

# Rolle des Differenzierungszustandes für die Empfindlichkeit von Säugerzellen gegenüber genotoxischen Agenzien

Role of the differentiation status for the sensitivity  
of mammalian cells to genotoxic agents



## **Dissertation**

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades

der Graduate School of Life Sciences

an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Klasse Biomedizin

vorgelegt von

**Gracia Anna Montag, geb. Kukielka**

aus Rybnik, Polen

Würzburg, 2018

Meinen Eltern in Liebe gewidmet.

Eingereicht am: \_\_\_\_\_

**MITGLIEDER DES PROMOTIONSKOMITEES:**

Vorsitzender: \_\_\_\_\_

1. Betreuer: Prof. Dr. Helga Stopper
2. Betreuer: Prof. Dr. Thomas Haaf
3. Betreuer: Prof. Dr. Markus Christmann

Datum des Promotionskolloquiums: \_\_\_\_\_

Datum der Aushändigung der Doktorurkunde: \_\_\_\_\_

---

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>1</b>
<hr/>	
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>5</b>
<b>1.1 ONTOGENESE</b>	<b>5</b>
1.1.1 PHYSIOLOGISCHE DIFFERENZIERUNGSMODELLE	7
1.1.2 NICHT-PHYSIOLOGISCHE DIFFERENZIERUNGSMODELLE	7
<b>1.2 KARZINOGENESE</b>	<b>8</b>
<b>1.3 THERAPIEVERFAHREN BEI KREBS</b>	<b>10</b>
<b>1.4 ZYTOSTATIKA UND ANDERE GENOTOXISCHE AGENZIEN</b>	<b>11</b>
1.4.1 DOXORUBICIN	12
1.4.2 ETOPOSID	13
1.4.3 METHYLMETHANSULFONAT	14
1.4.4 MITOMYCIN C	14
1.4.5 KLASSISCHE VINCA-ALKALOIDE	15
1.4.6 NEUE VINCA-ALKALOIDE	18
<b>2 ZIELSETZUNG</b>	<b>20</b>
<hr/>	
<b>3 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>21</b>
<b>3.1 VERBRAUCHSMATERIAL</b>	<b>21</b>
<b>3.2 CHEMIKALIEN UND LÖSUNGEN</b>	<b>21</b>
<b>3.3 BIOLOGISCHES MATERIAL</b>	<b>25</b>
3.3.1 MULTIPOTENTE PRIMÄRE ZELLEN (HÄMATOPOETISCHE STAMMZELLEN)	25
3.3.2 IMMORTALISIERTE ZELLINIEN	25
3.3.2.1 TK6-Zellen	25
3.3.2.2 HT-22-Zellen	26
3.3.2.3 CaCo2-Zellen	26
3.3.2.4 HL-60-Zellen	26
<b>3.4 MEDIEN FÜR DIE ZELLKULTUR</b>	<b>27</b>
<b>3.5 METHODEN</b>	<b>28</b>
3.5.1 ZELLKULTIVIERUNG	28
3.5.1.1 Einfrieren und Auftauen der immortalisierten Zelllinien	28
3.5.1.2 Auftauen von hämatopoetischen Stammzellen	29

3.5.2	KULTIVIERUNG UND SUBKULTIVIERUNG DER ZELLEN	30
3.5.2.1	Hämatopoetische Stammzellen	30
3.5.2.2	TK6-Zellen	30
3.5.2.3	HT-22-Zellen	31
3.5.2.4	CaCo2-Zellen	31
3.5.2.5	HL-60-Zellen	32
3.5.3	ZELLZAHLBESTIMMUNG	32
3.5.4	MYKOPLASMENTEST	32
3.5.5	ZELLDIFFERENZIERUNG	33
3.5.5.1	HT-22-Zellen	33
3.5.5.2	CaCo2-Zellen	33
3.5.5.3	HL-60-Zellen	34
3.5.6	BESTIMMUNG DES DIFFERENZIERUNGSSTATUS	35
3.5.6.1	HT-22-Zellen	35
3.5.6.2	CaCo2-Zellen	36
3.5.6.3	HL-60-Zellen	36
3.5.7	BESTIMMUNG DER DNS-KONDENSATIONSDICHTE	38
3.5.8	BESTIMMUNG DER DNS-MENGE	39
3.5.9	VITALITÄTSTEST	39
3.5.10	MIKROKERNTEST	40
3.5.11	EINZELZELLGELELEKTROPHORESE	41
3.5.11.1	Bestimmung des DNS-Schadens	42
3.5.11.2	Inhibierung der Topoisomerase	44
3.5.11.3	Bestimmung der DNS-Schadensreparatur nach DNS-DNS-Crosslink	45
3.5.11.4	Bestimmung der DNS-Schadensreparatur nach UV-Strahlung	46
3.5.12	DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE APOPTOSEDETEKTION	46
3.5.13	DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ZELLYKLUSDETEKTION	48
3.5.14	DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE DETEKTION DER REAKTIVEN SAUERSTOFFSPEZIES	49
3.5.15	MIKROSKOPISCHE DETEKTION REAKTIVER SAUERSTOFFSPEZIES	50
3.5.16	STATISTISCHE DATENAUSWERTUNG	51
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>52</b>
<b>4.1</b>	<b>HÄMATOPOETISCHE STAMMZELLEN IM VERGLEICH ZU TK6-ZELLEN</b>	<b>52</b>

---

4.1.1	VITALITÄT	53
4.1.2	PROLIFERATION	55
4.1.3	APOPTOSE	58
4.1.4	MITOSE	61
4.1.5	MIKROKERNE	64
<b>4.2</b>	<b>LEUKÄMIEZELLINIE HL-60</b>	<b>67</b>
4.2.1	VITALITÄT	68
4.2.2	PROLIFERATION	70
4.2.3	APOPTOSE	72
4.2.4	FRÜHE APOPTOSE	74
4.2.5	ZELLZYKLUSANALYSE	77
<b>4.3</b>	<b>EXPONENTIELL WACHSENDE ZELLINIEN IM VERGLEICH ZU DIFFERENZIIERTEN ZELLINIEN</b>	<b>79</b>
4.3.1	ZELLDIFFERENZIERUNG UND DIFFERENZIERUNGSKONTROLLE	80
4.3.1.1	HT-22-Zellen	80
4.3.1.2	CaCo2-Zellen	82
4.3.1.3	HL-60-Zellen	83
4.3.2	DNS-KONDENSATIONSDICHTE	84
4.3.3	DNS-MENGE	87
4.3.4	VITALITÄT	90
4.3.5	DNS-SCHADEN	96
4.3.6	DNS-SCHADENSREPARATUR	101
4.3.7	REAKTIVE SAUERSTOFFSPEZIES	106
4.3.7.1	DCF-Färbung	106
4.3.7.2	DHE-Färbung	108
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>110</b>
<b>5.1</b>	<b>HÄMATOPOETISCHE STAMMZELLEN IM VERGLEICH ZU TK6-ZELLEN</b>	<b>110</b>
5.1.1	VITALITÄT	111
5.1.2	PROLIFERATION	111
5.1.3	APOPTOSE	112
5.1.4	MITOSE	113
5.1.5	MIKROKERNE	114
<b>5.2</b>	<b>LEUKÄMIEZELLINIE HL-60</b>	<b>117</b>

5.2.1	VITALITÄT	118
5.2.2	PROLIFERATION	119
5.2.3	APOPTOSE	119
5.2.4	FRÜHE APOPTOSE	120
5.2.5	ZELLZYKLUSANALYSE	121
<b>5.3</b>	<b>EXPONENTIELL WACHSENDE ZELLINIEN IM VERGLEICH ZU DIFFERENZIIERTEN ZELLINIEN</b>	<b>122</b>
5.3.1	DIFFERENZIERUNG UND DIFFERENZIERUNGSKONTROLLE	122
5.3.2	DNS-KONDENSATIONSDICHTE	123
5.3.3	DNS-MENGE	124
5.3.4	VITALITÄT	125
5.3.5	DNS-SCHADEN	127
5.3.6	DNS-SCHADENSREPARATUR	130
5.3.7	REAKTIVE SAUERSTOFFSPEZIES	134
5.3.7.1	DCF-Färbung	134
5.3.7.2	DHE-Färbung	134
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>		<b>136</b>
<b>SUMMARY</b>		<b>138</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>		<b>140</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>		<b>149</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>		<b>153</b>
<b>DANKSAGUNG</b>		<b>154</b>
<b>PUBLIKATIONSLISTE</b>		<b>155</b>
<b>LEBENS LAUF</b>		<b>157</b>
<b>EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG</b>		<b>159</b>
<b>ANHANG</b>		<b>160</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
°C	Grad Celsius
16a	Quartäres Ammoniumsalz des Vindolins
17b	Quartäres Ammoniumsalz des 3,5-Dimethoxyanilins
18a	Quartäres Ammoniumsalz des Vinblastins
4CBL	4-Chlorochablastin
4CCR	4-Chlorochacristin
5-Aza	5-Azacytidin
Aph	Aphidicolin
ATP	Adenosintriphosphat
BER	Basenexzisionsreparatur
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
CaCo2	Humane kolorektale Epithelzelle
CBPI	Cytochalasin B-Proliferationsindex (cytochinesis-block proliferation index)
Cispl	Cisplatin
CytoB	Cytochalasin B
d	Tag(e)
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DCF	Dichlorofluorescein
DE	Deutschland
(d)H <sub>2</sub> O	(demineralisiertes) Wasser
diff.	differenziert
DK	doppelkernig
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose
Doxorubicin/ Doxo	Doxorubicinhydrochlorid
DPBS	Dulbecco phosphate-gepufferte Salzlösung (Dulbecco's phosphate buffered saline)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alii

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
Eto	Etoposid
FAB	French-American-British
FACS	Durchflusszytometer (fluorescence activated cell sorting)
FBS	Rinderserumalbumin (fetal bovine serum)
FDA	Fluoresceindiacetat
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Flt3	humaner aufgereinigter Fms-ähnlicher Tyrosinkinase-3-Ligand (Fms-related tyrosin kinase3 ligand)
g/ mg/ µg/ ng	Gramm/ Milligramm/ Mikrogramm/ Nanogramm
h	Stunde(n)
H <sub>2</sub> DCF	Dichlorodihydrofluorescein
H <sub>2</sub> DCFDA	2',7'-Dichlorofluoresceindiacetat
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ylethanesulphonsäure
HL-60	Akute promyelozytische Leukämiezelle
HMP-Agarose	Agarose MEEQ Ultra-Qualität (high melting point agarose)
HPGM	Stammzellmedium (hematopoietic growth medium)
HSA	Humanes Serumalbumin
HSZ	Hämatopoetische Stammzelle
HT22	Murine Fibroblastzelle
IC <sub>50</sub>	halbmaximale inhibitorische Konzentration
i.v.	intravenös
MK	Mikrokern(e)
MMC	Mitomycin C
MMS	Methylmethansulfonat
l/ ml/µl	Liter/ Milliliter/ Mikroliter
LMP-Agarose	2-Hydroxyethylagarose Typ IV (low melting point agarose)
m/ cm/ mm/ nm	Meter/ Zentimeter/ Millimeter/ Nanometer
M/ mM/ nM/ µM	Molar/ Millimolar/ Nanomolar/ Mikromolar
MEM	Minimum Essential Medium
min	Minute(n)

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
mg	Milligramm
n	Zahl der Replikate bzw. Zellen
NEAAS	Nichtessentielleamino­säure­lösung (MEM non-essential amino acid solution)
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NK	Negativkontrolle
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
Pen/ Strep	Penicillin-Streptomycin
PET	Polyethylenterephthalat
PI	Propidiumiodid
PK	Positivkontrolle
PS	Phosphatidylserin
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNase	RNase A Lösung
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SCF	Humaner aufgereinigter Stammzellfaktor (stem cell factor)
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SOD	Superoxid-Dismutase
TK6	Humane lymphoblastoide Zelle
Topo	Topoisomerase
TPO	Humanes aufgereinigtes Trombopoetin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodamin
UK	Vereinigtes Königreich (United Kingdom)
undiff.	undifferenziert
USA	Vereinigte Staaten von Amerika (United States of America)
UV-Licht	Ultraviolettes Licht

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
Vinblastin/ VBL	Vinblastinsulfat
Vincristin/ VCR	Vincristinsulfat
Vinflunin/ VFL	Vinfluninbis[(R,R)-tartrat]
Vinorelbin/ VRB	Vinorelbinbis[(R,R)-tartrat]

---

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Ontogenese

Die Ontogenese beschreibt den Prozess der Individualentwicklung eines Lebewesens. Erst nach erfolgreicher Befruchtung der Eizelle durch ein Spermium beginnt sich die Zelle zu teilen. Zunächst bilden die Tochterzellen Blastomere, welche bis zu einer Zellzahl von 12 Zellen als Morula bezeichnet werden. Diese frühe Blastomere ist totipotent und somit in der Lage einen vollständigen eigenständigen Organismus auszubilden. Ab dem dritten Stadium der embryonalen Entwicklung kommt es zur Ausbildung der intrazellulären Flüssigkeit, was zur Entwicklung einer Blastozyste führt. In diesem Schritt findet die erste Zelldifferenzierung statt bei der die äußere Zellmasse den Trophoblast und die innere den Embryoblast bildet [1]. Über eine Vielzahl von weiteren Zellteilungen und Differenzierungsschritten werden Gewebe und Organe, wie das Herz oder die Haut, gebildet, bis ein kompletter, lebensfähiger Organismus herangereift ist. Diese Entwicklung endet allerdings nicht mit der Geburt, sondern begleitet den Erwachsenen bis ins hohe Alter. So werden auch im Erwachsenenalter multipotente Zellen ausgebildet, welche in der Lage sind sich innerhalb eines Gewebetyps zu differenzieren. Bei der Kategorisierung von Stammzellen kann somit zwischen embryonalen, fetalen und adulten Stammzellen unterschieden werden. Embryonale Stammzellen sind pluripotent und dementsprechend in der Lage sich in Zellen aller Abstammungslinien zu differenzieren. Stammzellen, welche der Plazenta, dem Nabelschnurblut, dem Fruchtwasser oder dem Wharton-Gelee entstammen, werden als fetale Stammzellen bezeichnet. Zu den adulten Stammzellen werden mesenchymale Stammzellen, endotheliale Vorläuferzellen und endogene Lungenstammzellen gezählt [2]. Da Stammzellen hinsichtlich ihres Ursprungsgewebes klassifiziert werden, kann zusätzlich zwischen multipotenten mesenchymalen, neuralen und hämatopoetischen Stammzellen differenziert werden.

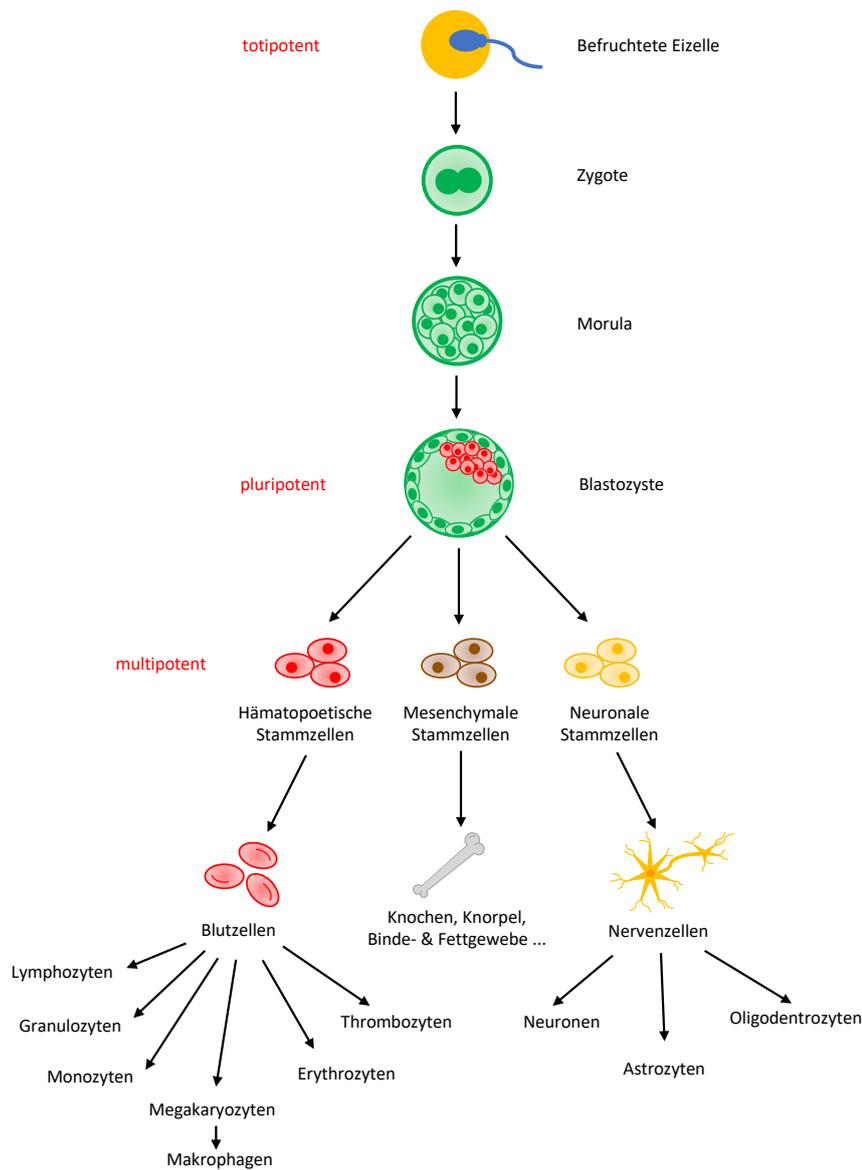


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Stammzellhierarchie ausgehend von der totipotenten befruchteten Eizelle bis hin zu ausdifferenzierten adulten Zellen. Verändert nach Hayes et al. [2]

Ein Beispiel für die Entwicklung multipotenter hämatopoetischer Stammzellen, welche beispielsweise zu Erythrozyten oder Thrombozyten differenzieren können, kann Abbildung 1 entnommen werden. Da diese selbst nur eine begrenzte Lebensdauer besitzen (Thrombozyten: max. 10 d, Erythrozyten: max. 120 d), ist eine ständige Erneuerung aus Vorläuferzellen notwendig [3, 4]. So werden im menschlichen erwachsenen Körper aus hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen durch physiologische Signale mehr als eine Million reife ausdifferenzierte Blutzellen pro Sekunde gebildet [5].

### 1.1.1 Physiologische Differenzierungsmodelle

Trotz vieler Studien, welche versuchten den Zusammenhang zwischen der Differenzierung von Stammzellen zu Vorläuferzellen und weiter ausdifferenzierten Zellen herzustellen, konnte bisher keine eindeutige Klärung des Zusammenspiels gefunden werden. Im menschlichen Körper befinden sich Stammzellen zunächst in einer speziellen Nischenumgebung, welche deren Differenzierung verhindert und den Erhalt der charakteristischen Stammzeleigenschaften unterstützt [6]. Es wird davon ausgegangen, dass ein komplexes flexibles Zusammenspiel vieler Umweltfaktoren, sowie lokaler und systemischer Faktoren einen Einfluss auf physiologische Differenzierungsvorgänge ausüben [7, 8]. Je nach Stadium der zu differenzierenden Zellen ist eine Vielzahl von unterschiedlichen Mediatoren dafür verantwortlich. Bei Stammzellen werden Signale mitunter intrinsisch über Proteine und Stammzelloberflächenmarker reguliert oder extrinsisch über Signale der Nischenumgebung, welche einen Einfluss darauf ausüben, ob es sich um ruhende oder aktive Stammzellen handelt [9, 10]. Des Weiteren beeinflussen beispielsweise Zytokine und Wachstumsfaktoren die Selbsterneuerung, die Proliferation, die Differenzierung und die Apoptose von hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) und ausgereiften Zellen, wie beispielsweise T-Zellen [11, 12].

### 1.1.2 Nicht-physiologische Differenzierungsmodelle

Um eine Differenzierung unter Zellkulturbedingungen *ex-vivo* hervorzurufen, gibt es verschiedene Vorgehensweisen. Die in Zellkultur befindlichen Zellen werden durch Zugabe von Zusätzen unter möglichst physiologischer Umgebung inkubiert. Durch gezieltes Entfernen oder Zuführen dieser Zusätze können in Zellen absichtlich hervorgeführte Effekte (Proliferation, Differenzierung...) erzielt werden. Somit ist es möglich eine unter Zellkulturbedingungen natürlich stattfindende Proliferation zu unterbinden oder bei nicht-proliferierenden Zellen eine Proliferation zu induzieren [13]. Aus diesem Grund wird beispielsweise humanen Lymphozyten, welche natürlicherweise keine Zellteilung mehr durchlaufen würden, Phytohämagglutinin (PHA) zugeführt, um sie zur erneuten Proliferation anzuregen [14]. Des Weiteren können dem Kulturmedium Chemikalien zugeführt werden, welche die Differenzierung von immortalisierten Zelllinien hervorrufen. Es ist bekannt, dass Dimethylsulfoxid (DMSO) oder Natriumbutyrat eine myeloide oder monozytische Differenzierung der Zelllinie HL-60 hervorrufen [15]. Stammzellen werden willentlich zum Wachstum angeregt und somit aus ihrer Nische heraus aktiviert indem ihnen

Wachstumsfaktoren und rekombinante Zytokine in bestimmten Konzentrationen zugeführt werden. Dadurch kann es zu einer asymmetrischen selbsterneuernden Zellteilung kommen, bei der eine Tochterzelle als genetisches Duplikat, die andere Tochterzelle allerdings als eine differenzierte multipotente Vorläuferzelle mit erhöhter Proliferation fungiert [2]. Durch die Zugabe von humanem aufgereinigtem Fms-ähnlichen Tyrosinkinase-3-Ligand (Flt3), humanem aufgereinigtem Stammzellfaktor (SCF), humanem aufgereinigtem Trombopoetin (TPO) und Interleukin 3 und 6 sollen die multipotenten Eigenschaften der hämatopoetischen Stammzellen erhalten bleiben, ohne dabei eine Differenzierung der Zellen zu induzieren [16, 17]. Bei einer symmetrischen Zellteilung entstehen zwei identische Tochterzellen mit gleicher genetischer Information und epigenetischer Modifikation. Dieser Prozess soll unter physiologischen Bedingungen die quantitative Aufrechterhaltung eines identischen Stammzellpools im adulten Körper gewährleisten [10].

### **1.2 Karzinogenese**

Unter den in Kapitel 1.1 beschriebenen Fakten ist es somit selbsterklärend, dass die Aufrechterhaltung des Stammzellpools unter allen Umständen gewährleistet werden sollte, da Stammzellen als multipotente Zellen grundlegend für weitere Zellentwicklungen sind. Der Schutz des Stammzellpools sollte besonders im Vordergrund stehen, wenn es zu einer Entstehung von malignen Tumorzellen gekommen ist und die Erkrankung des Patienten therapiert wird. Weltweit wurden im Jahr 2016 die meisten Wirkstoffe, welche sich im Endstadium der Entwicklung befanden, den Medikamenten gegen Krebserkrankung zugeschrieben. Somit liegt der Anteil der neu entwickelten Medikamente, welche sich in der klinischen Phase II oder III befinden im Bereich der Onkologie bei 28 %. Mit großem Abstand dazu kommen mit 12 % Medikamente, welche das zentrale Nervensystem betreffen [18]. Diese Tatsache ist nicht verwunderlich, wenn man die Statistik der Weltgesundheitsorganisation (WHO) für Krebsneuerkrankungen betrachtet. So wurden im Jahr 2012 weltweit rund 14,1 Millionen Krebserkrankungen registriert, wobei 24,4 % davon auf Europa entfielen [19].

