

B.67 IN-VITRO-GENMUTATIONSPRÜFUNG AN SÄUGETIERZELLEN ANHAND DES THYMIDINKINASE-GENS

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode (PM) entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 490 (2016). Die Prüfmethode werden regelmäßig geprüft und überarbeitet, um dem wissenschaftlichen Fortschritt, den rechtlichen Anforderungen und den Belangen des Tierschutzes gerecht zu werden. Der Maus-Lymphom-Assay (MLA) und die TK6-Prüfung mit dem Thymidinkinase-Lokus (TK-Lokus) waren ursprünglich Bestandteil der Prüfmethode B.17. Die MLA Expert Workgroup des Internationalen Workshops für Genotoxizitätsprüfungen (International Workshop on Genotoxicity Testing, IWGT) hat später jedoch international harmonisierte Empfehlungen zu Akzeptanzkriterien für den Assay und zur Auswertung der Daten des MLA entwickelt (1) (2) (3) (4) (5). Diese Empfehlungen wurden in dieser neuen Prüfmethode B.67 berücksichtigt. Diese Prüfmethode wurde für den MLA sowie (da dabei ebenfalls der TK-Lokus verwendet wird) für die TK6-Prüfung entwickelt. Der MLA ist für rechtliche Zwecke allgemein üblich. Die TK6-Prüfung hingegen ist erheblich weniger verbreitet. Ungeachtet der Ähnlichkeit der Endpunkte sind die beiden Zelllinien allerdings nicht austauschbar, und in rechtlichen Vorgaben kann im Zusammenhang mit einem bestimmten rechtlichen Zweck durchaus eine Präferenz für die eine oder andere Zelllinie zum Ausdruck gebracht werden. Beispielsweise wurde mit der Validierung des MLA nachgewiesen, dass mit dem Assay nicht nur Genmutationen erkannt werden können, sondern dass auch die Fähigkeit einer Prüfchemikalie zur Induzierung struktureller Chromosomenschäden festgestellt werden kann. Diese Prüfmethode ist Bestandteil einer Reihe von Prüfmethode zur genetischen Toxikologie. Die OECD hat ein Dokument erstellt, das kurz gefasste und hilfreiche Informationen zu Untersuchungen zur genetischen Toxikologie sowie eine Übersicht über die jüngsten Änderungen der OECD-Prüfrichtlinien zur genetischen Toxikologie enthält (6).
2. Die *In-vitro*-Genmutationsprüfungen an Säugetierzellen werden zum Nachweis chemisch induzierter Genmutationen verwendet. Mit den in diesen Prüfungen verwendeten Zelllinien können Vorwärtsmutationen an Reporter-Genen, insbesondere am endogenen Thymidinkinase-Gen (*TK* bei menschlichen Zellen und *Tk* bei Nagerzellen, bei dieser Prüfmethode gemeinsam als *TK* bezeichnet) gemessen werden. Diese Prüfmethode ist zur Verwendung mit zwei Zelllinien vorgesehen: der Maus-Lymphom-Zelllinie L5178Y TK^{+/-}-3.7.2C (im Allgemeinen als L5178Y-Zelllinie bezeichnet) und der humanen Lymphoblastoid-Zelllinie TK6 (allgemein als TK6-Zelllinie bezeichnet). Die beiden Zelllinien unterscheiden sich zwar u. a. in Bezug auf ihre Herkunft, das Zellwachstum und den p53-Status. Die *TK*-Genmutationsprüfungen können jedoch bei beiden Zelltypen ähnlich durchgeführt werden, wie in dieser Prüfmethode beschrieben.
3. Die autosomale und heterozygote Beschaffenheit des Thymidin-Kinase-Gen ermöglicht die Erkennung lebensfähiger Kolonien von Zellen, denen infolge einer Mutation von TK^{+/-} nach TK^{-/-} das Enzym Thymidin-Kinase fehlt. Das Fehlen des Enzyms kann auf genetische Prozesse zurückzuführen sein, die das *TK*-Gen beeinträchtigen (u. a. auf Genmutationen (Punktmutationen, Frame-Shift-Mutationen, kleine Deletionen usw.) und auf Chromosomenveränderungen (große Deletionen, Chromosomen-Rearrangements und mitotische Rekombinationen)). Letztere äußern sich in einem Verlust der Heterozygotie, der bei der humanen Tumorgenese häufig mit einer genetischen Veränderung von Tumorsuppressorgenen einhergeht. Theoretisch kann der Verlust des gesamten Chromosoms mit dem *TK*-Gen infolge der Hemmung der Spindelfaserbildung und/oder durch mitotische Non-disjunction mit dem MLA nachgewiesen werden. Eine kombinierte zytogenetische und molekulare Untersuchung zeigt tatsächlich eindeutig, dass einige MLA-*TK*-Mutanten auf eine Non-disjunction zurückzuführen sind. Mit *TK*-Genmutationsprüfungen werden Aneugene durch die Berücksichtigung von Standardkriterien zur Feststellung einer Zytotoxizität (wie bei dieser Prüfmethode beschrieben) jedoch nachweislich nicht zuverlässig erkannt. Daher sind diese Prüfungen zum Nachweis von Aneugen nicht geeignet (7) (8) (9).
4. Bei den *TK*-Genmutationsprüfungen werden zwei verschiedene Phänotypklassen von *TK*-Mutanten erzeugt: die normal wachsenden Mutanten, die so schnell wachsen wie die heterozygoten *TK*-Zellen, und die langsam wachsenden Mutanten mit längeren Verdopplungszeiten. Die normal und die langsam wachsenden Mutanten werden beim MLA als Mutanten mit starker bzw. geringer Koloniebildung und bei der TK6-Prüfung als Mutanten mit früh bzw. spät auftretender Koloniebildung festgestellt. Die molekulare und zellgenetische Beschaffenheit von MLA-Mutanten mit starker bzw. geringer Koloniebildung wurde eingehend untersucht (8) (10) (11) (12) (13). Die molekulare und zellgenetische Beschaffenheit der früh und der spät auftretenden TK6-Mutanten wurde ebenfalls eingehend untersucht (14) (15) (16) (17). Langsam wachsende Mutanten bei beiden Zelltypen entwickelten genetische Schäden (einschließlich möglicherweise wachstumsregulierender Gene in der Nähe des *TK*-Locus), die zu längeren Verdopplungszeiten und zur späteren Bildung kleinerer Kolonien führen (18). Eine Induzierung langsam wachsender Mutanten erfolgt vor allem bei Chemikalien, die erhebliche strukturelle Änderungen auf der Chromosomenebene hervorrufen. Zellen, bei denen die Schäden die möglicherweise wachstumsregulierenden Gene in der Nähe des *TK*-Locus nicht betreffen, teilen sich ähnlich schnell wie die Elternzellen und entwickeln sich zu normal wachsenden Mutanten. Eine Induzierung normal wachsender Mutanten erfolgt bei Chemikalien, die hauptsächlich als Punktmutagene wirken. Daher ist entscheidend, dass sowohl langsam als auch normal wachsende Mutanten gezählt werden, um alle Mutanten zu erfassen und Aufschluss über den Typ (die Typen) der Schäden (Mutagene vs. Klastogene) zu erhalten, die durch die Prüfchemikalie induziert werden (10) (12) (18) (19).

5. Die Prüfmethode wurde so gestaltet, dass sie allgemeine Informationen sowohl beim MLA als auch bei der TK6-Prüfung liefert. Außerdem enthält sie spezifische Hinweise zur Durchführung der einzelnen Prüfungen.
6. Es gelten die Begriffsbestimmungen in Anlage 1.

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND BEGRENZUNGEN

7. *In vitro* durchgeführte Prüfungen erfordern in der Regel die Verwendung eines exogenen Fremdstoff-Metabolisierungssystems. Mit diesem exogenen Stoffwechselaktivierungssystem lassen sich die *In-vivo*-Bedingungen jedoch nicht gänzlich nachvollziehen.
8. Bedingungen, die zu künstlich verursachten Positivergebnissen führen könnten (d. h. mögliche Wechselwirkungen mit dem Prüfsystem), die nicht von einer Interaktion zwischen der Prüfchemikalie und dem genetischen Material der Zelle herrühren, sind unbedingt zu vermeiden; zu solchen Bedingungen gehören Veränderungen des pH-Wertes bzw. der Osmolalität, eine Interaktion mit einzelnen Komponenten des Mediums (20) (21) oder eine hochgradige Zytotoxizität (22) (23) (24). Zytotoxizitätswerte, die die empfohlenen Höchstwerte nach Nummer 28 überschreiten, werden für den MLA und TK6-Prüfung als zu hoch betrachtet. Außerdem ist zu beachten, dass Prüfchemikalien, bei denen es sich um Thymidin-Nachbildungen handelt oder die sich wie Thymidin-Nachbildungen verhalten, bei der Behandlung der Zellen infolge der selektiven Vermehrung der spontanen Hintergrundmutationen die Mutantenhäufigkeit erhöhen und Untersuchungen mit weiteren Prüfmethoden erforderlich machen können, um eine angemessene Auswertung zu ermöglichen (25).
9. Für hergestellte Nanomaterialien sind möglicherweise spezielle Anpassungen dieser Prüfmethode erforderlich, die an dieser Stelle jedoch nicht beschrieben werden.
10. Bevor die Prüfmethode zur Untersuchung eines Gemischs für die Generierung von Daten für einen bestimmten Regulierungszweck verwendet wird, ist zu prüfen, ob sie für den beabsichtigten Zweck angemessene Ergebnisse liefern kann und, wenn dem so ist, warum. Solche Erwägungen entfallen, wenn die Prüfung des Gemischs rechtlich vorgeschrieben ist.
11. Mutantenzellen, die infolge der Mutation von $TK^{+/-}$ zu $TK^{-/-}$ keine Aktivität des Enzyms Thymidinkinase (TK) entwickeln, sind gegenüber der zytotoxischen Wirkung des Pyrimidinanalogs Trifluorthymidin (TFT) resistent. Bei Anwesenheit von TK sind Zellen hingegen empfindlich gegenüber TFT, das die Hemmung des Zellstoffwechsels verursacht und eine weitere Zellteilung verhindert. Somit können Mutantenzellen sich in Anwesenheit von TFT vermehren und erkennbare Kolonien bilden. Zellen, die das Enzym TK enthalten, sind dazu nicht in der Lage.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

12. Zellen in Suspensionskultur werden über einen angemessenen Zeitraum (Nummer 19) mit und ohne exogenes Fremdstoff-Metabolisierungssystem (Nummer 33) mit der Prüfchemikalie behandelt und anschließend subkultiviert, um die Zytotoxizität zu bestimmen und vor der Mutantenselektion die Expression des Phänotyps zu ermöglichen. Die Zytotoxizität wird anhand des relativen Gesamtwachstums (RTG) (Nummer 25) beim MLA bzw. anhand der relativen Überlebensrate (RS) (Nummer 26) bei der TK6-Prüfung ermittelt. Die behandelten Kulturen werden für einen ausreichenden Zeitraum, der für den jeweils gewählten Zelltyp charakteristisch ist (Nummer 37), in einem Wachstumsmedium gehalten, um eine annähernd optimale Expression des Phänotyps der induzierten Mutationen zu ermöglichen. Nach der Expression des Phänotyps wird die Mutantenhäufigkeit bestimmt, indem eine bekannte Anzahl von Zellen auf ein Medium mit dem selektierenden Agens zur Bestimmung der Mutantenkolonien und auf ein Medium ohne selektierendes Agens zur Bestimmung der Klonierungseffizienz (Lebensfähigkeit) geimpft wird. Nach einer geeigneten Inkubationszeit werden die Kolonien gezählt. Die Mutantenhäufigkeit wird anhand der entsprechend der Klonierungseffizienz bei der Mutantenselektion bereinigten Anzahl der Mutantenkolonien berechnet.

