 0,1	2,1 $\pm$ 1,0	2,7 $\pm$ 0,3	2,7 $\pm$ 0,1	2,9 $\pm$ 0,8	2,5 $\pm$ 0,1	2,9 $\pm$ 0,2
C-Mitosen	0,2 $\pm$ 0,3	0,5 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,3	0,9 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,3
Ana-Telophasen mit Brücken und/oder Fragmenten (% $\pm$ SD)	0,2 $\pm$ 0	0,3 $\pm$ 0,1	1,1 $\pm$ 0,4	0,9 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0	0,6 $\pm$ 0,3	0,8 $\pm$ 0
Pyknosen (% $\pm$ SD)	0,7 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,3	0,6 $\pm$ 0,3	1,0 $\pm$ 0	0,7 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1
Mitotischer Index (% $\pm$ SD)	4,3 $\pm$ 1,4	3,6 $\pm$ 0,4	4,1 $\pm$ 0,8	3,1 $\pm$ 0,5	3,5 $\pm$ 0	3,3 $\pm$ 0,5	3,6 $\pm$ 0

**Tab.7 und 8:** Spindelstörungen in V79 MZ nach Behandlung mit Albendazol und Genistein (mit S9-Mix) (Mittelwert  $\pm$  SD)

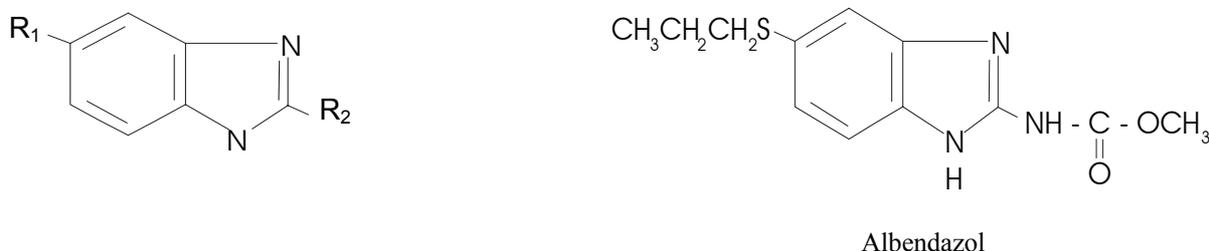
<b>Albendazol</b> Konzentration ( $\mu$ M)	0	5	10	20	30	50
DMSO (+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Normale mitotische Zellen (% $\pm$ SD)	96,02 $\pm$ 0,6	85,5 $\pm$ 2,9	37,9 $\pm$ 9,2	11,2 $\pm$ 5,5	2,1 $\pm$ 0,4	2,2 $\pm$ 0,3
Prophasen	9,7 $\pm$ 1,8	7,9 $\pm$ 0,1	6,3 $\pm$ 0,2	2,9 $\pm$ 1,1	1,2 $\pm$ 0,3	2,2 $\pm$ 0,3
Metaphasen	70,2 $\pm$ 1,4	66,1 $\pm$ 0,5	24,9 $\pm$ 7,3	6,6 $\pm$ 3,2	0,8 $\pm$ 0	0
Ana-Telophasen	16,2 $\pm$ 0,9	11,5 $\pm$ 2,5	6,8 $\pm$ 1,7	1,7 $\pm$ 1,2	0,1 $\pm$ 0,1	0
Mitosen mit Spindelstörungen (% $\pm$ SD)	3,03 $\pm$ 0,1	3,4 $\pm$ 0,6	6,3 $\pm$ 1,3	5,3 $\pm$ 0,8	5,7 $\pm$ 0,2	3,5 $\pm$ 0,3
Initiale C-Mitosen	2,3 $\pm$ 0,2	2,2 $\pm$ 0,3	3,7 $\pm$ 1,6	2,7 $\pm$ 0,5	2,4 $\pm$ 0,4	1,2 $\pm$ 0,3
C-Mitosen	0,6 $\pm$ 0,3	0,8 $\pm$ 0,3	2,3 $\pm$ 0,4	2,4 $\pm$ 0,1	3,2 $\pm$ 0,2	2,4 $\pm$ 0,6
Ana-Telophasen mit Brücken und/oder Fragmenten (% $\pm$ SD)	0,2 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0	0,3 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,1	0	0
Pyknosen (% $\pm$ SD)	0,8 $\pm$ 0,3	12,03 $\pm$ 1	55,8 $\pm$ 10,5	83,6 $\pm$ 6,3	92,3 $\pm$ 0,2	94,3 $\pm$ 0,6
Mitotischer Index (% $\pm$ SD)	1,0 $\pm$ 0,3	1,8 $\pm$ 0	1,6 $\pm$ 0,4	2,8 $\pm$ 0,9	4,5 $\pm$ 0,1	6,1 $\pm$ 1,6
<hr/>						
<b>Genistein</b> Konzentration ( $\mu$ M)	0	100	200	300	400	500
DMSO (+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Normale mitotische Zellen (% $\pm$ SD)	96,02 $\pm$ 0,6	94,8 $\pm$ 0,2	95,1 $\pm$ 0,1	94,8 $\pm$ 0,2	95,3 $\pm$ 1,1	94,1 $\pm$ 0,6
Prophasen	9,7 $\pm$ 1,8	10,9 $\pm$ 0,6	9,8 $\pm$ 1,0	11,2 $\pm$ 0,3	11,1 $\pm$ 0,4	11,8 $\pm$ 2,3
Metaphasen	70,2 $\pm$ 1,4	72,6 $\pm$ 0,7	73,9 $\pm$ 2,9	72,9 $\pm$ 0,2	73,6 $\pm$ 0,4	72,6 $\pm$ 1,9
Ana-Telophasen	16,2 $\pm$ 0,9	11,4 $\pm$ 0,1	11,5 $\pm$ 1,6	10,6 $\pm$ 0,1	10,7 $\pm$ 1,0	9,8 $\pm$ 1,0
Mitosen mit Spindelstörungen (% $\pm$ SD)	3,03 $\pm$ 0,1	4,1 $\pm$ 0,3	4,3 $\pm$ 0,3	4,4 $\pm$ 0,5	4,0 $\pm$ 0,4	5,3 $\pm$ 0,3
Initiale C-Mitosen	2,3 $\pm$ 0,2	2,7 $\pm$ 0,7	2,4 $\pm$ 0,4	2,7 $\pm$ 0,5	2,2 $\pm$ 0,5	3,0 $\pm$ 0,4
C-Mitosen	0,6 $\pm$ 0,3	0,8 $\pm$ 0,3	0,8 $\pm$ 0	0,9 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,3	1,6 $\pm$ 1,1
Ana-Telophasen mit Brücken und/oder Fragmenten (% $\pm$ SD)	0,2 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,2	1,1 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,4
Pyknosen (% $\pm$ SD)	0,8 $\pm$ 0,3	1,1 $\pm$ 0,4	0,6 $\pm$ 0	0,8 $\pm$ 0,3	0,7 $\pm$ 0,7	0,6 $\pm$ 0,3
Mitotischer Index (% $\pm$ SD)	1,0 $\pm$ 0,3	1,4 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,1	1,7 $\pm$ 0	1,4 $\pm$ 0,2	1,5 $\pm$ 0,1

## 5. Diskussion

### 5.1 Bisherige Befunde zur Wirkung der Testchemikalien

#### 5.1.1 Albendazol

Medikamente aus der Gruppe der Benzimidazole finden eine breite Verwendung als Anthelmintika, Fungizide oder Pestizide in der Veterinär- und Humanmedizin. Es konnte gezeigt werden, dass Benzimidazole an derselben Bindungsstelle wie Colchizin am Tubulin binden (Whittaker und Faustman, 1992) und die Polymerisation von Mikrotubuli hemmen (Friedman und Platzer, 1978; Lacey und Watson, 1985). Die Art der Hemmung ähnelt der von Colchizin. Benzimidazolcarbamate binden wie Colchizin an dimeres Tubulin und beeinflussen das dynamische Gleichgewicht zwischen der dimeren und der polymeren Form, indem sie das „self-assembly“ der Untereinheiten zum wachsenden Mikrotubulus verhindern (Lacey, 1988). Diese Spindel-hemmende Aktivität kann sich u.a. in der Entstehung von Aneuploidien manifestieren. Es hat sich gezeigt, dass diese Wirkung zum einen durch eine Carbamatgruppe (NH-CO<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>) an Position 2 des Benzimidazolringes (R<sub>2</sub> in Abb.1) und zum anderen durch einen hydrophoben Rest an Position 5 (R<sub>1</sub> in Abb.1), wie z.B. Schwefel bei Albendazol, verursacht wird. Für einige Vertreter dieser Stoffklasse gibt es eindeutige Hinweise auf ein aneugenes oder klastogenes Potential (Seiler, 1976; Mailhes et al., 1992).



**Abb. 1:** Strukturformel des Benzimidazol-Grundgerüsts und Albendazol im Vergleich

---

Untersuchungen von Whittaker und Faustman (1991) zeigten, dass Albendazol während der embryonalen Entwicklung toxisch ist. Albendazol und sein Metabolit Albendazolsulfoxid hemmten in der Zellkultur das Wachstum und die Differenzierung von embryonalen Zellen von Ratten, wobei eine Ansammlung von Zellen in der Mitose feststellbar war. Hierbei zeigte sich, dass Albendazol wesentlich toxischer war als sein Metabolit, Albendazolsulfoxid, obwohl letzterer für die teratogene Aktivität verantwortlich gemacht wird (Delatour et al., 1981). Ein teratogener Effekt wurde in Labornagern und Kaninchen bei einer Verabreichung während der Organogenese beobachtet und äußerte sich in erster Linie in Knochendefekten der Gliedmaßen (Delatour et al., 1984; Mantovani, 1992).