## Krebsneuerkrankungen nach Weltregionen (2012)

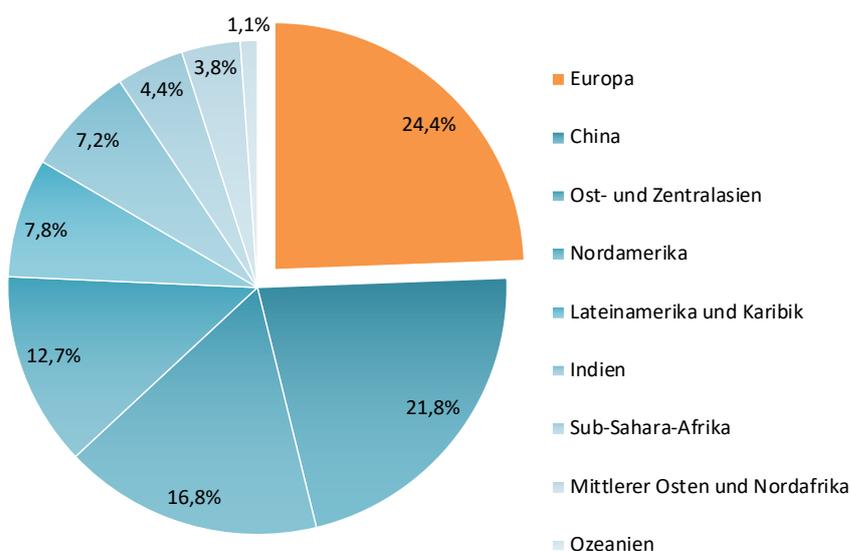


Abbildung 2: Statistische Darstellung der weltweiten Verteilung von Krebsneuerkrankungen (Inzidenz) nach Weltregionen im Jahr 2012. Datenerheber: World Health Organization (WHO); Statistik nach Weltkrebsbericht 2014 der International Agency for Research on Cancer. Verändert nach [19]

Die besonders in Europa, aber auch weltweit hohe Inzidenz von Krebserkrankungen stellt Ärzte vor die schwere Wahl eines optimalen Therapieregimes. Besonders kritisch sind dabei Therapieverfahren zu betrachten, welche schnell proliferierende Zellen zerstören, da nicht nur Krebszellen, sondern auch Stammzellen zur Sorte der schnell proliferierenden Zellen zählen [2, 20]. Bei der Karzinogenese wird von einer entarteten Zellproliferation ausgegangen, bei der gesunde Zellen durch komplexe biologische Prozesse zu malignen Tumoren heranwachsen. Der erste Schritt ist dabei die Initiation, bei der die Zelle nicht in der Lage ist die Mutation des Genoms zu eliminieren. Eine Mutation des Genoms kann spontan, durch Viren hervorgerufen oder familiär bedingt auftreten [21, 22] oder beispielsweise durch Umweltfaktoren, wie genotoxische Substanzen oder Strahlung, verursacht werden [23]. Während der Promotion findet durch Wachstumssignale bedingt eine maligne Zellvermehrung statt [24]. Hanahan und Weinberg beschreiben, dass die Krebszelltypisierung mit sechs essentiellen Veränderungen der Zellphysiologie einhergeht. So zeigen Krebszellen eine autarke Produktion von Wachstumssignalen, eine Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen, eine Fähigkeit den programmierten Zelltod zu umgehen, eine unbegrenzte Fähigkeit der Replikation, eigenständige Angiogenese, Gewebeinvasion bis hin zur Metastasierung [25]. Die Entstehung von Zweitumoren kann ebenfalls durch eine Krebstherapie mit genotoxisch-wirksamen Zytostatika begünstigt werden [26]. Die Inzidenz

von Zweittumoren nach einer Strahlentherapie stellt eine große Herausforderung dar, da die Latenzzeit nach der Erstbehandlung in etwa zehn Jahre beträgt [27]. Mit diesem Hintergrund sollte ein Therapieverfahren zur Bekämpfung der Krebserkrankung gewählt werden, welche zu einer Zerstörung der malignen Krebszellen führt und dabei keine Genomschäden an Stamm- und Vorläuferzellen hervorruft, um eine Entwicklung von Zweittumoren zu verhindern [28].

### 1.3 Therapieverfahren bei Krebs

Um eine optimale Behandlung von Krebs erzielen zu können, wird die Erkrankung zunächst kategorisiert. So werden Tumoren mittels des TNM-Systems und der Beschaffenheit des Tumors (Grading) klassifiziert.  $T_0$  beschreibt dabei keine Nachweisbarkeit eines Primärtumors, wobei  $T_{1-4}$  das Vorhandensein und deren Größe bzw. Eindringtiefe in das umliegende Gewebe darstellt. Des Weiteren wird der Zustand der Lymphknoten (N, lymph node) in Tumornähe beschrieben. Die Skala erstreckt sich dabei von  $N_0$  (kein Lymphknotenbefall) bis  $N_{1-3}$  (zunehmender Befall der umliegenden Lymphknoten). Können keine Fernmetastasen detektiert werden, so findet eine Deklaration der Stufe  $M_0$  statt. Sollte der Patient überdies bereits Metastasen an einem oder mehreren Orten ausweisen, so wird nach P. Denoix seit dem Jahr 1946 die Kategorie  $M_1$  nachgewiesen. Die Einstufung des Tumorgewebes findet zudem anhand des sogenannten Gradings statt. Nach einer Biopsie oder durch eine Operation gewonnenes Tumorgewebe wird mikroskopisch untersucht und je nach Abweichung vom gesunden Gewebe bestimmt. Der Differenzierungsgrad ( $G_{1-4}$ ) kann sich somit zwischen gut differenzierten (weniger bösartigen), über mäßig und schlecht differenzierte bis hin zu nicht differenzierten (sehr bösartigen) Tumoren erstrecken [29]. Die Behandlungstaktik wird dementsprechend zwischen kurativer, neo-adjuvanter, adjuvanter und palliativer Chemotherapie unterschieden und wird hinsichtlich ihrer Zielsetzung eingestuft. Ziel einer kurativen oder primären Chemotherapie ist es eine komplette Remission zu erreichen oder, falls eine komplette Remission nicht wahrscheinlich ist oder nicht erreicht werden kann, die durch den Tumor verursachten Beschwerden zu lindern. In der Palliativtherapie ist davon auszugehen, dass der Tumor therapieresistent ist und dementsprechend durch keine andere Therapiemöglichkeit eine Heilung erreicht werden kann. Der Patient soll lediglich eine Verbesserung der Lebensqualität verspüren. Im Fall eines chemotherapiesensiblen Tumors, wird der Tumor eingestuft und chemotherapeutisch wirksame Substanzen gewählt, welche

für diese Erkrankung induziert sind. Eine neo-adjuvante oder protoadjuvante Chemotherapie kommt dann zum Einsatz, wenn eine Tumorreduktion oder eine frühe Metastasierung des Primärtumors verhindert werden kann. Hierbei erhält der Patient vor der operativen Entfernung des Tumors ein Zytostatikum, eine lokale Bestrahlung (Radatio) des Tumorgewebes oder eine Hormontherapie. Vorteilhaft dabei ist, dass bei der anschließenden Operation auf mikroskopischer Ebene der Anteil verbliebener vitaler Tumorzellen entfernt werden kann. Eine adjuvante Chemotherapie erfolgt unterstützend nach einer kurativen lokalen Therapie (Operation und/ oder Strahlentherapie), wodurch ein Rezidiv vermieden werden soll. Definitionsgemäß darf eine adjuvante Therapie nur erfolgen, wenn kein Tumor mehr nachgewiesen werden kann. Als Voraussetzung für eine adjuvante Chemotherapie gilt, dass für den jeweiligen Tumor auch ein Zytostatikum oder eine Zytostatikakombination mit der entsprechenden nachgewiesenen Indikation und Wirksamkeit zur Verfügung steht. Diese Therapieoption kommt dann zum Einsatz, wenn damit eine mögliche Metastasierung des Tumors unterbunden werden kann. Die Therapieerfolge der beschriebenen Therapieverfahren werden an der jeweiligen Remissionsrate, der Freiheit von Therapieversagen, rezidivfreier Überlebenszeit und dem jeweiligen Gesamtüberleben gemessen [30].

#### **1.4 Zytostatika und andere genotoxische Agenzien**

Bei der Chemotherapie kommen unterschiedliche Zytostatika zum Einsatz, welche entweder alleine (Monochemotherapie), in Kombination mit Zytostatika mit verschiedenen Angriffspunkten (Polychemotherapie) oder mit einer kombinierten Strahlentherapie oder Hyperthermiebehandlung (Multimodaltherapie) verabreicht werden. Bei der hyperthermen intraperitonealen Chemotherapie werden z. B. bei Patienten mit Ovarialkarzinom oder einer Peritonealkarzinose zunächst chirurgisch alle makroskopisch kleinen Tumorerläsionen in der Bauchhöhle verschlossen, bevor über verschiedene Zu- und Abläufe auf etwa 41 °C erhitzte Zytostatika, wie z. B. Cisplatin oder Doxorubicin, eingeleitet werden und die Bauchhöhle für ca. 90 min durchspült wird [31]. Verschiedene Zytostatika und genotoxische Agenzien, welche als Mono- oder Kombinationstherapie zum Einsatz kommen, werden im Folgenden hinsichtlich ihrer chemischen Klassen, Wirkmechanismen, Kinetik, Indikationen, Nebenwirkungen bzw. Mutagenitäten, Dosierungen und den daraus resultierenden Plasmaspiegeln für den Menschen beschrieben.

### 1.4.1 Doxorubicin

Das Zytostatikum Doxorubicin gehört der Gruppe der Anthrazykline an und gilt somit als antineoplastisches Glykosid-Antibiotikum. Es interkaliert in die DNS, hemmt durch seine interkalierende Wirkung das Enzym Topoisomerase II (Topo II) und induziert darüber hinaus DNS-Strangbrüche. Doxorubicin besitzt eine 70 %ige Plasmaproteinbindung und wird hepatisch zum aktiven Doxorubicinol und zu weiteren inaktiven Metaboliten abgebaut. Somit kommt es zu einer Aglykonbildung und einer biliären Elimination von ca. 50 %. Die renale Elimination beträgt dabei lediglich < 10 %. Der Wirkstoff Doxorubicin (Doxorubicinhydrochlorid) verfügt über Indikationsbereiche von soliden Tumoren, über Lymphome, bis hin zu akuter Leukämie und darf lediglich intravenös (i.v.) verabreicht werden. An Hand publizierter Daten zur Sicherheit des Wirkstoffs weisen präklinische Daten an Ratten embryotoxische, fetotoxische, teratogene und mutagene Effekte auf [32]. Die Dosierungsbereiche unterscheiden sich je nach Therapieregime, werden allerdings üblicherweise auf Basis der Körperoberfläche (mg/m<sup>2</sup>) berechnet. Bei einer Monotherapie beträgt die Einzeldosis 45 - 75 mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche (i.v.), kann aber auch geteilt an 2 - 3 aufeinanderfolgenden Tagen verabreicht werden. Diese Gabe erfolgt alle 21 d. Bei einer Kombinationstherapie sollte die Dosis auf 30 - 60 mg/m<sup>2</sup> alle 3 - 4 Wochen reduziert werden. Eine kumulative Schwellendosis von 400 - 550 mg/m<sup>2</sup> sollte bei einer Behandlung mit Doxorubicin nicht überschritten werden und vor Therapiebeginn das Blutbild des Patienten kontrolliert werden um die Leber- und Nierenfunktion an Hand der Creatinin-Clearance zu überprüfen. Des Weiteren muss vorab eine kardiale Abklärung z. B. mittels Echokardiographie stattfinden, da Doxorubicin bei kardialen Erkrankungen und schweren Leberfunktionsstörungen kontraindiziert ist [33, 34]. Die Plasmakonzentration im Fließgleichgewicht (steady state) eines Durchschnittserwachsenen mit einem Gewicht von 76,3 kg und einer Körperoberfläche von 1,89 m<sup>2</sup> kann an Hand folgender Berechnungsformel bestimmt werden [35, 36]:

$$\text{Plasmakonzentration im Steady State } c_{ss} = \frac{\text{Dosis } D * \text{Körperoberfläche}}{\text{Verteilungsvolumen } V_d}$$

Somit ergibt sich eine errechnete mittlere Plasmakonzentration von ca. 10 µM Doxorubicinhydrochlorid für eine maximale Dosis von 75 mg/m<sup>2</sup> Doxorubicinhydrochlorid i.v., einer mittleren Körperoberfläche von 1,89 m<sup>2</sup> und einem mittleren Verteilungsvolumen von ca. 25 l/kg für einen Durchschnittserwachsenen.

### 1.4.2 Etoposid

Bei der Substanz Etoposid handelt es sich um ein halbsynthetisches Podophyllotoxin-Derivat, welches allein oder in Kombination mit anderen chemotherapeutischen Substanzen angewandt werden kann. Etoposid ist zugelassen bei der Therapie akuter myeloischer Leukämie, Morbus Hodgkin, des Non-Hodgkin-Lymphoms, des kleinzelligen Bronchialkarzinoms, Choroidkarzinoms, Ovarialkarzinoms und eines therapieresistenten Hodenkarzinoms. Seine Hauptwirkung kommt in der G2/M-Phase des Zellzyklus zu tragen. Der Wirkmechanismus ist dosisabhängig. So kommt es bei hohen Konzentrationen von  $> 10 \mu\text{g/ml}$  zu einer Zelllyse von mitotischen Zellen, wohingegen es bei niedrigen Konzentrationen ( $0,3 - 10 \mu\text{g/ml}$ ) zu einem Zellarrest in der Prophase der Mitose kommt [34]. Der hintergründige makromolekulare Effekt entsteht durch eine Hemmung der DNS-Synthese, da es die Topo II selektiv hemmt [37]. Etoposid besitzt eine starke Plasmaproteinbindung (97 %), wobei mehr als 50 % der Substanz biliär ausgeschieden werden. Der Dosisbereich erstreckt sich von  $50 - 120 \text{ mg/m}^2$  i.v. über 5 aufeinanderfolgende Tage. Eine Hochdosistherapie wird mit  $500 \text{ mg/m}^2/\text{d}$  über 1 - 3 d i.v. dosiert. Die Maximaldosis von  $650 \text{ mg/m}^2$  pro Zyklus darf dabei nicht überschritten werden. Bei gleichzeitiger Einnahme von Kalziumantagonisten kann es zu einer Erhöhung der Etoposid bedingten Zytotoxizität kommen. Da Etoposid zudem eine Myelosuppression verursacht, darf ein Zyklus nicht häufiger als alle drei Wochen wiederholt werden. Da die Myelosuppression der häufigste dosislimitierende Faktor ist, gilt es solch einer Entwicklung entgegenzuwirken, indem das Blutbild regelmäßig auf entsprechende Anzeichen hin untersucht wird. Zudem ist laut präklinischen Daten bekannt, dass Etoposid bei Ratten und Mäusen embryotoxisch und teratogen wirkt und bei *in-vitro* und *in-vivo*-Untersuchungen Gen- und Chromosomenmutationen verursacht. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Etoposid auf den Menschen eine mutagene Wirkung hat. Es wurden keine Karzinogenitätsuntersuchungen an Labortieren durchgeführt, wobei Etoposid auf Grund seines mutagenen Potentials und seiner DNS-schädigenden Wirkung als potentiell karzinogen betrachtet werden kann [38]. Allerdings zeigte Ezoë, dass nach einer Behandlung mit Etoposid bereits nach zwei bis drei Jahren das Risiko an sekundärer Leukämie zu erkranken erhöht ist [39]. Der errechnete Blutplasmaspiegel beträgt bei einem durchschnittlichen Erwachsenen je nach Verteilungsvolumen ( $18 - 29 \text{ l/kg}$ ) zwischen  $13 - 21 \mu\text{M}$  Etoposid (Normaldosis) und  $55 - 89 \mu\text{M}$  Etoposid (Hochdosis) [34, 40].

### **1.4.3 Methylmethansulfonat**

Bereits 1949 wurde das Alkylanz Mechloretamin als eines der ältesten Krebsmedikamente zugelassen, welches sowohl Einzel- als auch Doppelstrangbrüche hervorruft. Bei der Substanz Methylmethansulfonat (MMS) handelt es sich um ein monofunktionelles Alkylanz, welches hauptsächlich als Modellsubstanz für Zytostatika mit monofunktionell alkylierender Wirkung verwendet wird. Monofunktionelle Alkylantien reagieren im Gegensatz zu bifunktionellen Substanzen mit DNS-Basen nur eines DNS-Strangs. Die zytotoxische Wirkung beruht hauptsächlich auf der Alkylierung von DNS-Basen, welche wiederum zu einer Beeinträchtigung von wesentlichen Prozessen, wie der DNS-Replikation und/ oder Transkription führen [41]. Eine durch Nikolova et al. veröffentlichte Studie beschreibt neben der Entstehung von Einzelstrangbrüchen auch das Vorkommen von Doppelstrangbrüchen, wenn die Replikationsgabel auf temporär vorhandene Einzelstrangbrüche trifft. Dies geschieht gehäuft in der S-Phase der Zellteilung, sodass während dieser Phase die Hauptwirkung von MMS stattfindet [42]. MMS führt zudem als klastogene Substanz zu Chromosomenabberationen und somit letztlich zur Ausbildung von Mikrokernen [43]. Sollten diese DNS-Schäden durch Reparaturmechanismen der Zelle nicht eliminiert werden können, verliert die Zelle die Fähigkeit sich zu replizieren und es kommt zur Apoptose dieser Zelle [44]. Diese Voraussetzungen kommen bei schnell proliferierenden Zellen zum Einsatz, sodass Alkylantien in der richtigen Dosierung bei der Behandlung von malignen Tumoren zum Einsatz kommen.

### **1.4.4 Mitomycin C**

Mitomycin (MMC) wird zur Klasse der bifunktionellen Alkylantien gezählt und wirkt als antineoplastisch wirksames Antibiotikum, welches aus *Streptomyces caepitosus* isoliert wurde. Es liegt als inaktive Form vor. Die Aktivierung erfolgt entweder bei physiologischem pH-Wert unter Anwesenheit von NADPH im Serum oder intrazellulär in allen Körperzellen. Eine Ausnahme sind lediglich Zellen des Cerebrums, da Mitomycin C die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden kann. Der Wirkmechanismus beruht auf der interkalierenden Wirkung von MMC in die DNS, führt zu einer Quervernetzung der DNS (crosslink) und einer daraus resultierenden Hemmung der DNS-Synthese. Es kommt überdies zur DNS-Depolarisation und einer Ausbildung freier Radikale von je einer Chinon-, Aziridin- und Urethangruppe, was letztlich zu Strangbrüchen in der DNS führt. Die Wirkung des Mitomycins C an der DNS findet zellzyklusspezifisch während der G1- und S-Phase der Zellteilung statt und, wie auch bei

anderen Alkylantien, werden unter MMC proliferierende Zellen stärker geschädigt als Zellen, welche sich in der Ruhephase (G<sub>0</sub>-Phase) befinden [45]. Die Aktivierung der Substanz findet intrazellulär durch die Öffnung des Aziridinrings statt, wodurch es letztlich zu einem hepatischen Abbau zu inaktiven Metaboliten kommt. Die Elimination findet lediglich zu einem geringen Teil über die Niere statt, da renal nur 25 % als Ausgangssubstanz, der Rest als Metaboliten ausgeschieden werden. Das Zytostatikum Mitomycin C ist für Kopf-Hals-Tumore, kolorektale Karzinome, Leberzell-, Magen-, Ösophagus-, Pankreas-, Zervix-, Mamma- und Harnblasenkarzinome induziert. Vor Therapiebeginn muss neben einem Blutbild und der Kontrolle der Leber- und Nierenfunktion (Creatinin-Clearance) auch eine kardiopulmonale Abklärung stattfinden. Mitomycin C besitzt zudem eine nachgewiesene mutagene, karzinogene und teratogene Wirkung [46, 47]. Die intravenöse Standarddosis unter einer Monochemotherapie beträgt 10 - 20 mg/m<sup>2</sup> pro Tag, in einem sechs bis achtwöchigen Rhythmus. Bei einer Polychemotherapie wird die Dosis an MMC auf 5 - 10 mg/m<sup>2</sup>/d gesenkt, wobei die Gabe alle sechs Wochen stattfinden soll [34, 48]. Der berechnete Plasmawert nach intravenöser Gabe liegt bei ca. 10 µM MMC und entspricht auch dem maximal gemessenen Wert von 3,2 µg/ml [45].

#### **1.4.5 Klassische Vinca-Alkaloide**

Vinca-Alkaloide sind eine wichtige Substanzklasse bei der Behandlung maligner Tumore. Die wichtigsten klinisch relevanten Vertreter sind Vinblastin (VBL), Vincristin (VCR), Vindesin, Vinorelbin (VRB) und Vinflunin (VFL). Ursprünglich wurden VBL und VCR als natürliche Inhaltsstoffe des Madagaskar-Immergrüns (*Catharantus roseus*) gewonnen und wurden zunächst bei Bluthochdruck und Diabetes eingesetzt [49]. Im Jahr 1958 wurde der Pflanzenextrakt Diabetesratten injiziert, welche allerdings nach 5 - 7 d verstarben. Bei der Autopsie der Ratten wurde eine Veränderung des Knochenmarks entdeckt, was mit einer krankhaften Erniedrigung der Anzahl weißer Blutkörperchen und einer Granulozytopenie einherging. Daraufhin haben Noble und Beer eine Wirkung bei der Behandlung von Leukämie postuliert [50]. Durch später durchgeführte Studien wurde festgestellt, dass sowohl die beiden Leitsubstanzen VBL und VCR, als auch die halbsynthetisch hergestellten Analoga Vindesin, VFL und VRB durch ihre Interaktion mit Tubulin eine antimittotische Wirkung aufweisen. Tubulin ist ein in allen eukaryotischen Zellen vorkommendes heterodimeres Protein (α- und β-Tubulin) und maßgeblich an der Ausbildung von Mikrotubuli beteiligt [51]. Durch den dadurch hervorgerufenen Mitosearrest, welcher vornehmlich zellzyklusspezifisch in der G<sub>2</sub>/M-Phase

der Zellteilung stattfindet, werden die Vinca-Alkaloide auch als Spindelgifte bezeichnet. Neben der Arretierung der Mitose spielen Mikrotubuli auch eine große Rolle bei der Ausbildung neuronaler Zellen. Diese befördert mikrotubuli-assoziiert mit Neurotransmittern gefüllte Vesikel zu den Axonenden, wodurch es zur Ausbildung von Neuriten kommt [52].

Vinblastin, welches bei der Bekämpfung von Hodenkrebs, Brustkrebs, Keimzelltumoren, Morbus Hodgkin und Non-Hodgkin-Lymphom zum Einsatz kommt, wird durch unerwünschte Arzneimittelwirkungen, wie Dyspnoe, Fieber, sowie Brust- und Tumorschmerzen begleitet. Als dosislimitierender Faktor spielt allerdings die Neutropenie die wichtigste Rolle [49], wobei vor Therapiebeginn ein Blutbild des Patienten gemacht werden sollte, welches die Leber- und Nierenwerte kontrolliert. Außerdem sollte ein Neurostatus durchgeführt werden und eine Obstipationsprophylaxe stattfinden. Der Metabolismus verläuft über hepatische Aktivierung (Deacetylierung) und hepatische Metabolisierung durch Cytochrom-P450, wodurch es bei einer simultanen Gabe von Cisplatin, Etoposid oder Paclitaxel zu einer Erhöhung der Neurotoxizität kommt [34]. Unter VBL-Behandlung kommt es zu chromosomalen Anomalien, welche durch den Mikrokerntest nachgewiesen wurden und zur Ausbildung von Polyploidien. Durch diese Tatsachen kann ein karzinogener Effekt angenommen werden [53]. Zudem wurde eine Fertilitätstoxizität, Spermatotoxizität und Embryotoxizität festgestellt [54]. Während einer Krebsbehandlung beträgt die Dosierung an VBL initial  $3,7 \text{ mg/m}^2/\text{d}$  i.v. für 7 d und wird dann mit einer Erhaltungsdosis von  $5,5 - 7,5 \text{ mg/m}^2/\text{d}$  alle 7 d appliziert. Der errechnete Plasmaspiegel für einen Durchschnittserwachsenen beträgt ca.  $150 \text{ nM}$  Vinblastinsulfat nach intravenöser Gabe [55].

Das Zytostatikum Vincristin, welches für akute lymphatische und chronisch myeloische Leukämie, Non-Hodgkin-Lymphom, Morbus Hodgkin und nicht kleinzelliges Bronchialkarzinom zugelassen ist, darf erst nach genauer Kontrolle des Neurostatus, des Blutbildes und der Leber- und Nierenfunktion verabreicht werden. Außerdem muss vor Gabe eine medikamentöse Obstipationsprophylaxe durchgeführt werden. Zudem ist es bei Obstipation, manifesten Neuropathien und Leberfunktionsstörungen kontraindiziert, da der Metabolismus über den hepatischen Weg verläuft und die biliäre Exkretionsrate  $> 70 \%$  beträgt. Des Weiteren manifestieren sich bei ca.  $57 \%$  der Patienten neurologische Störungen [56]. Neben der ausgeprägten inhibierenden Wirkung an Tubulin zeigt VCR zudem Wirkung auf andere zelluläre Systeme, wie die DNS- und RNA-Synthese und die Lipidbiosynthese [57]. Die Dosierung unterscheidet sich je nach Protokoll zwischen  $3 - 4 \text{ mg/m}^2/\text{d}$  i.v. in einem ein-

bis zweiwöchigen Rhythmus oder einer intravenösen Gabe von 1 - 1,3 mg/m<sup>2</sup>/d für 5 - 7 d alle 21 d, wobei eine Maximaldosis von 5 mg nicht überschritten werden darf [34]. Zudem weist Vincristin, wie auch Vinblastin, nach Applikation eine Embryo-, Fertilitäts- und Spermatotoxizität auf und auch Aneuploidien und Polyploidien können detektiert werden, welche zur Kanzerogenese beitragen [53, 54]. Bei der Behandlung von malignen Tumoren stellt sich bei einem durchschnittlichen Erwachsenen rechnerisch ein Fließgleichgewicht von ca. 340 nM ein [58].