BESCHREIBUNG DER METHODE

Vorbereitungen

Zellen

13. MLA: Da der MLA mit der $TK^{+/-}$ -3.7.2C-Zelllinie als Unterzelllinie der L5178Y-Zelllinie entwickelt und beschrieben wurde, ist für den MLA diese spezielle Unterzelllinie zu verwenden. Die L5178Y-Zelllinie wurde aus einem durch Methylcholanthren induzierten Thymuslymphom einer DBA-2-Maus abgeleitet (26). Clive u. a. behandelten L5178Y-Zellen (von Clive als $TK^{+/+}$ -3 bezeichnet) mit Ethylmethansulfonat und isolierten einen $TK^{-/-}$ -Klon (bezeichnet als

TK^{-/-}-3.7-Klon) mit Bromodeoxyuridin als selektierendes Agens. Aus dem TK^{-/-}-Klon wurden ein spontaner TK^{+/-}-Klon (als TK^{+/-}-3.7.2. bezeichnet) und ein Subklon (bezeichnet als TK^{+/-}-3.7.2C) zur Verwendung im MLA isoliert und charakterisiert (27). Der Karyotyp der Zelllinie wurde veröffentlicht (28) (29) (30) (31). Der Modalwert der Chromosomen beträgt 40. Das metazentrische Chromosom (t12;13) ist als ein Chromosom zu zählen. Der TK-Locus bei Mäusen befindet sich am distalen Ende des Chromosoms 11. Die Zelllinie L5178Y TK^{+/-}-3.7.2C hat Mutationen auf den p53-Allelen und erzeugt mutantes p53-Protein (32) (33). Der p53-Status der TK^{+/-}-3.7.2C-Zelllinie ist wahrscheinlich die Ursache dafür, dass mit der Prüfung größere Schäden erkannt werden können (17).

14. TK6: TK6 ist eine humane lymphoblastoide Zelllinie. Die Elternzelllinie ist eine mit dem Epstein-Barr-Virus transformierte Zelllinie (WI-L2), die ursprünglich von einem 5-jährigen Jungen mit hereditärer Sphärozytose abgeleitet wurde. Der erste isolierte Klon (HH4) wurde mit ICR191 mutagenisiert; dabei wurde eine heterozygote TK-Zelllinie (TK6) erzeugt (34). TK6-Zellen sind annähernd diploid; der entsprechende Karyotyp ist 47, XY, 13+, t(14; 20), t(3; 21) (35). Der TK-Locus beim Menschen befindet sich am langen Arm des Chromosoms 17. TK6 ist eine p53-kompetente Zelllinie, da sie auf beiden Allelen eine Wildtyp-p53-Sequenz aufweist und ausschließlich Wildtyp-p53-Protein exprimiert (36).
15. Sowohl beim MLA als auch bei der TK6-Prüfung empfiehlt sich, dass das Prüflabor beim erstmaligen Herstellen oder beim Auffüllen der Master-Zellenbestände sicherstellt, dass keine *Mycoplasma*-Kontamination vorliegt, sowie dass es den Karyotyp der Zellen bestimmt oder die Chromosomen markiert, auf denen sich der TK-Locus befindet, und dass es die Zeiten für die Verdopplung der Populationen ermittelt. Die normale Dauer des Zellzyklus sollte bei den im Prüflabor verwendeten Zellen bekannt sein und mit veröffentlichten Zellcharakteristiken übereinstimmen (16) (19) (37). Dieser Master-Zellenbestand sollte bei -150 °C (oder noch niedrigeren Temperaturen) aufbewahrt und zur Herstellung aller Arbeitsstämme verwendet werden.
16. Entweder vor der Herstellung einer großen Anzahl an kryokonservierten Arbeitsstämmen oder unmittelbar vor der Verwendung in einem Versuch müssen die Zellkulturen möglicherweise von noch vorhandenen Mutanten gereinigt werden [wenn die Mutantenhäufigkeit (MF) der Lösungsmittelkontrolle nicht bereits im akzeptablen Bereich liegt – für MLA siehe Tabelle 2]. Dazu wird Methotrexat (Aminopterin) zur Selektion von Zellen ohne TK verwendet und Thymidin, Hypoxanthin und Glycin (L5178Y) bzw. 2'-Deoxycytidin (TK6) zur Kultur hinzugegeben, um ein optimales Wachstum der TK-kompetenten Zellen sicherzustellen (19) (38) (39) bzw. (40) für TK6. Allgemeine Hinweise zu bewährten Verfahren bei der Haltung von Zellkulturen sowie spezifische Hinweise zu L5178Y- und TK6-Zellen siehe (19) (31) (37) (39) und (41). Für Labors, die Master-Zellenbestände als Ausgangszellen für den MLA oder die TK6-Prüfung benötigen, sowie allgemein, wenn neue Master-Zellenbestände benötigt werden, ist ein Zellendepot mit gut charakterisierten Zellen verfügbar (37).

Medien und Kulturbedingungen

17. Bei beiden Prüfungen erfordert die Kultivierung geeignete Kulturmedien und Inkubationsbedingungen (z. B. Kulturgefäße, eine befeuchtete Atmosphäre mit einer CO₂-Konzentration von 5 % und eine Inkubationstemperatur von 37 °C). Die Zellkulturen sollten immer unter Bedingungen gehalten werden, bei denen das Wachstum in der Log-Phase sichergestellt ist. Vor allem ist für Medien- und Kulturbedingungen zu sorgen, die ein optimales Zellwachstum während der Expressionszeit und der Klonierung der mutierenden und nichtmutierenden Zellen gewährleisten. Für den MLA und die TK6-Prüfung ist ferner wichtig, dass die Kulturlösungen ein optimales Wachstum sowohl der großen Kolonien bzw. frühzeitig auftretender TK-Mutanten als auch der kleinen Kolonien bzw. spät auftretender TK-Mutanten gewährleisten. Nähere Informationen zur Haltung der Kulturen einschließlich der Notwendigkeit der Inaktivierung von Pferdeserum durch angemessene Erwärmung (wenn bei der Mutantenselektion RPMI-Medium verwendet wird) siehe (19) (31) (38) (39) (40) und (42).

Vorbereitung der Kulturen

18. Die Zellen werden aus Stammkulturen gewonnen und im Kulturmedium in einer solchen Dichte überimpft, dass die Suspensionskulturen während der Behandlung und der Expressionszeit weiterhin exponentiell wachsen.

Stoffwechselaktivierung

19. Bei der Verwendung von L5178Y- und TK6-Zellen sollten exogene metabolisierende Systeme verwendet werden, da diese Zellen eine unzulängliche endogene Stoffwechselkapazität entwickeln. Das gängigste und – sofern nicht anders begründet – standardmäßig empfohlene System, ist eine durch Ko-Faktoren ergänzte post-mitochondriale Fraktion (S9) aus der Leber von Nagetieren (in der Regel Ratten), die mit enzyminduzierenden Agenzien wie Aroclor 1254 (43) (44) (45) oder einer Kombination aus Phenobarbiton und β -Naphthoflavon (46) (47) (48) (49) (50) (51) vorbehandelt wurde. Die letztgenannte Kombination verstößt nicht gegen das Stockholmer Übereinkommen

über persistente organische Schadstoffe (52) und hat sich für die Induktion von Multifunktionsoxidasen als ebenso wirksam wie Aroclor 1254 erwiesen (45) (46) (47) (48) (49). Die S9-Fraktion wird im Endmedium in der Regel in Konzentrationen von 1-2 % verwendet, kann jedoch auf 10 % v/v erhöht werden. Die Wahl der Art und Konzentration des exogenen Metabolisierungssystems oder metabolischen Agens ist möglicherweise von der Klasse der Prüfchemikalien abhängig.

Vorbereitung der Prüfchemikalie

20. Feste Prüfchemikalien sollten vor der Behandlung der Zellen in geeigneten Lösungsmitteln gelöst und ggf. verdünnt werden (Nummer 21). Flüssige Prüfchemikalien können vor der Behandlung direkt zum Versuchssystem gegeben und/oder verdünnt werden. Gasförmige oder flüchtige Prüfchemikalien sind durch entsprechende Modifikationen der Standardprotokolle zu prüfen, z. B. durch Behandlung in hermetisch verschlossenen Kulturgefäßen (53) (54) (55). Zubereitungen der Prüfchemikalie sollten kurz vor der Behandlung hergestellt werden, es sei denn, die Stabilität der Chemikalie bei der Lagerung wird nachgewiesen.

PRÜFBEDINGUNGEN

Lösungsmittel

21. Das Lösungsmittel sollte so gewählt werden, dass zum einen eine optimale Löslichkeit der Prüfchemikalie gewährleistet ist, zum anderen aber die Durchführung der Prüfung nicht beeinträchtigt wird, z. B. durch Veränderung des Zellwachstums, Beeinträchtigung der Integrität der Prüfchemikalie, Reaktion mit Kulturgefäßen oder Behinderung des Metabolisierungssystems. Als erste Wahl ist möglichst die Verwendung eines wässrigen Lösungsmittels (oder Kulturmediums) zu empfehlen. Gründlich erprobte Lösungsmittel sind Wasser oder Dimethylsulfoxid. Organische Lösungsmittel sollten 1 % (v/v) und wässrige Lösungsmittel (Kochsalzlösung oder Wasser) 10 % (v/v) im Endmedium möglichst nicht überschreiten. Kommen weniger gründlich erprobte Lösungsmittel zum Einsatz (z. B. Ethanol oder Aceton), ist deren Verwendung anhand von Daten zu begründen, die ihre Verträglichkeit mit den Prüfchemikalien und dem Versuchssystem und ihre nicht gentoxische Wirkung in der verwendeten Konzentration belegen. Sind keine entsprechenden Belege verfügbar, sollten unbedingt unbehandelte Kontrollen (siehe Anlage 1, Begriffsbestimmungen) einbezogen werden, um nachzuweisen, dass durch die gewählten Lösungsmittel keine schädlichen oder mutagenen Wirkungen ausgelöst werden.