Über ein mögliches aneugenes Potential von Albendazol ist bisher wenig bekannt. Untersuchungen an humanen Lymphozyten haben gezeigt, dass Albendazol *in vitro* die Bildung von Mikronuklei induziert (Ramirez et al., 2001). Außerdem führte Albendazol zu einer Erhöhung des mitotischen Index, was auf einen Metaphaseblock deutet. Eine Unterscheidung, ob die gebildeten Mikronuklei Chromosomenfragmente oder ganze Chromosomen enthielten, wurde in diesem Experiment nicht getroffen, so dass nicht zwischen einem klastogenen oder aneugenem Effekt differenziert werden konnte. Zur Überprüfung, ob es sich bei den induzierten Mikronuklei um einen aneugenem oder klastogenem Effekt handelt, kann die immunologische Färbemethode mit Antikörpern gegen Kinetochorproteine (CREST-Antikörper) angewendet werden. Damit ist es möglich, Chromosomen mit Zentromer (Mikronukleus mit CREST-Signal) von Chromosomenfragmenten ohne Zentromer (ohne CREST-Signal) zu unterscheiden.

### 5.1.2 Genistein

Phytoestrogene aus der Familie der Isoflavone sind in zahlreichen Pflanzenarten vertreten und haben in den vergangenen Jahren in einer Vielzahl von Studien eine zumeist positive Wirkung auf die menschliche Gesundheit gezeigt. So stehen in diesem Zusammenhang Untersuchungen zu einer möglichen chemoprotektiven Wirkung von Genistein bei einigen Krebsarten wie Brustkrebs und Prostatakrebs sowie Studien über den Einfluss auf das Herz-Kreislaufsystem im Vordergrund (Barnes, 1995; Polkowski und Mazurek, 2000).

---

In der Literatur sind bisher nicht viele Hinweise auf eine aneugene Wirkung von Genistein zu finden. In verschiedenen Testsystemen wurde überprüft, inwieweit durch die Applikation von Genistein Gen- oder Chromosomenmutationen ausgelöst werden.

Im bakteriellen System (Ames Test) wurden keine Genmutationen beobachtet (Bartholomew und Ryan, 1980). Ebenso zeigte Genistein im HPRT-Genmutationstest in V79 Zellen lediglich eine geringe Mutagenität (Kulling und Metzler, 1997).

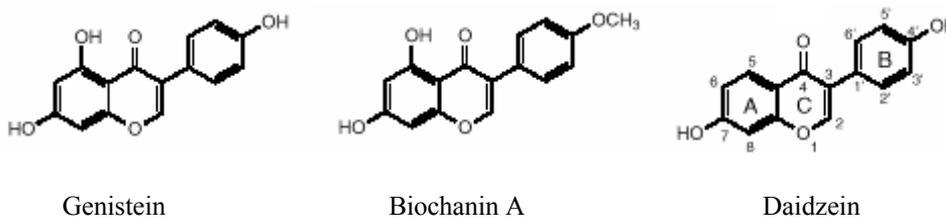
Mehrere Gruppen konnten allerdings einen klastogenen Effekt nachweisen. Kulling und Metzler (1997) zeigten in Untersuchungen an V79 Zellen, dass Genistein die Bildung von CREST-negativen Mikronuklei induziert. Ein Effekt auf den zytoplasmatischen Mikrotubulus-Komplex und die mitotische Spindel konnte in der gleichen Untersuchung für Genistein nicht nachgewiesen werden. Ein weiterer Hinweis auf das klastogene Potential von Genistein ist die Induktion von strukturellen Chromosomenaberrationen in humanen Lymphozytenkulturen (Kulling et al., 1999). Morris et al. (1998) beobachteten ebenfalls eine Induktion von Mikronuklei, Mutationen am HPRT-Locus und strukturellen Chromosomenaberrationen in einer humanen lymphoblastoiden Zelllinie nach Behandlung mit Genistein. In Splenozyten der Maus erzeugte Genistein *in vitro* die Bildung von Mikronuklei (Record et al. 1995). Der Effekt konnte *in vivo* jedoch nicht beobachtet werden. Diese Ergebnisse können als Hinweise auf eine klastogene oder auch aneugene Wirkung gewertet werden.

Viele der biologischen Effekte Genisteins sind auf dessen hemmende Wirkung der Enzyme Topoisomerase II und Tyrosinkinase zurückzuführen. Eine Verzögerung des Zellzyklusses sowie eine Blockade in der G<sub>2</sub>-Phase konnte in HGC-27 Zellen festgestellt werden. Matsukawa et al. (1993) führen diese Beobachtungen auf die Hemmung der Topoisomerase II sowie der Tyrosinkinase zurück. Zusätzlich wurde von Traganos et al. (1992) berichtet, dass Genistein nach längerer Exposition in leukämischen Zellen neben einer Blockade des Zellzyklusses eine erhöhte Anzahl polyploider Zellen verursachte.

Unter den Vertretern der Phytoestrogene weisen neben Genistein auch Daidzein und Biochanin A aneugene bzw. klastogene Wirkungen auf. Trotz der großen strukturellen Ähnlichkeit zeigen sich jedoch Unterschiede in ihrer Wirkung. Genistein unterscheidet sich nur durch eine zusätzliche OH-Gruppe in 5-Position vom Daidzein (7, 4'-Dihydroxyisoflavon), und Biochanin A (5, 7-Dihydroxy-4'-methoxyisoflavon) stellt ein GEN-4'-methylether dar (s. Abb.2).

Biochanin A zeigte eine aneugene Wirkung in kultivierten V79 Zellen und für Daidzein wurde ein schwach klastogener Effekt beobachtet (Anderson et al. 1997).

An diesen Beispielen wird deutlich, dass bereits geringe Variationen der Substituenten am A- und/oder B-Ring einen starken Einfluss auf die biologische Aktivität von Phytoestrogenen haben.



**Abb. 2:** Strukturformeln verschiedener Phytoestrogene

## 5.2 Induktion von Spindelstörungen in V79 MZ Zellen

### 5.2.1 Albendazol

C-Mitosen reflektieren die Induktion von Spindelstörungen und sind typisch für den Effekt des Spindelgiftes Colchizin (Östergren, 1944). Das Auftreten vollständiger C-Mitosen, sowie stark kontrahierter und im Zellraum verteilter Chromosomen lässt eine Inaktivierung der Mitosespindel vermuten. Das Auftreten von initialen C-Mitosen deutet auf eine unvollständige Ausbildung der Mitosespindel hin, welche zur normalen Verteilung der Chromosomen nicht mehr in der Lage ist. Die gewonnenen Ergebnisse mit dem V79-Assay zeigen deutlich, dass Albendazol ein wirksames Spindelgift ist. In Abhängigkeit von der Albendazolkonzentration wurden in V79 MZ Zellen Spindelstörungen ausgelöst, die dem Schadensmuster von Colchizin ähnlich waren. Dieser Befund beweist, dass das in den Spermien-Untersuchungen verwendete Albendazol wirksam war.

Nach der Zugabe eines metabolischen Aktivierungssystems (S9-Mix) wurde ein starker zytotoxischer Effekt beobachtet. Mit S9 wurde im Zellsystem eine Metabolisierung Albendazols durch Cytochrom P450 zu Albendazolsulfoxid ermöglicht, das für die zytotoxische toxische Wirkung verantwortlich gemacht werden kann.

---

### 5.2.2 Genistein

Bei der Auswertung der V79 MZ Zellen zeigte sich keine Erhöhung von Zellen mit initialen oder vollständigen C-Mitosen. Des Weiteren wurde lediglich ein geringer Anstieg von Zellen in der Metaphase und ein entsprechender Abfall von Zellen in der Ana-Telophase beobachtet, beide waren jedoch statistisch nicht signifikant. Die vorliegenden Beobachtungen an V79 Zellen reflektieren die Ergebnisse in der Literatur. So wurde im zellfreien *in vitro* Mikrotubuli-Polymerisations-Test für Genistein bis zu einer Konzentration von 50 µM im Testsystem keine hemmende Wirkung festgestellt (Metzler und Pfeiffer, 1995).

Die Induktion von Chromosomenaberrationen durch Genistein beschrieben Kulling et al. 1997 in V79 Zellen und Kulling et al. 1999 in humanen Lymphozyten. Dafür kann die eingangs erwähnte Topoisomerase II-Hemmung verantwortlich gemacht werden (Boos und Stopper, 2000, Markovits et al., 1989; Yamashita et al., 1990). Das klastogene Potential von Genistein konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden, da ein vermehrtes Auftreten von Anaphasebrücken und/oder Fragmenten nicht beobachtet wurde. Diese negativen Ergebnisse sind wahrscheinlich in erster Linie auf die kurze Expositionszeit zurückzuführen. V79 MZ Zellen haben eine Verdopplungszeit von 11 Stunden (Dr. Göggelmann, mündliche Auskunft). Bei früheren Untersuchungen mit anderen Testsubstanzen wurde in dem Labor von Frau Dr. Göggelmann eine Expositionszeit von 6 Stunden gewählt, d.h. ca. die Hälfte der Verdopplungszeit von V79 MZ Zellen. Da mit Albendazol bereits nach 2 Stunden ein deutlicher Effekt zu erkennen war, wurden beide Substanzen mit demselben Versuchsprotokoll untersucht.

Es ist schwierig, die klastogene und aneugene Wirkung einer Substanz in einem Versuchsansatz zu erfassen, da beide Endpunkte spezifische Untersuchungsprotokolle erfordern. Der *in vitro* Mikronukleus-Test mit Zentromer-Markierung durch CREST oder FISH (Kirsch-Volders et al., 1997) böte eine Möglichkeit dafür, das aneugene Potential von Genistein weiter zu untersuchen.

