

Projektträgerschaft "Programm Lebensgrundlage Umwelt und ihre Sicherung"

Forschungsbericht FZKA-BWPLUs

**UNTERSUCHUNGEN ZUM MECHANISMUS
FORMALDEHYD-INDUZIERTER MUTATIONEN**

von

G. Speit, O. Merk

Universitätsklinikum Ulm, Abteilung Medizinische Genetik, 89070 Ulm

Förderkennzeichen: PUG U 96 010

Die Arbeiten des Projekts "Umwelt und Gesundheit" wurden mit Mitteln des Landes Baden-
Württemberg gefördert

März 2000

Einleitung

Formaldehyd (FA) gehört zu den wichtigsten Produkten der chemischen Industrie, ist in der Umwelt weit verbreitet und hat große wirtschaftliche, ökologische und medizinische Bedeutung. FA wirkt genotoxisch und steht im Verdacht, ein für den Menschen relevantes Kanzerogen zu sein (IARC, 1995). FA induziert Tumore in der Nasenschleimhaut der Ratte und der Nachweis FA-induzierter DNA-Protein-Crosslinks (DPC) in der Nasenschleimhaut der Ratte dient als Indikator für die Exposition der Zielzellen im Hinblick auf die Risikoabschätzung (CASANOVA et al., 1991; 1994; CONOLLY & ANDERSEN, 1993). Es ist bisher jedoch nicht geklärt, welche Rolle DPC bei der FA-induzierten Mutagenese spielen. Es soll deshalb untersucht werden, welcher Zusammenhang zwischen FA-induzierten DPC und der Entstehung von Gen- und Chromosomenmutationen besteht und welche Bedeutung die DNA-Reparatur für die Verhinderung oder Manifestation irreversibler genetischer Schäden hat. Die Untersuchungen sollen zur Klärung der Frage beitragen, ob DPC ausschließlich als Indikator für eine Exposition angesehen werden können oder bereits einen frühen genetischen Effekt darstellen, der im direkten Zusammenhang mit der Mutagenese/Kanzerogenese steht.

Ergebnisse und Diskussion

Im Berichtszeitraum wurden zunächst vergleichende Untersuchungen zur Genotoxizität und Mutagenität von Formaldehyd (FA) in V79-Zellen des Chinesischen Hamsters durchgeführt. Zellkulturexperimente mit etablierten Testsystemen sind besonders gut geeignet, solche grundsätzlichen mechanischen Fragen zum Zusammenhang zwischen frühen genetischen Effekten (DPC) und irreversiblen genetischen Schäden (Gen- und Chromosomenmutationen) zu klären. Zunächst wurde der Einfluß von FA auf die Überlebensrate von V79-Zellen nach einmaliger Behandlung für vier Stunden bestimmt. Als Maß für die Zytotoxizität diente die relative Klonierungseffizienz nach Behandlung einer Massenkultur, so wie sie auch bei den anderen Tests erfolgte. Es zeigte sich, daß FA-Konzentrationen über 0,1 mM (entspricht etwa 3 ppm) die Überlebensrate signifikant reduzierten und bei einer Konzentration von 0,5 mM nur noch weniger als 10 % der Zellen überlebten. Es wurden dann Versuche zum Nachweis der Induktion von DPC durch FA durchgeführt. Dazu wurden vergleichende Untersuchungen mit zwei Methoden durchgeführt: nämlich einerseits der klassischen DPC-Bestimmung mit dem Kalium-SDS-Assay (ZHITKOVICH & COSTA, 1992) und außerdem mit einer modifizierten Form des Comet-Assay (PFUHLER & WOLF, 1996). Eine statistisch signifikante Zunahme fällbarer DNA als Indikator für DPC wurde auch im Kalium-SDS-Assay für FA-Konzentrationen >0,1 mM nachgewiesen. DPC-induzierende Agenzien führen nicht zu einer Zunahme der DNA-Migration im Comet-Assay unter Standard-Testbedingungen. Da die DNA-Migration im Comet-Assay die Folge von Strangbrüchen und einer Entspannung der chromosomalen DNA ist, bewirken DPC-induzierende Agenzien sogar eine Verminderung der DNA-Migration, da DPC die DNA stabilisieren. Diesen Effekt konnten wir im Comet-Assay unter Standardbedingungen zeigen, jedoch findet sich eine signifikante Reduktion des Kontrollwertes erst bei einer FA-Konzentration von 0,5 mM. Bei der modifizierten Version des Comet-Assay werden die Zellen mit FA behandelt und direkt vor der Aufnahme in Agarose ionisierender Strahlung (γ -Strahlung) ausgesetzt. γ -Bestrahlung (2 Gy) induziert allein eine starke Zunahme der DNA-Migration (Tailmoment) bei einer sehr homogenen Verteilung der Schadenshäufigkeit