MESSUNG DER ZYTOTOXIZITÄT UND AUSWAHL DER BEHANDLUNGSKONZENTRATIONEN

22. Bei der Bestimmung der höchsten Konzentration der Prüfchemikalie sind Konzentrationen zu vermeiden, die zu künstlich positiven Reaktionen führen können, z. B. zu übermäßiger Zytotoxizität (Nummer 28), Niederschlag (Nummer 29) oder ausgeprägten Veränderungen des pH-Werts oder der Osmolalität (Nummer 8). Wenn die Prüfchemikalie zum Zeitpunkt der Zugabe den pH-Wert des Mediums erheblich verändert, lässt sich der pH-Wert auch durch Anwendung eines Puffers im Endmedium einstellen, damit künstlich positive Reaktionen vermieden und geeignete Kulturbedingungen aufrechterhalten werden.
23. Die Konzentrationen werden u. a. nach der Zytotoxizität ausgewählt (Nummern 27-30). Wenngleich die Bewertung der Zytotoxizität im Rahmen eines Vorversuchs nützlich sein kann, um die im Hauptversuch verwendeten Konzentrationen besser bestimmen zu können, ist ein Vorversuch nicht erforderlich. Auch wenn die anfängliche Zytotoxizität bewertet wird, ist im Hauptversuch die Zytotoxizität jeder einzelnen Kultur zu messen. Wenn ein Dosisfindungsversuch durchgeführt wird, sollte dieser ein breites Spektrum an Konzentrationen abdecken. Der Dosisfindungsversuch kann entweder an Tag 1 nach der Behandlung abgebrochen werden oder über die 2-tägige Expression bis zur Mutantenselektion fortgesetzt werden (wenn sich die verwendeten Konzentrationen als geeignet erweisen sollten).
24. Die Zytotoxizität sollte für jede Prüfkultur und für jede Kontrollkultur separat ermittelt werden. Hinsichtlich der Methoden für den MLA (2) und die TK6-Prüfung (15) ist die international anerkannte Praxis maßgeblich.
25. Für die Durchführung des MLA mit der Agar- und der Microwell-Methode gilt: Die Zytotoxizität sollte anhand des relativen Gesamtwachstums (RTG) ermittelt werden (erstmal im Jahr 1975 von Clive und Spector beschrieben (2)). Dieser Parameter beinhaltet das relative Suspensionswachstum (RSG: Prüfkultur vs. Lösungsmittelkontrolle) während der Behandlung der Zellen, die Expressionszeit und die relative Klonierungseffizienz (RCE: Prüfkultur vs. Lösungsmittelkontrolle) zum Zeitpunkt der Mutantenselektion (2). Das RSG beinhaltet alle Zellverluste in der Prüfkultur während der Behandlung (Formel siehe Anlage 2).

26. Für die TK6-Prüfung gilt: Die Zytotoxizität sollte anhand der relativen Überlebensrate (RS) (d. h. der Klonierungseffizienz von unmittelbar nach der Behandlung ausplattierten Zellen) ermittelt werden; dabei ist eine Bereinigung um Zellverluste während der Behandlung auf der Grundlage der Zellzahl im Vergleich zur Negativkontrolle (mit einer Überlebensrate von 100 %) vorzunehmen (Formel siehe Anlage 2).
27. Es sollten mindestens vier Prüfkonzentrationen (ausgenommen das Lösungsmittel und Positivkontrollen) ausgewertet werden, die die Akzeptanzkriterien erfüllen (geeignete Zytotoxizität, Anzahl der Zellen usw.). Die Verwendung von Zweifachkulturen ist zu empfehlen, doch können für jede überprüfte Konzentration auch Replikat- oder Einfachkulturen herangezogen werden. Die Ergebnisse aus Replikatkulturen bei einer gegebenen Konzentration sollten getrennt angegeben werden, können zu Datenanalysezwecken aber auch gepoolt werden (55). Bei Prüfchemikalien mit geringer Zytotoxizität oder ohne zytotoxische Wirkung sind in der Regel Konzentrationsintervalle mit zwei- bis dreifacher Konzentration geeignet. Wenn Zytotoxizität auftritt, sollten die Konzentrationen einen Zytotoxizitätsbereich ausgehend vom Wert, bei dem Zytotoxizität auftritt (siehe Beschreibung unter Nummer 28), bis zu Konzentrationen mit mäßiger oder geringer oder nicht vorhandener Toxizität umfassen. Viele Prüfchemikalien zeigen steile Konzentrations-Reaktions-Kurven. Um Daten zu mäßiger oder geringer Toxizität zu erhalten oder um die Dosis-Reaktions-Beziehungen im Einzelnen auszuwerten, kann es daher erforderlich sein, Konzentrationen mit kleineren Abständen und/oder mehr als vier Konzentrationen zu verwenden, insbesondere in Fällen, in denen ein Wiederholungsversuch erforderlich ist (Nummer 70). Die Verwendung von mehr als 4 Konzentrationen kann besonders bei Einfachkulturen wichtig sein.
28. Wenn die Höchstkonzentration auf der Zytotoxizität beruht, sollte bei der Höchstkonzentration beim MLA ein relatives Gesamtwachstum von 10-20 % und bei der TK6-Prüfung eine relative Überlebensrate von 10 % erreicht werden (Nummer 67).
29. Im Falle schwer löslicher Chemikalien, die bei Konzentrationen unterhalb der niedrigsten unlöslichen Konzentration nicht zytotoxisch sind, sollte die höchste analysierte Konzentration am Ende der Behandlung mit der Prüfchemikalie eine Trübung oder eine mit bloßem Auge oder mithilfe eines Inversmikroskops erkennbare Ausfällung bewirken. Auch wenn Zytotoxizität oberhalb der niedrigsten unlöslichen Konzentration auftritt, ist es ratsam, nur eine Konzentration zu testen, bei der es zu einer Trübung oder sichtbaren Ausfällung kommt, da infolge dieser Ausfällungen künstliche Wirkungen auftreten können. Da beim MLA und bei der TK6-Prüfung Suspensionskulturen verwendet werden, ist bei der Konzentration, bei der es zu einer Ausfällung kommt, unbedingt sicherzustellen, dass die Ausfällung nicht die Durchführung des Versuchs beeinträchtigt. Unter Umständen empfiehlt es sich, die Löslichkeit im Kulturmedium vor dem Versuch zu bestimmen.
30. Wird keine Ausfällung bzw. keine grenzwertige Zytotoxizität beobachtet, sollte die höchste Versuchskonzentration 10 mM, 2 mg/ml oder 2 µl/ml entsprechen, je nachdem, welcher Wert der niedrigere ist (57) (58). Wenn die Zusammensetzung der Prüfchemikalie nicht genau definiert ist (bei Stoffen mit unbekannter oder schwankender Zusammensetzung, komplexen Reaktionsprodukten oder biologischen Materialien (UVCB), Umweltextrakten usw.), muss die höchste Konzentration möglicherweise höher angesetzt werden (z. B. 5 mg/ml), sofern keine ausreichende Zytotoxizität vorhanden ist, um die Konzentration der einzelnen Bestandteile zu erhöhen. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass diese Anforderungen sich von denen für Humanpharmazeutika unterscheiden können (59).

Kontrollen

31. Bei allen Versuchsbedingungen sind jeweils gleichzeitige Negativkontrollen (Nummer 21) anzulegen, bei denen das Behandlungsmedium lediglich Lösungsmittel enthält, die ansonsten aber auf die gleiche Weise behandelt wurden wie die Behandlungskulturen.
32. Die Eignung des Labors zum Nachweis von Mutagenen unter den Bedingungen des verwendeten Prüfprotokolls und (ggf.) die Wirksamkeit des exogenen Stoffwechselaktivierungssystems sowie eine angemessene Erkennung sowohl kleiner/spät auftretender als auch großer/früh auftretender TK-Mutanten sind anhand gleichzeitiger Positivkontrollen nachzuweisen. Beispiele für Positivkontrollen sind Tabelle 1 zu entnehmen. In begründeten Fällen können andere geeignete Positivkontrollstoffe verwendet werden. Da *In-vitro*-Tests auf Genotoxizität in Säugetierzellen für die gleichzeitigen Kurzzeitbehandlungen (3-4 Stunden) mit und ohne Zusatz eines Stoffwechselaktivierungssystems über die gleiche Behandlungsdauer ausreichend standardisiert sind, kann sich die Hinzuziehung von Positivkontrollen auf ein Mutagen beschränken, das eine Stoffwechselaktivierung erfordert. In diesem Fall wird durch die Reaktion einer einzelnen Positivkontrolle sowohl die Aktivität des Stoffwechselaktivierungssystems als auch die Empfindlichkeit des Prüfsystems nachgewiesen. Im Falle einer Langzeitbehandlung (d. h. 24 Stunden ohne S9) sollte jedoch eine gesonderte Positivkontrolle erfolgen, da der Versuch mit Stoffwechselaktivierung eine andere Behandlungsdauer hat. Jede Positivkontrolle sollte bei einer oder mehreren Konzentrationen durchgeführt werden, die voraussichtlich eine reproduzierbare und erkennbare Zunahme gegenüber dem Hintergrund ergeben (womit sich die Empfindlichkeit des Versuchssystems nachweisen lässt), und die Wirkung sollte nicht durch einen Zytotoxizitätswert beeinträchtigt werden, der die in dieser Prüfmethode vorgegebenen Grenzen überschreitet (Nummer 28).

Tabelle 1

Zur Beurteilung der Eignung des Labors und zur Wahl der Positivkontrollen empfohlene Referenzstoffe

Kategorie	Stoff	CAS-Nr.
1. Mutagene, die ohne Stoffwechselaktivierung wirken		
	Methylmethansulfonat	66-27-3
	Mitomycin C	50-07-7
	4-Nitroquinolin-N-oxid	56-57-5
2. Mutagene, die eine Stoffwechselaktivierung erfordern		
	Benzo(a)pyren	50-32-8
	Cyclophosphamid(monohydrat)	50-18-0 (6055-19-2)
	7,12-Dimethylbenzanthracen	57-97-6
	3-Methylcholanthren	56-49-5

VERFAHREN

Behandlung mit der Prüfchemikalie

33. Proliferierende Zellen werden mit und ohne Stoffwechselaktivierungssystem mit der Prüfchemikalie behandelt. Die Exposition sollte über einen geeigneten Zeitraum (gewöhnlich 3-4 Stunden) erfolgen. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass diese Anforderungen sich von denen für Humanpharmazeutika unterscheiden können (59). Wenn die Kurzzeit-Behandlung zu negativen Ergebnissen führt und verfügbare Informationen eine längere Behandlung als erforderlich erscheinen lassen [z. B. bei Nucleosidanalogen oder schlecht löslichen Chemikalien (5) (59)], ist beim MLA die Durchführung der Prüfung mit längeren Behandlungszeiten (d. h. 24 Stunden ohne S9) in Erwägung zu ziehen.
34. Wie viele Zellen für jede Prüfung und für jedes Stadium der Prüfung (Kontrolle und behandelte Kultur) mindestens zu verwenden sind, hängt von der Spontanmutationshäufigkeit ab. Als Faustregel gilt, dass in jeder Versuchskultur ausreichend Zellen behandelt werden sollten und eine hinreichende Passagenanzahl erreicht werden sollte, um in allen Stadien der Prüfung (Behandlung, Expression des Phänotyps und Mutantenselektion) mindestens 10 bzw. im Idealfall 100 Spontanmutationen zu erhalten (56).
35. Beim MLA liegt eine annehmbare Spontanmutationshäufigkeit bei $35-140 \times 10^{-6}$ (Agar-Methode) bzw. bei $50-170 \times 10^{-6}$ (Microwell-Methode) (siehe Tabelle 2). Um pro Prüfkultur mindestens 10 und im Idealfall 100 Spontanmutationen zu erhalten, die die Behandlung überleben, müssen mindestens 6×10^6 Zellen behandelt werden. Die Behandlung dieser Anzahl an Zellen und der Erhalt einer hinreichenden Anzahl an Zellen während der Expression und beim Klonen für die Mutantenselektion führt in allen Phasen des Versuchs zu einer hinreichenden Anzahl an Spontanmutationen (mindestens 10) – selbst bei Kulturen, die mit Konzentrationen behandelt wurden, bei denen sich eine Zytotoxizität von 90 % ergibt (nachgewiesen anhand eines RTG von 10 %) (19) (38) (39).
36. Die Spontanmutationshäufigkeit liegt bei Tk6 in der Regel zwischen 2 und 10×10^{-6} . Um pro Prüfkultur mindestens 10 Spontanmutationen zu erhalten, die die Behandlung überleben, müssen in jeder Kultur mindestens 20×10^6 Zellen behandelt werden. Die Behandlung dieser Anzahl an Zellen führt selbst bei Kulturen, die mit Konzentrationen behandelt wurden, bei denen sich eine Zytotoxizität von 90 % (RS 10 %) ergibt, zu einer hinreichenden Anzahl an Spontanmutationen (mindestens 10). Außerdem muss während der Expressionszeit eine hinreichende Anzahl an Zellen kultiviert und zur Mutantenselektion plattiert werden (60).