---

### **5.3 Untersuchungen zum Effekt der Testsubstanzen auf meiotische Verzögerung mit dem Laser-Scanning Zytometer (LSC)**

Bereits vor längerem wurde die Vermutung aufgestellt, dass Chemikalien mit einem aneugenem Potential den Ablauf der Zellteilung in Mitose und Meiose stören können (Adler, 1993). Miller und Adler (1992) diskutierten einen möglichen Zusammenhang zwischen der Aneuploidie-Induktion und einer Verzögerung der Meiose in Spermatozyten. Für die Untersuchungen der Chemikalien-induzierten Aneuploidie ist es daher notwendig, den optimalen Zeitpunkt für die Gewinnung der Spermien zu bestimmen. Bei früheren Untersuchungen mit dem Spermien-FISH-Assay wurde ausgehend von dem aus der Literatur bekannten Zeitverlauf der Spermatogenese der Maus (Oakberg, 1956), für die Gewinnung der Spermien ein Zeitpunkt von 22 Tagen nach der Behandlung gewählt.

Bei der Auswertung dieser FISH-Präparate wurde bei positiven Ergebnissen maximal eine Verdopplung aneuploider Spermien beobachtet. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung wäre, dass die Spermien nicht zum optimalen Zeitpunkt gewonnen wurden. Hinzu kommt, dass mögliche aneuploide Spermatozyten nicht unbedingt bis zur Reifung der Spermien überleben, da diese einem rigorosen Selektionsverfahren unterworfen sind (Braun, 1998) und daher mit dem Spermien-FISH-Assay unentdeckt bleiben. Überleben aneuploide Spermien die Reifung und gelangen in den Nebenhoden, können diese Spermien nur entdeckt werden, wenn der Zeitpunkt der Spermengewinnung aus dem Nebenhoden der Exposition durch Chemikalien während der Spermatogenese angeglichen ist. Aus diesem Grund wurde von Schmid et al. (2001) ein Testsystem entwickelt, welches erlaubt, den optimalen Zeitpunkt für die Spermengewinnung genauer festzulegen. Die quantitative Erfassung des zeitlichen Auftretens BrdU-markierter Spermien im Nebenhoden mit dem Laser-Scanning Zytometer kann das Zeitfenster für die Gewinnung der Spermien genauer eingrenzen und so die Sensitivität des Spermien-FISH-Assays erhöhen, um falsch-negative Ergebnisse zu vermeiden.

Das Auszählen mit dem LSC stellt eine sehr einfache und vor allem zeitsparende Methode dar. Im Vergleich zum manuellen Auszählen der Spermien-FISH Präparate (8-10 Stunden) dauerte das Auszählen eines Präparates nur zwischen 10 und 20 Minuten. Von Vorteil gegenüber der Flowzytometrie ist bei der Auszählung mit dem LSC zudem, dass jede Zelle auf dem Objektträger nach der Messung mit dem motorisierten Objektisch anhand der im

---

Computer gespeicherten Koordinaten wiedergefunden und eingehender untersucht werden kann.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen für die Kontrollgruppen das aus der Literatur bekannte Zeitintervall für die Entwicklung von Spermatozyten zu epididymalen Spermien, ein Maximum BrdU-positiver Spermien wurde am Tag 22 bzw. 23 verzeichnet. Für 2500 mg/kg Albendazol wurde in den vorliegenden Experimenten eine signifikante Erniedrigung der Zahl BrdU-markierter Spermien beobachtet. Da die Rate der markierten Spermien am 22. Tag dem Kontrollwert entsprach, wurde dieser Zeitpunkt für die Aneuploidie-Untersuchung gewählt. Aneuploidie-Induktion wurde mit dieser Dosis nicht beobachtet, jedoch mit der niedrigeren Dosis von 1000 mg/kg. Es ist möglich, dass ein zu früher Zeitpunkt der Spermengewinnung für die hohe Dosis gewählt wurde. Nach Genistein-Behandlung konnte kein verzögernder Effekt auf die meiotische Teilung beobachtet werden. Für Genistein ergab sich ein ähnlicher Kurvenverlauf im Vergleich zur Kontrollgruppe, ohne signifikanten Unterschied. Daher wurden die Aneuploidie-Untersuchungen an Spermien nach 22 Tagen durchgeführt.

#### **5.4 Untersuchungen zur Aneuploidie-Induktion an Spermien der Maus**

Die Induktion von Aneuploidien durch Chemikalien wurde mittels der Dreifarben-FISH nach Schmid et al. (1999) mit chromosomenspezifischen DNA-Sonden für die Chromosomen X, Y und 8 an Spermien der Maus untersucht. Durch die Auswahl der chromosomenspezifischen DNA-Sonden war es außerdem möglich, zwischen der Induktion diploider und disomer Spermien zu unterscheiden. Ein disomes Spermium enthält insgesamt drei Signale, ein diploides Spermium immer vier Signale.

Für die Untersuchungen wurden ausschließlich junge männliche Mäuse eingesetzt, da eine altersabhängige Zunahme von Aneuploidien in den Spermien der Mäuse nicht ausgeschlossen werden kann. Hinweise darauf lieferten entsprechende FISH-Analysen an menschlichen Spermien (Griffin et al., 1995; Robbins et al., 1995). Für die Studie zur Untersuchung der Aneuploidie-Induktion in murinen Spermien wurden Mäuse mit drei verschiedenen Dosierungen der jeweiligen Testsubstanz behandelt. Die Dosierungen wurden so gewählt, dass sie nahe der maximal tolerierbaren Grenze lagen.

---

Dabei handelte es sich um einmalige Gaben. Zusätzlich wurde jeweils eine fraktionierte Behandlung mit einer geringeren Dosierung an fünf aufeinander folgenden Tagen durchgeführt, um das Zeitfenster, in dem die Spermien der Testsubstanz ausgesetzt sind zu erweitern und so die Möglichkeit zu erhöhen, geschädigte Spermien im Nebenhoden zu entdecken.

#### 5.4.1 Albendazol

Die Behandlung von Mäusen mit Albendazol hatte keinen Einfluss auf die Häufigkeit diploider Spermien. Bei einer Behandlung mit 1000 mg/kg konnte eine signifikante Erhöhung ( $p = 0,05$ ) disomer Spermien beobachtet werden, nicht jedoch nach der Behandlung mit 2500 mg/kg. Ebenfalls zeigte sich bei der fraktionierten Behandlung mit 100 mg/kg an fünf aufeinander folgenden Tagen keine Induktion von Aneuploidien.

Trotz der in anderen Studien nachgewiesenen hemmenden Wirkung von Albendazol auf den Spindelapparat konnte mit dem Spermien-FISH-Assay kein eindeutig aneugener Effekt beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung für die Befunde könnte sein, dass eine Dosis von 2500 mg/kg Albendazol die Spermatozyten so stark geschädigt hat, dass sie nicht bis zur Reifung im Nebenhoden überlebten, sondern zur Apoptose übergingen und somit durch den Spermien-FISH-Assay nicht erfasst werden konnten. Es ist auch möglich, dass die höhere Albendazol-Dosis den Ablauf der meiotischen Teilungen sehr stark verzögert hat, so dass die während der Meiose exponierten Spermatozyten erst zu einem späteren Zeitpunkt, vermutlich nach 24 Tagen, als reife Spermien in den Nebenhoden gelangten. Dafür spräche der positive Befund im Aneuploidie-Assay mit der niedrigeren Dosierung, wenn man davon ausgeht, dass sie keine Meiose-Verzögerung verursachte. Eine Klärung dieser Möglichkeiten hätte nur durch weitere Experimente herbeigeführt werden können, die sich aus zeitlichen Gründen verboten.

Die hier dargestellten Ergebnisse geben kein endgültiges Bild des aneugenen Potentials von Albendazol. Auch andere Substanzen lieferten in den unterschiedlichen Testsystemen zur Erkennung von Aneuploidie-Induktion widersprüchliche Ergebnisse. Diese Tatsache macht deutlich, dass nicht nur ein Testsystem zur Erkennung einer aneugenen Wirkung führt, sondern dass eine Reihe von verschiedenen Testsystemen – eine Testbatterie - erforderlich ist.

---

#### 5.4.2 Genistein

Nach einmaliger oder mehrmaliger Behandlung von Mäusen mit Genistein konnte keine Erhöhung der Rate aneuploider Spermien beobachtet werden. Diese Ergebnisse entsprechen dem Gesamtbild der bisherigen Befunde für Geni von numerischen Chromosomenveränderungen durch Genistein, auch wenn seine Topoisomerase II-hemmende Wirkung den Verdacht nahe legt. Der negative Befund mit dem Spermien-FISH-Assay erlaubt aber auch hier sicherlich kein Stein. Die publizierten Daten geben wenig Hinweise auf ein Potential zur Auslösung einer endgültigen Entscheidung, sondern ist nur ein weiterer Hinweis auf die Erstellung eines Gesamtbildes.

### **5.5 Schlussfolgerung und Ausblick**

Die vorliegenden Untersuchungen haben die Datenbank für den Spermien-FISH-Assay erweitert. Zusammen mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wurden bisher 14 Chemikalien mit dem Spermien-FISH-Assay untersucht. Damit konnte eine gute Datenbasis für dieses Testsystem geschaffen werden. Eine Zusammenfassung der Daten ist in Tabelle 1 dargestellt. Vier der untersuchten Substanzen - Acrylamid, Genistein, Omeprazol und Taxol - waren negativ, obwohl frühere Untersuchungen oder der Wirkungsmechanismus ein aneugenes Potential nahe legten. Mit einer aneugenischen Gefährdung der männlichen Keimzellen durch diese Chemikalien ist vermutlich nicht zu rechnen. Die zwei Topoisomerase II-hemmenden Verbindungen Etoposid und Merbaron waren eindeutig positiv. Daraus ergibt sich für Patienten mit Chemotherapie durch diese beiden Medikamente eine Gefährdung der Nachkommen, da disome Spermien zu Spontanaborten oder zu Kindern mit numerischen Chromosomenaberrationen führen können. Dasselbe gilt für das Anthelmintikum Trichlorfon, das in einer früheren Arbeit mit dem gehäuften Auftreten von Kindern mit Missbildungen und Down-Syndrom in einem ungarischen Dorf in Zusammenhang gebracht wurde, in dem Fische einer Fischfarm mit Trichlorfon behandelt worden waren (Czeizel et al., 1993). Inzwischen konnte das aneugene Potential von Trichlorfon auch in Oozyten-Kulturen der Maus nachgewiesen werden (Yin et al., 1998). Für Diazepam, den Wirkstoff des Beruhigungsmittels Valium<sup>®</sup>, wurde sowohl in männlichen Mäusen als auch in Männern nach akuter oder chronischer Diazepam-Exposition eine

aneugene Wirkung während der Meiose nachgewiesen (Adler, 2002, Baumgartner et al., 2001a).