zwischen den Einzelzellen. Dieser Wert dient als Kontrollwert. Vorbehandlung mit FA führt nun konzentrationsabhängig zu einer Verminderung des strahlungsinduzierten Effekts. Eine eindeutige Abnahme des Tailmoment ist auch hier für FA-Konzentrationen $>0,1$ mM zu sehen, wobei ein statistisch signifikanter Effekt bei der FA-Konzentration von $0,25$ mM auftrat. Mit diesen Versuchen konnten wir zeigen, daß der Comet-Assay, der viel einfacher und schneller durchzuführen ist, in der modifizierten Version hervorragend zum Nachweis von DPC geeignet ist und in der Empfindlichkeit dem klassischen Kalium-SDS-Assay weitgehend entspricht. Als weiterer genetischer Endpunkt wurde die Induktion von Schwesterchromatid-Austauschen (SCE) untersucht. SCE sind ein empfindlicher Indikator für eine Vielzahl von DNA-Schäden, die die Replikation stören. Da DPC Replikationshindernisse darstellen, sollten sie zu einer Induktion von SCE führen. Tatsächlich führen auch in diesem Indikatorstest FA-Konzentrationen ab $0,1$ mM zu einer signifikanten Induktion eines genotoxischen Effektes. Höhere FA-Konzentrationen führen zu einer weiteren Zunahme der SCE-Häufigkeiten, jedoch sind zum Nachweis dieses Effektes längere Kultivierungszeiten erforderlich, um den Zellen Gelegenheit zu geben, die zweite Mitose zu erreichen. Mit dem Mikronukleus-Test lassen sich sowohl klastogene als auch aneuploidogene Effekte (d. h. Chromosomenbrüche und -fehlverteilungen) nachweisen. FA führte in V79-Zellen konzentrationsabhängig zu einer Induktion von Mikronuklei, wobei auch hier ein statistisch signifikanter Effekt bei Konzentrationen über $0,1$ mM auftrat. Es wurden bisher noch keine spezifischen Versuche zur Klärung der Ursache der Induktion von Mikronuklei durchgeführt, aber die Größe der induzierten Mikronuklei und das Auftreten von Chromosomenaberrationen in den SCE-Präparaten lassen den Schluß zu, daß es sich bei den Mikronuklei um das Ergebnis eines chromosomenbrechenden (klastogenen) Effekts handelt. Im Unterschied zu den bisherigen Testergebnissen wurde im V79/HPRT-Genmutationstest kein eindeutig positives Ergebnis erhalten. FA führte konzentrationsabhängig zu einer Zunahme des zytotoxischen Effektes und reduzierte das Zellwachstum (relative plating efficiency) bei einer Konzentration von $0,5$ mM auf unter 10 %. Keine der getesteten Konzentrationen führte zu einer signifikanten Erhöhung der Mutantenfrequenz. Um sicher zu gehen, daß die von uns verwendeten Versuchsbedingungen zum Nachweis induzierter Mutanten in V79-Zellen geeignet sind, haben wir Versuche mit verschiedenen Expressionszeiten durchgeführt. Bei diesen Versuchen wurde eine Kultur mit Ethylmethansulphonat (EMS) behandelt und als Positivkontrolle mitgeführt. Expressionszeiten von 5, 7 und 9 Tagen führten in keinem Fall zu einer Induktion von Mutanten durch FA. Die Versuche mit EMS zeigten für alle Expressionszeiten eine starke Induktion von Mutationen, wobei der reproduzierbar höchste Wert nach 7 Tagen (Standardprotokoll) erhalten wurde. Das negative Ergebnis für FA im HPRT-Test mit V79-Zellen stimmt mit publizierten Daten an CHO-Zellen überein (GRAVES & GREEN, 1996). Die Autoren beschreiben zwar eine geringe Erhöhung der Mutantenfrequenz (von $5,3$ auf $11,4$) für die FA-Konzentration $0,2$ mM bei einer Überlebensrate von 55 %. Dieser Effekt war jedoch statistisch nicht signifikant und die Tatsache, daß bei der Konzentration $0,5$ mM bei einer Überlebensrate von 37 % nur $2,1$ Mutanten pro Million überlebender Zellen gefunden wurden, weist eher auf eine Variabilität des Kontrollwertes hin. Im Unterschied zu unseren Daten zeigten MILTENBURGER et al. (1991) eine eindeutige Induktion von HPRT-Mutationen in V79-Zellen. 15 $\mu\text{g/ml}$ FA (entspricht ca. $0,5$ mM) erhöhten die Mutantenfrequenz von $14,3$ auf $51,8$ bei einer Überlebensrate von $24,1$ %. Dieser mutagene Effekt wurde dramatisch verstärkt, wenn die Zellen nicht einmal für 4 Stunden, sondern zwei Mal für jeweils 2 Stunden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen behandelt wurden. Wir haben auch dieses Protokoll angewandt, fanden jedoch auch hier keine