Expressionszeit des Phänotyps und Messung der Zytotoxizität und der Mutantenhäufigkeit

37. Im Anschluss an die Behandlungsphase werden die Zellen über einen bestimmten Zeitraum kultiviert, um für jede Zelllinie eine annähernd optimale spezifische Expression des Phänotyps neu induzierter Mutanten zu ermöglichen. Beim MLA beträgt die Expressionszeit des Phänotyps 2 Tage. Bei der TK6-Prüfung dauert die Expression des Phänotyps 3-4 Tage. Bei einer 24-stündigen Behandlung beginnt die Expressionszeit am Ende der Behandlung.
38. Während der Expressionszeit des Phänotyps werden die Zellen täglich gezählt. Beim MLA wird anhand der täglichen Zellzählungen das tägliche Suspensionswachstum (SG) berechnet. Nach der 2-tägigen Expressionszeit werden die Zellen mit und ohne selektierendes Agens zur Bestimmung der Mutantenzahl (Selektionsplatten) bzw. der Klonierungseffizienz (Viabilitätsplatten) im Medium suspendiert. Beim MLA sind zwei Methoden zum Klonen für die Mutantenselektion annehmbar: die Soft-Agar-Methode und die Methode mit dem flüssigen Medium in 96-Well-Platten (19) (38) (39). Die Klonierung bei der TK6-Prüfung erfolgt mit flüssigen Medien und einer 96-Well-Platte (16).
39. Als selektierendes Agens für TK-Mutanten wird ausschließlich Trifluorothymidin (TFT) empfohlen (61).
40. Beim MLA werden die Agar- und die Microwell-Platten nach 10- bis 12-tägiger Inkubation gezählt. Bei der TK6-Prüfung werden die Kolonien der früh auftretenden Mutanten auf den Microwell-Platten nach 10-14 Tagen gezählt. Zur Rückgewinnung der langsam wachsenden (spät auftretenden) TK6-Mutanten müssen die Zellen nach dem Zählen der früh auftretenden Mutanten nochmals mit dem Wachstumsmedium versorgt und mit TFT behandelt werden. Anschließend werden die Platten weitere 7-10 Tage inkubiert (62). Hinweise zur Zählung langsam und normal wachsender TK-Mutanten siehe Nummern 42 und 44.
41. Die Berechnungen bei den beiden Untersuchungen mit den beiden Methoden (Agar- und Microwell-Methode) beim MLA werden in Anlage 2 erläutert. Beim MLA mit der Agar-Methode werden die Kolonien gezählt, und die Anzahl der Mutantenkolonien wird entsprechend der Klonierungseffizienz bereinigt, um die Mutantenhäufigkeit (MF) zu berechnen. Beim MLA mit der Microwell-Methode und bei der TK6-Prüfung wird die Klonierungseffizienz sowohl der Platten zur Selektion als auch der Platten zur Bestimmung der Klonierungseffizienz nach der Poisson-Verteilung bestimmt (63). Aufgrund der jeweils ermittelten Klonierungseffizienz wird die MF berechnet.

Charakterisierung der Mutantenkolonien

42. Wenn die Prüfchemikalie beim MLA einen positiven Befund ergibt (Nummern 62 und 63), sollte die Charakterisierung nach Größe und Wachstumsentwicklung der Kolonien zumindest bei einer der Prüfkulturen (im Allgemeinen der mit der höchsten positiven Konzentration) sowie bei den Negativ- und den Positivkontrollen erfolgen. Ergibt sich bei der Prüfchemikalie ein negativer Befund (Nummer 64), so ist eine Charakterisierung der Mutantenkolonien bei den Negativ- und Positivkontrollen vorzunehmen. Beim MLA mit der Microwell-Methode werden Mutantenkolonien als klein betrachtet, die weniger als 25 % des Durchmessers eines Wells bedecken. Als groß gelten Mutantenkolonien, die mehr als 25 % des Well-Durchmessers bedecken. Bei der Agar-Methode werden die Mutantenkolonien und die Koloniegroßen mit einem automatischen Kolonienzähler bestimmt. Die Ansätze zur Bestimmung von Koloniegroßen werden in der Fachliteratur erläutert (19) (38) (40). Die Charakterisierung der Kolonien auf der Negativ- und der Positivkontrolle wird als Nachweis dafür benötigt, dass die Untersuchungen ordnungsgemäß durchgeführt wurden.
43. Für eine Prüfchemikalie kann kein negativer Befund festgestellt werden, wenn in der Positivkontrolle weder große noch kleine Mutantenkolonien angemessen nachgewiesen werden können. Die Charakterisierung der Kolonien kann allgemein Aufschluss darüber geben, ob eine Prüfchemikalie Punktmutationen und/oder Chromosomenveränderungen auslösen kann (Nummer 4).
44. TK6: Normal und langsam wachsende Mutanten unterscheiden sich durch die Inkubationszeit (Nummer 40). Bei der TK6-Prüfung werden sowohl früh als auch spät auftretende Mutanten bei allen Kulturen einschließlich der Negativ- und der Positivkontrollen bewertet. Die Charakterisierung der Kolonien der Negativ- und der Positivkontrolle wird als Nachweis dafür benötigt, dass die Untersuchungen ordnungsgemäß durchgeführt wurden. Für eine Prüfchemikalie kann kein negativer Befund festgestellt werden, wenn in der Positivkontrolle weder früh noch spät auftretende Mutantenkolonien angemessen nachgewiesen werden können. Die Charakterisierung der Kolonien kann allgemein Aufschluss darüber geben, ob eine Prüfchemikalie Punktmutationen und/oder Chromosomenveränderungen auslösen kann (Nummer 4).

Kompetenz des Labors

45. Um ausreichende Erfahrungen mit der Prüfung nachzuweisen, bevor routinemäßige Prüfungen erfolgen, sollte das Labor eine Reihe von Versuchen mit positiven Referenzstoffen durchgeführt haben, die sich unterschiedlicher Mechanismen (mindestens ein aktiver Mechanismus mit und ein aktiver Mechanismus ohne Stoffwechselaktivierung, ausgewählt aus den in Tabelle 1 aufgeführten Stoffen) und verschiedener Negativkontrollen (unter Verwendung verschiedener Lösungsmittel/Vehikel) bedienen. Die Reaktionen dieser Positiv- und Negativkontrollen sollten mit der Literatur im Einklang stehen. Dies gilt nicht für erfahrene Laboratorien, d. h. für Laboratorien, die über eine historische Datenbank im Sinne der Nummern 47-50 verfügen. Bei der MLA sollten die für die Positiv- und die Negativkontrollen ermittelten Werte im Einklang mit den IWGT-Empfehlungen stehen (siehe Tabelle 2).
46. Bei kurzer Behandlungsdauer sowie dann, wenn keine Stoffwechselaktivierung erfolgt ist, sollte eine Auswahl von Positivkontrollstoffen (siehe Tabelle 1) mit kurzer und (bei längeren Behandlungen) mit langer Behandlungsdauer untersucht werden, um die Fähigkeit zur Erkennung mutagener Chemikalien nachzuweisen und die Wirksamkeit des Stoffwechselaktivierungssystems zu ermitteln und zum einen die Eignung der Bedingungen für das Zellwachstum während der Behandlung sowie für die phänotypische Expression und für die Mutantenselektion und zum anderen die Eignung der Auswertungsverfahren zu belegen. Zum Nachweis der Empfindlichkeit und dynamischen Bandbreite des Versuchssystems sollte eine Spanne der Konzentrationen der ausgewählten Stoffe festgelegt werden, um reproduzierbare und konzentrationsabhängige Zunahmen gegenüber dem Hintergrund zu erhalten.

Historische Kontrolldaten

47. Das Labor sollte Folgendes bestimmen:

- den Bereich und die Verteilung historischer Positivkontrollen und

- den Bereich und die Verteilung historischer Negativkontrollen (unbehandelt, Lösungsmittel).

48. Bei der erstmaligen Erfassung von Daten zur Verteilung einer historischen Negativkontrolle sollten gleichzeitige Negativkontrollen veröffentlichten Negativkontrolldaten entsprechen. Werden weitere Versuchsdaten zur Verteilung der Kontrollen hinzugefügt, sollten gleichzeitige Negativkontrollen idealerweise innerhalb der Kontrollgrenzen von 95 % der gewählten Verteilung liegen (64) (65).
49. Die Datenbank des Labors zu historischen Negativkontrollen sollte zunächst mit mindestens 10 Versuchen angelegt werden. Vorzugsweise sollte sie jedoch aus mindestens 20 Versuchen bestehen, die unter vergleichbaren Versuchsbedingungen durchgeführt wurden. Labors sollten Qualitätskontrollverfahren anwenden, wie z. B. Qualitätsregelkarten (z. B. C-Karten oder X-Bar-Karten) (65), um zu ermitteln, wie variabel ihre Positiv- und Negativkontrolldaten sind, und um nachzuweisen, dass die Methodik in ihrem Labor kontrolliert wird (66). Nähere Informationen und Empfehlungen zum Sammeln und zur Verwendung historischer Daten sind der Fachliteratur zu entnehmen (64).
50. Negativkontrolldaten sollten die Mutantenhäufigkeit aus einer Einzelkultur oder vorzugsweise aus Replikatkulturen erfassen, wie in Nummer 27 beschrieben. Gleichzeitige Negativkontrollen sollten idealerweise innerhalb der Kontrollgrenzen von 95 % der Verteilung in der Datenbank des Labors zu historischen Negativkontrollen liegen. Sofern Negativkontrolldaten außerhalb der Kontrollgrenze von 95 % liegen, ist es zulässig, sie in die historische Kontrollverteilung aufzunehmen, solange es sich bei den Daten nicht um „extreme Ausreißer“ handelt und nachgewiesen werden kann, dass das Prüfsystem kontrolliert wird (Nummer 49) und dass kein technisches oder menschliches Versagen vorliegt.
51. Sämtliche Änderungen am Versuchsprotokoll sind auf Übereinstimmung mit den bereits vorhandenen historischen Kontrolldaten zu prüfen. Bei größeren Inkonsistenzen sollte eine neue Datenbank historischer Kontrolldaten erstellt werden.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Darstellung der Prüfergebnisse

52. Die Darstellung der Daten des MLA und der TK6-Prüfung sollte für behandelte Kulturen und für Kontrollkulturen die erforderlichen Daten für die Berechnung der Zytotoxizität (RTG bzw. RS) und die Mutantenhäufigkeit beinhalten wie im Folgenden beschrieben.
53. Beim MLA sollten für die jeweiligen Kulturen das RSG und das RTG, die Kolonierungseffizienz zum Zeitpunkt der Mutantenselektion und die Anzahl der Mutantenkolonien (Agar-Methode) bzw. die Anzahl der leeren Wells (Microwell-Methode) angegeben werden. Unter der Mutantenhäufigkeit ist der zahlenmäßige Anteil der Mutantenzellen pro Million überlebender Zellen zu verstehen. Bei einer positiven Reaktion sollten die Mutantenhäufigkeiten kleiner und großer Kolonien (und/oder die Prozentanteile der Gesamtmutationshäufigkeit) für mindestens eine Konzentration der Prüfchemikalie (im Allgemeinen die höchste Konzentration mit positivem Befund) sowie für die Negativ- und die Positivkontrolle angegeben werden. Bei einer negativen Reaktion sollte die Mutantenhäufigkeit für die Negativ- und für die Positivkontrolle angegeben werden.
54. Bei der TK6-Prüfung sollten für die einzelnen Kulturen jeweils die relative Überlebensrate (RS), die Klonierungseffizienz zum Zeitpunkt der Mutantenselektion und die Anzahl der leeren Wells bei früh und bei spät auftretenden Mutanten angegeben werden. Die MF sollte als Anzahl der Mutantenzellen bezogen auf die Anzahl der überlebenden Zellen angegeben werden und die Gesamtmutationshäufigkeit sowie die Mutantenhäufigkeit (und/oder den Prozentanteil der Gesamtmutationshäufigkeit) der früh und der spät auftretenden Mutanten beinhalten.