**Tab.1:** Zusammenfassung der Ergebnisse des Spermien-FISH Tests mit den bisher getesteten Chemikalien

<b>Chemikalien</b>	<b>Dosierungen</b>	<b>Aneuploidie</b>	<b>Diploidie</b>
Acrylamid	60 mg/kg	-	-
	120 mg/kg	-	-
<b>Albendazol</b>	<b>5x100 mg/kg</b>	-	-
	<b>1000 mg/kg</b>	+	-
	<b>2500 mg/kg</b>	-	-
Carbendazim	500 mg/kg	-	+
	1000 mg/kg	-	-
Colchizin	1,5 mg/kg	-	-
	3 mg/kg	+	-
Diazepam	3 mg/kg	-	-
	75 mg/kg	-	-
	150 mg/kg	-	+
	300 mg/kg	+	+
Etoposid	12,5 mg/kg	-	+
	25 mg/kg	+	+
	50 mg/kg	+	+
<b>Genistein</b>	<b>5x100 mg/kg</b>	-	-
	<b>250 mg/kg</b>	-	-
	<b>500 mg/kg</b>	-	-
Griseofulvin	500 mg/kg	+	-
	1000 mg/kg	+	+
	2000 mg/kg	+	+
Merbaron	15 mg/kg	-	-
	30 mg/kg	-	+
	60 mg/kg	+	+
Omeprazol	150 mg/kg	-	-
	300 mg/kg	-	-
Taxol	50 mg/kg	-	-
Thiabendazol	100 mg/kg	-	-
	300 mg/kg	-	+
Trichlorfon	200 mg/kg	+	-
	300 mg/kg	+	-
	405 mg/kg	+	-
Vinblastin	0,5 mg/kg	-	-
	1 mg/kg	+/-	-
	2 mg/kg	+	-

Schmid et al., 1999; Sun et al., 2000; Adler et al., 2002 ; Attia et al., 2002, eigene Daten fett gedruckt.

---

Das Fungizid Griseofulvin induzierte Aneuploidien in der männlichen Meiose, aber in noch stärkerem Maße in der weiblichen Meiose der Maus (Marchetti et al., 1996; Shi et al., 1999). Zwei der bisher untersuchten Substanzen – das Pestizid Carbendazim und das Anthelmintikum Thiabendazol - induzierten nur diploide Spermien, wodurch vermutlich keine Gefährdung der Nachkommen verursacht wird, weil triploide Embryonen nicht lebensfähig sind. Colchizin und Vinblastin, die klassischen Spindelgifte wurden als positive Kontrollen eingesetzt, dabei erbrachte Vinblastin wie auch in anderen Tests widersprüchliche Ergebnisse, so dass an seiner aneugenen Wirkung in der Meiose Zweifel bestehen (Gassner und Adler, 1995).

Die vorliegenden Untersuchungen mit Albendazol legen eine aneugene Wirkung in der männlichen Meiose nahe, jedoch sind weitere Untersuchungen notwendig, um den positiven Befund bei der niedrigeren Dosierung zu bestätigen.

Der Spermien-FISH-Assay ist ein relativ einfacher Aneuploidie-Test in männlichen Keimzellen, der allerdings zeitraubende mikroskopische Auswertungen erfordert. Ansätze zur automatischen Auswertung der Fluoreszenzsignale sind vielversprechend (Baumgartner et al., 2001b). Der Test könnte in die internationalen Richtlinien zur Testung von Chemikalien aufgenommen werden, aber in einem Stufenmodell der Aneuploidie-Testung müsste er am Ende der Testbatterie stehen, um zu klären, ob Chemikalien mit aneugener Wirkung *in vitro* und *in vivo* in somatischen Zellen, auch in Keimzellen wirksam sind.

---

## 6 Zusammenfassung

Aneuploidien oder numerische Chromosomenaberrationen sind charakterisiert durch eine Abweichung des normalen diploiden (somatische Zellen) oder haploiden (Keimzellen) Chromosomensatzes und zählen zu den häufigsten chromosomalen Aberrationen in der menschlichen Population; um die 50 % aller spontanen Aborte sind aneuploid, die Mehrzahl darunter Trisomien. Nur wenige Aneuploidien überleben bis zur Geburt und sind meist mit kongenitalen Missbildungen wie körperliche und mentale Retardierung verknüpft. Ebenso hat Aneuploidie in somatischen Zellen ernsthafte Konsequenzen. Als Folge sind neben dem Zelltod die Entwicklung von Tumoren zu nennen.

Verschiedene Chemikalien aus Umwelt und Medizin sind in der Lage, Aneuploidien oder Polyploidie durch Wechselwirkungen mit Komponenten des Spindelapparates der Zelle zu verursachen. Um die Identifizierung solcher Substanzen zu ermöglichen, wurde in den vergangenen Jahren mit Hilfe der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung ein neues Testsystem für verschiedene Spezies, darunter die Maus, entwickelt. Die Mehrfarben-FISH an Spermien der Maus verwendet chromosomenspezifische DNA-Sonden für die Chromosomen 8, X und Y. Durch die Verwendung mehrerer DNA-Sonden wird die gleichzeitige Detektion von Disomien und Diploidien ermöglicht.

In der vorliegenden Arbeit wurde an zwei Substanzen mittels der Dreifarben-FISH die Fähigkeit zur Induktion numerischer Chromosomenaberrationen untersucht. Das Anthelmintikum Albendazol sowie das Phytoestrogen Genistein gehören aufgrund ihrer biologischen Wirkungsweise zu den möglicherweise aneugen wirkenden Substanzen.

Im Vorfeld der Untersuchungen mit dem Spermien-FISH-Assay wurde zunächst geklärt, ob durch die Behandlung mit den beiden Testsubstanzen eine zeitliche Verzögerung der meiotischen Teilung ausgelöst wurde. Dies ist notwendig zur Bestimmung des optimalen Zeitpunktes für die Gewinnung des Spermienmaterials, da aneugen wirkende Substanzen ebenfalls einen Effekt auf den zeitlichen Ablauf der Meiose aufweisen können. Mit Hilfe des Laser-Scanning Zytometers wurde das Auftreten BrdU-markierter Spermien im Nebenhoden quantitativ erfasst. Bei diesen Untersuchungen zeigte sich für beide Substanzen keine Veränderungen im Auftreten BrdU-positiver Spermien im Vergleich zur Kontrollgruppe. Genistein zeigte einen ähnlichen Kurvenverlauf wie die Kontrollgruppe und Albendazol verzeichnete einen signifikanten Rückgang BrdU-positiver Spermien am Tag 23.

---

Daher wurde der Zeitpunkt zur Gewinnung des Spermienmaterials für beide Testsubstanzen auf 22 Tage nach der Behandlung festgelegt.

Im Spermien-FISH-Assay wurden beide Substanzen in jeweils zwei einmaligen Dosierungen sowie in einer fraktionierten Dosierung getestet. Die fraktionierte Behandlung mit einer geringeren Tagesdosis sollte die Expositionszeit der Testsubstanz auf die Entwicklungsstadien der Spermien erhöhen.

Die Ergebnisse für das Anthelmintikum Albendazol zeigen, dass nach einer Behandlung von Mäusen mit 1000 mg/kg vermehrt hyperhaploide (disome) Spermien induziert wurden. Für eine weitere, höhere Dosierung (2500 mg/kg) und die fraktionierte Behandlung konnten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Außerdem zeigte sich in allen drei Dosierungen kein Einfluss auf die Häufigkeit diploider Spermien.

Die Behandlung mit dem Phytoestrogen Genistein (250 mg/kg, 500 mg/kg und 5x100 mg/kg) induzierte weder vermehrt diploide noch disome Spermien.

Aufgrund der unerwarteten negativen Ergebnisse im Spermien Test wurden beide Substanzen zusätzlich in einem *in vitro* Testsystem auf ihre Wirksamkeit untersucht. Auch hier ergab sich für Genistein kein positiver Effekt. Lediglich ein geringer Anstieg von Zellen in der Metaphase mit gleichzeitigem Rückgang des Anteils von Ana-Telophasen deutete auf einen leichten Metaphaseblock. Im Gegensatz dazu erwies sich Albendazol als wirksames Spindelgift in V79-Zellen. Das vermehrte Auftreten von Zellen mit C-Mitosen sowie ein gleichzeitiger Rückgang von Zellen in der Ana-Telophase waren zu verzeichnen. Dieser Befund beweist, dass das in den Spermien-Untersuchungen verwendete Albendazol wirksam war.

---

## 7 Summary

### 7.1 Molecular cytogenetic analyses to detect aneugenic effects in mouse male germ cells induced by albendazole and genistein

Aneuploidy, or numerical chromosome aberrations, are characterized by a deviation of the normal diploid (somatic cells) or haploid (germ cells) chromosome number. It is the most common class of chromosome aberrations in the human population; around 50 % of all spontaneous abortions are aneuploid, most of which are trisomic. Only a few aneuploidies survive up till birth and this condition is usually linked with congenital malformations such as physical and mental retardation. Likewise, aneuploidy in somatic cells has serious consequences such as cell death and the development of tumors.