Induktion von Mutanten. Im Unterschied zu der vierstündigen Behandlung war der toxische Effekt schwächer ausgeprägt. Da MILTENBURGER et al. eine Verstärkung der FA-induzierten Mutagenese auch bei wiederholter Behandlung (drei Mal zwei Stunden am selben Tag) zeigen konnten, haben wir V79-Zellen zwei Mal für vier Stunden am selben Tag behandelt. Dieses Protokoll führte zu einer deutlichen Zunahme der Zytotoxizität, aber nicht zu einer Induktion von Mutanten. Um festzustellen oder auszuschließen, ob sich die berichtete Mutagenität in V79-Zellen auf einer Besonderheit der in diesen Studien verwendeten V79-Sublinie beruht, haben wir vergleichende Untersuchungen mit unserer V79-Zelllinie (V79UL) und der von MILTENBURGER et al. (1991) verwendeten Sublinie (V79DA) durchgeführt, die sich eindeutig aufgrund der Chromosomenhäufigkeitsverteilung unterscheiden lassen. Während die modale Chromosomenzahl der V79UL-Zellen 21 betrug, war sie bei V79DA-Zellen 22. Vergleichende Untersuchungen zur Zytotoxizität und Mutagenität von FA in den beiden V79-Sublinien brachten keinen grundsätzlichen Unterschied. In beiden Zelllinien reduzierte die FA-Behandlung die Überlebensrate der Zellen im gleichen Konzentrationsbereich im vergleichbaren Ausmaß. In keinem der Versuche kam es zu einer signifikanten Induktion von HPRT-Mutanten. Auch die Behandlung für jeweils zwei Stunden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen führte in V79DA-Zellen nicht zu einer Induktion von HPRT-Mutanten.

Zusammenfassend läßt sich also feststellen, daß die vergleichende Untersuchung genotoxischer und mutagener Effekte von FA in V79-Zellen ergeben hat, daß FA im gleichen Konzentrationsbereich, in dem zytotoxische Effekte auftreten, DPC, SCE und Mikronuklei induziert, nicht jedoch zu einer Induktion von HPRT-Genmutationen führt. Aus den bisherigen Daten läßt sich ableiten, daß es einen möglichen Zusammenhang zwischen der Induktion von DPC, zytotoxischen und klastogenen Effekten gibt und daß FA-induzierte DPC offensichtlich nicht zur Entstehung von Genmutationen am HPRT-Lokus beitragen. **Diese Ergebnisse wurden publiziert (MERK and SPEIT, 1998).**