Akzeptanzkriterien

55. Beim MLA und bei der TK6-Prüfung sollten die folgenden Anforderungen erfüllt sein, bevor die Gesamtergebnisse einer Prüfchemikalie ermittelt werden.
- Beide Versuchsanordnungen (kurzzeitige Behandlung mit und ohne Stoffwechselaktivierung – siehe Nummer 33) wurden geprüft, sofern nicht bereits mit einer Versuchsanordnung ein positiver Befund ermittelt wurde.
 - Für die Untersuchung ist eine angemessene Anzahl an Zellen und Konzentrationen verfügbar (Nummern 27 und 34-36).
 - Die Kriterien für die Auswahl der höchsten Konzentration entsprechen den Kriterien unter den Nummern 28-30.

Akzeptanzkriterien für Positiv- und Negativkontrollen

56. Die von der IWGT Expert MLA Workgroup durchgeführte Untersuchung umfangreicher MLA-Daten führte zu einem internationalen Konsens in Bezug auf bestimmte Akzeptanzkriterien für den MLA (1) (2) (3) (4) (5). Daher enthält die Prüfmethode spezifische Empfehlungen für die Akzeptanz negativer und positiver Kontrollen und für die Bewertung der Ergebnisse einzelner Stoffe beim MLA. Bei der TK6-Prüfung ist die Datenbasis erheblich kleiner, und die verfügbaren Daten wurden nicht von der Arbeitsgruppe evaluiert.
57. Beim MLA sollte bei jedem Versuch geprüft werden, ob die nicht behandelte Kultur/Lösungsmittelkontrolle die Akzeptanzkriterien der IWGT MLA Workgroup ((4) und folgende Tabelle 2) in Bezug auf die folgenden Punkte erfüllt: (1) MF (wobei zu beachten ist, dass die IWGT beim MLA je nach Verwendung der Agar- oder der Microwell-Methode unterschiedliche MFs ansetzt), (2) Klonierungseffizienz (CE) zum Zeitpunkt der Mutantenselektion und (3) Suspensionswachstum (SG) der Lösungsmittelkontrolle (Formel siehe Anlage 2).

Tabelle 2

Akzeptanzkriterien des MLA

Parameter	Soft-Agar-Methode	Microwell-Methode
Mutantenhäufigkeit	35-140 × 10 ⁻⁶	50-170 × 10 ⁻⁶
Klonierungseffizienz	65-120 %	65-120 %
Suspensionswachstum	8- bis 32-fach (3- bis 4-stündige Behandlung) 32- bis 180-fach (24-stündige Behandlung, wenn durchgeführt)	8- bis 32-fach (3- bis 4-stündige Behandlung) 32- bis 180-fach (24-stündige Behandlung, wenn durchgeführt)

58. Beim MLA sollte bei jeder Prüfung auch bewertet werden, ob die Positivkontrolle/n mindestens eines der beiden folgenden von der IWGT-Arbeitsgruppe entwickelten Akzeptanzkriterien erfüllt/erfüllen:
- Bei der Positivkontrolle ist eine absolute Zunahme der Gesamtmutationshäufigkeit (d. h. eine Zunahme über die Häufigkeit der spontanen Hintergrundmutationen hinaus [eine induzierte MF (IMF)] von mindestens 300×10^{-6}) festzustellen. Mindestens 40 % der IMF sollten sich in der Häufigkeit kleiner Mutantenkolonien widerspiegeln.
 - Die Positivkontrolle führt zu einer Zunahme der Häufigkeit kleiner Mutantenkolonien um mindestens 150×10^{-6} gegenüber der Häufigkeit bei der gleichzeitigen unbehandelten Kontrolle/Lösungsmittelkontrolle (eine induzierte Häufigkeit kleiner Mutantenkolonien von 150×10^{-6}).
59. Bei der TK-Prüfung gilt eine Untersuchung als annehmbar, wenn die gleichzeitige Negativkontrolle als zulässig für die Aufnahme in die Datenbank des Labors mit historischen Negativkontrolldaten betrachtet wird (Nummern 48 und 49). Außerdem sollten die gleichzeitigen Positivkontrollen (Nummer 32) Reaktionen hervorrufen, die mit den Reaktionen kompatibel sind, die in der Datenbank für historische Positivkontrollen erzeugt werden, und gegenüber den gleichzeitigen Negativkontrollen eine statistisch signifikante Zunahme aufweisen.
60. Bei beiden Prüfungen sollte der obere Grenzwert der bei der Positivkontrolle festgestellten Zytotoxizität identisch mit dem Wert der Versuchskulturen sein. Das RTG bzw. die RS darf nicht weniger als 10 % betragen. Die Verwendung einer einzelnen Konzentration (bzw. einer der Konzentrationen der Positivkontrollkulturen, wenn mehrere Konzentrationen verwendet werden) ist hinreichend für den Nachweis, dass die Akzeptanzkriterien der Positivkontrolle erfüllt wurden. Außerdem muss die MF der Positivkontrolle im für das Labor festgestellten annehmbaren Bereich liegen.

Beurteilung und Auswertung der Ergebnisse

61. Im Zusammenhang mit der MLA hat die Mauslymphom-Sachverständigengruppe (Mouse Lymphoma Expert Workgroup) der IWGT umfangreiche Arbeiten zur biologischen Relevanz und zu den Kriterien für eine positive Reaktion durchgeführt (4). Daher enthält diese Prüfmethode spezifische Empfehlungen für die Auswertung der mit dem MLA ermittelten Ergebnisse der Prüfchemikalien (Nummern 62-64). Bei der TK6-Prüfung ist die Datenbasis erheblich kleiner, und die verfügbaren Daten wurden nicht von der Arbeitsgruppe evaluiert. Daher sind die Empfehlungen zur Auswertung der Daten bei der TK6-Prüfung allgemeiner gehalten (Nummern 65 und 66). Weitere Empfehlungen gelten für beide Prüfungen (Nummern 67-71).

MLA

62. Ein Ansatz zur Festlegung positiver und negativer Reaktionen wird empfohlen, um sicherzustellen, dass die erhöhte MF biologisch relevant ist. Anstelle der bei anderen Prüfungen üblichen statistischen Analysen wird bei dieser Prüfung von der Verwendung einer festgelegten induzierten Mutantenhäufigkeit (d. h. einer Zunahme der MF gegenüber der gleichzeitigen Kontrolle) ausgegangen; dieser globale Bewertungsfaktor (GEF) beruht auf der Analyse der Verteilung der MF-Daten der Negativkontrolle der beteiligten Labors (4). Beim MLA unter Verwendung der Agar-Methode beträgt der GEF 90×10^{-6} , und bei der Microwell-Methode wird ein GEF von 126×10^{-6} angenommen.
63. Unter der Voraussetzung, dass alle Akzeptanzkriterien erfüllt sind, gilt eine Prüfchemikalie als eindeutig positiv, wenn bei einer der getesteten Versuchsbedingungen (Nummer 33) die über den gleichzeitigen Hintergrund hinausgehende MF-Zunahme den GEF überschreitet und die Zunahme konzentrationsabhängig ist. (Dies wird beispielsweise mit einem Trendtest festgestellt.) Es wird dann davon ausgegangen, dass die Prüfchemikalie Mutationen in diesem Versuchssystem auslösen kann.
64. Sofern alle Akzeptanzkriterien erfüllt sind, wird eine Prüfchemikalie als eindeutig negativ bewertet, wenn bei allen geprüften Versuchsbedingungen (Nummer 33) keine konzentrationsabhängige Reaktion festgestellt wurde bzw. – wenn eine Zunahme der MF zu verzeichnen ist – wenn die Zunahme der MF den GEF nicht überschreitet. Es wird dann davon ausgegangen, dass die Prüfchemikalie keine Mutationen in diesem Versuchssystem auslösen kann.

TK6

65. Unter der Voraussetzung, dass alle Akzeptanzkriterien erfüllt sind, gilt eine Prüfchemikalie als eindeutig positiv, wenn bei einer der getesteten Versuchsbedingungen (siehe Nummer 33):

- mindestens eine der Versuchskonzentrationen weist gegenüber der gleichzeitigen Negativkontrolle eine statistisch signifikante Zunahme auf,
- ein geeigneter Trendtest zeigt, dass die Zunahme konzentrationsabhängig ist (Nummer 33),
- Ergebnisse liegen außerhalb der Verteilung der historischen Negativkontrolldaten (z. B. auf einer Poisson-Verteilung beruhende Kontrollgrenze von 95 %, siehe Nummer 48).

Sind all diese Kriterien erfüllt, wird davon ausgegangen, dass die Prüfchemikalie in diesem Versuchssystem Mutationen auslösen kann. Für Empfehlungen zu den am besten geeigneten statistischen Methoden siehe Literaturhinweise (66) (67).

66. Unter der Voraussetzung, dass alle Akzeptanzkriterien erfüllt sind, gilt eine Prüfchemikalie als eindeutig negativ, wenn in allen getesteten Versuchsbedingungen (siehe Punkt 33):

- keine der Versuchskonzentrationen eine statistisch signifikante Zunahme gegenüber der gleichzeitigen Negativkontrolle aufweist,
- die Bewertung anhand einer geeigneten Trendprüfung keine konzentrationsabhängige Zunahme ergibt,
- alle Ergebnisse innerhalb der Verteilung der historischen Negativkontrolldaten liegen (z. B. auf einer Poisson-Verteilung beruhende Kontrollgrenze von 95 %, siehe Nummer 48).

Es wird dann davon ausgegangen, dass die Prüfchemikalie keine Mutationen in diesem Versuchssystem auslösen kann.