Das erste fluorierte halbsynthetisch hergestellte Zytostatikum Vinflunin ist für die Behandlung von transitionalem Urothelzellkarzinom, nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom und Brustkrebs zugelassen und weist hohe Aktivität in einem weiten Spektrum von soliden Tumoren auf. Dosislimitierend wirkt sich eine entstehende Neutropenie aus, welche zudem von Nebenwirkungen wie Dispnöe und sensorischen Neuropathien begleitet wird. Da VFL, wie auch VBL, Cytochrom (CYP) 3A4-abhängig metabolisiert und hepatisch eliminiert wird, muss auch bei einer Kombinationstherapie mit Cisplatin, Etoposid oder Paclitaxel eine regelmäßige neurologische Untersuchung des Patienten stattfinden, um eine auftretende Neurotoxizität frühzeitig zu erkennen. Somit muss eine Dosisanpassung stattfinden und die übliche Dosierung von 320 mg/m<sup>2</sup>/d i.v. alle drei Wochen vermindert werden [34]. Hinsichtlich der Toxizität im Tierversuch ist Vinflunin embryotoxisch, fetotoxisch und teratogen bei Ratten und Kaninchen. Nach ICH-Regularien (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use) wurde Vinflunin hinsichtlich seiner Genotoxizität untersucht. Bei Tests mit Bakterienzellen konnte keine Mutagenität festgestellt werden, wobei mutagene und klastogene Effekte mit Säugerzellen *in-vivo* und *in-vitro* nachgewiesen werden konnten. Bezüglich der Kanzerogenese sind keine Studien bekannt, was hinsichtlich der Indikation von Vinflunin nachvollziehbar ist. Somit wird Vinflunin als wahrscheinliches Karzinogen für den Menschen betrachtet [59]. Bei einem Durchschnittserwachsenen beträgt der errechnete Plasmaspiegel unter Monochemotherapie 18 µM [60].

Das semisynthetische Vinca-Alkaloid Vinorelbin kommt bei der Behandlung von nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom, Mammakarzinom sowie Osteosarkom zum Einsatz. Obwohl es im Vergleich zu anderen Vinca-Alkaloiden zu weniger peripheren Neuropathien kommt, muss vor der Behandlung ein Neurostatus, ein Blutbild, sowie eine Kontrolle der Leber- und Nierenwerte durchgeführt werden, da auch VRB hepatisch metabolisiert und biliär

eliminiert wird. Zudem muss, wie bereits bei VBL und VFL beschrieben, auch bei einer VRB-Kombinationsbehandlung mit Cisplatin, Etoposid oder Paclitaxel eine Dosisanpassung durchgeführt werden und die Dosierung von VRB dabei gesenkt werden. Das Zytostatikum VRB ist als teratogen, embryotoxisch und fetotoxisch deklariert [61]. Obwohl ein genotoxischer Effekt auf *Drosophila melanogaster* nach Vinorelbinbehandlung nachgewiesen werden konnte [62], wurde VRB nach einer niedrigen Dosis bei Ratten und Mäusen nicht als karzinogen deklariert [63]. Bei einer Monotherapie ist eine Dosis von 30 mg/m<sup>2</sup>/d i.v. bei wöchentlicher Gabe Standard. Zudem ist bei VRB auch eine orale Gabe des Arzneistoffs möglich [34]. Die errechnete Plasmakonzentration für einen Durchschnittsmenschen beträgt ca. 2 µM und beruht auf einer schwachen Plasmaeiweißbindung (13,5 %) und zugleich an einer starken Bindung an Blutplättchen (78 %) [63]. Die geringe Ausprägung durch VRB hervorgerufenen Neuropathien kann durch eine bevorzugte Tubulinbindung und damit verbundene Inhibierung der Mitosespindel erklärt werden. Es bindet dementsprechend weniger an axonale Tubulinen, was zu einem geringeren neuronalen Nebenwirkungsprofil führt [56]. Nichts desto trotz können neu entwickelte Vinca-Alkaloide ein verbessertes Wirkspektrum mit einem verminderten Nebenwirkungsprofil aufweisen und bedingen einer genauen Betrachtung.

### 1.4.6 Neue Vinca-Alkaloide

Um möglichen Nebenwirkungen, wie Neuropathien oder Nephropathien entgegenzuwirken, ist es wünschenswert die Entwicklung von neuen spindelstörenden Agenzien weiter voranzutreiben. Eine Möglichkeit für die Herstellung neuer Vinca-Alkaloide besteht darin, bereits bestehende klassische Substanzen, wie Vinblastin oder Vincristin mit  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Seitenketten zu derivatisieren. Ngo et al. haben solch eine Synthese an der Vietnamesischen Akademie der Wissenschaft und Technologie durchgeführt und die Substanzen freundlicherweise zu Forschungszwecken innerhalb dieser Doktorarbeit zur Verfügung gestellt [64]. Zunächst wurden verschiedene  $\alpha,\beta$ -ungesättigte aromatische Verbindung mittels Claisen-Kondensation hergestellt. Hierfür wurde unter Raumtemperatur zunächst Arylcarboxaldehyd und Aceton in Methanol vermengt, gefolgt von einer selektiven Monobromierung eines transienten  $\alpha$ -Methylketons. Dies geschah durch Zugabe von N-Bromsuccinimid in Gegenwart von p-Toluensulfonsäure. Die Reaktion der Addukte verlief über 2 h bei Raumtemperatur, wobei für die Edukte eine Ausbeute von > 70 % erzielt wurde.

Im weiteren Verlauf der Synthese reagierten diese synthetisierten Substanzen im gleichen Verhältnis mit verschiedenen Vinca-Verbindungen unter Anwesenheit von Acetonitril weiter. Die verwendeten Vinca-Grundgerüste waren Vinblastin, Vincristin, aber auch Anhydrovinblastin und sein vereinfachtes Analogon 18(S)-3',5'-Dimethoxyanilincleavamin [65]. Die daraus entstandenen endgültigen Verbindungen wurden von 16a bis 19b nummeriert, wiesen eine Reinheit von 72 - 83 % auf und wurden mittels Röntgenstrukturanalyse untersucht. Zudem wurden durch Ngo et al. erste Zytotoxizitätsuntersuchungen mit humanen Krebszelllinien (Leber-, Lungen-, Brust- und Gebärmutterhalskrebszellen) durchgeführt, welche nahe gelegt haben, dass manche neu synthetisierten Substanzen ähnliche Effekte wie Vinblastin aufwiesen [64]. Die für diese Doktorarbeit zur Verfügung gestellten Substanzen waren die Substanzen 16a, 17b, 18a, 18b und 19b. Die quartären Ammoniumsalze des Vindolins, 3,5-Dimethoxyanilins und des Vinblastins wurden als Substanzen 16a, 17b und 18a deklariert, wohingegen die Analoga von Vinblastin und Vincristin (18b und 19b) eine Nomenklatur erhielten und als 4-Chlorochablastin und 4-Chlorochacristin bezeichnet wurden.

## **2 ZIELSETZUNG**

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von genotoxischen Substanzen auf Säugertierzellen zu untersuchen. Da der Organismus sich aus toti-, pluri- und multipotenten Zellen, wie den Stamm- und Vorläuferzellen entwickelt, könnte der Differenzierungsstatus der untersuchten Zellen eine wichtige Rolle auf die Untersuchungsergebnisse haben. Da allerdings bisher kaum Zellen in unterschiedlichen Differenzierungsstufen untersucht und miteinander verglichen wurden, befasst sich diese Arbeit unter Verwendung verschiedener biologischer Endpunkte mit möglichen Sensitivitätsunterschieden hinsichtlich genotoxischer Agenzien. Insbesondere Patienten, die an Krebs erkrankt sind, sind diesen Substanzen ausgesetzt. Deswegen soll vermehrt der Einfluss von Zytostatika auf verschiedene Krebszellarten, aber auch auf Vorläuferzellen, welche sich in der Entwicklungshierarchie vor den Krebszellen befinden, untersucht werden. Diese Stamm- und Vorläuferzellen, welche die Grundlage aller Zellentwicklungen sind, gilt es zu schützen oder den Zellschaden auf ein mögliches Minimum zu reduzieren. Somit werden in der nachfolgenden Arbeit Untersuchungen, wie die Kontrolle der Vitalität, Proliferation, Apoptose und Mitose der Zellen nach Substanzbehandlung vorgenommen. Aber auch weitere Methoden, wie die Zellzyklusbestimmung, der Mikrokerntest oder die Einzelzellgelelektrophorese kommen zum Einsatz, um Effekte wie chromosomale Mutationen, Schäden an der DNS oder an nachfolgenden Schadensreparaturmechanismen zu untersuchen. Diese Testmethoden ermöglichen es nicht nur Aussagen über die Empfindlichkeit von Krebs-, Vorläufer- oder Stammzellen zu treffen, sondern geben auch Auskunft über mögliche DNS-Schäden. Diese Schäden können im weiteren Differenzierungsverlauf zur Ausbildung von Zweittumoren führen könnten.

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Verbrauchsmaterial

Die Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen Greiner (Frickenhausen, DE), Sarstedt (Nümbrecht, DE) und VWR (Darmstadt, DE) bezogen.

#### 3.2 Chemikalien und Lösungen

Vinorelbisbis[(R,R)-tartrat] (Vinorelbin, 10 mg/ml) wurde bei Actavis (München, DE), gekauft. Das FACS-Fließmittel (FACS Sheath Fluid) wurde von BD Biosciences (Erembodegem, BE), das Rinderserumalbumin (FBS, fetal bovine serum) und das Pferdeserum von der Firma Biochrom AG (Berlin, DE) bezogen. Das Bradford-Reagenz (protein-assay dye reagent concentrate) wurde bei Bio-Rad (München, DE) bestellt. Sowohl die GelGreen-Färbelösung (GelGreen nucleic acid gel stain 10.000X) als auch die GelRed-Färbelösung (GelRed nucleic acid gel stain 10.000X) wurden bei Biotium (Hayward, Californien, USA) bezogen. Aceton (CAS Nr. 67-64-1), Agarose MEEQ Ultra-Qualität (HMP-Agarose, high melting point agarose, CAS Nr. 9012-36-6), Dimethylsulfoxid (DMSO) (CAS Nr. 67-68-5), Ethanol (CAS Nr. 64-17-5), Glycerol (CAS Nr. 56-81-5), Kaliumchlorid (CAS Nr. 7447-40-7), Methanol (CAS Nr. 67-56-1) und Natriumchlorid (CAS Nr. 7647-14-5) wurden bei Carl Roth (Karlsruhe, DE) bestellt. Das Neurobasal-Medium (1x), das N-2-Supplement (100x) und 2',7'-Dichlorofluoresceindiacetat (H<sub>2</sub>DCFDA, CAS Nr. 4091-99-0) wurden bei Life Technologies (Carlsbad, Californien, USA) bezogen. Mitomycin C (MMC, 1 mg/ml) wurde von Medac (Hamburg, DE) bezogen. Dihydroethidium (CAS Nr. 38483-26-0), Dinatriumhydrogenphosphat (CAS Nr. 10028-24-7), Kaliumdihydrogenphosphat (CAS-Nr. 7778-77-0), Kalziumchlorid (CAS-Nr. 10043-52-4) wurden bei Merck Millipore (Darmstadt, DE) bezogen. Das Stammzellmedium (HPGM, hematopoietic growth medium) wurde bei Lonza (Köln, DE) bestellt. Der humane aufgereinigte Fms-ähnliche Tyrosinkinase-3-Ligand (Flt3, Fms-related tyrosin kinase3 ligand), der humane aufgereinigte Stammzellfaktor (SCF, stem cell factor) und das humane aufgereinigte Trombopoetin (TPO) wurden von MACS Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, DE) bezogen. Vinfluninbis[(R,R)-tartrat] (Vinflunin, 25 mg/ml) wurde bei Pierre Fabre Pharma (Freiburg, DE) und Annexin-V-FLUOS bei Roche (Mannheim, DE) gekauft. Fluoresceindiacetat (FDA, CAS Nr. 596-09-8) und die Kollagen R

Lösung (0,2 %) wurde bei Serva (Heidelberg, DE) bezogen. 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO, CAS Nr. 280-57-9), 2-Hydroxyethylagarose Typ IV (LMP-Agarose, low melting point agarose, CAS Nr. 39346-81-1), 4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ylthanesulphonsäure (HEPES, CAS Nr. 7365-45-9), Aphidicolin (Aph, CAS Nr. 38966-21-1), Cytochalasin B (CytoB, CAS Nr. 14930-96-2), D (+)-Glukose (CAS Nr. 50-99-7), Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose (DMEM), Ethanol (CAS Nr. 64-17-5), Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, CAS Nr. 6381-92-6), Ethylendiamintetraessigsäurelösung (0,2 % in DPBS), Hoechst 33258 Lösung (Bisbenzimid, CAS Nr. 23491-45-4), humanes Serumalbumin (HSA, CAS Nr. 70024-90-7), L-Glutaminlösung (200 nM, CAS Nr. 56-85-9), Methylmethansulfonat (MMS, CAS Nr. 66-27-3), Minimum Essential Medium Eagle (MEM), Natriumhydroxid (CAS Nr. 1310-73-2), Natriumpyruvatlösung (100 nM, CAS Nr. 113-24-6), Nichtessentielleamino-säurelösung (NEAAS, 100x, MEM non-essential amino acid solution), Penicillin-Streptomycin (Pen/Strep, 10.000 Einheiten Penicillin und 10 mg Streptomycin pro ml), RPMI 1640 Medium (mit Phenolphthalein und phenolphthaleinfrei, HEPES Modifikation), Propidiumiodid-Lösung (PI-Lösung, CAS Nr. 25535-16-4), Rinderserumalbumin (BSA, bovine serum albumine, CAS Nr. 9048-46-8), Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS, CAS Nr. 77-86-1), Triton-X-100 (CAS Nr. 9002-93-1), Trypsin-EDTA-Lösung (10x) und Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30 wt. % in H<sub>2</sub>O CAS Nr. 7722-84-1) wurden von Sigma-Aldrich (München, DE) bezogen. Doxorubicinhydrochlorid (Doxorubicin, 2 mg/ml), Etoposid (20 mg/ml), Vinblastinsulfat (Vinblastin, 1 mg/ml) und Vincristinsulfat (Vincristin, 1 mg/ml) wurden bei Teva (Ulm, DE) bezogen. RNase A Lösung (7.000 Einheiten pro ml) wurde bei Qiagen (Hildesheim, DE) bestellt.

Eine Auflistung der verwendeten Lösungen ist in der nachfolgenden Tabelle 1 ersichtlich.

Tabelle 1: Zusammenfassung der verwendeten Lösungen

<b>Lösungen</b>	<b>Zusätze</b>	<b>Konzentration</b>
<i>Bisbenzimid-Stammlösung</i>	Hoechst 33258	1 mg
	DMSO	1 ml
<i>Bisbenzimid-Lösung</i>	Bisbenzimid-Stammlösung	5 µl
	PBS (1x)	ad 1 ml
<i>CytoB-Lösung</i>	Cytochalasin B	500 µg
	DMSO	1 ml
<i>DABCO-Lösung (pH 8,6)</i>	DABCO	250 mg
	Glycerol	90 ml

	PBS (1x)	ad 10 ml
<i>DHE-Lösung (5 mM)</i>	DHE	15,77 mg
	DMSO	1 ml
<i>EDTA (0,2 M)</i>	EDTA	74,45 g
	dH <sub>2</sub> O	200 ml
<i>Elektrophorese-Puffer</i>	Natriumhydroxid-Lösung (5 M)	120 ml
	EDTA (0,2 M)	10 ml
	dH <sub>2</sub> O	ad 1 l
<i>Fluoresceindiacetat-Lösung</i>	FDA	5 mg
	Aceton	1 ml
<i>GelGreen-Lösung</i>	GelGreen-Lösung (10.000X)	10 µl
	dH <sub>2</sub> O	ad 1 ml
<i>GelRed-Lösung</i>	GelGreen-Lösung (10.000X)	10 µl
	dH <sub>2</sub> O	990 µl
	DABCO	3 ml
<i>Glukose-Lösung (steril filtriert)</i>	D (+)-Glukose	39,9 g
	DMEM	200 ml
<i>HEPES-Puffer (10x) (pH 7,4; sterilfiltriert)</i>	Kalziumchlorid	1,47 g
	HEPES	4,76 g
	Natriumchlorid	19,64 g
	dH <sub>2</sub> O	200 ml
<i>HEPES-Bindungspuffer (1x)</i>	HEPES-Puffer (10x)	10 ml
	dH <sub>2</sub> O	ad 100 ml
<i>HMP-Agarose-Lösung (1,5 %)</i>	HMP-Agarose	1,5 g
	PBS (1x)	100 ml
<i>Kollagen-Lösung (Typ I)</i>	Kollagen R Lösung (0,2 %)	10 µl
	dH <sub>2</sub> O	ad 1 ml
<i>LMP-Agarose-Lösung (0,5 %)</i>	LMP-Agarose	0,05 g
	PBS (1x)	10 ml
<i>Lyse-Lösung</i>	Triton-X	750 µl
	DMSO	7,5 ml
	Lyse-Puffer	66,74 ml

<i>Lyse-Puffer</i> (pH 10,0)	TRIS	1,21 g
	EDTA	37,22 g
	Natriumchlorid	146,1 g
	dH <sub>2</sub> O	1 l
<i>Natriumhydroxid-Lösung (5 M)</i>	Natriumhydroxid	200 g
	dH <sub>2</sub> O	1 l
<i>PBS-Lösung (10x)</i> (pH 7,4; autoklaviert)	Kaliumdihydrogenphosphat	2 g
	Dinatriumhydrogenphosphat	2 g
	Kaliumchlorid	5,75 g
	Natriumchlorid	80 g
	dH <sub>2</sub> O	1 l
<i>PBS-Lösung (1x)</i>	PBS-Lösung (10x)	100 ml
	dH <sub>2</sub> O	ad 1 l
<i>PBS/BSA-Lösung (1%)</i>	BSA	5 g
	PBS (1x)	500 ml
<i>PBS/EDTA-Lösung</i>	EDTA-Lösung (0,2 % in DPBS)	5 ml
	PBS (1x)	ad 100 ml
<i>PI-Lösung (50 µg/ml)</i>	PI-Lösung (1 mg/ml in dH <sub>2</sub> O)	1,5 µl
	dH <sub>2</sub> O	28,5 µl
<i>RNase A-Lösung</i>	RNase A Lösung (7.000 Einheiten/ml)	10 µl
	PBS	90 µl
<i>TRIS-Puffer (0,4 M)</i> (pH 7,5; autoklaviert)	TRIS	14,89 g
	dH <sub>2</sub> O	1 l
<i>Trypsin/EDTA-Lösung</i>	Trypsin-EDTA-Lösung (10x)	10 ml
	PBS (1x)	ad 100 ml
<i>Vitalitätsfärbelösung</i> (2 Wochen bei 4 °C haltbar)	GelRed-Lösung (10.000X)	2 µl
	FDA	12 µl
	PBS (1x)	2 ml

### **3.3 Biologisches Material**

Die Untersuchungen, welche in dieser Arbeit beschrieben werden, wurden an murinen und humanen Zellen durchgeführt. Darüber hinaus unterscheiden sich die Zelllinien in ihren unterschiedlichen Fähigkeiten an Zellkulturoberflächen zu adhären. Sowohl die murinen neuronalen Zellen HT-22, als auch die humanen colon-adenokarzinom Zellen CaCo2 sind adhären Zellen. Wohingegen es sich bei der humanen Leukämiezelllinie HL-60, den humanen lymphoblastoiden TK6-Zellen und den hämatopoetischen Stammzellen aus humanem Nabelschnurblut um Suspensionszellen handelt, welche frei schwimmend im Zellkulturmedium wachsen.

Überdies unterscheiden sich die Zellsysteme in ihrem Differenzierungsstadium und der Fähigkeit zu proliferieren. Darauf wird im Folgenden näher eingegangen.

#### **3.3.1 Multipotente primäre Zellen (hämatopoetische Stammzellen)**

Nabelschnurblut enthält CD34 positive hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen. Sie wurden von einem männlichen kaukasischen Probanden unbekanntes Alters entnommen und durch den Hersteller Lonza (Köln, DE) per Isolation durch Dichtegradient mit anschließender magnetischer Immunseparation von mononukleären Zellen getrennt. Laut Hersteller lag der prozentuale Anteil an CD34 positiven Zellen nach durchflusszytometrischer Kontrolle aller für die Versuche verwendeten Vials bei 90,93 % [66]. Pro Aliquot befanden sich mindestens 100.000 Zellen pro ml, welche anschließend in speziellem Wachstumsmedium für Stammzellen als Suspensionszellen kultiviert wurden [67].

#### **3.3.2 Immortalisierte Zelllinien**

##### *3.3.2.1 TK6-Zellen*

Die humane B-lymphoblastoide Zelllinie TK6 wurde im Jahr 1968 am Universitätskrankenhaus in Pennsylvania nach einer Milzexstirpation eines 5-jährigen kaukasischen Jungen mit Kugelzellanämie etabliert [68]. Über genetische Veränderung der Lymphoblasten-Kultur WIL-2 zur lymphoblastoiden Kultur HH4 wurde durch weitere Selektionsprozesse die Zelllinie TK6 gewonnen, welche eine Heterozygotie am Locus der Thymidin-Kinase aufweist [69]. Die für die Untersuchungen verwendete TK6-Kultur wurde freundlicherweise von W. J. Caspary vom National Institute of Health (NIEHS/RTP; Durham, North Carolina, USA) zur Verfügung gestellt.

Bei den TK6-Zellen handelt es sich um immortalisierte Zellen der Risikogruppe 1, welche nicht aus Tumorgewebe extrahiert wurden und in Suspension kultiviert werden.

### 3.3.2.2 HT-22-Zellen

Bei den HT-22-Zellen handelt es sich um immortalisierte murine Hippocampuszellen, welche keinem Tumorgewebe entstammen [70]. Sie wurden als Subklon aus HT-4-Zellen eines Rattenembryos (Tierstamm: Holtzman) am 17. Tag der Trächtigkeit gewonnen. Die Immortalisierung erfolgte durch die Übertragung eines temperaturempfindlichen SV40-T-Antigens über retrovirale Vektoren. Die gegen Glutamat empfindlichen adhärent wachsenden HT-22-Zellen der Risikogruppe 1 wurden mit Erlaubnis von D. Schubert des Salk Institutes (San Diego, Californien, USA) von T. Grune (Potsdam, DE) bezogen.

### 3.3.2.3 CaCo2-Zellen

Die humane Zelllinie CaCo2 wurde einem an kolorektalem Adenokarzinom erkrankten 72-jährigen kaukasischen Mann entnommen. Bei den CaCo2-Zellen handelt es sich um adhärent wachsende Zellen der Risikogruppe 1, welche eine epithelartige Monoschicht am Kulturboden ausbilden. Die Tumorzelllinie wurde freundlicherweise durch H. Walles des Lehrstuhls für Tissue Engineering und Regenerative Medizin der Julius-Maximilians-Universität (Würzburg, DE) für Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

### 3.3.2.4 HL-60-Zellen

Die humane, permanent wachsende Zelllinie HL-60 wurde ursprünglich im Jahr 1976 aus peripherem Blut einer 35-jährigen kaukasischen Patientin mit akuter promyelozytischer Leukämie gewonnen [71]. Laut FAB-Klassifikation beziehungsweise nach Nomenklatur der Weltgesundheitsorganisation WHO entspricht die Zelllinie HL-60 der Kategorie FAB M2 und kann nach morphologischen und immunologischen Kriterien kategorisiert werden. So befinden sich  $\geq 10\%$  der Zellen in der Myelopoese und weniger als 20 % der Zellen liegen als Monozyten vor [72, 73]. Für Versuchsdurchführungen wurden die in Suspension wachsenden HL-60-Zellen der Risikogruppe 1 freundlicherweise durch R. Schinzel von Vasopharm (Würzburg, DE) zur Verfügung gestellt.

### 3.4 Medien für die Zellkultur

Für die Versorgung im lebenden Organismus übernehmen Blutgefäße sowohl den Transport benötigter Nährstoffe als auch den Abtransport von Stoffwechselprodukten. In der Zellkultur muss dies durch Zugabe beziehungsweise durch das Auswechseln des Mediums stattfinden.

In Tabelle 2 sind alle verwendeten Zellkulturmedien als Basismedien (je 500 ml) mit den jeweiligen Zusätzen für die entsprechenden Zelllinien aufgelistet. Nach der sterilen Herstellung wurden die Medien bei 4 °C gelagert und innerhalb von 6 - 8 Wochen aufgebraucht.