Wir haben dann vergleichende Untersuchungen Formaldehyd (induziert DNA-Protein-Crosslinks), Mitomycin C (MMC; induziert DNA-DNA Interstrand-Crosslinks) und Cisplatin (DDP; induziert DNA-DNA-Intrastrand-Crosslinks) durchgeführt. Um die biologische Bedeutung der Effekte im Comet Assay besser zu beurteilen, haben wir versucht, diese in Beziehung zu anderen genotoxischen und zytotoxischen Effekten zu setzen. Wir haben zunächst eine 4-stündige FA Behandlung von V79 Zellen im Comet Assay, im Cytotoxizitätstest, im SCE-Test und im HPRT-Test durchgeführt. Im Comet Assay wurde eine Vorbehandlung mit 3 Gy Gammabestrahlung zur Induktion von DNA-Migration durchgeführt. Die Bestrahlung erhöhte das Tailmoment von 0.3 (Kontrollwert) auf 4.4. FA (62.5 bis 500 μM) verursachte eine konzentrationsabhängige Reduzierung der induzierten DNA Migration. Bei 500 μM FA war die DNA Migration in allen Zellen vollständig gehemmt. FA-Konzentrationen ab 250 μM verursachten eine signifikante Verminderung des klonalen Wachstums. 500 μM FA führte zu einer relativen Klonierungseffizienz von weniger als 10%. SCE wurden ebenfalls konzentrationsabhängig induziert. Ein signifikanter Anstieg der SCE-Häufigkeiten wurde ab 125 μM beobachtet. Wie schon früher berichtet, konnte keine Induktion von Genmutationen im HPRT-Test nachgewiesen werden.

Eine zweistündige Behandlung mit MMC, ein DNA-DNA Interstrand-Crosslinker, reduzierte ebenfalls die Strahlen-induzierte DNA Migration im Comet Assay, reduzierte die Klonierungseffizienz und induzierte SCE und HPRT-Mutationen. Jedoch traten diese Effekte

bei verschiedenen MMC-Konzentrationen auf. Effekte im Comet Assay wurden bei 200 μM beobachtet, wie schon von PFUHLER und WOLF (1996) berichtet. Eine signifikante Reduktion induzierter DNA Migration trat aber auch schon bei 10 μM auf, allerdings war auch schon bei dieser Konzentration kein klonales Zellwachstum mehr möglich. Während also Crosslink-Effekte im Comet Assay nur im Grenzbereich zu cytotoxischen Bedingungen beobachtet wurden, kam es zu einer Induktion von SCE schon bei Konzentrationen, die weder im Comet Assay noch im Cytotoxizitätstest einen Effekt zeigten. HPRT-Mutationen wurden parallel zur zunehmenden Cytotoxizität induziert. 5.0 und 7.5 μM MMC führten zu einer signifikanten Erhöhung der Mutantenfrequenz und reduzierten die Klonierungseffizienz um mehr als 50%.

Behandlung mit DDP für 2h führte ähnlich wie MMC in allen vier Tests zu positiven Befunden. DDP induziert überwiegend DNA-DNA-Intrastrand-Crosslinks. Im Comet Assay war eine signifikante Reduktion der Strahlen-induzierten DNA Migration nur unter extrem cytotoxischen Bedingungen nachweisbar. Ein signifikanter Effekt wurde bei einer Konzentration von 100 μM beobachtet; jedoch fand schon bei der Konzentration 50 μM kein klonales Zellwachstum mehr statt. Im Unterschied dazu traten Effekte im SCE-Test schon bei Konzentrationen auf (2 und 5 μM), die weder im Comet Assay einen Effekt zeigten noch Cytotoxizität induzierten. Eine Induktion von HPRT Mutationen tritt ebenfalls auf, bevor Effekte im Comet Assay gesehen werden. Parallel zur Zunahme der Mutantenfrequenzen wird eine starke Zunahme der Cytotoxizität beobachtet. In den Mutagenitätstest wurde 40 μM DDP als höchste Konzentration getestet, da bei 50 μM die Zellen sich von der Behandlung nicht erholten und kein Zellwachstum mehr stattfand.

Diese Ergebnisse zeigen, daß man mit dem Comet Assay nicht nur DPC sondern auch DNA-DNA-Crosslinks nachweisen kann. Die Tatsache jedoch, daß eine Reduktion der Strahlen-induzierten DNA-Migration nur unter cytotoxischen Bedingungen auftritt und daß andere genotoxische und mutagene Effekte bei viel niedrigeren Konzentrationen nachweisbar sind, läßt den Comet Assay für die Untersuchung von DNA-DNA-Crosslinkern weniger geeignet erscheinen. Es ist nicht bekannt, wie DNA-DNA-Crosslinks in den Prozeß der SCE-Induktion und die Entstehung von Genmutationen involviert sind und ob diese Crosslinks die entscheidenden Primärläsionen für die Mutagenese von MMC und DDP sind. Unsere Untersuchungen zeigen jedoch eindeutig, daß es charakteristische Unterschiede in der genetischen Relevanz von DPC-induzierenden Substanzen und DNA-DNA-Crosslinkern gibt. Für DNA-DNA-Crosslinks kann man ein Potential zur Auslösung von Genmutationen annehmen. Bei DPC steht das klastogene und cytotoxische Potential im Vordergrund und sie können bereits im nicht-toxischen Bereich mit dem Comet Assay nachgewiesen werden. Der Comet Assay in seiner modifizierten Form kann daher als sehr sensitiver und spezifischer Indikator für DPC angesehen werden. **Diese Ergebnisse wurden publiziert (MERK und SPEIT, 1999).**