MLA und TK6:

67. Wenn die Höchstkonzentration auf der Zytotoxizität beruht, sollte bei der Höchstkonzentration ein relatives Gesamtwachstum bzw. eine relative Überlebensrate von 10-20 % erreicht werden. Allgemeiner Konsens ist, dass bei der Auswertung positiver Ergebnisse ausschließlich mit RTG- bzw. RS-Werten im Bereich zwischen 10 und 20 % Vorsicht geboten ist und dass Ergebnisse dann nicht als positiv zu bewerten sind, wenn die Zunahme der MF ausschließlich im Umfang von höchstens eines RTG- bzw. RS-Werts von 10 % (wenn ermittelt) erfolgt (2) (59).

68. In einigen Fällen können zusätzliche Informationen bei der Feststellung hilfreich sein, dass eine Prüfchemikalie nicht mutagen wirkt, wenn keine Kultur vorliegt, bei der ein RTG-Wert im Bereich von 10-20 % der RTG-/RS-Werte ermittelt wird. Dies gilt für folgende Fälle: (1) Es gibt bei einer Reihe von Datenpunkten im Bereich von 20-100 % der RTG-/RS-Werte keine Anzeichen für eine Mutagenität (z. B. keine Dosis-Reaktion, keine Mutantenhäufigkeiten über die in der gleichzeitigen Negativkontrolle oder die historisch ermittelten Häufigkeiten hinaus), und mindestens ein Datenpunkt liegt im Bereich von 20-25 % der RTG-/RS-Werte. (2) Es gibt bei einer Reihe von Datenpunkten im Bereich von 25-100 % der RTG-/RS-Werte keine Anzeichen für eine Mutagenität (z. B. keine Dosis-Reaktion, keine Mutantenhäufigkeiten über die in der gleichzeitigen Negativkontrolle festgestellten Häufigkeiten oder über die historisch ermittelten Häufigkeiten hinaus) und einen negativen Datenpunkt geringfügig unter 10 % der RTG-/RS-Werte. In beiden Fällen kann für die Prüfchemikalie ein negativer Befund festgestellt werden.

69. Bei einer eindeutig positiven oder negativen Reaktion ist eine Verifizierung nicht erforderlich.

70. In den Fällen, in denen die Reaktion, wie oben beschrieben, weder eindeutig negativ noch eindeutig positiv ist, und/oder um die biologische Relevanz eines Ergebnisses zu untermauern, sollten die Daten durch eine fachkundige Beurteilung und/oder anhand weiterer Untersuchungen bewertet werden. Die Durchführung eines Wiederholungsversuchs, möglicherweise unter veränderten Versuchsbedingungen [z. B. Abstände der Konzentrationen, um die Wahrscheinlichkeit der Ermittlung von Datenpunkten im RTG-/RS-Bereich von 10-20 % zu erhöhen, sowie die Verwendung anderer Stoffwechselaktivierungsbedingungen (d. h. Konzentration oder Herkunft von S9) und eine Änderung der Behandlungsdauer], könnte hilfreich sein.

71. In seltenen Fällen erlaubt der Datensatz selbst nach weiteren Untersuchungen keine definitive Aussage zu positiven oder negativen Ergebnissen. Daher sollte die Reaktion der Prüfchemikalie als nicht eindeutig eingestuft werden (d. h. für ein positives und für ein negatives Ergebnis besteht die gleiche Wahrscheinlichkeit).

PRÜFBERICHT

72. Der Prüfbericht sollte folgende Angaben enthalten:

Prüfchemikalie:

- Herkunft, Partienummer, ggf. begrenztes Verwendungsdatum;
- Stabilität der Prüfchemikalie, falls bekannt;
- Löslichkeit und Stabilität der Prüfchemikalie im Lösungsmittel, falls bekannt;
- Messung des pH-Werts, der Osmolalität und ggf. des Niederschlags im Kulturmedium, dem die Prüfchemikalie zugegeben wurde.

Einkomponentiger Stoff:

- physikalisches Erscheinungsbild, Wasserlöslichkeit und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften;
- chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS-Bezeichnung, CAS-Nummer, SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel, Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.

Mehrkomponentiger Stoff, UVCB-Stoffe und Gemische:

- So weit wie möglich Charakterisierung durch die chemische Zusammensetzung (siehe oben), das quantitative Vorkommen und die relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften der einzelnen Komponenten.

Lösungsmittel:

- Begründung der Auswahl des Lösungsmittels;
- Anteil des Lösungsmittels im endgültigen Kulturmedium.

Zellen:

Bei Labor-Masterkulturen:

- Art und Herkunft der Zellen und Historie des Prüflabors;
- Karyotypmerkmale und/oder Modalzahl der Chromosomen;
- zum Erhalt der Zellkultur verwendete Verfahren;
- Nichtvorhandensein von Mycoplasma;
- Verdopplungszeit der Zellen.

Prüfbedingungen:

- Begründung der Wahl der Konzentrationen und der Anzahl der Zellkulturen darunter z. B. Angaben zur Zytotoxizität und Löslichkeitsgrenze;

- Medienzusammensetzung, CO₂-Konzentration, Feuchtigkeit;
- Konzentration der Prüfchemikalie, ausgedrückt als Endkonzentration im Kulturmedium (z. B. µg oder mg/ml oder mM des Kulturmediums);
- Konzentration (und/oder Volumen) des Lösungsmittels und der beigegebenen Prüfchemikalie;
- Inkubationstemperatur;
- Inkubationszeit;
- Behandlungsdauer;
- Zelldichte während der Behandlung;
- Art und Zusammensetzung des Stoffwechselaktivierungssystems (Herkunft von S9, Zubereitungsmethode des S9-Gemisches, Konzentration oder Volumen des S9-Gemisches und S9 im Endmedium, Qualitätskontrollen von S9);
- Positiv- und Negativkontrollstoffe, Endkonzentrationen für die jeweiligen Behandlungsbedingungen;
- Dauer der Expressionszeit (ggf. einschließlich Anzahl der überimpften Zellen, Subkulturen und Medienwechsel);
- Bezeichnung und Konzentration des selektierenden Agens;
- beim MLA verwendete Methode (Agar oder Microwell);
- Akzeptanzkriterien für die Prüfungen;
- Methoden zur Zählung der lebensfähigen und mutierten Zellen;
- Methoden zur Bestimmung der Zytotoxizität;
- evtl. zusätzliche Angaben zur Zytotoxizität und zum verwendeten Verfahren;
- Inkubationszeiten nach dem Plattieren;
- Angaben zur Berücksichtigung der Kolonien nach Größe und Typ (ggf. einschließlich Kriterien für „kleine“ und „große“ Kolonien);
- Kriterien zur Einstufung der Studien als positiv, negativ oder nicht eindeutig;
- Methoden zur Bestimmung des pH-Werts, der Osmolalität (wenn durchgeführt) und des Niederschlags (wenn relevant).

Ergebnisse:

- Anzahl der behandelten Zellen und Anzahl der subkultivierten Zellen der einzelnen Kulturen;
- Toxizitätsparameter (RTG beim MLA und RS bei der TK6-Prüfung);
- Anzeichen für Ausfällungen und Bestimmungszeit;
- Anzahl der plattierten Zellen im selektierenden und im nicht selektierenden Medium

- Anzahl der Kolonien im nicht selektierenden Medium und Anzahl der resistenten Kolonien im selektierenden Medium sowie entsprechende Mutantenhäufigkeiten;
- Koloniegröße bei Negativ- und Positivkontrollen und die Angabe, ob die Prüfchemikalie zumindest in einer Konzentration positiv ist, sowie die entsprechenden Mutantenhäufigkeiten;
- nach Möglichkeit Dosis-Reaktions-Verhältnis;
- Daten zu gleichzeitigen Negativkontrollen (Lösungsmittelkontrollen) und Positivkontrollen (Konzentrationen und Lösungsmittel);
- historische Daten zu Negativkontrollen (Lösungsmittelkontrollen) und Positivkontrollen (Konzentrationen und Lösungsmittel) mit Bereichen, Mittelwerten und Standardabweichungen; Anzahl der Prüfungen, auf denen die historischen Kontrollen beruhen;
- statistische Analysen (für einzelne Kulturen und (ggf.) für gepoolte Replikatkulturen) sowie ggf. p-Werte; beim MLa zusätzlich die GEF-Bewertung.

Erörterung der Ergebnisse.

Schlussfolgerung.

LITERATUR

- (1) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J. (Berichterstatter), Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cole, J., Gollapudi, B., Harrington-Brock, K., Mitchell, A., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., San, R., Shimada, H. und Stankowski, L.F. Jr. (2000). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus (TK) Gene Mutation Assay: International Workshop on Genotoxicity Test Procedures (IWGTP) Workgroup Report, Environ. Mol. Mutagen., 35(3): 185-190.
- (2) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Harrington-Brock, K., Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Collard, D., Fellows, M., Flanders, K., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Kraycer, J., McEnaney, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Oliver, Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Shimada, H. und Stankowski, L.F. Jr. (2002). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: Follow-Up International Workshop on Genotoxicity Test Procedures, New Orleans, Louisiana, (April 2000), Environ. Mol. Mutagen., 40 (4): 292-299.
- (3) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Delongchamp, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A., Wakuri, S. und Yoshimura, I. (2003). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: International Workshop (Plymouth, UK) on Genotoxicity Test Procedures Workgroup Report, Mutation Res., 540: 127-140.
- (4) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Delongchamp, R., Durward, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Lloyd, M., Majeska, J., Myhr, B., O'Donovan, M., Omori, T., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A.K., Van Goethem, F., Wakuri, S. und Yoshimura, I. (2006). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Gene Mutation Assay: Follow-Up Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Tests – Aberdeen, Scotland, 2003 – Assay Acceptance Criteria, Positive Controls, and Data Evaluation, Environ. Mol. Mutagen., 47 (1): 1-5.
- (5) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Clay, P., Doppalapudi, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Muster, W., Pant, K., Kidd, D.A., Lorge, E., Lloyd, M., Myhr, B., O'Donovan, M., Riach, C., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A.K. und Van Goethem, F. (2007). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Mutation Assay: Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing, San Francisco, 2005, Recommendations for 24-h Treatment, Mutation. Res., 627 (1): 36-40.
- (6) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment No. 234, OECD, Paris.