Chemicals in the environment and for medicinal purposes are able to induce aneuploidy or polyploidy by interacting with components of the spindle apparatus of the cell. In order to identify such substances, a new test system using the fluorescence *in situ* hybridization (FISH) technique for different species, including the mouse, was developed in the past years. The multicolour FISH with murine sperm uses chromosome-specific DNA-probes for the chromosome 8, X and Y. By using a combination of several DNA-probes, simultaneous detection of disomy and diploidy is possible.

In the present work, two substances were examined for the induction of numerical chromosome aberrations by means of the three-colour FISH. The anthelmintic albendazole as well as the phytoestrogen genistein belong to the suspected aneugenic chemicals due to their biological effect. Prior to investigations with the sperm-FISH assay, the effect of treatment with these two test chemicals on the timing of meiotic division was determined. This was necessary in order to select the appropriate sampling time for sperm from the epididymides since aneugenic substances can delay timing of meiosis. With the aid of the laser scanning cytometer, the appearance of BrdU- labeled sperm in the cauda epididymides was determined quantitatively. In these investigations, no differences between chemicals were observed in the frequency of BrdU-positive sperm in both control and treated groups. No significant difference was found between genistein-treated and control sperm whereas albendazole showed a significant decrease in BrdU-positive sperm on day 23. Therefore, for both chemicals, a sampling time of 22 days after treatment was chosen for collection of the sperm.

In the sperm-FISH assay, the same amount of both substances was tested by administering either two different single doses or multiple doses. The multiple treatment with a smaller daily dose should increase the exposition time of the test substance on the different development stages of the sperm.

The results for the anthelmintic albendazole showed that after treatment of mice with 1,000 mg/kg an increase in hyperhaploid (disomic) sperm was induced. At a further, higher dosage (2,500 mg/kg) and the multiple treatment, no significant differences were observed, compared to the controls. Furthermore, no influence on the frequency of diploid sperm was shown for all three doses.

The treatment with the phytoestrogen genistein (250 mg/kg, 500 mg/kg and 5x100 mg/kg) induced neither an increase in diploid nor disomic sperm.

Due to the unexpected negative results in the sperm-FISH assay, the effectiveness of both substances was examined in an *in vitro* test. No positive effect was seen after administration of genistein. However, only a small increase of cells in the metaphase with simultaneous decrease of the proportion of ana-telophases pointed to a slight metaphase block. In contrast, albendazole proved to be an effective spindle poison in V79 cells. The increase of cells with c-mitoses as well as a simultaneous decrease of cells in the ana-telophase were observed. These findings prove that albendazol was effective causing aneuploidy in the sperm FISH assay.

---

## 8 Literaturverzeichnis

**Adams, I.R., Kilmartin, J.V. (2000).** Spindle pole body duplication: a model for centrosome duplication? *Trends in Cell Biology*. **10**: 329-335

**Adler, I-D. (1993).** Synopsis of the *in vivo* results obtained with the 10 known or suspected aneugens tested in the CEC collaborative study. *Mutation Research*. **287**: 131-137

**Adler, I-D. (1996).** Comparison of the duration of spermatogenesis between male rodents and humans. *Mutation Research*. **352**: 169-172

**Adler, I-D., Schmid, T.E., Baumgartner, A. (2002).** Induction of aneuploidy in male mouse germ cells detected by the sperm-FISH assay: a review of the present data base. *Mutation Research*. **504**: 173-182

**Adlerkreutz, H. (1995).** Phytoestrogens: Epidemiology and a possible role in cancer protection. *Environmental Health Perspectives*. **103**: 103-112

**Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M., Fukami, Y. (1987).** Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *The Journal of Biological Chemistry*. **262** (12): 5592-5595

**Anderson, D., Dobrzynska, M.M., Basaran, N. (1997).** Effect of various genotoxins and reproductive toxins in human lymphocytes and sperm in the comet assay. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*. **17**: 29-43

**Ashworth, A., Rastan, S., Lovell-Badge, R., Kay, G. (1991).** X-chromosome inactivation explains the difference in viability of XO humans and mice. *Nature*. **351** (6325): 406-408

**Attia, S.M., Schmid, T.E., Badary, O.A., Hamada, F.M., Adler, I-D. (2002).** Molecular cytogenetic analysis in mouse sperm of chemically induced aneuploidy: studies with topoisomerase II inhibitors. *Mutation Research*. **520**: 1-13

---

**Ault, J.G., Rieder, C.L. (1994).** Centrosome and kinetochore movement during mitosis. *Current Opinion in Cell Biology*. **6** (1): 41-49

**Avila, J. (1990).** Microtubule dynamics. The FASEB (Federation of American Societies for Experimental Biology) Journal. **4**: 3284-3290

**Barnes, S. (1995).** Effects of genistein on *in vitro* and *in vivo* models of cancer. *Journal of Nutrition*. **125**: 777S-783S

**Barrowman, M.M., Marrner, S.E., Bogan, J.A. (1984).** The binding and subsequent inhibition of tubulin polymerization in *Ascaris suum* (*in vitro*) by benzimidazole anthelmintics. *Biochemical Pharmacology*. **33**: 3037-3040

**Bartholomew, R.M., Ryan, D.S. (1980).** Lack of mutagenicity of some phytoestrogens in the Salmonella/ mammalian microsome assay. *Mutation Research*. **78**: 317-321

**Baumgartner, A., Schmid, T.E., Schuetz, C.G., Adler, I.-D. (2001a).** Detection of aneuploidy in rodent and human sperm by multicolor FISH after chronic exposure to diazepam. *Mutation Research*. **490**: 11-19

**Baumgartner, A., Schmid, T.E., Maerz, H.K., Adler, I.-D., Tarnok, A., Nuesse, M. (2001b).** Automated evaluation of frequencies of aneuploid sperm by laser scanning cytometry (LSC). *Cytometry* . **44**: 156-160

**Bennetts, H.W., Underwood, E.J., Shier, F.L. (1946).** A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia. *Australian Journal of Agriculture Research*. **22**: 131-138

**Bishop, C.E., Hatat, D. (1987).** Molecular cloning and sequence analysis of a mouse Y chromosome RNA transcript expressed in the testis. *Nucleic Acids Research*. **15**: 2959-2969

**Bond, D.J. (1987).** Mechanisms of aneuploid induction. *Mutation Research*. **181**: 257-266

---

**Boos, G., Stopper, H. (2000).** Genotoxicity of several clinically used topoisomerase II inhibitors. *Toxicology Letters*. **116**: 7-16

**Boyle, A.L., Ward, D.C. (1992).** Isolation and initial characterization of a large repeat sequence element specific to mouse chromosome 8. *Genomics*. **12**: 517-525

**Braun, R.E. (1998).** Every sperm is sacred- or is it? *Nature Genetics*. **18**: 202-204

**Brinkley, B.R., Stubblefield, E. (1966).** The fine structure of the kinetochore of a mammalian cell *in vitro*. *Chromosoma*. **19** (1): 28-43

**Brinkley, B.R. (2001).** Managing the centrosome numbers game: from chaos to stability in cancer cell divisions. *Trends in Cell Biology*. **11** (1): 18-21

**Bryant, C., Bennet, E.M. (1983).** Observations on the fumarate reductase system in *Haemonchus contortus* and their relevance to anthelmintic resistance and to strain variations of energy metabolism. *Molecular and Biochemical Parasitology*. **7** (4): 281-292

**Buselmeier, W., Bacchus, C., Grohe, G., Winking, H. (1988).** Behavioural and developmental abnormalities in mouse trisomy 19: an animal model of mental retardation induced by chromosome imbalance. *Teratology*. **37** (2): 167-174

**Campbell, N.A., Markl J. (Hrsg.) (1997).** *Biologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford

**Cassimeris, L. (1999).** Accessory protein regulation of microtubule dynamics throughout the cell cycle. *Current Opinion in Cell Biology*. **11** (1): 134-141

**Cattanach, B.M., Pollard, C.E. (1969).** An XYY sex-chromosome constitution in the mouse. *Cytogenetics*. **8** (1): 80-86

**Champion, M.D., Hawley, R.S. (2002).** Playing for half the deck: the molecular biology of meiosis. *Nature Cell Biology*. **4** (10): 550-556

---

**Choo, K.H. (2000).** Centromerization. *Trends in Cell Biology*. **10** (5): 182-188

**Compton, D.A. (2000).** Spindle assembly in animal cells. *Annual Review of Biochemistry*. **69**: 95-114

**Corbett, A.H., Osheroff, N. (1993).** When good enzymes go bad: conversion of topoisomerase II to a cellular toxin by antineoplastic drugs. *Chemical Research in Toxicology*. **6** (5): 585-597

**Czeizel, A.E., Elek, C., Gony, S., Metneki, J. Nemes, E. Reis, A., Sperling, K., Timar, L., Tusnady, G., Viragh, Z. (1993).** Environmental trichlorfon and cluster of congenital abnormalities. *Lancet*. **341**: 539-542

**Darnell, J., Lodish, H., Baltimore, D. (1986).** *Molecular Cell Biology*. 1.Auflage, New York. Scientific American Books

**Darzynkiewicz, Z., Bedner, E., Li, X., Gorczyca, W., Melamed, M.R. (1999).** Laser-scanning cytometry: a new instrumentation with many applications. *Experimental Cell Research*. **249**: 1-12

**Delatour, P., Parish, R.C., Gyurik, R.J. (1981).** Albendazole: A comparison of relay embryotoxicity with embryotoxicity of individual metabolites. *Annales de Recherches Veterinaire*. **12**: 159-167

**Dellarco, V.L., Mavournin, K.H., Tice, R.R. (1985).** Aneuploidy and health risk assessment: current status and future directions. *Environmental Mutagenesis*. **7** (3): 405-424

**de Stoppelaar, J.M., de Roos, B., Mohn, G.R., Hoebee, B. (1997).** Analysis of DES-induced micronuclei in binucleated rat fibroblasts : comparison between FISH with a rat satellite I probe and immunocytochemical staining with CREST serum. *Mutation Research*. **392** (1-2): 139-149