Um Hinweise auf die Bedeutung der DNA Reparatur für die FA-induzierte Mutagenese zu bekommen, wurden vergleichende Untersuchungen mit reparaturdefekten menschlichen Zelllinien durchgeführt. Als normale Kontrollzellen verwendeten wir die Zelllinie MRC5CV1. Die reparaturdefekten Zelllinien waren GM06914 und XP12ROSV. GM06914 ist eine Fanconi-Anämie Zelllinie, die sich durch einen Defekt bei der Eliminierung von DNA-DNA-Crosslinks auszeichnet. XP12ROSV ist eine Xeroderma pigmentosum Zelllinie, die defekt für die Nukleotid-Exzisionsreparatur ist. Der Nachweis von DPC erfolgte mit dem modifizierten Comet Assay, die Cytotoxizität wurde über Wachstumskurven bestimmt (der Nachweis der

Klonierungseffizienz hatte sich aufgrund der sehr niedrigen Kontrollwerte als unzuverlässig erwiesen) und als Endpunkt für mutagene Effekte wurden Mikronukleustests (MNT) durchgeführt. Hinsichtlich der Induktion von Crosslinks durch eine zweistündige Behandlung gibt es keine wesentlichen Unterschiede zwischen den drei Zelllinien. In allen Zelllinien findet man im gleichen Konzentrationsbereich eine konzentrationsabhängige Reduktion der Strahlen-induzierten DNA Migration. Diese Ergebnisse stimmen auch völlig mit denen überein, die wir für V79 Zellen erhalten hatten. Es wurde für die drei Zelllinien die Aufhebung des FA-Effektes mit der Zeit als Maß für die Reparatur von DPC untersucht. Die Zelllinien wurden entweder mit 125 μM FA für 2 h behandelt, dann bestrahlt (3 Gy) und im Comet Assay analysiert (Zeitpunkt 0) oder es wurde nach der FA-Exposition ein Mediumwechsel durchgeführt und die Analyse erfolgte nach verschiedenen Postinkubationsperioden. Man sieht schon während der ersten zwei und vier Stunden eine deutliche Zunahme im Tailmoment. Dieser Effekt ist sicher auf Reparatur zurückzuführen und kann nicht durch "Verdünnung" aufgrund von DNA Neusynthese und Zellteilungen erklärt werden. Entsprechend den Befunden für V79 Zellen ist die Hemmung der DNA Migration nach 24 h vollständig aufgehoben, was auf eine vollständige Eliminierung der DPC schließen läßt. Diese Daten lassen den Schluß zu, daß die reparaturdefekten Zellen DPC mit gleicher Geschwindigkeit eliminieren wie normale menschliche Zellen. Auch hinsichtlich der Cytotoxizität (Wachstumshemmung) von FA gab es zwischen den drei Zelllinien keine wesentlichen Unterschiede. In jedem Fall zeigte sich eine konzentrationsabhängige Hemmung des Wachstums durch die FA-Konzentrationen, die im Comet Assay signifikante Effekte gezeigt hatten. Es zeigte sich auch, daß die beiden Reparaturdefizienten Zelllinien etwas schlechter wachsen und sich nach Behandlung mit 500 μM FA praktisch nicht mehr teilen. Viel größere Unterschiede fanden wir in der Wachstumshemmung durch den DNA-DNA-Crosslinker MMC. Während in MRC5-Zellen eine deutliche Reduktion des Wachstums durch 10 μM MMC induziert wurden, war dies in der Fanconi-Zelllinie bereits bei 1 μM der Fall und bei der XP-Zelllinie bei 0.05 μM . Interessante Unterschiede fanden sich in den drei Zelllinien bei der Induktion von Mikronuklei durch FA. In der Fanconi-Zelllinie wurden unter gleichen experimentellen Bedingungen deutlich mehr Mikronuklei induziert als in MRC5. Dabei war nicht nur die Häufigkeit der Zellen mit Mikronuklei erhöht sondern auch die Zahl der Mikronuklei pro Zelle. Auch die XP-Zelllinie zeigt eine erhöhte Sensitivität gegenüber FA-induzierten Mikronuklei. Allerdings war in diesen Zellen bereits die Spontanrate deutlich höher als in den anderen beiden Zelllinien. Diese Daten weisen darauf hin, daß FA-induzierte DPC zwar in allen drei Zelllinien vergleichbar schnell eliminiert werden, daß aber die Reparatur von DPC sowohl in Fanconi-Zellen als auch in XP-Zellen in höherem Maße fehlerhaft verläuft und zu Chromosomenaberrationen führt. Ähnliche Befunde haben wir auch für MMC in den drei Zelllinien erhoben. Ein wesentlicher Unterschied bestand allerdings darin, daß die Hypersensitivität der Fanconi-Zelllinie gegenüber MMC sehr viel stärker ausgeprägt war. Da Hypersensitivität gegenüber MMC ein charakteristisches Merkmal von Fanconi-Zellen ist, wird damit gleichzeitig der spezifische Defekt der verwendeten Zelllinie bestätigt.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß wir hinsichtlich der Induktion und Reparatur von FA-induzierten DPC zwischen normalen und reparaturdefekten Zellen mit dem Comet Assay keinen Unterschied feststellen konnten, daß es aber zur verstärkten Induktion von Mikronuklei sowohl in Fanconi-Zellen als auch in XP-Zellen kommt. Dies deutet darauf hin, daß sowohl die Crosslinkreparatur als die Nukleotidexzisionsreparatur für die fehlerfreie