Tabelle 2: Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien entsprechend der Zelllinien

Zelllinie	Basismedium	Zusatz	Konzentration
<i>TK6</i>	RPMI-1640	Pferdeserum	10 %
		L-Glutamin	1 %
		Natriumpyruvat	1 %
		Pen/ Strep	0,4 %
		FBS	10 %
<i>HT-22</i>	DMEM	L-Glutamin	1 %
		Pen/ Strep	1 %
		Glukoselösung	0,35 %
<i>CaCo2</i>	MEM	FBS	20 %
		NEAAS	1 %
		Natriumpyruvat	1 %
		L-Glutamin	1 %
		Pen/ Strep	0,4 %
<i>HL-60</i>	RPMI-1640	FBS	10 %
		L-Glutamin	1 %
		Pen/ Strep	0,4 %
<i>HSZ</i>	HPGM	Flt3	50 ng/ml
		TPO	50 ng/ml
		SCF	25 ng/ml

## 3.5 Methoden

### 3.5.1 Zellkultivierung

#### 3.5.1.1 Einfrieren und Auftauen der immortalisierten Zelllinien

Sowohl nach dem Ablösen vom Boden der Kulturflasche den adhärennten Zelllinien CaCo2 und HT-22, als auch in den Suspensionszelllinien HL-60 und TK6, wurden die Zellzahl mittels Neubauerkammer bestimmt. Eine detaillierte Beschreibung der Zellzahlbestimmung mittels Neubauerkammer ist in Kapitel 3.5.4 beschrieben. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (1.000 rpm, 5 min, RT) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit dem jeweiligen Medium unter Zugabe von 10 % DMSO resuspendiert, sodass eine Zelldichte von  $1,5 \times 10^6$  Zellen/ml vorlag. Nach Einstellung dieser Zellkonzentration wurde 1 ml Zellsuspension in ein steriles Cryoröhrchen überführt und mit einem 10 %igen DMSO-Medium-Gemisch überschichtet. Im Anschluss wurden die Einfrierröhrchen zum Vorkühlen für 24 h bei - 80 °C in einem mit 70 %igem Isopropanol befüllten Einfrierbehälter überführt, bevor sie in der Dampfphase eines Stickstofftanks bis zum erneuten Auftauvorgang gelagert werden konnten. Der Auftauprozess verlief bei allen immortalisierten Zelllinien indem das Cryoröhrchen aus dem Stickstofftank entnommen und sofort in einem auf 37 °C vorgewärmten Wasserbad unter dauerndem Schwenken aufgetaut wurde. Nach der Desinfektion mit 70 %igem Ethanol wurde das Röhrchen unter die Werkbank überführt, um steriles Weiterarbeiten zu ermöglichen. Die Zellsuspension wurde aus dem Cryoröhrchen entnommen, mit 5 ml auf 37 °C vortemperierten zelllinienspezifischen Medium vermischt und anschließend zentrifugiert (1.000 rpm, 5 min, RT). Der Überstand, welcher 10 % DMSO enthielt, wurde verworfen und das Zellpellet mit 5 ml frischen Medium resuspendiert, welches anschließend in einer zelltypspezifischen 25-cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche mit farbig markiertem Filterschraubverschluss überführt wurde. Für die Zelllinien HT-22 und CaCo2 wurden Flaschen für sensitive adhärennte Zellen mit gelbem Filterschraubverschluss, für die Zelllinien HL-60 und TK6 wurden Flaschen für Suspensionszellen mit rotem Filterschraubverschluss verwendet. Eine weitere Subkultivierung fand nach 48 h statt. Bis dahin wurden die Kulturflaschen liegend im wasserdampfgesättigten Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Überdies wurden die Zellen vor dem Einfrieren und kurze Zeit nach dem Auftauen (ca. 7 d) auf Mykoplasmen getestet. Eine genaue Erläuterung des Mykoplasmentests ist in Kapitel 3.5.3 ersichtlich.

### 3.5.1.2 Auftauen von hämatopoetischen Stammzellen

Da die Stammzellen im Vergleich zu immortalisierten Zelllinien deutlich empfindlicher auf äußere Faktoren reagieren, musste die Handhabung der hämatopoetischen Stammzellen besonders vorsichtig, aber dennoch zügig stattfinden. Für den Auftauvorgang waren drei verschiedene Kulturmedien notwendig. Sie unterschieden sich in der prozentualen Zusammensetzung der Zusätze, welche Tabelle 3 entnommen werden können.

Tabelle 3: Zusammensetzung der verwendeten Kulturmedien für den Auftau- und Kultivierungsvorgang der hämatopoetischen Stammzellen

Medium	Zusätze	Konzentration
<i>HPGM (pur)</i>	-	-
	Flt3	55 ng/ml
<i>HPGM (Vorkultur-Medium)</i>	TPO	55 ng/ml
	SCF	27,5 ng/ml
	Flt3	50 ng/ml
<i>HPGM (Kultur-Medium)</i>	TPO	50 ng/ml
	SCF	25 ng/ml

Der Auftauvorgang der HSZ begann mit der Entnahme des Cryoröhrchens aus der Gasphase des Stickstofftanks. Direkt im Anschluss wurde das Röhrchen vorsichtig in ein auf 37 °C vorgeheiztes Wasserbad geschwenkt, bis lediglich ein etwa 5 mm kleiner Eiskristall erkennbar war. Nach Desinfektion mit 70 %igem Ethanol, wurde das Cryoröhrchen in die Werkbank überführt. Fortan wurden alle Schritte in steriler Umgebung durchgeführt. Für den ersten Waschschrift wurden die in Suspension befindlichen HSZ mit einer 5-ml-Glaspipette langsam in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen überführt und das Cryoröhrchen 2-mal mit je 1 ml HPGM (pur) gespült und ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen überführt. Nachdem das Röhrchen auf 10 ml mit HPGM (pur) aufgefüllt und zum Durchmischen der Zellsuspension vorsichtig gekippt wurde, wurden die HSZ bei 1300 rpm für 10 min bei RT zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand bis auf 2 ml abgenommen. Durch Zugabe von 8 ml HPGM (pur), leichtes Schnippen gegen den Boden des Röhrchens und erneutes Kippen wurde das Pellet resuspendiert, bevor es ein weiteres Mal zentrifugiert wurde (1300 rpm, 10 min, RT). Nach dem zweiten Waschschrift wurde der Überstand bis auf 1 ml entfernt und das Pellet mit einer 10-ml-Glaspipette langsam und vorsichtig resuspendiert. Durch zweifache Auszählung mittels

Neubauerkammer wurde die Zelldichte in 1 ml bestimmt. Nach Zugabe von 9 ml HPGM (Vorkulturmedium) wurde eine Zytokinkonzentration im Medium erreicht, welche dem HPGM (Kultur-Medium) entsprach (10 ml Endvolumen). Diese Zellsuspension wurde in eine 75-cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche für Suspensionszellen (mit rotem Filterschraubverschluss) überführt, entsprechend einer Zelldichte von  $9,5 \times 10^3$  Zellen/ml mit HPGM (Kulturmedium) aufgefüllt und für 72 h im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

### **3.5.2 Kultivierung und Subkultivierung der Zellen**

Die Kultivierung und Subkultivierung der Zelllinien wie auch der primären Zellen erfolgte in den jeweiligen zellspezifischen Medien (Tabelle 2) im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und wasserdampfgesättigter Luft.

#### *3.5.2.1 Hämatopoetische Stammzellen*

Die hämatopoetischen Stammzellen, welche aus humanem Nabelschnurblut gewonnen wurden, wurde von der Firma Lonza (Köln, DE) gefroren bezogen und wie oben beschrieben aufgetaut. Nach 72 h in HPGM (Kulturmedium), welches humane Zytokine enthielt (Tabelle 3) wurden die Zellzahl zweifach mittels Neubauerkammer bestimmt. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1300 rpm 10 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet vorsichtig mit frischen HPGM (Kulturmedium) resuspendiert, sodass eine neue Zelldichte von 9.500 Zellen/ml erreicht wurde. Diese Suspension wurde für weitere 24 h im wasserdampfgesättigten Inkubator (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) in 75-cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen inkubiert. Nach dieser 24-stündigen Inkubation wurden die Experimente durchgeführt, sodass sich die maximale Kulturdauer, einschließlich der Dauer des Experiments, auf maximal 5 d belief.

#### *3.5.2.2 TK6-Zellen*

Die Kultivierung der TK6-Zellen erfolgte in zelltypspezifischem Medium (Tabelle 2). Eine Zelldichte von  $0,75 - 1 \times 10^4$  Zellen/ml wurde im Wechsel entweder durch Ausdünnung (Ersatz des verbrauchten Mediums durch frisches Medium) oder durch Zentrifugation (1.000 rpm, 5 min, RT) und Resuspendierung in frischem Medium erreicht. Die Subkultivierung erfolgte alle 2 - 3 d in 75-cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen mit rotem Filterschraubverschluss für Suspensionszellen.

### 3.5.2.3 HT-22-Zellen

Für die Kultivierung der neuronalen murinen HT-22-Zellen wurde zellspezifisches Medium mit den entsprechenden Zusätzen (Tabelle 2) verwendet. Da es sich um adhärenente Zellen handelt, fand bei jedem Mediumwechsel eine Passagierung statt. Zunächst wurde das verbrauchte Medium mit einer Glaspipette entfernt und die nun frei vorliegenden am Kulturflaschenboden befindlichen Zellen vorsichtig mit 5 ml vortemperiertem 1-fach PBS (37 °C) gespült. Das PBS wurde entfernt und verworfen. Zum Ablösen der Zellen vom Kulturboden wurde mit 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung (1x) überschichtet und die Kulturflasche für 2 min im Brutschrank inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurde mindestens 2 ml HT-22-Kulturmedium zugegeben und die Zellsuspension mit einer 5-ml-Glaspipette vorsichtig resuspendiert und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Mittels einer Neubauerkammer wurde die Zellzahl bestimmt, bevor die Suspension zentrifugiert (1.000 rpm, 5 min, RT) wurde. Anschließend wurde der Überstand verworfen und durch Zugabe von frischem vortemperiertem Medium (37 °C) eine neue Zelldichte von 5 - 7,5 x 10<sup>4</sup> Zellen/ml eingestellt. Die Subkultivierung erfolgte alle 2 - 3 d in 75-cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen mit gelbem Filterschraubverschluss für adhärenente Zellen.

### 3.5.2.4 CaCo2-Zellen

Die Kultivierung der Adenokarzinomzelllinie CaCo2 verlief vergleichbar mit der Kultivierung der HT-22-Zellen. Für die CaCo2-Zellen wurde zelllinienspezifisches Medium verwendet (Tabelle 2). Das verbrauchte Medium wurde entfernt, der Kulturboden vorsichtig mit vortemperierten PBS (1x) gewaschen. Zum Ablösen der Zellen vom Kulturflaschenboden mussten sie vor der Behandlung mit Trypsin/EDTA (1x) mit 1 ml PBS/EDTA-Lösung behandelt und für 1 min im Brutschrank inkubiert werden. Die PBS/EDTA-Lösung wurde verworfen und 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung (1x) direkt nachbehandelt. Die darauffolgende Inkubation im Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) zum Ablösen der Zellen vom Kulturboden dauerte 6 - 7 min, welche mit der Zugabe von mindestens 2 ml frischen vortemperiertem Medium angehalten wurde. Die Zellen wurden vorsichtig mit einer 5-ml-Glaspipette durchmischt, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und die Zellzahl mittels Neubauerkammer gezählt. Nach dem Zentrifugationsschritt (1.000 rpm, 5 min, RT) wurde der Überstand verworfen und die Zellen in einer Zelldichte von 5 - 7,5 x 10<sup>4</sup> Zellen/ml in frischem Medium ausgesät. Die Subkultivierung erfolgte alle 3 - 4 d in 75-cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen mit gelbem Filterschraubverschluss für adhärenente Zellen.

### 3.5.2.5 HL-60-Zellen

Für die Kultur der HL-60-Zellen kam das zelllinienspezifische Medium aus Tabelle 2 zum Einsatz. Um ein optimales Wachstum zu gewährleisten, wurden die Zellen entweder durch Entfernung von verbrauchter Zellsuspension ausgedünnt und frisches temperiertes Medium (37 °C) zugegeben oder das verbrauchte Medium durch Zentrifugation (1.000 rpm, 5 % CO<sub>2</sub>, RT) durch frisches Medium ersetzt. Dabei belief sich die Zelldichte beim Subkultivieren auf 5 - 7,5 x 10<sup>4</sup> Zellen/ml alle 2 - 3 d, wobei die Zellen in 75-cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen mit rotem Filterschraubverschluss für Suspensionszellen kultiviert wurden. Zum Schutz der Zellen vor Differenzierung wurde stets eine Zelldichte unterhalb von 1 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml gewährleistet.

### 3.5.3 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl innerhalb einer Kultur wurden die Zellen zelltypspezifisch geerntet und 10 µl der Zellsuspension luftblasenfrei unter das Deckglas einer Neubauerkammer gegeben. Anschließend erfolgte die Auszählung der lebenden Zellen innerhalb aller vier Großquadranten einer Neubauerkammer unter einem Durchlichtmikroskop. Lebende Zellen konnten anhand des morphologischen Erscheinungsbildes kategorisiert werden. Da das Volumen, welches innerhalb der vier Großquadranten der Neubauerkammer gefasst werden kann 0,1 µl beträgt, ergibt sich für die Berechnung der lebenden Zellen innerhalb eines ml einer Zellsuspension folgende Formel:

$$Zellzahl_{\text{lebend}} = \frac{\text{Anzahl lebender Zellen}}{4} \times 10.000$$

### 3.5.4 Mykoplasmentest

Sowohl kurz nach dem Auftauen, direkt vor dem Rückfrieren und mindestens alle vier Wochen sollten die in Kultur befindlichen Zellen auf den Befall von Mykoplasmen kontrolliert werden. Mykoplasmen sind 0,15 - 0,3 µm kleine fakultativ anaerobe Bakterien [74, 75], welche sich parasitär von Wachstumsfaktoren der befallenen Zellen ernähren und somit deren Proliferation negativ beeinflussen [76].

Für den Mykoplasmentest wurden die zu untersuchenden Zellen zelltypspezifisch geerntet und es wurde mittels der Neubauerkammer die Zellzahl bestimmt. Für eine Probe wurde das Volumen einer Zellsuspension benötigt, welche in etwa 30.000 Zellen enthielt. Diese Zellen

wurden mittels Cytospin-Methode mit dem Shandon Cytospin3 (Thermo Scientific; Dreieich, DE) auf einem Glasobjektträger aufgebracht, für mindestens 2 h in - 20 °C kaltem Methanol fixiert, bevor sie mittels Bisbenzimid-Färbung betrachtet werden konnten. Für die Bisbenzimid-Färbung wurde der Glasobjektträger aus dem Methanol entnommen, kurz abgedampft und der noch feuchte Zellpunkt mit 20 µl Bisbenzimid-Lösung behandelt und mit einem 18x18 mm Deckglas für 3 min eingedeckt. Anschließend wurde das Deckglas mittels PBS (1x) abgespült und der Zellpunkt mit 10 µl DABCO und einem 18x18 mm Deckglas eingedeckt. Da Bisbenzimid die DNS unter Betrachtung mittels UV-Licht blau anfärbt, waren die Zellkerne der zu untersuchenden Zellen deutlich blau erkennbar. Sollte ein Mykoplasmenbefall vorhanden sein, wären kleine rosenkranzartig aufgereihete Punkte um den Zellkern herum erkennbar, welche als Mykoplasmen deklariert werden könnten. Während aller Experimente kam es zu keinem Mykoplasmenbefall der zu untersuchenden Zellkulturen.

### **3.5.5 Zelldifferenzierung**

#### *3.5.5.1 HT-22-Zellen*

Um die neuronalen murinen HT-22-Zellen zu differenzieren, wurden sie zunächst wie gewohnt in normalem Kulturmedium für HT-22 in 6-Loch-Platten für adhärenente Zellen ausgesät und über Nacht im Brutschrank mit wasserdampfgesättigter Luft bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Am Folgetag wurde das Kulturmedium aus den Probengefäßen abgenommen, die Zellen vorsichtig mit 1 ml auf 37 °C temperiertem PBS (1x) gewaschen, bevor frisches HT-22-Differenzierungsmedium zugegeben wurde. Das HT-22-Differenzierungsmedium enthielt Neurobasal-Medium (1x) und 1 % des N-2-Supplements (100x). Zur Differenzierung wurden die Zellen nicht wie in der Studie von Xu et al. für 12 h inkubiert [77], sondern für 24 h im HT-22-Differenzierungsmedium im Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, RT) belassen, bevor die Experimente durchgeführt wurden.

#### *3.5.5.2 CaCo2-Zellen*

Die Differenzierung der kolorektalen Adenokarzinomzellen CaCo2 verlief über einen Zeitraum von 21 d. Die Differenzierung fand in Zellkultureinsätzen (Inlets) der Firma Sarstedt (Nümbrecht, DE) statt. Die Inlets bestehen aus einem transparentem Polystyrolkörper, auf dem eine transparente Membran aus Polyethylenterephthalat (PET) aufgebracht ist. Zunächst wurden die Inserts mit je 1 ml einer Kollagen-Lösung (Typ I) für 3 h bei RT inkubiert.

Anschließend wurde die Lösung entfernt und das Insert bei RT über Nacht getrocknet, bevor mit der Differenzierung begonnen werden konnte. Die Beschichtung mit Kollagen ist notwendig um eine Ablösung der diff. Zellen entgegenzuwirken. In einer 6-Loch-Platte wurde ein Insert mit einem Durchmesser von 24 mm platziert. In den Zellkultureinsatz wurden  $1 \times 10^6$  CaCo2-Zellen in 1 ml Medium gegeben und 3 ml Medium in das Probengefäß der 6-Loch-Platte. Somit war die Membran komplett von beiden Seiten durch CaCo2-Kulturmedium umschlossen. Anschließend wurden die Zellen für 4 d im Brutschrank (36 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) kultiviert und adhärten an der Oberfläche der PET-Membran. Nach dieser Zeit wurde das verbrauchte Medium auf beiden Seiten der Membran entfernt und vorsichtig 1 ml frisches auf 37 °C temperiertes Medium innerhalb des Inserts zugeführt, indem es langsam an der Wand des Polystyrolkörpers zu getropft wurde. Außerhalb des Inserts (innerhalb der Kammer der 6-Lochplatte) wurde 3 ml frisches Medium (37 °C) zugeführt. Dieses Prozedere wurde im 4-Tages Rhythmus bis zum 20 d wiederholt. An Tag 21 der Differenzierung wurde das Medium erneut ausgewechselt und das Experiment gestartet [78].

### 3.5.5.3 HL-60-Zellen

Die Differenzierung der HL-60-Zellen wurde durch Behandlung mit DMSO hervorgerufen. Die durch das DMSO hervorgerufene Differenzierung führte zur Ausbildung von granulozytenartigen Zellen [79]. Da Collins et al. unterschiedliche Konzentrationen an DMSO (1 % - 1,5 %) und Behandlungsintervallen (bis zu 7 d) verwendet hatten [80-82], wurde vor Versuchsbeginn eine Differenzierungskontrolle mit verschiedenen DMSO-Konzentrationen und Behandlungsdauern verglichen. Die Ergebnisse sind unter 3.5.6.3 ersichtlich. Aus diesem Vorversuch ergab sich ein optimaler Differenzierungsanteil mit 1,25 % DMSO und einer Behandlungsdauer von 3 d. Hierfür wurden die Zellen durch Zentrifugation (1.000 rpm, 5 min, RT) vom verbrauchten Medium befreit und 6-Lochplatten mit frischem auf 37 °C vortemperiertem HL-60-Kulturmedium ausgesät. Diesem frischen Medium wurde 1,25 % DMSO zugefügt. Das Probengefäß wurde für 24 h im Inkubator (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) platziert. Am Folgetag wurden die Zellen zentrifugiert (1.000 rpm, 5 min, RT), mit frischem auf 37 °C vortemperiertem Medium mit 1,25 % DMSO-Anteil resuspendiert und für 24 h inkubiert. Dieses Prozedere wurde ein weiteres Mal wiederholt, bevor nach weiteren 24 h das Experiment mit den diff. Zellen beginnen konnte. Zum experimentellen Vergleich der diff. HL-60-Zellen mit den undiff. HL-60-Zellen wurde am 3. Tag der Differenzierung die Zellzahl der

diff. Zellen innerhalb der Kultur mittels Neubauerkammer bestimmt. Da die Verdopplungszeit der undiff. HL-60-Zellen ca. 24 h beträgt [83], wurde die Kultur der undiff. Zellen mit der halben Zelldichte im Vergleich zu den diff. Zellen ausgesät und für 24 h im wasserdampfgesättigten Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

### **3.5.6 Bestimmung des Differenzierungsstatus**

#### *3.5.6.1 HT-22-Zellen*

Zur Bestimmung des Differenzierungsstatus der HT-22-Zellen wurde den Zellen im Anschluss an die unter 3.5.5.1 beschriebene Differenzierung ein weiteres Mal frisches Neurobasal-Medium zur Verfügung gestellt. Zur Unterscheidung des Differenzierungszustandes zwischen undiff. und diff. HT-22-Zellen wurden neben den diff. Zellen separat auch undiff. Zellen für Versuchszwecke ausgesät. Bei den undiff. Zellen wurde das Medium zu denselben Zeitpunkten wie die den diff. Zellen ausgewechselt, allerdings wurde hierfür das normale Kulturmedium für HT-22-Zellen verwendet. Beiden Medien wurde zusätzlich Cytochalasin B (CytoB) in einer Konzentration von 3 µg/ml zugefügt, was die Zellteilung unterdrückt, allerdings nicht die Kernteilung [84]. Nach 24-stündiger Inkubation im Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) wurden die Zellen zelltypspezifisch abgelöst und mittels Shandon Cytospin3 (Thermo Scientific; Dreieich, DE; 1.000 rpm, 5 min, RT) auf Glasobjektträger aufgebracht. Diese Objektträger wurden anschließend in - 20 °C kaltem Methanol für mindestens 2 h gelagert, um die Zellen auf der Glasoberfläche zu fixieren. Zur Betrachtung wurden der Zellpunkt mit 10 µl GelGreen-Färbelösung (1:100 in dH<sub>2</sub>O verdünnt) für 7 min mit einem 18x18 mm Deckglas eingedeckt, mit PBS (1x) gewaschen und wiederum mit 10 µl DABCO und einem 18x18 mm Deckglas eingedeckt. Die Färbung ermöglicht eine Betrachtung der Zellpopulation, indem das Zellplasma unter FITC-Filter des Nikon Eclipse 55i (Nikon GmbH; Düsseldorf, DE) und einer 400-fachen Vergrößerung eine rotorange und der Zellkern eine gelbgrüne Färbung aufweist. Zur Unterscheidung des Differenzierungszustandes wurde als Hilfsmittel der Anteil an zwei- und mehrkernigen Zellen innerhalb von 2 x 1.000 Zellen einer Zellpopulation unter Verwendung des Fluoreszenzmikroskops Eclipse 55i (Nikon GmbH; Düsseldorf, DE) herangezogen. Es wurde postuliert, dass nach der Differenzierung der HT-22-Zellen innerhalb einer Probe keine wesentliche Proliferation der Kultur stattgefunden hat und somit im Vergleich zu den undiff. HT-22-Zellen ein deutlich geringerer Anteil an zwei- und mehrkernigen Zellen vorhanden war.

Eine historische Kontrolle der jeweiligen NK der undiff. und diff. HT-22-Zellen kann Kapitel 4.3.1.1 entnommen werden.

### 3.5.6.2 *CaCo2-Zellen*

Um die Differenzierung der CaCo<sub>2</sub>-Zellen nachzuweisen, wurde bei den diff. CaCo<sub>2</sub>-Zellen nach der 21 d andauernden Differenzierung die Anzahl der Zellkuppeln (domes) ermittelt. Undiff. CaCo<sub>2</sub>-Zellen wurden 2 d vor Versuchsstart mit einer Zelldichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/3 ml CaCo<sub>2</sub>-Medium in einer 6-Lochplatte für adhärente Zellen ausgesät, sodass sich bis Versuchsstart ein konfluenter Zellrasen ausbilden konnte. Die Zellkulturoberfläche der diff. Zellen ist durch die Größe der Inserts auf 24 mm Durchmesser begrenzt. Somit wurde zum Vergleich zwischen undiff. und diff. CaCo<sub>2</sub>-Zellen auch bei der undiff. Zellpopulation die Anzahl der Zellkuppeln innerhalb eines kreisrunden Bereichs mit 24 mm Durchmesser quantifiziert. Die Ergebnisse der historischen Kontrolle der NK sind in Kapitel 4.3.1.2 dargestellt.

### 3.5.6.3 *HL-60-Zellen*

Um eine optimale Zelldifferenzierung zu induzieren, wurden vor Beginn der Experimente Vorversuche durchgeführt. Hierfür wurden HL-60-Zellen mit Medium unterschiedlichen DMSO-Anteils (0 %, 1,25 %, 1,5 %, 1,75 % und 2 %) für 3 d behandelt. Nach dieser Zeit wurde der Anteil an diff. HL-60-Zellen nach Färbung mit GelGreen-Färbelösung fluoreszenzmikroskopisch mit dem Eclipse 55i (Nikon GmbH; Düsseldorf, DE) unter 400-facher Vergrößerung unter FITC-Filter (Nikon GmbH; Düsseldorf, DE) ausgezählt. Die Auswertung verlief nach morphologischen Kriterien. Undiff. Zellen wiesen einen runden/eiförmigen Zellkern auf, wobei diff. Zellen eine veränderte Morphologie zeigten. Die Zellkerne verloren ihre Form und glichen Bohnen oder wiesen Ein- und Ausbuchtungen am Zellkernrand auf. Eine repräsentative Auswahl an undiff. und verschiedenen diff. HL-60-Zellen kann Abbildung 3 entnommen werden. Pro Konzentration wurden 2 x 200 Zellen quantifiziert.