---

**Disteche, C.M., Tantravahi, U., Gandy, S., Eisenhard, M., Adler, D., Kunkel, L.M. (1985).** Isolation and characterization of two repetitive DNA fragments located near the centromere of the mouse X chromosome. *Cytogenetic Cell Genetics*. **39**: 262-268

**Duesberg, P. (1999).** Are centrosomes or aneuploidy the key to cancer? *Science*. **284** (5423): 2091-2092

**Eastmond, D.A., Pinkel, D. (1990).** Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in situ* hybridization with centrosome-specific DNA-probes. *Mutation Research*. **234** (5): 303-318

**Eichenlaub-Ritter, U. (1994).** Mechanisms of nondisjunction in mammalian meiosis. *Current Topics in Developmental Biology*. **29**: 281-324

**Eichenlaub-Ritter, U., Baart, E., Yin, H., Betzendahl, I. (1996).** Mechanisms of spontaneous and chemically-induced aneuploidy in mammalian oogenesis: basis of sex-specific differences in response to aneugens and the necessity for further tests. *Mutation Research*. **372** (2): 279-294

**Fallah, M., Mirarab, A., Jamalian, F., Ghaderi, A. (2002).** Evaluation of two years of mass chemotherapy against ascariasis in Hamadan, Islamic Republic of Iran. *Bulletin of the World Health Organization*. **80**: 399-402

**Ford, D.K., Yerganian, G. (1958).** Observations on the chromosomes of Chinese hamster cells in tissue culture. *Journal of the National Cancer Institute*. **21**: 393-425

**Friedman, P.A., Platzer, E.G. (1978).** Interaction of anthelmintic benzimidazole and benzimidazole derivatives with bovine brain tubulin. *Biochemical and Biophysical Acta*. **544**: 605-614

**Fritz, W.A., Coward, L., Wang, J., Lamartiniere, C.A. (1998).** Dietary genistein: perinatal mammary cancer prevention, bioavailability and toxicity testing in the rat. *Carcinogenesis*. **19** (12): 2151-2158

---

**Fuentes-Mascorro, G., Serrano, H., Rosado, A. (2000).** Sperm Chromatin. Archives of Andrology. **45**: 215-225

**Gardner, R.D., Burke, D.J. (2000).** The spindle checkpoint: two transitions, two pathways. Trends in Cell Biology. **10**: 154-158

**Gassner, P., Adler, I.-D. (1995).** Analysis of chemically induced spindle aberrations in male mouse germ cells: Comparison of differential and immunofluorescent staining procedures. Mutagenesis. **10**: 243-252

**Glatt, H., Gemperlein, I., Turchi, G., Heinritz, H., Doehmer, J., Oesch, F. (1987).** Search for cell culture systems with diverse xenobiotic-metabolizing activities and their use in toxicologic studies. Molecular Toxicology. **1** (4): 313-334

**Göggelmann, W., Bauchinger, M., Kulka, U., Schmid, E. (1996).** Genotoxicity of 4-chloro-*o*-toluidine in *Salmonella typhimurium*, human lymphocytes and V79 cells. Mutation Research. **370**: 37-47

**Griffin, D.K., Abruzzo, M.A., Millie, E.A., Shean, L.A., Feingold, E., Sherman, S.L., Hassold, T.J. (1995).** Non-disjunction in human sperm: Evidence for effect of increasing paternal age. Human Molecular Genetics. **4**: 2227-2232

**Gropp, A. (1982).** Value of an animal model for trisomy. Virchows Archiv. **395**: 117-131

**Gull, K., Dawson, P.J., Davis, C., Byard, E.H. (1986).** Microtubules as target organelles for benzimidazole anthelmintic chemotherapy. Biochemical Society Transactions. **15**: 59-60

**Gyurik, R.J., Chow, A.W., Zaber, B., Brunner, E.L., Miller, J.A., Villani, A.J., Petka, A., Parish, R.C. (1981).** Metabolism of albendazole in cattle, sheep, rats and mice. Drug Metabolism and Disposition. **9**: 503-508

**Handel, M.A. (1987).** Genetic control of spermatogenesis in mice. Results and Problems in Cell Differentiation, Vol. 15, Springer-Verlag, Berlin: S. 1-62

---

**Hassold, T., Warburton, D., Kline, J., Stein, Z. (1984).** The relationship of maternal age and trisomy among trisomic spontaneous abortions. *American Journal of Human Genetics*. **36**: 1349-1356

**Hassold, T.J., Hunt, P.A. (1984).** Trisomy in man. *Annual Review of Genetics*. **18**: 69-97

**Hassold, T.J., Hunt, P.A. (2001).** To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nature Reviews Genetics*. **2**: 280-291

**Heyting, C. (1996).** Synaptonemal complexes: structure and function. *Current Opinion in Cell Biology*. **8**: 389-396

**Hirayama, T. (1979).** Epidemiology of prostate cancer with special reference to the role of diet. *National Cancer Institute Monography*: 149-155

**Hongell, K., Gropp, A. (1982).** Trisomy 13 in the mouse. *Teratology*. **26**: 95-104

**Idris, M.A., Shaban, M.A.A., Fatahallah, M. (2001).** Effective control of hookworm infection in school children from Dhofar, Sultanate of Omar: a four-year experience with albendazole mass chemotherapy. *Acta Tropica*. **80**: 139-143

**Ireland, C.M., Gull, K., Gutteridge, W.E., Pogson, C.I. (1979).** The interaction of benzimidazole carbamates with mammalian microtubule protein. *Biochemical Pharmacology*. **28**: 2680-2682

**John, H.A., Birnstiel, M.L., Jones, K.W. (1969).** RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature*. **223**: 583-587

**Kallio, M, Lähdetie, J. (1993).** Analysis of micronuclei induced in mouse early spermatids by mitomycin C, vinblastine sulfate or etoposide using fluorescence *in situ* hybridization. *Mutagenesis*. **8**: 561-567

---

**Kallio, M., Lähdetie, J. (1996).** Fragmentation of centromeric DNA and prevention of homologous chromosome separation in male mouse meiosis *in vivo* by the topoisomerase II inhibitor etoposide. *Mutagenesis*. **11**: 435-443

**Kirsch-Volders, M., Elhajouji, A., Cundari, E., van Hummelen, P. (1997).** The *in vitro* micronucleus tests: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome loss and non-disjunction. *Mutation Research*. **392**: 19-30

**Kirsch-Volders, M., Vanhauwaert, A., De Boeck, M., Decordier, I. (2002).** Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. *Mutation Research*. **504** (1-2): 137-148

**Kulling, S.E., Metzler, M. (1997).** Induction of micronuclei, DNA strand breaks and HPRT mutations in cultured Chinese hamster V79 cells by the phytoestrogen coumestrol. *Food and Chemical Toxicology*. **35**: 605-613

**Kulling, S.E., Rosenberg, B., Jacobs, E., Metzler, M. (1999).** The phytoestrogens coumestrol and genistein induce structural chromosomal aberrations in cultured human peripheral blood lymphocytes. *Archives of Toxicology* **73**: 50-54

**Kulling, S.E., Lehmann, L., Metzler, M. (2002).** Oxidative metabolism and genotoxic potential of major isoflavone phytoestrogens. *Journal of Chromatography B*. **777**: 211-218

**Kurzer, M.S., Xu, X. (1997).** Dietary phytoestrogens. *Annual Review of Nutrition*. **17**: 353-381

**Lacey, E. (1990).** Mode of action of benzimidazoles. *Parasitology Today*. **6**: 112-115

**Lacey, E. und Watson, T.R. (1985).** Structure-activity relationships of benzimidazole carbamates as inhibitors of mammalian tubulin, *in vitro*. *Biochemical Pharmacology*. **34**: 1073-1077

---

**Lacey, E. (1988).** The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *International Journal for Parasitology*.

**18:** 855-936

**Lacey, E. and Gill, J.H. (1994).** Biochemistry of benzimidazole resistance. *Acta Tropica*. **56:** 245-262

**Leopardi, P., Zijno, A., Bassani, B., Pacchierotti, F. (1993).** *In vivo* studies on chemically induced aneuploidy in mouse somatic and germinal cells. *Mutation Research*. **287 (1):** 119-130

**Liang, J.C., Brinkley, B.R. (1985).** Chemical probes and possible targets for the induction of aneuploidy. *Basic Life Science*. **36:** 491-505

**Lowe, X.R., de Stoppelaar, J.M., Bishop, J., Cassel, M., Hoebee, B., Moore II, D., Wyrobek, A.J. (1998).** Epididymal sperm aneuploidies in three strains of rats detected by multicolor fluorescence *in situ* hybridization. *Environmental Molecular Mutagenesis*. **31:** 125-132

**Mailhes, S., Aadema, M. (1992).** Benomyl-induced aneuploidy in mouse oocytes. *Mutagenesis*. **7:** 303-309

**Mantovani, A. (1992).** The role of multigeneration studies in safety of residues of veterinary drugs and additives. *Annali dell'Istituto superiore di sanita*. **28 (4):** 429-435

**Marchetti, F., Mailhes, J.B., Bairnsfather, L., Nandy, I., London, S.S. (1996).** Dose-response study and threshold estimation of griseofulvin-induced aneuploidy during female mouse meiosis II and II. *Mutagenesis*. **11:** 195-200

**Markovits, J., Linassier, C., Fossé, P., Couprie, J., Pierre J., Jacquemin-Sablon, A., Saucier, J-M., Le Pecq, J-B., Larsen, A. K. (1989).** Inhibitory effects of the tyrosine kinase inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase II. *Cancer Research*. **49:** 5111-5117

---

**Matsukawa, Y., Nobuyuki, M., Sakai, T., Satomi, Y., Yoshida, M., Matsumoto, K., Nishino, H., Aoike, A. (1993).** Genistein arrests cell cycle progression at G<sub>2</sub>-M. *Cancer Research*. **53**: 1328-1331