- (7) Fellows M.D., Luker, T., Cooper, A. und O'Donovan, M.R. (2012). Unusual Structure-Genotoxicity Relationship in Mouse Lymphoma Cells Observed with a Series of Kinase Inhibitors. *Mutation Res.*, 746 (1): 21-28.
- (8) Honma, M., Momose, M., Sakamoto, H., Sofuni, T. und Hayashi, M. (2001). Spindol Poisons Induce Allelic Loss in Mouse Lymphoma Cells Through Mitotic Non-Disjunction. *Mutation Res.*, 493 (1-2): 101-114.
- (9) Wang, J., Sawyer, J.R., Chen, L., Chen, T., Honma, M., Mei, N. und Moore, M.M. (2009). The Mouse Lymphoma Assay Detects Recombination, Deletion, and Aneuploidy. *Toxicol. Sci.*, 109 (1): 96-105.
- (10) Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A. und Hozier, J.C. (1990). Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. *Proc. National. Academy. Sci. USA*, 87 (1): 51-55.
- (11) Hozier, J., Sawyer, J., Moore, M., Howard, B. und Clive, D. (1981). Cytogenetic Analysis of the L5178Y/TK^{+/-} Leads to TK^{-/-} Mouse Lymphoma Mutagenesis Assay System. *Mutation Res.*, 84 (1): 169-181.
- (12) Hozier, J., Sawyer, J., Clive, D. und Moore, M.M. (1985). Chromosome 11 Aberrations in Small Colony L5178Y TK^{-/-} Mutants Early in their Clonal History. *Mutation Res.*, 147 (5): 237-242.
- (13) Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. und Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFTr) Mutants of L5178Y/TK^{+/-} Mouse Lymphoma Cells. *Mutation Res.*, 151 (1): 161-174.
- (14) Liber, H.L., Call, K.M. und Little, J.B. (1987). Molecular and Biochemical Analyses of Spontaneous and X-Ray-Induced Mutants in Human Lymphoblastoid Cells. *Mutation Res.*, 178 (1): 143-153.
- (15) Li, C.Y., Yandell, D.W. und Little, J.B. (1992). Molecular Mechanisms of Spontaneous and Induced Loss of Heterozygosity in Human Cells *In Vitro*. *Somat. Cell Mol. Genet.*, 18 (1): 77-87.
- (16) Honma, M., Hayashi, M. und Sofuni, T. (1997). Cytotoxic and Mutagenic Responses to X-Rays and Chemical Mutagens in Normal and P53-Mutated Human Lymphoblastoid Cells. *Mutation Res.*, 374 (1): 89-98.
- (17) Honma, M., Momose, M., Tanabe, H., Sakamoto, H., Yu, Y., Little, J.B., Sofuni, T. und Hayashi, M. (2000). Requirement of Wild-Type P53 Protein for Maintenance of Chromosomal Integrity. *Mol. Carcinogen.*, 28 (4): 203-214.
- (18) Amundson, S.A. und Liber, H.L. (1992). A Comparison of Induced Mutation at Homologous Alleles of the TK Locus in Human Cells. II. Molecular Analysis of Mutants. *Mutation Res.*, 267 (1): 89-95.
- (19) Schisler, M.R., Moore, M.M. und Gollapudi, B.B. (2013). *In Vitro* Mouse Lymphoma (L5178Y TK^{+/-} -3.7.2C) Forward Mutation Assay. In *Protocols in Genotoxicity Assessment A. Dhawan and M. Bajpayee (Eds.)*, Springer Protocols, Humana Press: 27-50.
- (20) Long, L.H., Kirkland, D., Whitwell, J. und Halliwell, B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium. *Mutation Res.*, 634 (1-2): 177-183.
- (21) Nesslany, F., Simar-Meintieres, S., Watzinger, M., Talahari, I. und Marzin, D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrotriacetic Acid. *Environ. Mol. Mutagen.*, 49 (6): 439-452.
- (22) Brusick, D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion Concentrations. *Environ. Mutagen.*, 8 (6): 879-886.

- (23) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. und Okumura, K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. *Mutation Res.*, 268 (2): 297-305.
- (24) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M.Jr, Brusick, D., Ashby, J. und Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Res.*, 257: 147-204.
- (25) Wang, J., Heflich, R.H. und Moore, M.M. (2007). A Method to Distinguish Between the *De Novo* Induction of Thymidine Kinase Mutants and the Selection of Pre-Existing Thymidine Kinase Mutants in the Mouse Lymphoma Assay. *Mutation Res.*, 626 (1-2): 185-190.
- (26) Fischer, G.A. (1958). Studies on the Culture of Leukemic Cells *In Vitro*. *Ann. N.Y. Academy Sci.*, 76: 673-680.
- (27) Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson, A.G. und Brown, M.M.M. (1979). Validation and Characterization of the L5178Y/TK^{+/-} Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. *Mutation Res.*, 59(1): 61-108.
- (28) Sawyer, J., Moore, M.M., Clive, D. und Hozier, J. (1985). Cytogenetic Characterization of the L5178Y TK^{+/-} 3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, *Mutation Res.*, 147 (5): 243-253.
- (29) Sawyer, J.R., Moore, M.M. und Hozier, J.C. (1989). High-Resolution Cytogenetic Characterization of the L5178Y TK^{+/-} Mouse Lymphoma Cell Line, *Mutation Res.*, 214 (2): 181-193.
- (30) Sawyer, J.R., Binz, R.L., Wang, J. und Moore, M.M. (2006). Multicolor Spectral Karyotyping of the L5178Y TK^{+/-}-3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, *Environ. Mol. Mutagen.*, 47 (2): 127-131.
- (31) Fellows, M.D., McDermott, A., Clare, K.R., Doherty, A. und Aardema, M.J. (2014). The Spectral Karyotype of L5178Y TK^{+/-} Mouse Lymphoma Cells Clone 3.7.2C and Factors Affecting Mutant Frequency at the Thymidine Kinase (TK) Locus in the Microtitre Mouse Lymphoma Assay, *Environ. Mol. Mutagen.*, 55 (1): 35-42.
- (32) Storer, R.D., Jaynak, A.R., McKelvey, T.W., Elia, M.C., Goodrow, T.L. und DeLuca, J.G. (1997). The Mouse Lymphoma L5178Y TK^{+/-} Cell Line is Heterozygous for a Codon 170 Mutation in the P53 Tumor Suppressor Gene. *Mutation. Res.*, 373 (2): 157-165.
- (33) Clark, L.S., Harrington-Brock, K., Wang, J., Sargent, L., Lowry, D., Reynolds, S.H. und Moore, M.M. (2004). Loss of P53 Heterozygosity is not Responsible for the Small Colony Thymidine Kinase Mutant Phenotype in L5178Y Mouse Lymphoma Cells. *Mutagen.*, 19 (4): 263-268.
- (34) Skopek, T.R., Liber, H.L., Penman, B.W. und Thilly, W.G. (1978). Isolation of a Human Lymphoblastoid Line Heterozygous at the Thymidine Kinase Locus: Possibility for a Rapid Human Cell Mutation Assay. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 84 (2): 411-416.
- (35) Honma, M. (2005). Generation of Loss of Heterozygosity and its Dependency on P53 Status in Human Lymphoblastoid Cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 45 (2-3): 162-176.
- (36) Xia, F., Wang, X., Wang, Y.H., Tsang, N.M., Yandell, D.W., Kelsey, K.T. und Liber, H.L. (1995). Altered P53 Status Correlates with Differences in Sensitivity to Radiation-Induced Mutation and Apoptosis in Two Closely Related Human Lymphoblast Lines. *Cancer. Res.*, 55 (1): 12-15.
- (37) Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, A. Sutter, D.J. Kirkland (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Manuskript in Vorbereitung).

- (38) Lloyd, M. und Kidd, D. (2012). The Mouse Lymphoma Assay. Springer Protocols: Methods in Molecular Biology 817, Genetic Toxicology Principles and Methods, Hrsg. Parry and Parry, Humana Press. ISBN, 978-1-61779-420-9, 35-54.
- (39) Mei, N., Guo, X. und Moore, M.M. (2014). Methods for Using the Mouse Lymphoma Assay to Screen for Chemical Mutagenicity and Photo-Mutagenicity. In: Optimization in Drug Discover: *In Vitro* Methods: Yan, Z, und Caldwell (Hrsg.) , 2nd Edition, GW; Humana Press, Totowa, NJ.
- (40) Liber, H.L. und Thilly, W.G. (1982). Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploidhuman Lymphoblasts. *Mutation Res.*, 94 (2): 467-485.
- (41) Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., Merten, OW., Price, A., Schechtman, L., Stacey, G. und Stokes, W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. *ATLA*, 33 (3): 261-287.
- (42) Moore, M.M. und Howard, B.E. (1982). Quantitation of Small Colony Trifluorothymidine-Resistant Mutants of L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Cells in RPMI-1640 Medium, *Mutation Res.*, 104 (4-5): 287-294.
- (43) Ames, B.N., McCann, J. und Yamasaki, E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 31 (6): 347-364.
- (44) Maron, D.M. und Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 113 (3-4): 173-215.
- (45) Natarajan, , A.T., Bates, , A.D, Van Buul, , P.P.W., Meijers, M. und de Vogel, N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens After Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. *Mutation Res.*, 37 (1): 83-90.
- (46) Matsuoka, A., Hayashi, M. und Ishidate, M. Jr. (1979). Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*. *Mutation Res.*, 66 (3): 277-290.
- (47) Ong, T.M., u. a. (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, 4 (1): 55-65
- (48) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. und Wolf, R.C. (1992). Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. *Mutagen.*, 7 (3): 175-177.
- (49) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. und Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. de Serres F.J., u. a., Hrsg., Elsevier, North-Holland, S. 85-88.
- (50) Galloway, S.M., u. a. (1994). Report from Working Group on *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations. *Mutation Res.*, 312 (3): 241-261.
- (51) Johnson, T.E., Umbenhauer, D.R. und Galloway, S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/Beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, *Environ. Mol. Mutagen.*, 28 (1): 51-59.
- (52) UNEP (2001). Stockholmer Übereinkommen über persistente organische Schadstoffe, Umweltprogramm der Vereinten Nationen (UNEP).

- (53) Krahn, D.F., Barsky, F.C. und McCooey, K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Genotoxic Effects of Airborne Agents Tice R.R., Costa D.L. and Schaich K.M. (Hrsg.). New York, Plenum, S. 91-103.
- (54) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. und Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. Environ. Mutagen., 5 (6): 795-801.
- (55) Asakura, M., Sasaki, T., Sugiyama, T., Arito, H., Fukushima, S. und Matsushima, T. (2008). An Improved System for Exposure of Cultured Mammalian Cells to Gaseous Compounds in the Chromosomal Aberration Assay. Mutation Res., 652 (2): 122-130.
- (56) Arlett, C.F., u. a. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Hrsg.), Cambridge University Press, S. 66-101.
- (57) Morita, T., Honma, M. und Morikawa, K. (2012). Effect of Reducing the Top Concentration Used in the *In Vitro* Chromosomal Aberration Test in CHL Cells on the Evaluation of Industrial Chemical Genotoxicity. Mutation Res., 741 (1-2): 32-56.
- (58) Brookmire, L., Chen, J.J. und Levy, D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay. Environ. Mol. Mutagen., 54 (1): 36-43.
- (59) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Abrufbar unter: [https://www.federalregister.gov/a/2012-13774].
- (60) Honma, M. und Hayashi, M. (2011). Comparison of *In Vitro* Micronucleus and Gene Mutation Assay Results for P53-Competent Versus P53-Deficient Human Lymphoblastoid Cells. Environ. Mol. Mutagen., 52 (5): 373-384.
- (61) Moore-Brown, M.M., Clive, D., Howard, B.E., Batson, A.G. und Johnson, K.O. (1981). The Utilization of Trifluorothymidine (TFT) to Select for Thymidine Kinase-Deficient (TK^{-/-}) Mutants from L5178Y/TK^{+/-} Mouse Lymphoma Cells, Mutation Res., 85 (5): 363-378.
- (62) Liber, H.L., Yandell, D.W. und Little, J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HRPT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK locus. Mutation Res., 216 (1): 9-17.
- (63) Furth, E.E., Thilly, W.G., Penman, B.W., Liber, H.L. und Rand, W.M. (1981). Quantitative Assay for Mutation in Diploid Human Lymphoblasts Using Microtiter Plates. Anal. Biochem., 110 (1): 1-8.
- (64) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H. J. und Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, Mutation Res., 723 (2): 87-90.
- (65) Ryan, T.P. (2000). Statistical Methods for Quality Improvement. John Wiley and Sons, New York 2nd Edition.
- (66) OECD (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 199.), Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (67) Fleiss, J.L., Levin, B. und Paik, M.C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

Anlage 1

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

Aneugen: Eine Chemikalie oder ein Prozess, die/der durch Wechselwirkung mit den Komponenten des mitotischen oder meiotischen Zellteilungszyklus zu Aneuploidie in Zellen oder Organismen führt.