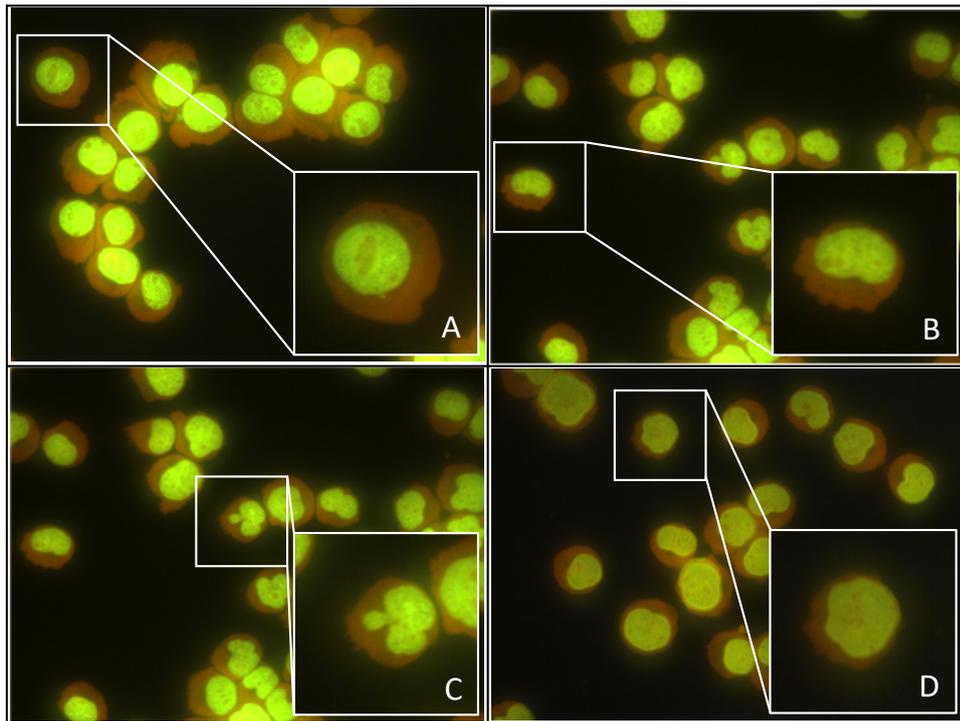


Abbildung 3: Beispielhafte mikroskopische Darstellung undiff. HL-60-Zellen und diff. HL-60-Zellen. A = Negativkontrolle undiff. HL-60-Zellen mit rundem/eiförmigen Zellkern, B = bohnenförmiger Zellkern diff. HL-60-Zellen, C = Zellkern diff. HL-60-Zellen mit Einbuchtungen am Zellkernrand, D = Zellkern diff. HL-60-Zellen mit Ausbuchtungen am Zellkernrand. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen unter 400-facher Vergrößerung unter FITC-Filter (Nikon GmbH; Düsseldorf, DE), Verwendung der Fluoro Pro MP 5000 Kamera (Intas Science Imaging Instruments GmbH; Göttingen, DE) und des Programms QCapture Pro 5.0.1.26 (QImaging; Surrey, British Columbia, Kanada).

Bei den Konzentrationen oberhalb von 1,5 % DMSO, aber besonders bei 2 % DMSO, wurde ein hoher Anteil an apoptotischen Zellen festgestellt. Somit wurde anschließend der Differenzierungsstatus mit einem 1,25 % DMSO-Anteil untersucht, wobei das Medium täglich gewechselt und frisches DMSO mit der gleichen Konzentration zugeführt wurde. Nach 1 d waren lediglich ca. 50 %, nach 2 d durchschnittlich über 80 % und 24 h später sogar knapp 90 % der Zellen differenziert. Somit wurde eine optimale Differenzierungskonzentration von 1,25 % DMSO und eine Dauer von 3 d festgelegt. Die Ergebnisse der Differenzierungsunterschiede zwischen undiff. und diff. HL-60-Zellen wurden parallel zu allen Versuchen durchgeführt und sind in der historischen Kontrolle der NK in Kapitel 4.3.1.3 vermerkt.

### 3.5.7 Bestimmung der DNS-Kondensationsdichte

Bei eukaryotischen Zellen ist die DNS im Zellkern angeordnet. Da die DNS einer Zelle im Prozess der Mitose entwunden und wieder stärker kondensiert werden muss, spielen eine Vielzahl an Proteinen, wie z. B. Histonen, eine wichtige Rolle bei der Zellteilung. Dieser Komplex aus DNS und Proteinen wird als Chromatin bezeichnet [85]. 5-Azacytidin (5-Aza) ist als synthetisches Nukleosid in der Lage eine Veränderung der Chromosomenstabilität hervorzurufen und somit verantwortlich für eine Unterkondensation der DNS [86]. Aus diesem Grund verursacht 5-Aza eine Verminderung der DNS-Dichte, welche mittels Bisbenzimid-Färbung nachgewiesen werden kann [87]. Bisbenzimid ist zellpermeabel und in der Lage in das Chromatin einzudringen und spezifisch an die DNS zu binden. Bevorzugt findet das in Bereichen mit erhöhtem Anteil an den Nukleinbasen Adenin und Thymin statt. Bisbenzimid besitzt ein Exzitations-/ Emissionsmaximum von 352/416 nm und ist somit mittels mikroskopischer Betrachtung unter UV-Licht erkennbar [88]. Hinsichtlich ihrer DNS-Packungsdichte, könnte der Differenzierungsstatus Unterschiede zwischen undiff. und diff. Zellen beinhalten und somit ein Eindringen von unterschiedlichen Agenzien bis zur DNS erschweren. Um mögliche Unterschiede festzustellen, wurden die jeweiligen Zellen zellartspezifisch geerntet, mittels Shandon Cytospin3 (Thermo Scientific; Dreieich, DE; 1.000 rpm, 5 min, RT) auf Glasobjektträger aufgebracht und mit Hilfe von - 20 °C kaltem Methanol für mindestens 2 h fixiert. Anschließend wurden die Zellpunkte mit der Bisbenzimid-Färbelösung unter Abdeckung mit einem 18x18 mm Deckglas für 3 min gefärbt. Nach Abspülen des Deckglases mit PBS (1x), wurde der Zellpunkt mit 10 µl DABCO eingedeckt und direkt betrachtet. Es trat eine blaue Färbung auf, welche mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops Eclipse 55i mit UV-Filter (Nikon GmbH; Düsseldorf, DE), einer Fluoro Pro MP 5000 Kamera (Intas Science Imaging Instruments GmbH; Göttingen, DE) und des Programms QCapture Pro 5.0.1.26 (QImaging; Surrey, British Columbia, Kanada) unter einer 400-fachen Vergrößerung abgelichtet werden konnte. Diese Bilder wurden anschließend unter Verwendung des Programms Image J 1.46 r (<http://rsbweb.nih.gov/ij>) in die einzelnen Farbkanäle getrennt, wobei für die Unterscheidung der Leuchtintensität lediglich der blaue Kanal betrachtet wurde. Für die qualitative Auswertung wurden pro Probe 200 Zellen ausgewertet und hinsichtlich ihrer Leuchtkraft verglichen.

### 3.5.8 Bestimmung der DNS-Menge

Um möglich Unterschiede zwischen der DNS-Menge bei undiff. und diff. HL-60-Zellen zu ermitteln, wurde der Zellzyklus durchflusszytometrisch untersucht. Hierfür wurden sowohl die undiff., als auch die diff. HL-60-Zellen geerntet und in einem 15-ml-Zentrifugenröhrchen 1x mit 3 ml sterilem PBS (1x) gewaschen und zentrifugiert (1.000 rpm, 5 min, RT). Der Überstand wurde entfernt und die Zellen mit vortemperierten eiskalten Ethanol (70 % v/v) fixiert. Hierfür wurde 1 ml Ethanol tröpfchenweise sehr langsam (> 2 min Tropfdauer) unter Verwendung eines Vortex-Schüttlers dem Zellpellet zugegeben. Anschließend wurde die Zellsuspension für 30 min auf Eiswasser gelagert. Dieser Schritt ermöglichte es im späteren Verlauf dem Farbstoff Propidiumiodid (PI) in die Zelle einzudringen, da PI alleine nicht zellmembranpermeabel ist. PI besitzt eine Exzitations-/ Emmisionsmaximum von 535/416 nm und interkaliert in die DNS und die Ribonukleinsäure (RNA) [88, 89]. Durch Zugabe des Enzyms Ribonuklease A (RNase A), wurde die RNA hydrolysiert und somit wurde im späteren Verlauf durch das PI lediglich der DNS-Anteil in der Zelle gefärbt [90]. Nach dem Fixierungsschritt wurde der Ethanol mit 1 ml PBS (1x) ausgewaschen, indem die Zellsuspension nach Zugabe des PBS auf dem Vortex-Schüttler durchmischt und bei 2600 rpm 5 min unter Kühlung in einer auf 4 °C vortemperierten Kühlzentrifuge zentrifugiert wurde. Nach Entfernung des Überstandes wurde dieser Waschschrift 1x wiederholt. Dann wurden die Zellen mit 50 µl der verdünnten RNase A-Lösung behandelt und durchmischt. Direkt danach wurde 200 µl des Farbstoffs PI zugegeben und die Probe direkt am Durchflusszytometer BD-LSR I (Becton Dickinson; Heidelberg, DE) vermessen. Pro Probe wurden 10.000 undiff. HL-60-Zellen vermessen und mit Hilfe des Programms BD CellQuest™ Pro 4.0 (Becton Dickinson; Heidelberg, DE) ausgewertet. Mit unveränderten Einstellungen wurde anschließend die diff. HL-60-Zellen vermessen und mögliche Unterscheide der Positionen des G1-/S-/G2/M-Peaks von undiff. und diff. HL-60-Zellen auf der x-Achse verglichen.

### 3.5.9 Vitalitätstest

Um die Vitalität der in Kultur befindlichen Zellen zu ermitteln, wurde der Vitalitätstest mittels Fluoresceindiacetat (FDA)/GelRed-Färbung bestimmt. Diese Methode kam zum Einsatz, wenn die Zytotoxizität bestimmter Substanzbehandlungen untersucht werden sollte. Die Färbung basiert auf dem Prinzip, dass FDA die Zellmembran gesunder, vitaler Zellen passieren kann und intrazellulär durch Esterasen zu grün-fluoreszierendem Fluorescein hydrolysiert wird [91]. GelRed ist in der Lage in nicht-vitale Zellen einzudringen und, vergleichbar wie

Ethidiumbromid, mit der DNS zu interkalieren. GelRed ist 100x sensitiver als Ethidiumbromid und überdies nicht kanzerogen [92]. Nach dem zelltypspezifischen Ablösen der Zellen wurden 35 µl Zellsuspension mit 15 µl Vitalitätsfärbelösung vermischt. 15 µl dieser Lösung wurden auf einen Glasobjektträger aufgebracht, mit einem 21x26 mm Deckglas eingedeckt und 200 Zellen pro Probe auf ihre Vitalität mittels Eclipse 55i Mikroskop (Nikon GmbH; Düsseldorf, DE) bei 200-facher Vergrößerung unter Verwendung eines FITC-Filters (Nikon GmbH; Düsseldorf, DE) untersucht. Vitale Zellen waren deutlich als grün fluoreszierende und nicht-vitale Zellen als rot-fluoreszierende Zellen erkennbar. Der vitale Anteil in einer Zellpopulation konnte somit mit folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Vitalität [\%]} = \frac{\text{Zellzahl}_{\text{vital}}}{\text{Zellzahl}_{\text{gesamt}}} \times 100 \%$$

### 3.5.10 Mikrokerntest

Der Mikrokerntest ist ein seit langem etablierter Test auf DNS-Schäden, welcher basierend auf der entsprechenden Richtlinie der OECD (Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung) zur Detektion der Aktivität von klastogenen und aneuploiden Substanzen *in vitro* bei Säugerzellen und *in vivo* bei Nagere-erythrozyten zum Einsatz kommt. Mit Hilfe dieser Tests ist es möglich Mikrokerne im Zellplasma einer Zelle nachzuweisen. Mikrokerne können entweder ganze Chromosomen oder lediglich Chromosomenfragmente enthalten [93]. Es besteht die Möglichkeit den Mikrokerntest mit und ohne Zugabe von CytoB durchzuführen, wobei die durch Fenech und Morley modifizierte Version eine Begrenzung der Untersuchung auf Zellen ermöglicht, welche seit Substanzexposition eine Mitose abgeschlossen haben [84]. Der für die Experimente hier verwendete Test wurde mit CytoB durchgeführt, um Zellen zu untersuchen, welche trotz Substanzbehandlung noch proliferieren. Die zu untersuchenden Zellen wurden zelltypspezifisch geerntet und in eine 15-ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellzahl wurde mittels Neubauerkammer bestimmt und eine Zellsuspension, welche ca. 30.000 Zellen enthielt, in einen Trichter der Cytospinapparatur Shandon Cytospin3 (Thermo Scientific; Dreieich, DE) gegeben und bei 1.000 rpm 5 min bei RT zentrifugiert. Die auf diese Weise auf den Objektträger aufbrachten Zellen wurden für mindestens 2 h in -20 °C kaltem Methanol fixiert. Nach dieser Zeit wurde der Zellpunkt getrocknet und für 7 min mit 11 µl GelGreen-Färbelösung mit einem 18x18 mm Deckglas eingedeckt. Dieses wurde mit 1x PBS abgespült und der Zellpunkt mit 10 µl DABCO unter einem 18x18 mm Deckglas eingedeckt. Die Anzahl mikrokernhaltiger Zellen wurde innerhalb von 1.000 doppelkernigen Zellen

(Mittelwert aus Doppelbestimmung) mikroskopisch unter Verwendung einer 400-facher Auflösung mittels FITC-Filter am Eclipse 55i Fluoreszenzmikroskop (Nikon GmbH; Düsseldorf, DE) ermittelt. Die Zellen einer mit CytoB behandelten Population besaßen somit einkernige (EK), doppelkernige (DK) und mehrkernige (MeK) Zellen. Bei der Auswertung des Mikrokerntests ist es somit nicht nur möglich den Anteil an Zellen zu erfassen, welche mindestens einen Mikrokern in sich tragen, sondern auch den Anteil innerhalb von 1.000 Zellen, welche gerade eine Mitose durchlaufen oder durch die Substanzbehandlung in die Apoptose gegangen sind und sog. apoptotic bodies enthielten. Außerdem ermöglichte eine CytoB-Behandlung die Proliferation einer Zellpopulation zu quantifizieren. Hierfür kam der Cytochalasin B-Proliferationsindex zum Einsatz, welcher durch folgende Formel dargestellt wurde:

$$CBPI = \frac{1 \times EK + 2 \times DK + 3 \times MeK}{EK + DK + MeK}$$

Als Ergebnis für den CBPI waren Werte  $\geq 1$  möglich. Werte um 1 beschrieben eine Population, welche kaum proliferiert hat. Ergab sich nach Berechnung ein CBPI-Wert um 2, haben so gut wie alle Zellen eine Mitose durchlaufen. Werte  $> 2$  wurden von Populationen erzielt, wenn einzelne Zellen mehr als eine Mitose abgeschlossen haben und somit als MeK-Zellen vorlagen.

### 3.5.11 Einzelzellgelelektrophorese

Die Einzelzellgelelektrophorese, auch Comet Assay genannt, ist eine Methode um Schäden an der DNS einzelner Zellen zu vermessen. Bereits im Jahr 1984 haben Ostling und Johanson das Verfahren in seinen Grundzügen entwickelt [94], welches im Laufe der Zeit weiterentwickelt wurde. Die gebräuchliche Variante, welche auch für die nachfolgenden Experimente verwendet wurde, ist die alkalische Variante, bei der sowohl die Lyse, als auch die Elektrophorese alkalisch durchgeführt wird [95]. Mit dieser Methode lassen sich Einzel- und Doppelstrangbrüche, Basenschäden und alkalilabile Stellen detektieren und quantitativ nachweisen, indem Zellkerne einer Elektrophorese unterzogen wurden und dabei DNS-Bruchstücke im elektrischen Feld schneller zur Anode wandern als intakte DNS. Somit entsteht der charakteristische Schweif, welcher computergestützt quantifiziert werden konnte. In Abbildung 4 kann der schematische Ablauf der Versuchsdurchführung entnommen werden.

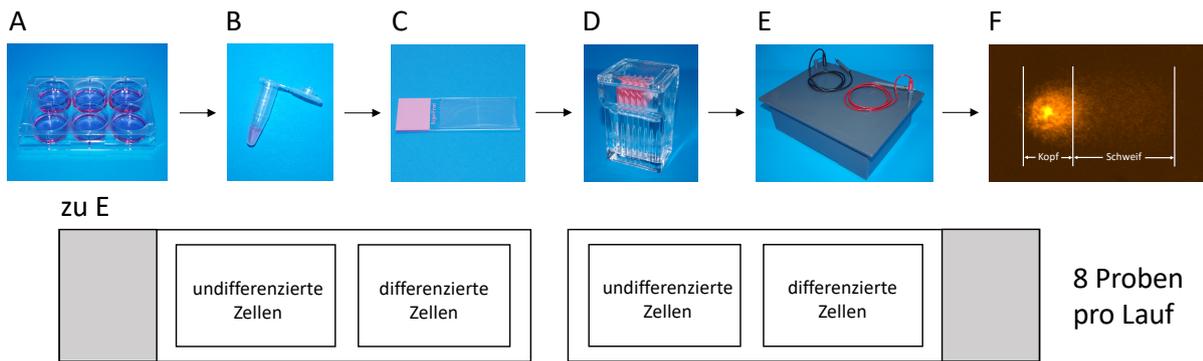


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Durchführung einer Einzelzellgelelektrophorese mit zwei Proben (undiff. und diff. Zellen) pro Objektträger. A = Zellpopulationen aus der 6-Loch-Platte entnehmen, B = Zellpellet mit Agarose vermengen, C = jeweils zwei Proben pro Objektträger (undiff. und diff. Zellen) auftragen und mit Deckglas (24x24 mm) eindecken, D = Zelllyse in einer Glasküvette (im Dunkeln), E = Elektrophorese, F = Anfärben der DNS mittels GelRed-Färbelösung und fluoreszenzmikroskopische Auswertung Labophot-2 unter 200-facher Vergrößerung unter TRITC-Filters (Nikon GmbH; Düsseldorf, DE) und der Software Komet 5 (BFI Optilas; Dietzenbach, DE).

Mit verschiedenen Variationen der Zellbehandlungen ließ sich somit ein DNS-Schaden oder eine DNS-Schadensreparatur ermitteln.

### 3.5.11.1 Bestimmung des DNS-Schadens

Die zu untersuchenden diff. und undiff. Zellen wurden nach Substanzbehandlung zelltypspezifisch geerntet, in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen überführt und die Zellsuspension zentrifugiert (1.000 rpm, 5 min, RT). Der Überstand wird bis auf ca. 100 µl verworfen. Das Zellpellet wird mit Hilfe des restlichen Überstandes resuspendiert. 10 µl dieser Zellsuspension wurden mit 90 µl vorgewärmter LMP-Agarose unter Verwendung eines Vortex-Schüttlers vermischt. Anschließend wurden jeweils 38 µl dieser Suspension auf 2 gegenüberliegenden vorab mit HMP-Agarose beschichtete Glasobjektträgern aufgebracht und mit je einem 24x24 mm Deckglas eingedeckt. So wurde mit den undiff. und diff. Zellen verfahren, sodass pro Glasobjektträger 2 Proben aufgebracht werden konnten. Diese Technik hatte zum Vorteil, dass während eines Versuches, im Vergleich zur konventionellen Methode, die doppelte Probenmenge untersucht werden konnte. Nach kurzer Zeit erhärtete die Agarose-Zellsuspension-Mischung, sodass das Deckglas vorsichtig abgezogen werden konnte und die Objektträger für 1 h im Dunkeln in einer Glasküvette mit vorgekühlter Lyselösung (4 °C) platziert wurden. In dieser Zeit fand die alkalische Zelllyse statt, sodass schließlich nur noch die Zellkerne in der Agarose eingeschlossen waren. Anschließend wurden die Objektträger aus der Glasküvette entnommen, vorsichtig mit dH<sub>2</sub>O gespült und in einer Elektrophoresekammer für 8 Objektträger mit Replikaten platziert. Die Objektträger-Replikate wurden dabei stets

gegenüberliegend mit der Agaroseschicht nach oben angeordnet und die Kammer so mit einer vorgekühlten Elektrophorese-Lösung (4 °C) befüllt, dass die Objektträger komplett mit der Lösung bedeckt waren. Für den Entwindungsprozess der DNS wurden die Objektträger mit den darauf befindlichen Zellen für 30 min in der alkalischen Elektrophorese-Lösung inkubiert, bevor die Elektrophorese für 30 min gestartet wurde. Hierbei wurden die Objektträger im gleichen Puffer belassen und eine Spannung von 30 Volt und eine Stromstärke von 0,3 Ampere angelegt. Die Elektrophoresekammer befand sich überdies in einer Wanne mit Eiswasser, um eine homogene Kühlung der Kammer während des gesamten Laufes zu ermöglichen. Es musste außerdem darauf geachtet werden, dass Wanne und Kammer auf einer geraden Oberfläche standen und sich keine Luftblasen unter den Objektträgern befanden, um ein gleichmäßiges elektrisches Feld zu ermöglichen. Nach Ende der Elektrophorese wurden die Objektträger aus der Lösung entnommen, vorsichtig mit dH<sub>2</sub>O gespült und für 5 min in TRIS-Lösung in einer Glasküvette gegeben, um eine Neutralisation hervorzuführen. Abschließend wurden die Zellen fixiert, indem die Glasobjektträger für 5 min in - 20 °C kaltem Methanol in einer Glasküvette inkubiert wurden. Bis zum Anfärben der Zellen wurden die Objektträger trocken gelagert. Das Anfärben der DNS erfolgte mittels GelRed-Färbelösung, indem 38 µl dieser Lösung zu gleichen Teilen auf beide 24x24 mm Agaroseschichten eines Objektträgers getropft wurde und mit einem 24x60 mm Deckglas eingedeckt wurde. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch am Labophot-2 unter 200-facher Vergrößerung und einem TRITC-Filter (Nikon GmbH; Düsseldorf, DE). Pro Probe wurden 50 Zellen auf zwei Replikaten ausgewertet. Der DNS-Schaden wurde dabei mit Hilfe der Software Komet 5 (BFI Optilas; Dietzenbach, DE) über die Vermessung des DNS-Anteils im Schweif vermessen, quantifiziert und in Prozent dargestellt. In Abbildung 5 sind beispielhaft zwei Zellkerne dargestellt, welche wenig und viel DNS-Schaden aufweisen.

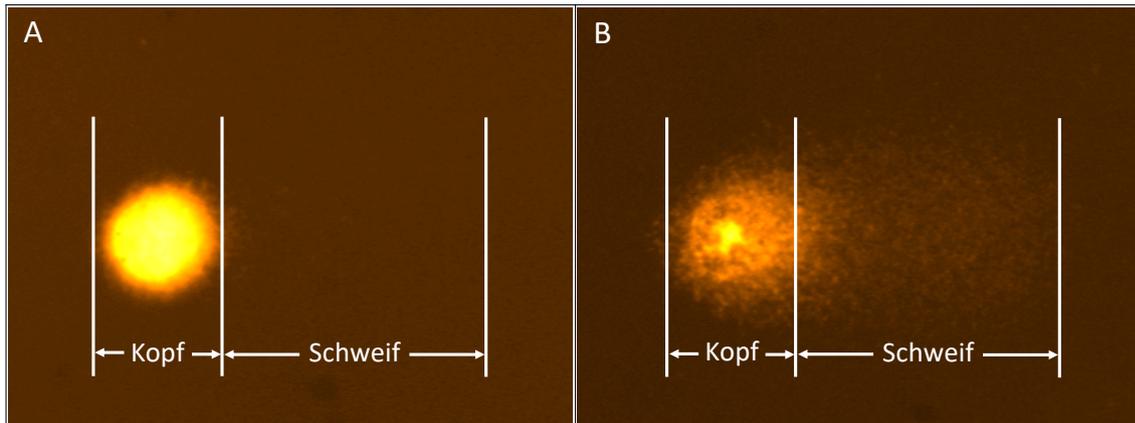


Abbildung 5: Beispielhafte Darstellung von HL-60-Zellen nach Durchführung einer Einzelzellgelelektrophorese. A = Negativkontrolle mit geringem DNS-Anteil im Schweif, B = großer DNS-Anteil im Schweif nach Behandlung mit 200  $\mu$ M MMS für 4 h. Fluoreszenzmikroskopische Auswertung am Labophot-2 unter 200-facher Vergrößerung mittels eines TRITC-Filters (Nikon GmbH; Düsseldorf, DE) und der Software Komet 5 (BFI Optilas; Dietzenbach, DE).