**Mazur, W. (1998).** Phytoestrogen content in foods. *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism*. **12** (4): 729-742

**Metzler, M., Pfeiffer, E. (1995).** Effects of estrogens on microtubule polymerization *in vitro*: correlation with estrogenicity. *Environmental Health Perspectives*. **103**: 21-22

**Miller, B.M., Adler, I-D. (1992).** Aneuploidy induction in mouse spermatocytes. *Mutagenesis*. **7** (1): 69-76

**Miller, J.M., Boyd, H.A., Ostrowski, S.R., Cookson, S.T., Parrise, M.E., Gonzaga, P.S., Addiss, D.G., Wilson, M., Nguyen-Dinh, P., Wahlquist, S.P., Weld, L.H., Wainwright, R.B., Gushulak, B.D., Cetron, M.S. (2000).** Malaria, intestinal parasites, and schistosomiasis among Barawan Somali refugees resettling to the United States: a strategy to reduce morbidity and decrease the risk of imported infections. *American Journal of Tropical Medical Hygiene*. **62** (1): 115-121

**Moreno, M.S., Barrett, J. (1979).** Monoamine oxidase in adult *Hymenolepis diminuta* (Ceastoda). *Parasitology*. **78** (1): 1-5

**Morris, S.M., Chen, J.J., Domon, O.E., McGarrity, L.J., Bishop, M.E., Manjanatha, M.G., Casciano, D.A. (1998).** *p53*, mutations, and apoptosis in genistein-exposed human lymphoblastoid cells. *Mutation Research*. **405**: 41-56

**Mountain, V., Compton, D.A. (2000).** Dissecting the role of molecular motors in the mitotic spindle. *The Anatomical Record (New Anat.)*. **261**: 14-24

**Oakberg, E.F. (1956).** Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cell cycle of the seminiferous epithelium. *American Journal of Anatomy*. **99**: 507-516

---

**Önfelt, A. (1986).** Mechanistic aspects on chemical induction of spindle disturbances and abnormal chromosome numbers. *Mutation Research*. **168**: 249-300

**Östergren, G. (1944).** Colchicine mitosis, chromosome contraction, narcosis and protein chain folding. *Hereditas*. **30**: 429-467

**Oshimura, M., Barrett, J.C. (1986).** Chemically induced aneuploidy in mammalian cells: mechanisms and biological significance in cancer. *Environmental Mutagenesis*. **8** (1): 129-159

**Pardue, M.L., Gall, J.G. (1970).** Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Science*. **168**: 1356-1358

**Parry, J.M., Sors, A. (1993).** The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community Aneuploidy Project. *Mutation Research*. **287**: 3-15

**Parry, J.M., Parry, E.M., Bourner, R., Doherty, A., Ellard, S., O'Donovan, J., Hoebee, B., de Stoppelaar, J.M., Mohn, G.R., Önfelt, A., Renglin, A., Schultz, N., Söderpalm-Berndes, C., Jensen, K.G., Kirsch-Volders, M., Elhajouji, A., Van Hummelen, P., Degrassi, F., Antoccia, A., Cimini, D., Izzo, M., Tanzarella, C., Adler, I-D., Kliesch, U., Schriever-Schwemmer, G., Gasser, P., Crebelli, R., Carere, A., Andreoli, C., Benigni, R., Leopardi, P., Marcon, F., Zinjo, Z., Natarajan, A.T., Boei, J.J.W.A., Kappas, A., Voutsinas, G., Zarani, F.E., Patrinely, A., Pacchierotti, F., Tiveron, C., Hess, P. (1996).** The detection and evaluation of aneugenic chemicals. *Mutation Research*. **353**: 11-46

**Pletcher, M.T., Wiltshire, T., Cabin, D.E., Villanueva, M., Reeves, R.H. (2001).** Use of comparative physical and sequence mapping to annotate mouse chromosome 16 and human chromosome 21. *Genomics*. **74**: 45-54

**Polkowski, K., Mazurek, A.P. (2000).** Biological properties of genistein. A review of *in vitro* and *in vivo* data. *Acta Poloniae Pharmaceutica*. **57** (2): 135-155

---

**Ramírez, T., Benítez-Bribiesca, L., Ostrosky-Wegman, P., Herrera, L.A. (2001).** *In vitro* effects of albendazole and its metabolites on cell proliferation kinetics and micronuclei frequency of stimulated human lymphocytes. *Archives of Medical Research.* **32**: 119-122

**Record, I.R., Jannes, M., Dreosti, I.E., King, R.A. (1995).** Induction of micronucleus formation in mouse splenocytes by the soy isoflavone genistein *in vitro* but not *in vivo*. *Food and Chemical Toxicology.* **33** (11): 919-922

**Richtsmeier, J.T., Zumwalt, A., Carlson, E.J., Epstein, C.J., Reeves, R.H. (2002).** Craniofacial phenotypes in segmentally trisomic mouse models for down syndrome. *American Journal of Medical Genetics.* **107**: 317-324

**Rieder, C.L., Cole, R.W., Khodjakov, A., Sluder, G. (1995).** The checkpoint delaying anaphase in response to chromosome monoorientation is mediated by an inhibitory signal produced by unattached kinetochores. *The Journal of Cell Biology.* **130** (4): 941-948

**Rieger, R., Michaelis, A., Green, M.M. (1976).** *Glossary of Genetics and Cytogenetics.* Gustav Fischer Verlag, Jena. 4. Auflage: S. 434

**Robbins, W.A., Baulch, J.E., Moore II, D., Weier, H-U., Blakey, D., Wyrobek, A.J. (1995).** Three-probe fluorescence *in situ* hybridization to assess chromosome X, Y, 8 aneuploidy in sperm of 14 men from two healthy groups: evidence for a paternal age effect on sperm aneuploidy. *Reproduction, Fertility and Development.* **7**: 799-809

**Rolin, S., Suohaili-El Amri, H., Batt, A-M., Levy, M., Bargel, D., Siest, G. (1989).** Study of the *in vitro* bioactivation of albendazole in human liver microsomes and hepatoma cell lines. *Cell Biology and Toxicology.* **5**: 1-14

**Sachs, L. (1984).** *Angewandte Statistik.* 6. Auflage. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg

**Schiebel, E. (2000).** Gamma-tubulin complexes: binding to the chromosome, regulation and microtubule nucleation. *Current Opinions of Cell Biology.* **12** (1): 113-118

---

**Schmid, T.E., Xu, W., Adler, I-D. (1999).** Detection of aneuploidy by multicolor FISH in mouse sperm after *in vivo* treatment with acrylamide, colchicine diazepam or thiabendazole. *Mutagenesis*. **14**: 173-179

**Schmid, T.E., Attia, S., Baumgartner, A., Nuesse, M., Adler, I-D. (2001).** Effect of chemicals on the duration of male meiosis in mice detected with laser scanning cytometry. *Mutagenesis*. **16**: 339-343

**Schriever-Schwemmer, G., Adler, I-D. (1994).** Differentiation of micronuclei in mouse bone marrow cells: a comparison between CREST staining and fluorescent *in situ* hybridization with centromeric and telomeric DNA probes. *Mutagenesis*. **9** (4): 333-340

**Seiler, J.P. (1976).** The mutagenicity of benzimidazole and benzimidazole derivatives VI. Cytogenetic effects of benzimidazole derivatives in the bone marrow of the mouse and the Chinese hamster. *Mutation Research*. **40**: 339-348

**Sen, S. (2000).** Aneuploidy and cancer. *Current Opinion in Oncology*. **12**: 82-88

**Shi, Q., Schmid, T.E., Adler, I-D. (1999).** Griseofulvin-induced aneuploidy and meiotic delay in male mouse germ cells: detected by using conventional cytogenetics and three-color FISH. *Mutation Research*. **441**: 181-190

**Shimizu, H., Ross, R.K., Bernstein, L., Yatani, R., Henderson, B.E., Mack, T.M. (1991).** Cancers of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angeles County. *British Journal of Cancer* **63**: 963-966

**Solana, H.D., Teruel, M.T., Najle, R., Lanusse, C.E., Rodríguez, J.A. (1998).** The anthelmintic albendazole affects *in vivo* the dynamics and the detyrosination-tyrosination cycle of rat brain microtubules. *Acta physiologica et therapeutica latinoamericana*. **48**:199-205

**Sotelo, J. and Jung, H. (1998).** Pharmacokinetic optimisation of the treatment of neurocysticercosis. *Clinical Pharmacokinetics*. **34**:503-515

---

**Stewart, Z.A., Pietepol, J.A. (2001).** *p53* signaling and cell cycle checkpoints. *Chemical Research in Toxicology*. **14** (3): 243-263

**Sun, F-Y, Schmid, T.E., Schmid, E., Baumgartner, A., Adler, I-D (2000).** Trichlorfon induces spindle disturbances in V79 hamster cells and aneuploidy in male mouse germ cells. *Mutagenesis*. **15**:17-34

**Theodorides, V.J., Gyurik, R.J., Kingsbury, W.D., Parish, R.C. (1975).** Anthelmintic activity against liver flukes, tapeworms, lung and gastrointestinal roundworms. *Experientia*. **32** :702 –703

**Thomas, J.A. (1999).** Diet, micronutrients, and the prostate gland. *Nutrition Review*. **57**: 95-103

**Traganos, F., Ardelt, B., Halko, N., Bruno, S., Darzynkiewicz, Z. (1992).** Effects of genistein on the growth and cell cycle progression of normal human lymphocytes and human leukemic MOLT-4 and HL-60 cells. *Cancer Research*. **52**: 6200-6208

**Van Hooser, A.A., Mancini, M.A., Allis, C.D., Sullivan, K.F., Brinkley, B.R. (1999).** The mammalian centromere: structural domains and the attenuation of chromatin modeling. *The FASEB (Federation of American Societies for Experimental Biology) Journal*. **13** (Suppl.): 216-220