Reparatur FA-induzierter DPC erforderlich sind. **Diese Ergebnisse wurden zur Publikation angenommen (SPEIT et al. 1999).**

Literatur

- CASANOVA M., MORGAN K.T. STEINHAGEN W.H., EVERITT J.I., POPP J.A., HECK H.A. (1991): Covalent binding of inhaled formaldehyde to DNA in the respiratory tract of Rhesus monkeys: Pharmacokinetics, rat-to-monkey interspecies scaling, and extrapolation to man. *Fund. Appl. Toxicol.* **17**, 409 - 428.
- CASANOVA M., MORGAN K.T., GROSS E.A., MOSS O.R., HECK H.A. (1994): DNA-protein crosslinks and cell replication at specific sites in the nose of F344 rats exposed subchronically to formaldehyde. *Fund. Appl. Toxicol.* **23**, 525 - 536.
- CONOLLY R.B., ANDERSEN M.E. (1993): An approach to mechanism-based cancer risk assessment for formaldehyde. *Environm. Health Perspect. Suppl.* **101**, 169 - 176.
- GRAVES R.J., GREEN T. (1996): Mouse liver glutathione S-transferase mediated metabolism of methylene chloride to a mutagen in the CHO/HPRT assay. *Mutation Res.* **367**, 143 - 150.
- IARC (1995): IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Wood dust and formaldehyde. Vol. **62**, Lyon, 1995.
- MERK O., SPEIT G. (1998)** Significance of formaldehyde-induced DNA-protein crosslinks for mutagenesis. *Environ. Molec. Mutagenesis* **32**, 260 - 268.
- MERK O., SPEIT G. (1999)** Detection of crosslinks with the comet assay in relationship to genotoxicity and mutagenicity. *Environ. Molec. Mutagenesis* **33**, 167 - 172.
- MILTENBURGER H.G., TIMM A., POTH A. (1991): Lokale Genotoxizität des Formaldehyd. Schriftenreihe der Bundesanstalt für Arbeitsschutz, Fb **639**, Dortmund, 1991.
- PFUHLER S., WOLF H.U. (1996): Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline comet assay. *Environ. Molec. Mutagenesis* **27**, 196 - 201.
- SPEIT G., SCHÜTZ P., MERK O. (1999)** Induction and repair of formaldehyde-induced DNA-protein crosslinks in repair-deficient human cell lines. *Mutagenesis* (im Druck).
- ZHITKOVICH A, COSTA M. (1992): A simple, sensitive assay to detect DNA-protein crosslinks in intact cells and in vivo. *Carcinogenesis* **13**, 1485 - 1489.