### 3.5.11.2 Inhibierung der Topoisomerase

Topoisomerasen sind Enzyme, welche für die Veränderung der Topologie von DNS-Molekülen verantwortlich sind. Die Topoisomerase I (Topo I) erzeugt DNS-Einzelstrangbrüche und die Topo II entwindet und lockert im speziellen die Helix doppelsträngiger DNS unter Verbrauch von ATP [96]. Wirkstoffe, welche die Topo II angreifen, fallen in eine der zwei Kategorien, Inhibitoren oder Gifte. Einige dieser Topo II-Gifte kommen bei der Krebstherapie zum Einsatz. So auch Doxorubicin, welches ein interkalierendes Gift der Topo II ist. Die Struktur von Doxorubicin mit planaren aromatischen Ringsystemen ermöglicht elektrostatische Quervernetzungen des Moleküls mit Basenpaaren der Nucleinsäure und erzeugen somit eine Interkalation. Durch diese strukturelle Veränderung der DNS ist Topo II nicht in der Lage die durch ihre Aktivität eingefügten Doppelstrangbrüche wieder vollständig zu verschließen. Doxorubicin besitzt neben der Wirkung auf die Topo II auch die Fähigkeit freie Radikale zu erzeugen und damit die Zelle zu schädigen. Etoposid hingegen ist ein nicht-interkalierendes Topo II-Gift, welches nicht mit der DNS interkaliert, sondern vermutlich über eine Protein-Arzneistoff-Wechselwirkung die Topo II beeinflusst [97]. In wie weit diese Mechanismen eine schädigende Wirkung auf undiff. und diff. Zellen ausüben, wurden mittels der Zelllinien HT-22, CaCo2 und HL-60 untersucht. Somit wurden die Zellen entsprechend ihres Zelltyps differenziert, wobei zum direkten Vergleich undiff. Zellpopulationen mit gleicher Zelldichte ausgesät wurden. Um Unterschiede einer DNS-schädigenden Wirkung zu vergleichen, wurden die Zellen nach 1-stündiger Behandlung mit Etoposid oder 4-stündiger Behandlung mit

Doxorubicin zelltypspezifisch geerntet und eine Einzelzellgelelektrophorese, wie in Kapitel 3.5.11.1 durchgeführt und ausgewertet.

### *3.5.11.3 Bestimmung der DNS-Schadensreparatur nach DNS-DNS-Crosslink*

Bei der Krebsbehandlung kommen unter anderem Substanzen, wie Cisplatin und andere Platin-Derivate zum Einsatz [98]. Cisplatin wird beispielsweise seit den 70er Jahren als Medikation gegen Hoden- und Eierstockkrebs eingesetzt [99], obwohl es eine Vielzahl an unerwünschten Nebenwirkungen, wie Nephro- und Neurotoxizität hervorruft, wobei die Knochenmarksdepression der größte dosislimitierende Faktor ist [100]. Crosslinker, wie Cisplatin, bilden DNS-Platin-DNS- und DNS-Platin-Protein-Quervernetzungen aus, unterbinden somit die DNS-Replikation und führen letztlich zum Zelltod [101]. Das chemotherapeutisch wirksame Alkylanz Mitomycin C, ein weiterer Crosslinker, benötigt eine enzymatische Reduktion, bevor es zu einem hoch reaktiven Mediat umgewandelt wird. Dieses alkyliert zelluläre Nukleophile und bildet somit DNS-Quervernetzungen aus, welche wiederum eine DNS-Replikation inhibieren [102]. Um eine Schadensreduktion durch Crosslinker im Comet Assay nachweisen zu können, wurde  $\text{H}_2\text{O}_2$  als strangbruchinduzierendes Agens verwendet. Andreoli et al. verwendeten eine  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration bis max. 100  $\mu\text{M}$  bei der Behandlung von humanen Lymphozyten [103]. Aus Vorversuchen mit HL-60-Zellen ergab sich bei diesen Konzentrationen allerdings ein zu geringer Schaden, um Effekte durch Quervernetzungen zu erzeugen, und somit wurde eine Konzentration von 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  für die Behandlung der HL-60-Zellen gewählt. Nach Differenzierung der HL-60 und einer Aussaat von undiff. HL-60-Zellen in 6-Loch-Platten wurden die Zellen für 1 h mit MMC oder Cisplatin behandelt. Cisplatin wurde bei diesen Experimenten als PK verwendet. Bei einem Teil des Versuchs wurde direkt im Anschluss für 30 min eine Nachbehandlung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  durchgeführt, bevor der Comet Assay zur Detektion der DNS-Schäden zum Einsatz kam. Bei einem anderen Teil der Proben wurden die Crosslinker MMC und Cisplatin mittels Zentrifugation (1.000 rpm, 5 min, RT) entfernt, bevor frisches Medium zugeführt wurde und die Zellen für eine Nachinkubationszeit von 4 h im Brutschrank (37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$ ) platziert wurden. Anschließend wurde auch hier 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  zugeführt, um DNS-Schäden hervorzurufen, welche durch den darauffolgenden Comet Assay detektiert werden konnten. Sollte eine Quervernetzung stattgefunden haben, so kann  $\text{H}_2\text{O}_2$  in sehr viel geringerem Ausmaß zur Ausbildung eines Schweifs führen. Dieser Versuchsaufbau kam zum Einsatz, um mögliche DNS-Schadensunterschiede zwischen undiff. und diff. HL-60-Zellen nachzuweisen.

#### *3.5.11.4 Bestimmung der DNS-Schadensreparatur nach UV-Strahlung*

Zur Ermittlung der DNS-Reparaturkapazität kam ebenfalls der Comet Assay zum Einsatz. Das Prinzip dieser modifizierten Methode basierte darauf, dass undiff. und diff. Zellen mittels des CL-1000 Shortwave Crosslinkers (Ultra-Violet Products Ltd.; Cambridge, UK) einer UV-Strahlung mit einer Wellenlänge von 254 nm ausgesetzt wurden, was zu einer DNS-Schadensinduktion führte [104]. Für die Reparatur dieser entstandenen Schäden war die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) zuständig, welche in der Lage war die durch das UV-Licht induzierten Schäden auszuschneiden [105]. Zusätzlich wurde bei einem Teil der Proben Aphidicolin (Aph) zugesetzt. Aph inhibierte die DNS-Polymerase  $\alpha$  während der Replikation, sodass die durch das UV-Licht induzierte offene DNS-Stellen nicht repariert werden konnten, ohne dabei die RNA- oder die Protein-Synthese zu inhibieren [106]. Die durch diesen Mechanismus entstandenen DNS-Bruchstücke konnten in der nachfolgend beschriebenen Einzelzellgelelektrophorese detektiert werden.

Um mögliche DNS-Schadensreparaturunterschiede zwischen undiff. und diff. HL-60-Zellen detektieren zu können, wurden die Zellen wie in Kapitel 3.5.5.3 beschrieben differenziert und in 6-Loch-Platten ausgesät. Einem Teil der Proben wurde 15  $\mu$ M Aph zugegeben, ein Teil der Proben wurde mit UV-Licht (15 J/m<sup>2</sup>) bestrahlt und manche Proben wurden in Kombination aus beidem behandelt. Zur Beurteilung der NER-Kapazität konnten unterschiedliche Postinkubationszeiten gewählt werden. Speit et al. haben sowohl nach 2 h als auch nach 4 h eine Comet Assay durchgeführt [107]. Bei den nachfolgend beschriebenen Experimenten wurde eine Postinkubationszeit von 2 h gewählt. Somit wurde bei einer Probenhälfte direkt nach dieser Behandlung ein Comet Assay durchgeführt, bei einem anderen Teil der Proben wurden die Probengefäße nach UV-Bestrahlung bzw. nach Aph-Zugabe zunächst für 2 h in den mit wasserdampfgesättigten Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) gestellt, bevor ein Comet Assay durchgeführt wurde. Der weitere Versuchsverlauf entspricht dem in Kapitel 3.5.11.1 beschriebenen Verlauf einer Einzelzellgelelektrophorese.

#### **3.5.12 Durchflusszytometrische Apoptosedetektion**

Die Apoptose ist eine Art des programmierten Zelltodes, wobei innerhalb einer Zellpopulation geschädigte Zellen eliminiert werden können. Caspasen ziehen eine Vielzahl von Kaskaden nach sich, welche letztlich den Zelltod herbeiführen [108]. Ein caspasevermittelter Prozess ist die Phosphatidylserin (PS)-Exposition. Bei gesunden Zellen ist das PS lediglich in der inneren

Plasmamembran lokalisiert. Bei früh apoptotischen Zellen geht die Asymmetrie des PS verloren, obwohl eine Membranintegrität erhalten bleibt. Diese Lokalisation des PS ist für Phagozyten ein Signal für die Infiltration [109]. Zellen, welche eine Nekrose erreicht haben, besitzen eine poröse Membran, durch die DNS-Farbstoffe penetrieren können. Diese beiden Mechanismen ermöglichen es dem fluoreszenzmarkierten Protein Annexin-V und dem Farbstoff PI eine Unterscheidung zwischen Zellen zu treffen, welche sich in der Phase einer frühen Apoptose oder späten Apoptose/ Nekrose befinden.

Während der Experimente, wurde die Zellen nach der Behandlung zelltypspezifisch geerntet, in ein 15-ml-Zentrifugationsröhrchen überführt und bei 1.000 rpm, 5 min lang bei RT zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde mit 1 ml HEPES-Bindungspuffer (1x) gewaschen und erneut zentrifugiert (1.000 rpm, 5 min, RT). Der Überstand wurde bis auf 100 µl verworfen, bevor für 20 min 100 µl Färbelösung (96 µl 1-fach HEPES-Bindungspuffer + 2 µl Annexin-V-FLUOS-Lösung + 2 µl PI-Lösung (50 µg/ml)) zugegeben und im Dunkeln bei RT inkubiert wurde. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 400 µl HEPES-Bindungspuffer (1x) gestoppt, bevor die Probe in das Probengefäß überführt und direkt im Anschluss am BD-LSR I (Becton Dickinson; Heidelberg, DE) vermessen wurde. Pro Probe wurden 30.000 Ereignisse vermessen und mit Hilfe des Programms BD CellQuest™ Pro 4.0 (Becton Dickinson; Heidelberg, DE) ausgewertet. Die Trennung der unterschiedlichen Zellen einer Zellpopulation verlief entsprechend Abbildung 6.

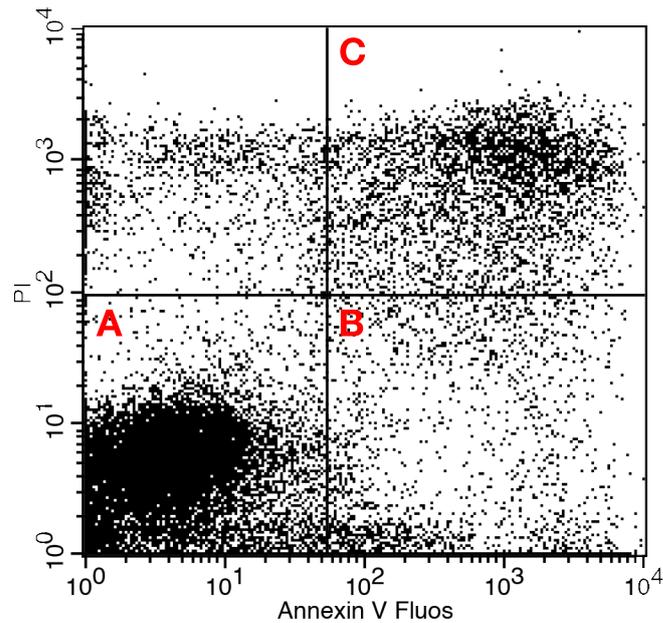


Abbildung 6: Schematische Darstellung eines Dot-Plot-Diagramms nach durchflusszytometrischer Apoptosedetektion von HL-60-Zellen nach Anfärben mit Annexin-V-FLUOS und PI. Quadrant A (niedriges Niveau an Annexin-V-FLUOS und PI): lebenden Zellen; Quadrant B (hohes Niveau an Annexin-V-Fluos und niedriges Niveau an PI): frühapoptotische Zellen; Quadrant C (hohes Niveau an Annexin-V-FLUOS und PI): spätapoptotische Zellen/ Nekrosen. Darstellung von insgesamt 30.000 Ereignissen mit BD-LSR I unter Verwendung des Programms BD CellQuest™ Pro 4.0.

Für die nachfolgenden Experimente wurden zur Auswertung lediglich Zellen des Quadranten B herangezogen, um frühapoptotische Zellen der verschiedenen Proben darzustellen.

### 3.5.13 Durchflusszytometrische Zellzyklusdetektion

Um Veränderungen nach Substanzbehandlung hinsichtlich des DNS-Gehaltes einer Zellpopulation zu bestimmen, wurde die Zellzyklusverteilung mittels Durchflusszytometer bestimmt. Die Methode beruht auf der Tatsache, dass der DNS-Gehalt einer Zelle in der G2/M-Phase doppelt so hoch ist, wie in der G1-Phase. Zellen der S-Phase, weisen einen DNS-Gehalt auf, welcher zwischen diesen beiden Bereichen liegt [110]. Die Aufarbeitung der Zellen entsprach der Erläuterung in Kapitel 3.5.8, lediglich die Bewertung unterlag einem anderen Schema. Pro Probe wurden auch 10.000 HL-60-Zellen vermessen und mit Hilfe des Programms BD CellQuest™ Pro 4.0 (Becton Dickinson; Heidelberg, DE) ausgewertet. Mit unveränderten Einstellungen wurden alle Messungen vollzogen und der prozentuale Anteil der Zellen quantifiziert, welche sich im Histogramm in Phase G1, S oder G2/M befanden. Eine schematische Darstellung zweier Histogramme ist in Abbildung 7 ersichtlich.

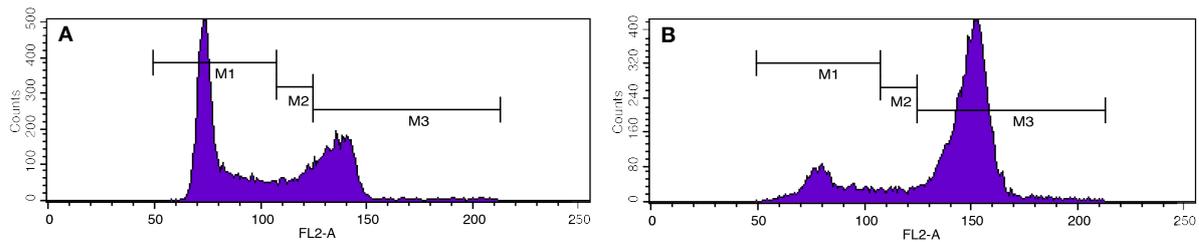


Abbildung 7: Schematische Darstellung zweier Histogramme nach durchflusszytometrischer Zellzyklusdetektion von HL-60-Zellen nach Anfärben mit PI. Histogramm A: NK (unbehandelte Zellen); Histogramm B: Verschiebung zu G2/M (für 24 h mit 100 nM Vinorelbin behandelte Zellen). Bereich M1: Zellen in der G1-Phase; Bereich M2: Zellen in der S-Phase; Bereich M3: Zellen in der G2/M-Phase. Darstellung von insgesamt 10.000 Ereignissen mit BD-LSR I unter Verwendung des Programms BD CellQuest™ Pro 4.0.

Die Grenzen zwischen den Zellzyklusphasen wurden manuell festgelegt und für alle Proben beibehalten. Somit konnte ein genereller Vergleich zwischen allen untersuchten Proben gezogen werden.

### 3.5.14 Durchflusszytometrische Detektion der reaktiven Sauerstoffspezies

Der Gehalt an reaktiver Sauerstoffspezies (ROS, reactive oxygen species) gilt als Maß für den oxidativen Stress. ROS verursachen eine Zerstörung von Lipiden, Proteinen und DNS, was eine Vielzahl an Genomschäden nach sich ziehen kann [111]. Zur Bestimmung der ROS kann mit Hilfe des Durchflusszytometers die DCF-Methode eingesetzt werden. Diese Methode beruht auf dem Prinzip, dass nicht fluoreszierendes 2',7'-Dichlorofluoresceindiacetat ( $H_2DCFDA$ ) in die Zelle gelangt. Im Zellplasma wird es durch zelluläre Esterasen zu nicht fluoreszierendem Dichlorodihydrofluorescein ( $H_2DCF$ ) deacetyliert. Dieses wird unter Anwesenheit vom ROS zum fluoreszierenden Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert und kann somit detektiert werden. Die Fluoreszenzintensität gilt als Maß für den oxidativen Stress.

15 min vor Ende der Substanzbehandlung wurden die Zellen mit 10  $\mu M$  2',7'-Dichlorofluoresceindiacetat behandelt und für die restlichen 15 min im wasserdampfgesättigten Brutschrank (37 °C, 5 %  $CO_2$ ) im Dunkeln inkubiert. Alle weiteren Aufarbeitungsschritte mussten im Dunkeln durchgeführt werden. Nach dieser Zeit wurden die Zellen zelltypspezifisch geerntet und in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen überführt, in welches vorab 3 ml kaltes PBS (1x) in einem Eiswasserbad vorgelegt wurde. Danach wurde das Zentrifugenröhrchen zentrifugiert (1.000 rpm, 5 min 4 °C), der Überstand verworfen und das Zellpellet mit 2 ml PBS/BSA-Lösung (4 °C) gewaschen und erneut zentrifugiert (1.000 rpm, 5 min, 4 °C). Das Zellpellet wurde in 700  $\mu l$  PBS/BSA-Lösung resuspendiert, bevor PI mit einer

Endkonzentration von 1 µg/ml zugegeben wurde. Die Parallelfärbung mit PI ermöglichte eine Differenzierung aufgrund der Zellmembranintegrität, sodass nur lebende Zellen hinsichtlich der Induktion von oxidativem Stress untersucht wurden. Diese Zellsuspension wurde in ein Probengefäß überführt und direkt im Anschluss an die Färbung die Fluoreszenzintensität innerhalb der Zellsuspension am Durchflusszytometer BD-LSR I (Becton Dickinson; Heidelberg, DE) detektiert. Pro Probe wurden 20.000 Ereignisse vermessen und mit Hilfe des Programms BD CellQuest™ Pro 4.0 (Becton Dickinson; Heidelberg, DE) ausgewertet. Als PK wurde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in einer Konzentration von 200 µM als Substanzbehandlung herangezogen, wobei die Verschiebung auf der x-Achse eine Veränderung der Fluoreszenzintensität mit sich brachte.

### **3.5.15 Mikroskopische Detektion reaktiver Sauerstoffspezies**

Reaktive Sauerstoffspezies lässt sich neben der durchflusszytometrischen Bestimmung auch mikroskopisch detektieren. Der Unterschied bei diesem Verfahren liegt darin, dass die entstehende Fluoreszenz enzymunabhängig verläuft. Dihydroethidium (DHE) ist zellpermeabel und interagiert mit Radikalen innerhalb der Zellen und oxidiert dadurch selbst zum fluoreszierendem Oxyethidium, welches mit den Nukleinsäuren der DNS wechselwirkt. Dadurch findet unter einem FITC-Filter eines Fluoreszenzmikroskops eine Verschiebung des Exzitations-/ Emissionsmaximums von 350/400 nach 518/605 statt und eine rote Färbung wird ersichtlich [112]. Für das Experiment wurden die Zellen 20 min vor Behandlungsende mit 2 µl einer 5 mM DHE-Lösung (Endkonzentration: 10 µM) behandelt und für die restliche Zeit im Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) weiter inkubiert. Ab diesem Zeitpunkt mussten alle weiteren Aufarbeitungsschritte im Dunkeln durchgeführt werden. Nach dieser Zeit wurden die Zellen zelltypspezifisch geerntet und in ein auf Eiswasser gelagertes 15-ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Dies ist notwendig, um eine weitere Reaktion zu unterbinden. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (1.000 rpm, 5 min, 4 °C), bevor der Überstand bis auf 100 µl verworfen wurde. Das Zellpellet wurde in diesen 100 µl resuspendiert, bevor 10 µl dieser neuen Zellsuspension auf einen Objektträger überführt und mit einem 21x26 mm Deckglas eingedeckt wurden. Die mikroskopische Auswertung fand direkt im Anschluss an die Färbung statt, indem mit einer 400-fachen Vergrößerung unter Verwendung eines FITC-Filters (Nikon GmbH; Düsseldorf, DE) des Fluoreszenzmikroskops Eclipse 55i (Nikon GmbH; Düsseldorf, DE), einer Fluoro Pro MP 5000 Kamera (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, DE) und des Programms QCapture Pro 5.0.1.26 (QImaging; Surrey, British Columbia, Canada) zügig

so viele Aufnahmen gemacht wurden, dass pro Probe 200 Zellen ausgewertet werden konnten. Als PK wurden die Zellen 10 min vor der Zugabe der DHE-Lösung mit 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  behandelt. Diese Bilder wurden anschließend unter Verwendung des Programms Image J 1.46r (<http://rsbweb.nih.gov/ij>) in die einzelnen Farbkanäle getrennt, wobei für die Unterscheidung der Leuchtintensität lediglich der rote Kanal betrachtet wurde. Für die qualitative Auswertung wurden pro Probe 200 Zellen ausgewertet und hinsichtlich ihrer Leuchtkraft verglichen.

### **3.5.16 Statistische Datenauswertung**

Da alle Experimente, falls nicht anders vermerkt, als drei voneinander unabhängige Proben ( $n=3$ ) durchgeführt wurden, wurde bei der statistischen Bewertung zunächst eine Kontrolle auf die Normalverteilung durchgeführt. Um Verzerrungen der Datensätze zu vermeiden, wurden lediglich die Versuchsergebnisse verwendet, welche der Normalverteilung entsprachen. Die Ergebnisse wurden dabei stets mit Angabe der Standardabweichung (SD, standard deviation) dargestellt. Wurden die Versuchsergebnisse normiert dargestellt, so wurde auf den Mittelwert der NK oder PK bezogen. Anschließend wurden alle Probenergebnisse hinsichtlich ihrer Signifikanz mittels des Mann-Whitney U-Test verglichen. Je nach Behandlung wurde entweder mit der NK oder der PK des jeweiligen Versuches verglichen. Dabei wurde eine Signifikanz erreicht, wenn das Signifikanzniveau  $p \leq 0,05$  war. Die statistische Analyse wurde mit dem Softwareprogramm IBM SPSS 24 (IBM; Armonk, New York, USA) durchgeführt.

## 4 ERGEBNISSE

Um den Einfluss der Sensitivität von Zellen mit unterschiedlichen Differenzierungsstadien hinsichtlich der Reaktion auf genotoxische Agenzien zu untersuchen, wurden sowohl hämatopoetische Stammzellen (HSZ), als auch immortalisierte, nicht aus Tumorgewebe etablierte Zellen und Tumorzellen verwendet. Die Zellen wurden hinsichtlich ihrer DNS-Menge, DNS-Kondensationsdichte und ihres Differenzierungszustandes untersucht. Die durchgeführten Versuche gaben zudem Aufschluss über die Vitalität, Proliferation, Mitose und Apoptose der Zellen, die Mikrokernentstehung und Entstehung von reaktiver Sauerstoffspezies nach Substanzbehandlung. Außerdem wurden Untersuchungen des daraus resultierenden DNS-Schadens, als auch der Schadensreparatur nach Behandlung mit Agenzien vorgenommen. Die Versuche wurden, falls nicht explizit deklariert, als Triplikate durchgeführt, wobei stets der Mittelwert mit der resultierenden Standardabweichung dargestellt wurde. Zunächst wurden die Ergebnisse zwischen humanen hämatopoetischen Stammzellen und humanen B-lymphoblastoiden TK6-Zellen verglichen und werden im Folgenden dargestellt.

### 4.1 Hämatopoetische Stammzellen im Vergleich zu TK6-Zellen

Mit den nachfolgend beschriebenen Untersuchungen wurden vergleichende Sensitivitätsuntersuchungen zwischen hämatopoetischen Stammzellen, welche aus humanem Nabelschnurblut gewonnen wurden, und der immortalisierten humanen B-lymphoblastoiden Zelllinie TK6 durchgeführt. Der Proteingehalt der Wachstumsmedien der Zellen, welche in dieser Arbeit verwendet wurden, lag nach photometrischer Bestimmung bei 1,7-3 mg/ml. Somit wurde nach Durchführung dieser Vorversuche dem Stammzellmedium 2 mg/ml humanes Serumalbumin zugeführt, um äquivalente Zellumgebungen zwischen allen verwendeten Zellen sicherzustellen. Die Ergebnisse dieses Vorversuches können Abbildung A1 entnommen werden, welche sich im Anhang dieser Arbeit befindet.

Die multipotenten HSZ befinden sich in der Zellhierarchie deutlich vor den differenzierten TK6-Zellen, sodass ein Vergleich zwischen den beiden Zellsorten einen ersten Einblick über die Sensitivität nach Substanzbehandlung zwischen Zellen verschiedener Differenzierungsstadien ermöglicht.

#### **4.1.1 Vitalität**

Mit Hilfe des Vitalitätstests wurden die Zellen hinsichtlich der Zytotoxizität nach 4-stündiger Substanzbehandlung betrachtet. Für die Vitalitätsuntersuchungen wurden sowohl die HSZ, als auch die TK6-Zellen zunächst mit Doxorubicin, Mitomycin C (MMC), Methylmethansulfonat (MMS) oder Vinblastin (VBL) behandelt. Nach 4 h wurde das im Medium befindliche Agens durch Zentrifugation entfernt, bevor die Zellen erneut für 20 h Nachinkubation in frischem Medium, welches CytoB enthielt, inkubiert wurden. Nach dieser Zeit wurden die Zellen geerntet und der Vitalitätstest durchgeführt, welcher der in Kapitel 3.5.9 beschriebenen Methode entnommen werden kann. Die Zytotoxizitätsergebnisse nach Substanzbehandlung für die HSZ und die TK6-Zellen sind in Tabelle 4 ersichtlich.