**Venkatesan, P. (1998).** Albendazole. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **41**: 145-147

**Vogel, F., Motulski, A.G. (1997).** *Human genetics*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

**Warr, T.J., Parry, E.M., Parry, J.M. (1993).** A comparison of two *in vitro* mammalian cell cytogenetic assays for the detection of mitotic aneuploidy using 10 known or suspected aneugens. *Mutation Research*. **287** (1): 29-46

---

**Waters, J.C., Cole, R.W., Rieder, C.L. (1993).** The force-producing mechanism for centrosome separation during spindle formation in vertebrates is intrinsic to each aster. *Journal of Cell Biology*. **122** (2): 361-372

**Watts, S.D., Rapson, E.B., Atkins, A.M., Lee, D.L. (1982).** Inhibition of acetylcholinesterase secretion from *Nippostrongylus brasiliensis* by benzimidazole anthelmintics. *Biochemical Pharmacology*. **31** (19): 3035-3040

**Wei, H., Wie, L., Frankel, K., Bowen, R., Barnes, S. (1993).** Inhibition of tumor promotor induced hydrogen peroxide formation *in vitro* and *in vivo* by genistein. *Nutrition Cancer*. **20**: 1-12

**Whittaker, S.G., Faustman, E.M. (1991).** Effects of albendazole and albendazole sulfoxide on cultures of differentiating rodent embryonic cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **109**: 73-84

**Whittaker, S.G., Faustman, E.M. (1992).** Effects of benzimidazole analogs on cultures of differentiating rodent embryonic cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **133**: 144-151

**Wyrobek, A.J., Ahlborn, T., Balhorn, R., Stanker, L., Pinkel, D. (1990).** Fluorescence *in situ* hybridization to Y chromosomes in decondensed sperm. *Molecular Reproduction and Development*. **27**: 200-208

**Wyrobek, A.J., Adler, I-D. (1996).** Detection of aneuploidy in human and rodent sperm using FISH and applications of sperm assays of genetic damage in heritable risk evaluation. *Mutation Research*. **352**: 173-179

**Yamashita, Y., Kawada, S-Z, Nakano, H. (1990).** Induction of mammalian topoisomerase II dependent DNA cleavage by nonintercalative flavonoids, genistein and orobol. *Biochemical Pharmacology*. **39** (4):737-744

---

**Yin, H., Cucurcam, S., Betzendahl, I., Adler, I.-D., Eichenlaub-Ritter, U. (1998).** Trichlorfon exposure, spindle aberrations and nondisjunction in mammalian oocytes. *Chromosoma*. **107**: 514-522

**Zheng, Y., Wong, M.L., Alberts, B., Mitchison, T. (1995).** Nucleation of microtubule assembly by a  $\gamma$ -tubulin-containing ring complex. *Nature*. **378**: 578-583

**Zimmerman, W., Sparks, C.A., Doxsey, S.J. (1999).** Amorphous no longer: the centrosome comes into focus. *Current Opinion in Cell Biology*. **11**: 122-128

## 9 Anhang

### 9.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterial, Kits, Antikörper

#### Chemikalien

Albendazol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ampicillin	GibCo
Biotin-16-dUTP	Roche
Blocking Reagenz	Boehringer
5-Bromo-2'-Deoxyuridin (BrdU)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Colchizin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
4', 6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Digoxigenin-11-dUTP	Roche
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Eisessig	Merck
Ethanol abs. p.a.	Merck
Formamid	Roth
Genistein	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Glykogen (20 mg/ml)	Roche
Isopropanol	Fluka
Lithiumsalz (LIS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Nonidet P40	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Trypanblau (0,4%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Xylol	Merck

#### Verbrauchsmaterialien

Ampuwa <sup>®</sup>	Fresenius
Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM)	Biochrom, Berlin
Fixogum <sup>®</sup>	Marabuwerke, Tamm
Fötales Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin
Objektträger	Roth

---

Phosphat-gepufferte Saline ohne Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> (PBS)	Biochrom, Berlin
Penicillin/ Streptomycin	Biochrom, Berlin
Petrischalen	Greiner, Frickenhausen
Quadriperm <sup>®</sup> -Schalen	Vivascience, Göttingen
Salmon Sperm (10mg/ml)	Boehringer
Trypsin/ EDTA-Lösung	Biochrom, Berlin
Vectashield <sup>®</sup>	Vector Labs, Linearis

### **Kits**

Nick Translations Kit	Invitrogen
Qiagen Plasmid Maxi-Kit	Qiagen

### **Antikörper**

Anti-DIG-FITC made in sheep, lyophilisiert	Roche
Anti-Streptavidin biotinyliert	Vector Labs, Linearis
FITC-Anti-Sheep made in rabbit (RAS)	Vector Labs, Linearis
Cy3-Streptavidin	Dianova
MAS 250-Monoclonal Rat-anti-BrdU	Diagnostic International GmbH
Goat F(ab') <sub>2</sub> Anti-RAT IgG FITC conjugat	Caltag Laboratories

## **9.2 Verwendete Lösungen und Puffer für die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung**

### DTT Lösung

Dithiothreitol	10 mM
Tris-HCl pH 8	0,1 M

### LIS Lösung

3,5-Diiodosalicylat	4 mM
Tris-HCl pH8	0,1 M

Formamid/ 2x SSC Lösung

Formamid	70%; 50%
20x SSC	10 ml
H <sub>2</sub> O Millipore	ad 100 ml

Den pH-Wert mit 1N HCl auf 7,0 einstellen.

PN – Puffer (Phosphat-Nonidet P40 Puffer)

0,1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	4,5 l
0,1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	450 ml
H <sub>2</sub> O Millipore	ad 4,95 ml

Den pH-Wert mit 50 % (w/w) NaOH auf 8,0 einstellen. 0,1 % Nonidet P40 zugeben.

Master Mix (MM 2.1)

Formamid	78,6%
20x SSC	0,5 ml
Dextransulfat	1 g
H <sub>2</sub> O Millipore	ad 7ml

Nach Mischen des Ansatzes für mehrere Stunden auf 70°C erwärmen. Nach Abkühlung wird der pH-Wert mit 1 N HCl auf 7,0 eingestellt.

PNBR

Blocking Reagenz	5 %
Natriumazid	0,02 %
PN – Puffer	ad 10 ml

Durch Erhitzen auf 50-70 °C wird das Reagenz unter Rühren in Lösung gebracht.

Anschließend lässt man die Lösung 30-60 min. stehen und filtriert dann steril. Die Lagerung erfolgt in 1 ml Aliquots bei –20 °C.

20x SSC (steril autoklavieren)

NaCl	3 M
Tri-Natriumcitrat Dihydrat	0,3 M

---

PBS (steril autoklavieren)

NaCl	0,3 M
KCl	10 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	20 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5 mM

Den pH-Wert auf 7,4 einstellen und in 500 ml-Flaschen autoklavieren.

### **9.3 Zellkultur**

S9-Mix für V79 MZ

Zugabe: 0,5 ml/ OT

Ansatz S9-Mix auf Eis

Für 1 ml S9-Mix:

0,5 ml PO<sub>4</sub> – Puffer

0,1 ml MgSO<sub>4</sub>

0,1 ml Na-Isocitrat

0,1 ml NADP

0,2 ml S9 (32,3 mg Protein /ml, RCC-CCR, Roßdorf)

$$\begin{aligned} \Rightarrow & 3,23 \text{ mg Protein} / 0,5 \text{ ml S9-Mix} \\ & = 0,64 \text{ mg Protein /ml Medium im OT} \end{aligned}$$

---

## 10 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Experimentelle Genetik am GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit unter der Leitung von Frau Dr. I.-D. Adler angefertigt.

Ich möchte Frau Dr. Adler für die Überlassung des interessanten Themas, die gute Betreuung und die Unterstützung meiner Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. Jörg Schmidt danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und die Möglichkeit zur Mitarbeit in der Versuchstierzucht und –haltung.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. E. Wolf für die Vertretung dieser Arbeit in der Fakultät bedanken.

Herrn Dr. T. Schmid danke ich für die Einführung in die FISH-Technik.

Für die Unterstützung bei der Zellkultur und bei der Auswertung danke ich Frau Dr. W. Göggelmann und Frau Carola Jacobsen sowie Herrn Prof. E. Schmid.

Bei Frau Isa-Sibylle Otten und Frau Helga Gonda bedanke ich mich für ihre Hilfe im Labor.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Maike Howaldt, Frau Aleksandra Terzic und Frau Angelika Appold, ohne deren Unterstützung und Freundschaft diese Arbeit nahezu nicht möglich gewesen wäre.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der AG Graw, Institut für Entwicklungsgenetik, für gute Nachbarschaft und viele leckere Kuchenrezepte bedanken.

Schließlich Vielen Dank an meine Familie für jegliche Unterstützung in diesen drei Jahren.

---

## 11 Lebenslauf

Tanja Ruthsatz  
Linkstr. 13  
80933 München

Geburtsdatum: 11. Januar 1973  
Geburtsort: Berlin - Schmargendorf  
Eltern: Lothar Ruthsatz  
Karin Ruthsatz, geb. Langerwisch

### Bildungsweg:

1979 – 1985 Grundschole am Eichenwald, Berlin  
1985 – 1992 Lily-Braun-Oberschole (Gymnasium), Berlin  
Mai 1992 Abitur  
1993 – 1998 Studium der Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin  
Oktober 1998 Approbation als Tierärztin  
1998 – 1999 Tätigkeit als Tierärztin in der Kleintierpraxis  
seit 01.10.1999 Wissenschaftliche Hilfskraft in der Abteilung für Vergleichende Medizin, GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Leiter: Prof. Dr. J. Schmidt mit Anfertigung der Dissertation am Institut für Experimentelle Genetik unter der Betreuung von Fr. Dr. I-D. Adler

**So long, and thanks for all the fish!**

(Douglas Adams)