Aneuploidie: Eine Abweichung von der normalen diploiden (oder haploiden) Chromosomenzahl durch ein einziges Chromosom oder mehr, nicht aber durch einen ganzen (oder mehrere) Chromosomensatz/-sätze (Polyploidie).

Basenpaaraustauschmutagene: Chemikalien, die den Austausch von Basenpaaren in der DNA verursachen.

Chemikalie: Ein Stoff oder ein Gemisch.

Expressionszeit des Phänotyps: Die Zeit nach der Behandlung, in der sich die genetische Alteration im Genom ausprägt und bereits vorhandene Genprodukte so weit abgebaut werden, dass die phänotypischen Eigenschaften verändert werden.

Genotoxisch: Ein allgemeiner Begriff, der alle Typen von DNA- oder Chromosomenschädigungen umfasst, einschließlich DNA-Brüchen, Addukt-Neubildungen, Mutationen, Chromosomenaberrationen sowie Aneuploidie. Nicht alle genotoxischen Effekte führen zu Mutationen oder stabilen Chromosomenschäden.

Klastogen: Chemikalie oder Prozess, die/der strukturelle Chromosomenaberrationen in Zell- oder Organismenpopulationen verursacht.

Klonierungseffizienz: Der Prozentanteil der mit einer niedrigen Dichte plattierten Zellen, die sich zu einer zählbaren Kolonie entwickeln können.

Lösungsmittelkontrolle: Veränderung der Chromosomenstruktur, nachweisbar durch mikroskopische Untersuchung des Metaphase-Stadiums der Zellteilung, äußert sich in Form von Deletionen und Fragmenten, intrachromosomalen oder reziproken Translokationen.

Mitotische Rekombination: Während der Mitose Rekombination homologer Chromatiden, die zur Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen oder einem Verlust der Heterozygotie führen kann.

Mutagen: Auslöser einer Erbgutveränderung der DNA-Basenpaarsequenz(en) in Genen oder in der Chromosomenstruktur (Chromosomenaberrationen).

Mutantenhäufigkeit (MF): Verhältnis der Anzahl der mutierten Zellen zur Anzahl der lebensfähigen Zellen.

Prüfchemikalie: Stoff oder Gemisch, der/das mit dieser Prüfmethode untersucht wird.

Rasterschubmutagene: Chemikalien, die die Addition oder Deletion eines oder mehrerer Basenpaare im DNA-Molekül verursachen.

Relative Überlebensrate (RS): Die relative Überlebensrate wird als Maßstab für die behandlungsbedingte Zytotoxizität bei der TK6 angenommen. Dabei handelt es sich um die relative Klonierungseffizienz (CE) von unmittelbar nach der Behandlung ausplattierten Zellen bereinigt um Zellverluste während der Behandlung bezogen auf die Klonierungseffizienz der Negativkontrolle.

Relatives Gesamtwachstum (RTG): Das relative Gesamtwachstum ist ein Maß der behandlungsbedingten Zytotoxizität beim MLA. Das RTG ist ein Maß für das relative (auf die Vehikelkontrolle bezogene) Wachstum der Prüfkulturen während der Behandlung, der zweitägigen Expression und der Klonierung der selektionierten Mutanten im Laufe der Prüfung. Das RSG der einzelnen Prüfkulturen wird mit der relativen Klonierungseffizienz der Prüfkultur zum Zeitpunkt der Mutantenselektion multipliziert und bezogen auf die Klonierungseffizienz der Negativkontrolle/Lösungsmittelkontrolle ausgedrückt (Clive und Spector, 1975).

Relatives Suspensionswachstum (RSG): Beim MLA das innerhalb von zwei Tagen zu verzeichnende relative Gesamtwachstum der Suspension der Prüfkultur bezogen auf das Gesamtwachstum der Suspension der Negativkontrolle/Lösungsmittelkontrolle in zwei Tagen (Clive und Spector, 1975). Das RSG sollte das relative Wachstum der Prüfkultur bezogen auf die Negativkontrolle/Lösungsmittelkontrolle während der Behandlungszeit beinhalten.

S9-Gemisch: Gemisch aus der S9-Leberfraktion und für die metabolische Enzymaktivität notwendigen Ko-Faktoren.

S9-Leberfraktion: Überstand des Leberhomogenats nach Zentrifugieren mit 9 000 g, d. h. Rohleberextrakt.

Suspensionswachstum (SG): Die n-fache Zunahme der Anzahl der Zellen im Laufe der Behandlung und der Expression während des MLA. Das SG wird durch Multiplikation der n-fachen Zunahme an Tag 1 mit der n-fachen Zunahme an Tag 2 bei der kurzzeitigen (3- bis 4-stündigen) Behandlung berechnet. Bei einer 24-stündigen Behandlung ist das SG die n-fache Zunahme während der 24-stündigen Behandlung multipliziert mit den n-fachen Zunahmen an den Expressionstagen 1 und 2.

Unbehandelte Kontrollen: Kulturen, die nicht behandelt werden (d. h. weder mit der Prüfchemikalie noch mit Lösungsmittel), jedoch in gleicher Weise aufgearbeitet werden wie die Kulturen, die mit der Prüfchemikalie behandelt werden.

Vorwärtsmutation: Genmutation vom Elterntyp zur mutierten Form, die eine Veränderung oder den Ausfall der Enzymaktivität oder der Funktion des kodierten Proteins bewirkt.

Zytotoxizität: Bei den Assays im Rahmen dieser Prüfmethode wird die Zytotoxizität als Reduzierung des relativen Gesamtwachstums (RTG) beim MLA bzw. der relativen Überlebensrate (RS) bei der TK6-Prüfung bezeichnet.

Anlage 2

FORMELN

Relative Populationsverdopplung (RPD)

Für die Durchführung des MLA mit der Agar- und der Microwell-Methode gilt:

Zytotoxizität ist das relative Gesamtwachstum (RTG); dieses beinhaltet das relative Suspensionswachstum (RSG) während der zweitägigen Expressionszeit und die zum Zeitpunkt der Mutantenselektion ermittelte relative Klonierungseffizienz (RCE). RTG, RSG und RCE werden in Prozent ausgedrückt.

Berechnung des RSG: Als Suspensionswachstum 1 (SG_1) wird das Wachstum zwischen Tag 0 und Tag 1 bezeichnet (Zellkonzentration an Tag 1 / Zellkonzentration an Tag 0). Suspensionswachstum 2 (SG_2) ist das Wachstum zwischen Tag 1 und Tag 2 (Zellkonzentration an Tag 2 / Zellkonzentration an Tag 1). Als RSG wird das Gesamtwachstum der Suspension ($SG_1 \times SG_2$) der behandelten Kultur bezogen auf die unbehandelte Kontrolle / Lösungsmittelkontrolle bezeichnet. Dabei gilt: $RSG = [SG_{1(test)} \times SG_{2(test)}] / [SG_{1(control)} \times SG_{2(control)}]$ SG_1 sollte anhand der Ausgangszellkonzentration bei Beginn der Behandlung berechnet werden. Damit werden unterschiedliche Zytotoxizitätswirkungen in der Prüfkultur / den Prüfkulturen während der Behandlung berücksichtigt.

Als RCE wird die relative Klonierungseffizienz der Prüfkultur bezogen auf die relative Klonierungseffizienz der unbehandelten Kontrolle / Lösungsmittelkontrolle zum Zeitpunkt der Mutantenselektion bezeichnet.

Relatives Gesamtwachstum (RTG): $RTG = RSG \times RCE$

TK6**Relative Überlebensrate (RS):**

Die Zytotoxizität wird anhand der relativen Überlebensrate ermittelt, d. h. anhand der Klonierungseffizienz (CE) von Zellen, die nach der Behandlung umgehend plattiert werden; dabei ist eine Bereinigung um Zellverluste während der Behandlung im Vergleich zur Klonierungseffizienz bei Negativkontrollen (mit einer Überlebensrate von 100 %) vorzunehmen. Die Bereinigung um Zellverluste bei der Behandlung kann wie folgt vorgenommen werden:

$$\text{Bereinigte CE} = CE \times \frac{\text{Anzahl der Zellen am Ende der Behandlung}}{\text{Anzahl der Zellen bei Beginn der Behandlung}}$$

Die RS einer mit einer Prüfchemikalie behandelten RS wird wie folgt berechnet:

$$RS = \frac{\text{Bereinigte CE der behandelten Kultur}}{\text{Bereinigte CE der Lösungsmittelkontrolle}} \times 100$$

Mutantenhäufigkeit bei MLA und TK6

Als Mutantenhäufigkeit (MF) wird die Klonierungseffizienz von Mutantenkolonien im selektierenden Medium (CE_M) bereinigt um die Klonierungseffizienz im nicht selektierenden Medium zum Zeitpunkt der Mutantenselektion (CE_V) bezeichnet (d. h. $MF = CE_M/CE_V$). Im Folgenden wird die Berechnung der Klonierungseffizienz-Werte beim Klonieren mit der Agar-Methode und der Microwell-Methode beschrieben.

MLA mit der Agar-Methode: Beim MLA mit der Soft-Agar-Methode werden die Anzahl der Kolonien auf der Platte zur Mutantenselektion (C_M) und die Anzahl der Kolonien auf der Platte, die nicht zur Selektion von Mutanten, sondern zur Bestimmung der Klonierungseffizienz (Anzahl der lebensfähigen Klone) (C_V) vorgesehen ist, unmittelbar durch Zählen der Klone ermittelt. Wenn 600 Zellen zur Bestimmung der Klonierungseffizienz (CE) auf der Platte zur Mutantenselektion (CE_M) und auf der Platte, die nicht zur Selektion von Mutanten, sondern zur Bestimmung der Klonierungseffizienz (Anzahl der lebensfähigen Klone) (CE_V) vorgesehen ist, ausplattiert wurden, werden 3×10^6 Zellen zur Mutantenselektion verwendet.

$$CE_M = C_M / (3 \times 10^6) = (C_M / 3) \times 10^{-6}$$

$$CE_V = C_V / 600$$

MLA und TK6 – Microwell-Methode: Wenn der MLA mit der Microwell-Methode durchgeführt wird, werden C_M und C_V als Produkt der Gesamtzahl der Microwells (TW) und der wahrscheinlichen Anzahl der Kolonien pro Well (P) auf den Microwell-Platten ermittelt.

$$C_M = P_M \times TW_M$$

$$C_V = P_V \times TW_V$$

Beim Null-Term der Poisson-Verteilung (Furth u. a., 1981) wird P wie folgt berechnet:

$$P = - \ln (EW / TW)$$

Wobei gilt: EW = leere Wells und TW = Gesamtzahl der Wells. Daher ist

$$CE_M = C_M / T_M = (P_M \times TW_M) / T_M$$

$$CE_V = C_V / T_V = (P_V \times TW_V) / T_V$$

Bei Durchführung des MLA mit der Microwell-Methode wird die Mutantenhäufigkeit (kleine und große Kolonien) für kleine und große Kolonien auf die gleiche Weise jeweils anhand der Anzahl leerer Wells berechnet.

Bei der TK6-Prüfung wird die Mutantenhäufigkeit (kleine und große Kolonien) danach bestimmt, ob die Mutanten früh oder später auftreten.