Tabelle 4: Zytotoxizitätsergebnisse nach Substanzbehandlung der HSZ und der TK6-Zellen;  
 \*  $p \leq 0,05$ , ° = Mittelwert aus 2 unabhängigen Proben

Substanz	Konzentration	HSZ	TK6
		Vitalität [%]	Vitalität [%]
<i>Kontrolle</i>	-	67,00 ± 6,56	90,00 ± 0,50
<i>Doxorubicin</i>	5 nM	71,00 ± 5,50	81,50 ± 11,36
	20 nM	63,33 ± 12,34	91,67 ± 2,56
	50 nM	66,83 ± 3,17	86,50 * ± 1,50
	200 nM	59,75 ± 7,12	80,00 * ± 0,50
	500 nM	52,58 ± 10,66	54,17 * ± 0,76
<i>Kontrolle</i>	-	67,83 ± 8,74	92,00 ± 1,00
<i>Vinblastin</i>	10 nM	60,67 ± 8,02	83,50 * ± 1,00
	20 nM	66,50 ± 7,40	79,00 * ± 7,40
	100 nM	60,08 ± 10,16	76,17 * ± 2,47
	150 nM	60,17 ± 5,96	72,33 * ± 5,13
	200 nM	58,92 ± 7,73	71,83 * ± 6,25
<i>Kontrolle</i>	-	70,67 ± 10,91	95,00 ± 3,50
<i>Methylmethansulfonat</i>	10 µM	72,67 ± 7,49	91,83 ± 6,53
	100 µM	61,33 ± 2,52	92,00 ± 3,60
	250 µM	67,67 ± 11,18	76,50 * ± 11,63
	375 µM	42,17 * ± 10,52	66,33 * ± 0,76
	500 µM	39,50 * ± 11,69	52,33 * ± 2,08
	1.000 µM	25,50 ° ± 0,71	26,00 * ± 2,00
<i>Kontrolle</i>	-	71,00 ± 3,97	91,50 ± 6,14
<i>Mitomycin C</i>	0,01 µM	52,17 ± 23,88	95,17 ± 0,76
	0,1 µM	68,83 ± 12,25	93,33 ± 2,25
	0,5 µM	61,67 ± 4,19	93,67 ± 2,47
	1 µM	52,00 * ± 15,21	91,17 ± 3,33
	10 µM	21,50 * ± 1,32	70,00 * ± 1,00
	100 µM	6,75 ° ± 5,30	43,00 * ± 4,58

Nach 4-stündiger Behandlung mit Doxorubicin ist mit steigender Substanzkonzentration bei den HSZ eine Abnahme der Vitalität erkennbar, allerdings war sie im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle nicht signifikant. Im Gegensatz dazu ist bei den TK6-Zellen bereits bei einer Konzentration von 50 nM Doxorubicin eine signifikante Abnahme (\*  $p \leq 0,05$ ) der prozentualen Vitalität ersichtlich. Auch nach Inkubation der Zellen mit Vinblastin (VBL) nahm lediglich bei der immortalisierten Zelllinie TK6 die Vitalität signifikant ab. Dies war bereits ab einer Konzentration von 10 nM VBL mikroskopisch detektierbar. Bei den HSZ kam es ebenfalls zu einem Absinken der Vitalität, allerdings war es nach Behandlung mit VBL nicht signifikant im Vergleich zur Negativkontrolle. Nach Behandlung mit Methylmethansulfonat (MMS) wurde eine signifikante Abnahme der Vitalität nachgewiesen. Unter der Substanzkonzentration von 375  $\mu\text{M}$  und 500  $\mu\text{M}$  MMS nahm die Vitalität signifikant zur entsprechenden Kontrolle ab. Auch bei 1.000  $\mu\text{M}$  MMS war eine Vitalitätsabnahme ersichtlich, allerdings wurden bei den HSZ nur zwei Probenansätze vermessen, sodass eine statistische Auswertung der Vitalität nach Behandlung mit 1.000  $\mu\text{M}$  MMS im Vergleich zur Kontrolle nicht möglich war. Der größte Effekt bei der Behandlung der HSZ konnte mit Mitomycin C (MMC) erzielt werden. Die Zytotoxizität ging deutlich mit ansteigender Substanzkonzentration einher. Somit konnte bereits bei 1  $\mu\text{M}$  MMC eine signifikante Vitalitätsabnahme der HSZ nach 4 h Substanzbehandlung und 20-stündiger Nachinkubation detektiert werden. Auch bei 100  $\mu\text{M}$  MMC war dies erkennbar, da allerdings auch hier lediglich zwei unabhängige Replikate untersucht wurden, konnte keine statistische Auswertung durchgeführt werden. Bei der Zelllinie TK6 wurde eine statistisch signifikante Abnahme erst bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  MMC erzielt, was eine Potenz höher im Vergleich zu den Versuchsdaten nach Behandlung der HSZ war.

#### **4.1.2 Proliferation**

Um eine vergleichende Bewertung der Proliferation zwischen den HSZ und den TK6-Zellen zu gewährleisten, wurde die Proliferation mittels des Cytochalasin B-Proliferationsindex (CBPI) bestimmt. Hierfür wurden die Zellen nach 4-stündiger Substanzbehandlung durch Zentrifugation vom Agens befreit und für weitere 20 h in frischem Medium, welches CytoB enthielt, behandelt. Anschließend wurden die Zellen, wie in Kapitel 3.5.10 beschrieben, aufgearbeitet, auf Objektträgern fixiert und gefärbt, sodass eine mikroskopische Detektion der Zellpopulation stattfinden und der CBPI berechnet werden konnte. Lag der berechnete CBPI knapp über 1, so hatten die Zellen kaum proliferiert, wohingegen ein Wert von ca. 2

eine Population widerspiegelt, welche weitestgehend eine Mitose durchlaufen hatte. War der Wert  $> 2$ , so hatten die Zellen im Durchschnitt mehr als eine Zellteilung durchlaufen. In den Abbildungen 8 - 11 sind die vergleichenden Zellproliferationen mit jeweils ansteigenden Substanzkonzentrationen dargestellt. Die schwarzen Balken stellen stets die Ergebnisse der HSZ und die grauen Balken die Ergebnisse der TK6-Zellen dar. In Abbildung 8 sind die Ergebnisse nach Doxorubicinbehandlung dargestellt.

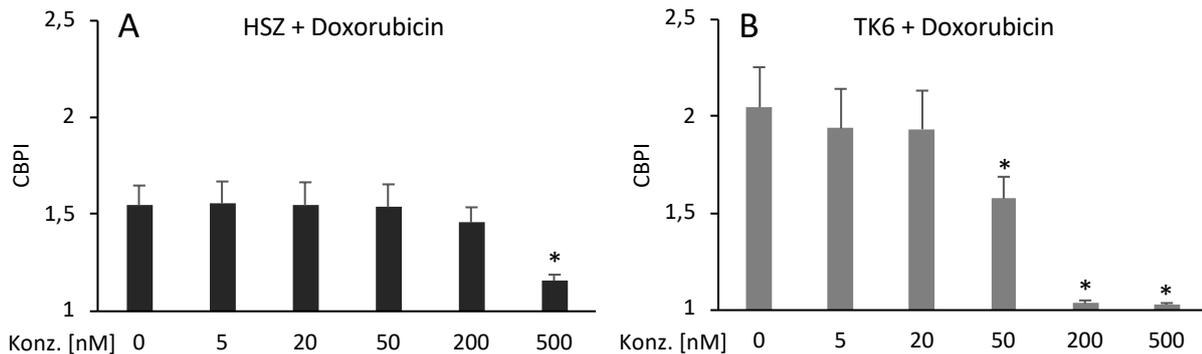


Abbildung 8: Ergebnisse der Proliferation hämatopoetischer Stammzellen (A = HSZ) und TK6-Zellen (B = TK6) nach Behandlung mit Doxorubicin (4 h) und Nachbehandlung mit Cytochalasin B (20 h). Auftragung des Cytochalasin B-Proliferationsindizes (CBPI) gegen eine ansteigende Konzentration (Konz.) an Doxorubicin; \*  $p \leq 0,05$ .

Bei den HSZ war eine signifikante Abnahme der Proliferation bei einer Konzentration von 500 nM Doxorubicin ersichtlich, wobei sich die Proliferation der Negativkontrolle der HSZ bei einem Wert von ca. 1,6 befand. Bei der Zelllinie TK6 befand sich der CBPI-Wert der Kontrolle bei ca. 2,1, was eine Proliferation widerspiegelt, bei der die Zellpopulation mindestens eine Mitose durchlaufen hat. Die Unterschiede zwischen den Proliferationen der jeweiligen Kontrollen (HSZ und TK6) konnte bei allen nachfolgenden Darstellungen festgestellt werden, was darauf hinweist, dass die Proliferation der HSZ im Vergleich zu den TK6-Zellen geringer ausfiel. Bei den TK6-Zellen war ein signifikanter Abfall der Proliferation bereits bei einer Konzentration von 50 nM Doxorubicin zu sehen. Bei den Konzentrationen 200 nM und 500 nM Doxorubicin haben kaum noch Zellen proliferiert, sodass der CBPI-Wert bei knapp über 1 lag. In Abbildung 9 sind die Ergebnisse nach Behandlung mit VBL dargestellt.

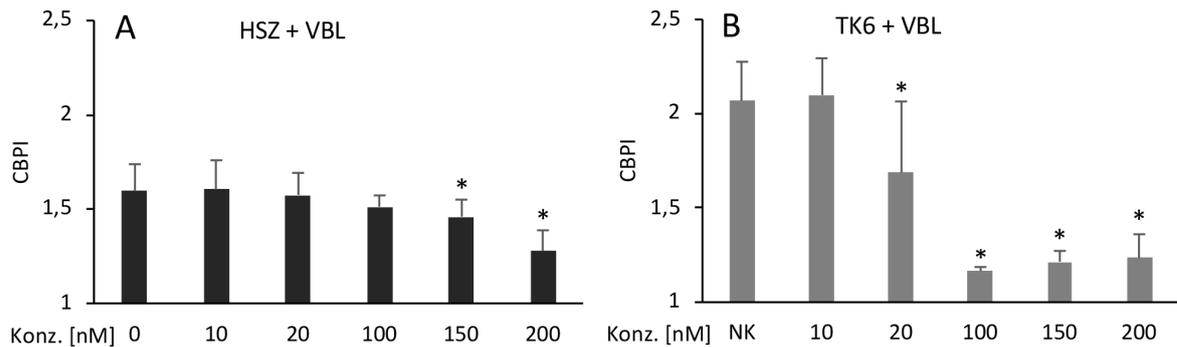


Abbildung 9: Ergebnisse der Proliferation hämatopoetischer Stammzellen (A) und TK6-Zellen (B) nach Behandlung mit Vinblastin (VBL, 4 h) und Nachbehandlung mit Cytochalasin B (20 h). Auftragung des Cytochalasin B-Proliferationsindizes (CBPI) gegen eine ansteigende Konzentration (Konz.) an VBL; \*  $p \leq 0,05$ .

Bei den HSZ war mit ansteigender Konzentration eine Abnahme der Proliferation zu erkennen, welche bei den Konzentrationen von 150 nM und 200 nM VBL signifikant war. So konnte auch bei den TK6-Zellen eine Proliferationsminderung festgestellt werden, welche in den Konzentrationsbereichen oberhalb von 20 nM VBL signifikant ausfiel. Abbildung 10 stellt die Proliferationen innerhalb verschiedener Zellpopulationen (HSZ und TK6-Zellen) nach 4-stündiger Inkubation mit Methylmethansulfonat (MMS) und einer 20-stündigen Nachinkubation mit CytoB dar.

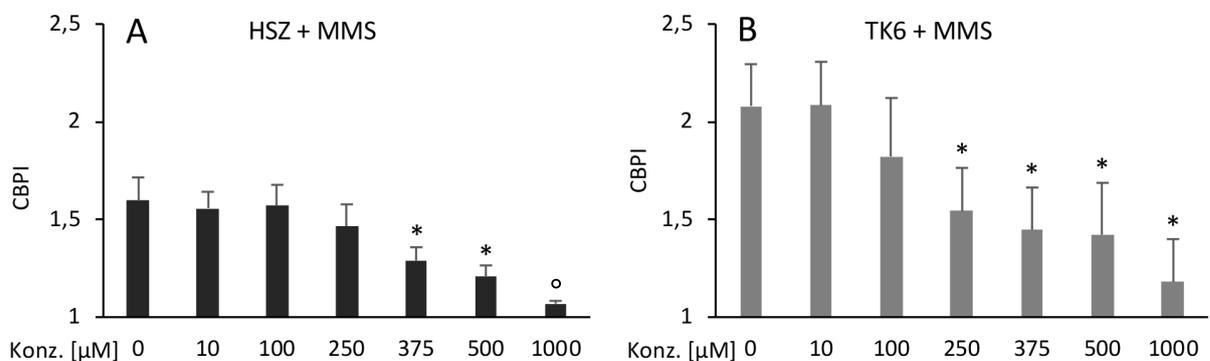


Abbildung 10: Ergebnisse der Proliferation hämatopoetischer Stammzellen (A) und TK6-Zellen (B) nach Behandlung mit Methylmethansulfonat (MMS, 4 h) und Nachbehandlung mit Cytochalasin B (20 h). Auftragung des Cytochalasin B-Proliferationsindizes (CBPI) gegen eine ansteigende Konzentration (Konz.) an MMS; \*  $p \leq 0,05$ , <sup>o</sup> = Mittelwert aus 2 unabhängigen Proben.

In Abbildung 10 war bei beiden Zellsystemen eine deutliche Abnahme der Proliferation mit steigender Konzentration an MMS erkennbar, welche bei den HSZ oberhalb von 375 µM MMS signifikant war. Der Proliferationsabfall nach 4-stündiger Behandlung mit 1.000 µM MMS konnte nicht als signifikante Proliferationsabnahme erachtet werden, da sich der Mittelwert aus lediglich 2 Probenergebnissen ergab. Bei dieser Konzentration konnte bei den HSZ

allerdings eine fast komplette Stagnation der Proliferation erzielt werden, da der CBPI fast den Wert 1 erreicht hat. Auch bei den TK6-Zellen konnte eine Proliferationsabnahme festgestellt werden, welche in den Konzentrationsbereichen zwischen 250  $\mu\text{M}$  und 1.000  $\mu\text{M}$  MMS signifikant im Bezug zur Negativkontrolle war. Ein Vergleich hinsichtlich der Proliferation zwischen HSZ und TK6-Zellen nach Mitomycin C-Behandlung können Abbildung 11 entnommen werden.

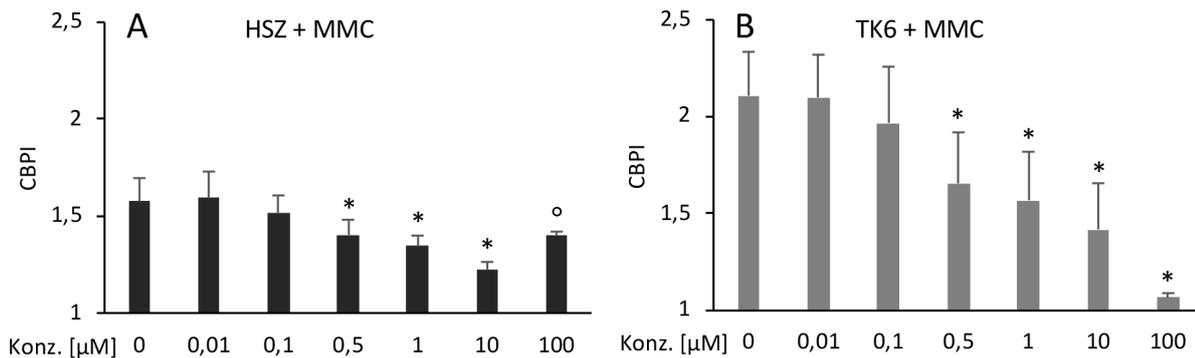


Abbildung 11: Ergebnisse der Proliferation hämatopoetischer Stammzellen (A) und TK6-Zellen (B) nach Behandlung mit Mitomycin C (MMC, 4 h) und Nachbehandlung mit Cytochalasin B (20 h). Auftragung des Cytochalasin B-Proliferationsindizes (CBPI) gegen eine ansteigende Konzentration (Konz.) an MMC; \*  $p \leq 0,05$ , ° = Mittelwert aus 2 unabhängigen Proben.

Die Ergebnisse der Proliferation nach Behandlung mit Mitomycin C (MMC) sind zwischen den HSZ und den TK6-Zellen ähnlich. So konnte sowohl bei den HSZ, als auch bei der humanen B-lymphoblastoiden Zelllinie TK6 eine signifikant verminderte Proliferation oberhalb einer Konzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  MMC festgestellt werden, welche lediglich bei 100  $\mu\text{M}$  MMC bei den HSZ nicht zutraf, da hier nur zwei verschiedene Proben untersucht wurden.

#### 4.1.3 Apoptose

Zur Beurteilung der apoptotischen Wirkung der verwendeten Agentien auf HSZ und TK6-Zellen wurden die Zellen für 4 h mit der entsprechenden Substanz inkubiert, bevor das Medium, welche die Substanz enthielt, durch Zentrifugation entfernt wurde. Anschließend wurden sowohl die HSZ, als auch die Zellen der Zelllinie TK6 mit frischem Medium und Zugabe von CytoB für weitere 20 h inkubiert. Die Zellen wurden im Anschluss, wie unter Mikrokerntest in Absatz 3.5.10 beschrieben, auf Objektträger aufgebracht, fixiert und angefärbt. Dann wurde die jeweilige Zellpopulation hinsichtlich ihrer Morphologie fluoreszenzmikroskopisch untersucht, wobei Zellen, welche apoptotische Körperchen mit kondensierter DNS enthalten und weder einkernige (EK), doppelkernige (DK), mehrkernige (MeK) oder mitotische Zellen

waren, als Apoptosen deklariert wurden. Es wurde stets der Anteil an Apoptosen innerhalb von 2x 1.000 Zellen pro Konzentration und Versuch gemittelt. Jeder Versuch wurde als Triplikat durchgeführt, sodass die dargestellten Ergebnisse, falls nicht anders deklariert, als Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung dargestellt wurden. Die schwarzen Balken in den Abbildungen 12 - 15 stellen die Apoptose-Ergebnisse der HSZ und die grauen Balken die Ergebnisse der TK6-Zellen dar. In Abbildung 12 sind die Ergebnisse nach Behandlung mit Doxorubicin ersichtlich.

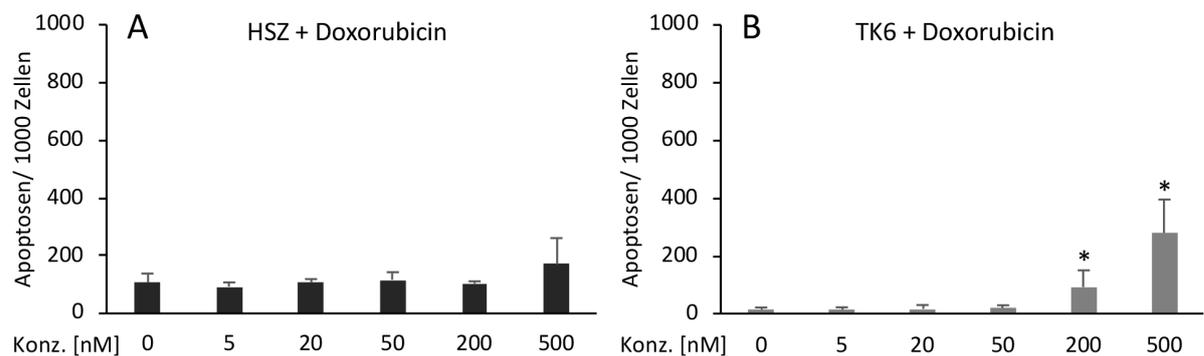


Abbildung 12: Ergebnisse der mikroskopischen Apoptosedetektion hämatopoetischer Stammzellen (A) und TK6-Zellen (B) nach Behandlung mit Doxorubicin (4 h) und Nachbehandlung mit Cytochalasin B (20 h). Auftragung des Anteils an apoptotischen Zellen innerhalb von 1.000 Zellen gegen eine ansteigende Konzentration (Konz.) an Doxorubicin; \*  $p \leq 0,05$ .

Bis zu einer Konzentration von 50 nM Doxorubicin wurde bei der Zelllinie TK6 kein signifikanter Anstieg an apoptotischen Zellen festgestellt. Ab einer Konzentration von 200 nM Doxorubicin war eine signifikante Erhöhung der Apoptosen innerhalb der TK6-Zellpopulation ersichtlich. Bei den HSZ war mit steigender Substanzkonzentration bis zu einer Dosis von 500 nM Doxorubicin keine signifikante Erhöhung apoptotischer Zellen pro 1.000 Zellen erkennbar. Hingegen nach Behandlung der HSZ mit VBL konnte ein signifikanter Anstieg gezeigt werden, welcher in Abbildung 13 (A) erkennbar ist.

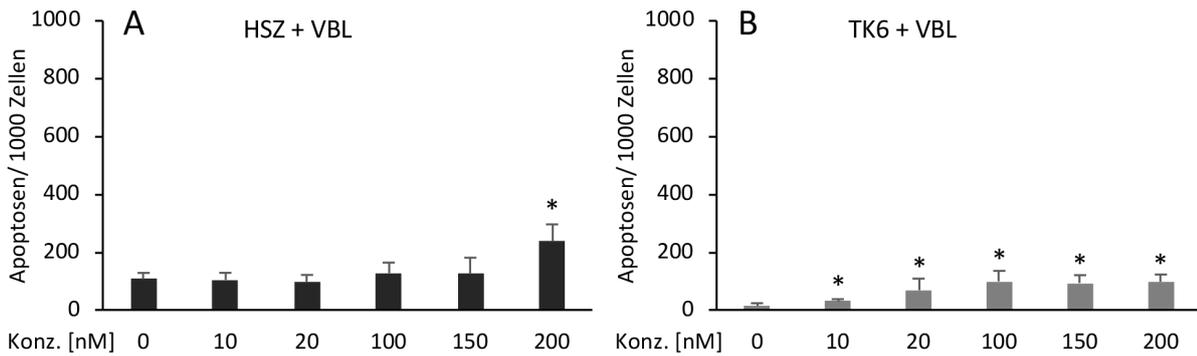


Abbildung 13: Ergebnisse der mikroskopischen Apoptosedetektion hämatopoetischer Stammzellen (A) und TK6-Zellen (B) nach Behandlung mit Vinblastin (VBL, 4 h) und Nachbehandlung mit Cytochalasin B (20 h). Auftragung des Anteils an apoptotischen Zellen innerhalb von 1.000 Zellen gegen eine ansteigende Konzentration (Konz.) an VBL; \*  $p \leq 0,05$ .

Nach Behandlung mit 200 nM VBL konnte im Vergleich zur Kontrolle ein signifikante Erhöhung apoptotischer Stammzellen festgestellt werden. Bei der humanen B-lymphoblastoiden Zelllinie TK6 konnte dies bei allen Konzentrationen oberhalb von 10 nM VBL gezeigt werden. Somit konnte eine 20-fach höhere Sensitivität der TK6-Zellen gegenüber dem spindelstörenden Agens Vinblastin im Vergleich zu den hämatopoetischen Stammzellen festgestellt werden. In Abbildung 14 können die Daten der Apoptosedetektion nach Behandlung mit MMS entnommen werden.

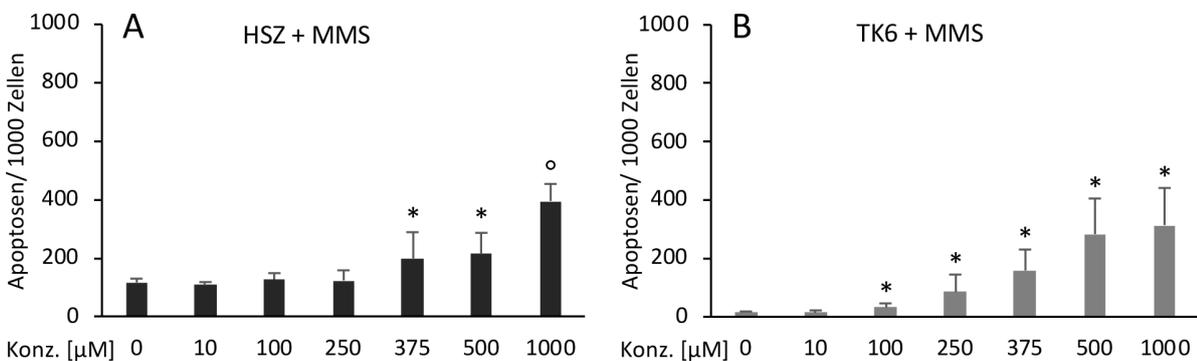


Abbildung 14: Ergebnisse der mikroskopischen Apoptosedetektion hämatopoetischer Stammzellen (A) und TK6-Zellen (B) nach Behandlung mit Methylnmethansulfonat (MMS, 4 h) und Nachbehandlung mit Cytochalasin B (20 h). Auftragung des Anteils an apoptotischen Zellen innerhalb von 1.000 Zellen gegen eine ansteigende Konzentration (Konz.) an MMS; \*  $p \leq 0,05$ , ° = Mittelwert aus 2 unabhängigen Proben.

Bis zu einer Konzentration von 250 µM MMS konnten für die HSZ keine signifikanten Apoptosezahlen detektiert werden, welche sich aber ab einer Konzentration von 375 µM MMS zeigten. Nach Inkubation der HSZ mit 1.000 µM MMS trat ein noch höherer Anstieg an apoptotischen Zellen auf. Diese Daten können allerdings nicht als signifikant betrachtet

werden, da sie lediglich aus zwei unabhängigen Versuchen stammen. Bei der Behandlung der TK6-Zellen konnte ein Effekt allerdings bereits bei 100  $\mu\text{M}$  MMS festgestellt werden, welcher bis zur höchsten untersuchten Konzentration von 1.000  $\mu\text{M}$  MMS weiter anstieg. Somit wiesen die TK6-Zellen im Vergleich zu den hämatopoetischen Stammzellen eine höhere Inzidenz an apoptotischen Zellen nach Behandlung mit Methylmethansulfonat auf. In Abbildung 15 wurden allerdings ähnliche Effekte nach Behandlung mit Mitomycin C (MMC) aufgezeigt.

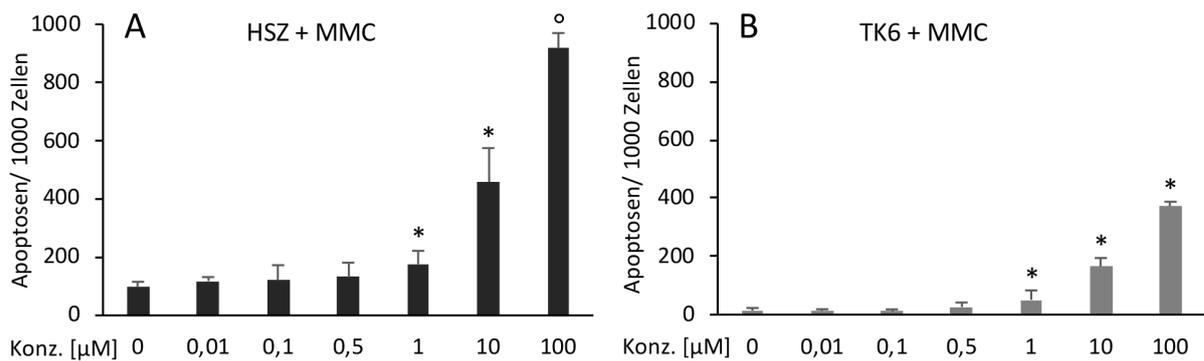


Abbildung 15: Ergebnisse der mikroskopischen Apoptosedetektion hämatopoetischer Stammzellen (A) und TK6-Zellen (B) nach Behandlung mit Mitomycin C (MMC, 4 h) und Nachbehandlung mit Cytochalasin B (20 h). Auftragung des Anteils an apoptotischen Zellen innerhalb von 1.000 Zellen gegen eine ansteigende Konzentration (Konz.) an MMC; \*  $p \leq 0,05$ , ° = Mittelwert aus 2 unabhängigen Proben.

Sowohl bei den HSZ, als auch bei den TK6-Zellen waren vergleichbare signifikante Anstiege an Apoptosen innerhalb der Zellpopulationen nach Behandlung oberhalb von 1  $\mu\text{M}$  MMC erkennbar. Diese konnten konzentrationsabhängig bis zur maximal untersuchten Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  MMC gesteigert werden. Obwohl bei den HSZ lediglich zwei unabhängige Proben untersucht wurden, und somit eine statistische Auswertung für diese hohe Konzentration nicht möglich war, lag die Apoptoserate bei den HSZ bei ca. 90 %. Der Faktor zwischen den HSZ und den TK6-Zellen lag hinsichtlich der Betrachtung der effektiven Dosis für Apoptoseinduktion nach MMC-Behandlung bei einem Wert von 1.

#### 4.1.4 Mitose

Neben Ergebnissen zur Vitalität, Proliferation und Apoptose, wurden auch Daten zu Mitosezahlen generiert. Die Zellen (HSZ, TK6) wurden jeweils für 4 h mit den entsprechenden Substanzen behandelt, bevor das Medium und die darin enthaltenen Substanzen mittels Zentrifugation entfernt wurden. Nach Resuspendierung des Zellpellets in frischem Medium, welches CytoB enthielt, wurden die Zellen erneut für 20 h inkubiert, bevor sie geerntet

wurden. Die Auswertung der Mitosedaten aus den durchgeführten Versuchen verlief entsprechend der Beschreibung in Kapitel 3.5.10. Es wurden mitotische Zellen fluoreszenzmikroskopisch detektiert, sodass eine Auftragung des Anteils der Zellen, welche sich in einer der Mitosephasen befanden, innerhalb von 2x 1.000 Zellen in den Abbildungen 16 - 19 dargestellt werden konnten. Es war zudem bei allen Negativkontrollen ersichtlich, dass die Mitosezahlen bei den HSZ im Vergleich zu den TK6-Zellen nur in etwa halb so hohe Werte einnahmen. Abbildung 16 stellt grafisch den Anteil der Zellen dar, welche morphologisch als Mitosen quantifiziert wurden.

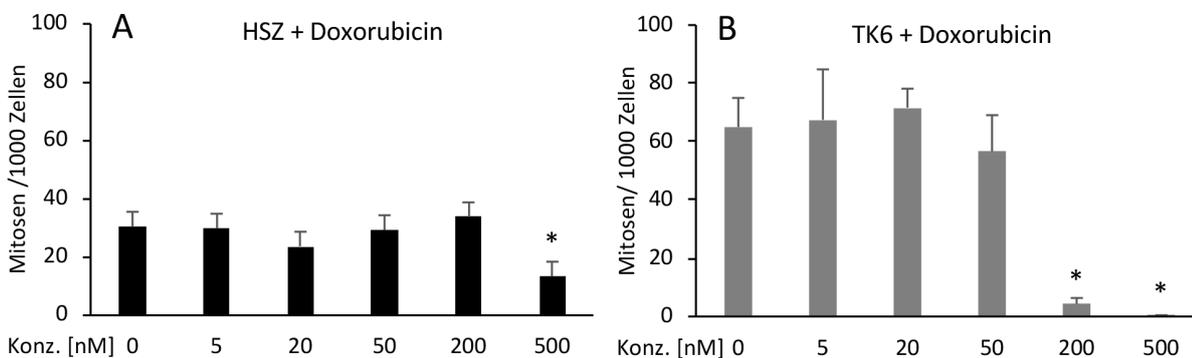


Abbildung 16: Ergebnisse der mikroskopischen Mitosedetektion hämatopoetischer Stammzellen (A) und TK6-Zellen (B) nach Behandlung mit Doxorubicin (4 h) und Nachbehandlung mit Cytochalasin B (20 h). Auftragung des Anteils an mitotischen Zellen innerhalb von 1.000 Zellen gegen eine ansteigende Konzentration (Konz.) an Doxorubicin; \*  $p \leq 0,05$ .

Sowohl bei den HSZ, als auch bei den TK6-Zellen kam es zum Abfall des Anteils an mitotischen Zellen nach Behandlung mit Doxorubicin. Bei der Zelllinie TK6 war dies bei Konzentrationen oberhalb von 200 nM Doxorubicin der Fall. Somit sank die Anzahl an Mitosen pro 1.000 TK6-Zellen von ca. 60-80 mitotische Zellen auf unter 10 Mitosen/ 1.000 Zellen. Ein signifikanter Abfall an sich teilenden Zellen war auch bei den HSZ zu erkennen, allerdings erst bei einer Konzentration von 500 nM Doxorubicin, bei der sich die Anzahl an Mitosen im Vergleich zur Kontrolle halbiert hat.

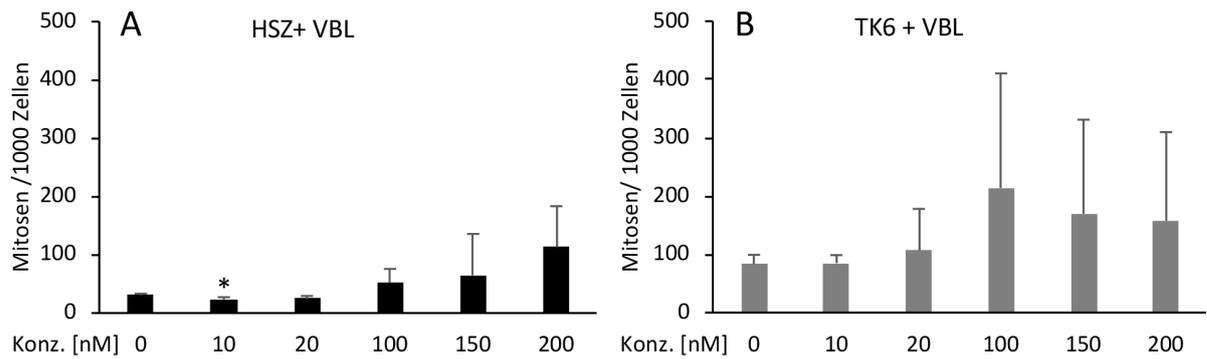


Abbildung 17: Ergebnisse der mikroskopischen Mitosedetektion hämatopoetischer Stammzellen (A) und TK6-Zellen (B) nach Behandlung mit Vinblastin (VBL, 4 h) und Nachbehandlung mit Cytochalasin B (20 h). Auftragung des Anteils an mitotischen Zellen innerhalb von 1.000 Zellen gegen eine ansteigende Konzentration (Konz.) an VBL; \*  $p \leq 0,05$ .

Das spindelstörende Agens Vinblastin (VBL) wechselwirkt mit dem Tubulin der Mikrotubuli, welche maßgeblich an der Zellteilung beteiligt sind. Deswegen konnte Vinblastin sowohl bei den humanen HSZ, als auch bei der humanen B-lymphoblastoiden Zelllinie TK6 zu einer Verdopplung der mitotischen Zellen führen, was aber weder für die HSZ, noch für die TK6-Zellen signifikant war. Nach Behandlung mit 10 nM VBL kam es zu einem signifikanten Abfall der Mitosen bei den HSZ. Methylmethansulfonat (MMS), welches keine Interaktion mit Tubulin eingeht, konnte zu einer Abnahme der Mitosezahlen führen, was in Abbildung 18 ersichtlich ist.

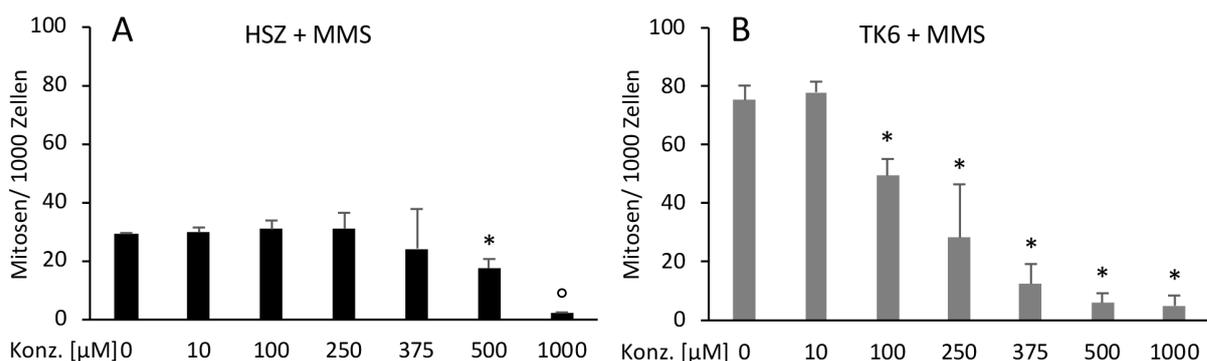


Abbildung 18: Ergebnisse der mikroskopischen Mitosedetektion hämatopoetischer Stammzellen (A) und TK6-Zellen (B) nach Behandlung mit Methylmethansulfonat (MMS, 4 h) und Nachbehandlung mit Cytochalasin B (20 h). Auftragung des Anteils an mitotischen Zellen innerhalb von 1.000 Zellen gegen eine ansteigende Konzentration (Konz.) an MMS; \*  $p \leq 0,05$ , ° = Mittelwert aus 2 unabhängigen Proben.

Nach der 4-stündigen Behandlung mit MMS erfolgte eine signifikante Abnahme des Anteils an Zellen, welche die Mitose erreichten. Somit wurde bei den TK6-Zellen bereits eine Abnahme oberhalb von 100 µM MMS ersichtlich, was besonders bei den Konzentrationen von 500 µM

und 1.000  $\mu\text{M}$  MMS mit einer fast kompletten Verhinderung des Eintritts in die Mitose einherging. Bei den HSZ kam es erst ab einer Konzentration oberhalb von 500  $\mu\text{M}$  MMS zum leichten Abfall mitotischer Zellen, wobei die Daten von 1.000  $\mu\text{M}$  MMS statistisch nicht ausgewertet konnten, da lediglich zwei unabhängige Replikate zur Verfügung standen. Ein leichter Unterschied nach Auswertung der Mitosezahlen war nach Behandlung mit Mitomycin C (Abbildung 19) zu erkennen.

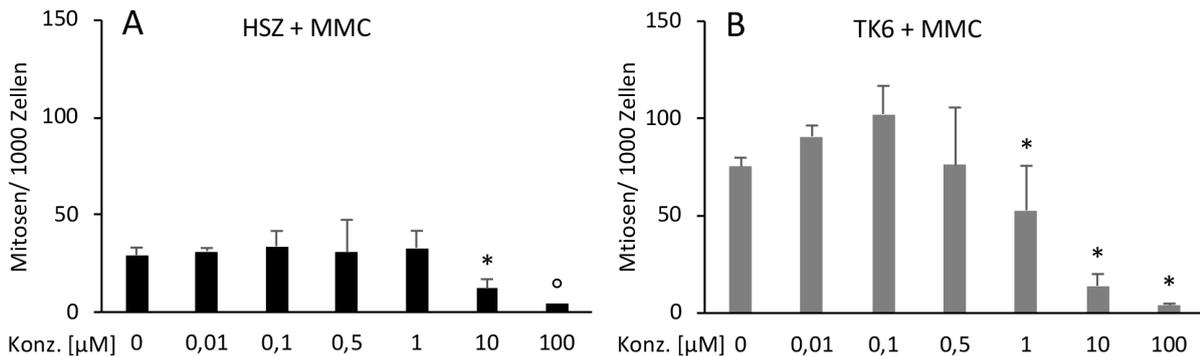


Abbildung 19: Ergebnisse der mikroskopischen Mitosedetektion hämatopoetischer Stammzellen (A) und TK6-Zellen (B) nach Behandlung mit Mitomycin C (MMC, 4 h) und Nachbehandlung mit Cytochalasin B (20 h). Auftragung des Anteils an mitotischen Zellen innerhalb von 1.000 Zellen gegen eine ansteigende Konzentration (Konz.) an MMC; \*  $p \leq 0,05$ , ° = Mittelwert aus 2 unabhängigen Proben.

Sowohl bei den HSZ, als auch bei den TK6-Zellen kam es nach Behandlung mit MMC (4 h) zu einem signifikanten Abfall an Zellen, welche die Mitose erreicht hatten. Bei den TK6-Zellen traf dies bereits bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  MMC, bei den HSZ erst bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  MMC ein. Es konnte zudem eine ähnliche Stagnation unter 100  $\mu\text{M}$  MMC stattfinden, welche bei den HSZ statistisch nicht nachgewiesen werden konnte, da nur zwei Proben zur Verfügung standen.

#### 4.1.5 Mikrokerne

Die Auswertung der Mikrokerndaten erfolgte entsprechend dem beschriebenen Vorgehen in Kapitel 3.5.10. So wurden die HSZ (50.000 Zellen/ 0,5 ml) und die TK6-Zellen (100.000 Zellen/ 1 ml) zunächst für jeweils 4 h mit den genotoxischen Agenzien behandelt. Anschließend wurden die Zellen durch einen Zentrifugationsschritt von den Substanzen befreit und den Zellen für weitere 20 h frisches Medium mit CytoB zur Verfügung gestellt. Nach Aufbringung der Zellen auf einem Objektträger, der Fixierung und der Anfärbung der Zellen wurden diese morphologisch quantifiziert, sodass der Anteil an einkernigen (EK), doppelkernigen (DK), mehrkernigen (MeK), apoptotischen und mitotischen Zellen notiert wurde. Für die

Auswertung der Mikrokernergebnisse wurde der Anteil an mikrokernhaltigen DK-Zellen gezählt, welche einen oder mehrere Mikrokerne (MK) enthielten. Bei allen Proben wurden 2x 1.000 DK-Zellen hinsichtlich der Anwesenheit eines oder mehrerer MK untersucht. Mikrokerne enthalten entweder ganze Chromosomen oder lediglich Chromosomenfragmente, welche nach Ausbildung einer eigenen Kernmembran eindeutig von den Zellkernen unterschieden werden konnten. Die Selektion der DK-Zellen oblag dem Hintergrund, dass so lediglich die Zellen verglichen wurden, welche genau eine Zellteilung durchlaufen hatten. Dies konnte durch die Zugabe von CytoB, welches die Zellteilung, allerdings nicht die Kernteilung inhibierte, gewährleistet werden. Betrachtete man die Frequenz an mikrokernhaltigen DK-Zellen in den jeweiligen Negativkontrollen, so war ersichtlich, dass die HSZ lediglich einen Anteil von in etwa 25 % im Vergleich zu den TK6-Zellen enthielten. In den Abbildungen 20 - 23 sind alle Daten zur Mikrokernentstehung nach Behandlung mit Doxorubicin, Vinblastin (VBL), Methylmethansulfonat (MMS) und Mitomycin C (MMC) zusammengefasst.

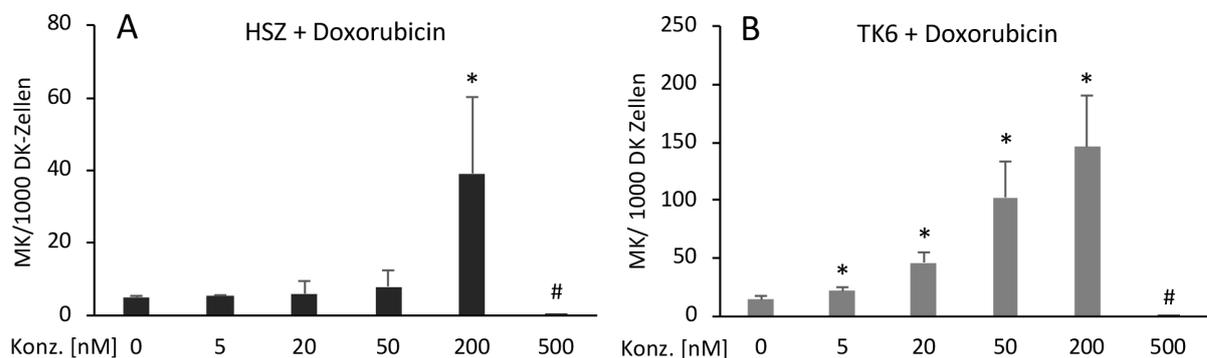


Abbildung 20: Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Detektion von Mikrokernen (MK) in hämatopoetischen Stammzellen (A) und TK6-Zellen (B) nach Behandlung mit Doxorubicin (4 h) und Nachbehandlung mit Cytochalasin B (20 h). Auftragung des Anteils an MK-haltigen Zellen innerhalb 1.000 doppelkerniger (DK) Zellen gegen eine ansteigende Konzentration (Konz.) an Doxorubicin; \*  $p \leq 0,05$ , # = nicht auswertbare Daten, da hohe Substanztoxizität einen zu geringen Anteil an DK-Zellen verursacht.

Doxorubicin führte bei den HSZ zu einer Mikrokerninduktion bei einer Konzentration von 200 nM, während dies bei den TK6-Zellen bereits ab einer Konzentration von 5 nM geschah. Die steigende Doxorubicindosis ging mit einer steigenden Zahl an mikrokern (MK)-haltigen Zellen einher. Die MK-Frequenz bei den TK6-Zellen war mehr als doppelt so hoch im Vergleich zu den HSZ. Die HSZ waren somit um den Faktor 40 weniger empfindlich hinsichtlich der Mikrokernentstehung nach Behandlung mit Doxorubicin. Eine Auswertung der MK-Daten war

ab einer Konzentration von 500 nM Doxorubicin nicht mehr möglich, da die Anzahl an DK-Zellen innerhalb einer Zellpopulation unter ein Niveau von 300 DK-Zellen/ 1.000 Zellen sank.

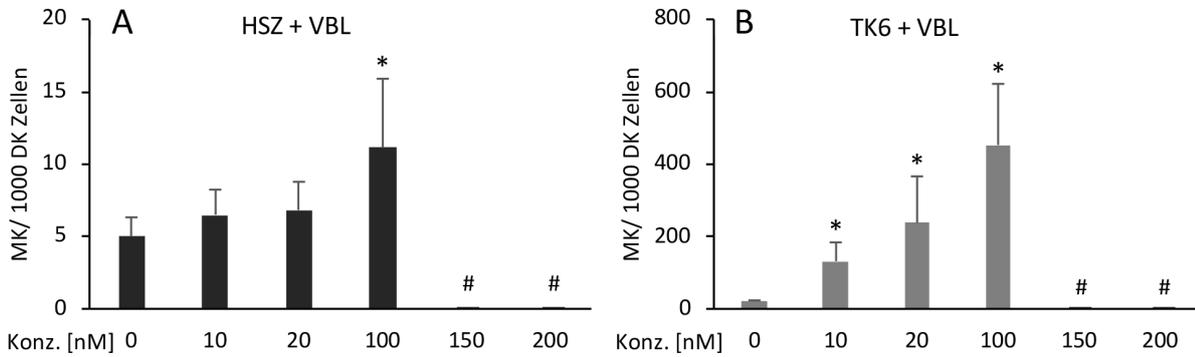


Abbildung 21: Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Detektion von Mikrokernen (MK) in hämatopoetischen Stammzellen (A) und TK6-Zellen (B) nach Behandlung mit Vinblastin (VBL, 4 h) und Nachbehandlung mit Cytochalasin B (20 h). Auftragung des Anteils an MK-haltigen Zellen innerhalb 1.000 doppelkerniger (DK) Zellen gegen eine ansteigende Konzentration (Konz.) an VBL; \*  $p \leq 0,05$ , # = nicht auswertbare Daten, da hohe Substanztoxizität einen zu geringen Anteil an DK-Zellen verursacht.

Das Vinca-Alkaloid Vinblastin verursacht eine erhöhte Frequenz von MK-haltigen DK-HSZ bei 100 nM und ab einer Konzentration von 10 nM von MK-haltigen DK-TK6-Zellen. Somit waren die Stammzellen 10x weniger empfindlich im Vergleich zur Zelllinie TK6. Bei den TK6-Zellen kam es bereits ab der ersten untersuchten Konzentration (10 nM VBL) zu einer signifikanten MK-Induktion, welche mit steigender Konzentration bis zu einer Konzentration von 100 nM VBL immer größer wurde. Oberhalb dieser Konzentration konnte weder bei den TK6-Zellen, noch bei den HSZ eine Auswertung stattfinden, da weniger als 300 DK-Zellen/ 1.000 Zellen vorhanden waren.

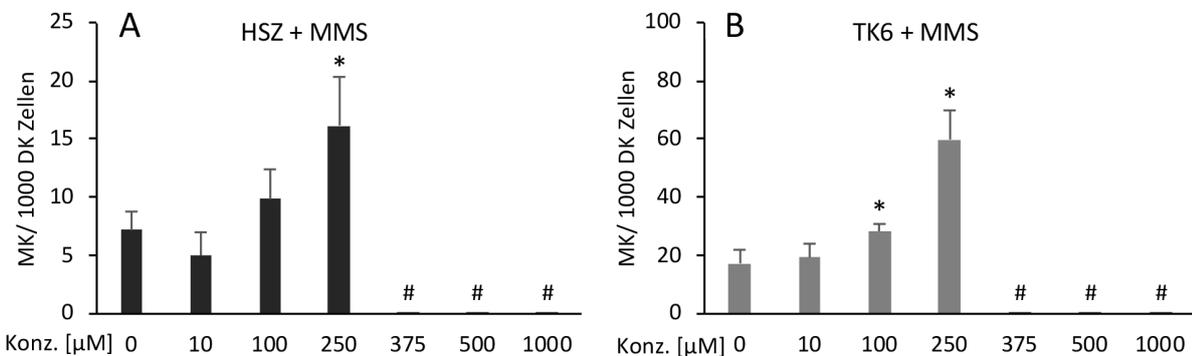


Abbildung 22: Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Detektion von Mikrokernen (MK) in hämatopoetischen Stammzellen (A) und TK6-Zellen (B) nach Behandlung mit Methylmethansulfonat (MMS, 4 h) und Nachbehandlung mit Cytochalasin B (20 h). Auftragung des Anteils an MK-haltigen Zellen innerhalb 1.000 doppelkerniger (DK) Zellen gegen eine ansteigende Konzentration (Konz.) an MMS; \*  $p \leq 0,05$ , # = nicht auswertbare Daten, da hohe Substanztoxizität einen zu geringen Anteil an DK-Zellen verursacht.

Das Alkylanz Methylmethansulfonat (MMS) führte bei den HSZ nach Behandlung mit 250  $\mu\text{M}$  MMS zu einer signifikanten MK-Entstehung. Bei den TK6-Zellen kam es bereits bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  MMS zu MK-haltigen DK-Zellen. Somit waren auch hier die HSZ weniger empfindlich, allerdings mit einem geringeren Faktor von nur noch 2,5 für die Entstehung von MK-haltigen Zellen. Eine Auswertung oberhalb von 250  $\mu\text{M}$  MMS war wegen der geringen Anzahl DK-Zellen für die HSZ und die TK6-Zellen nicht mehr möglich.

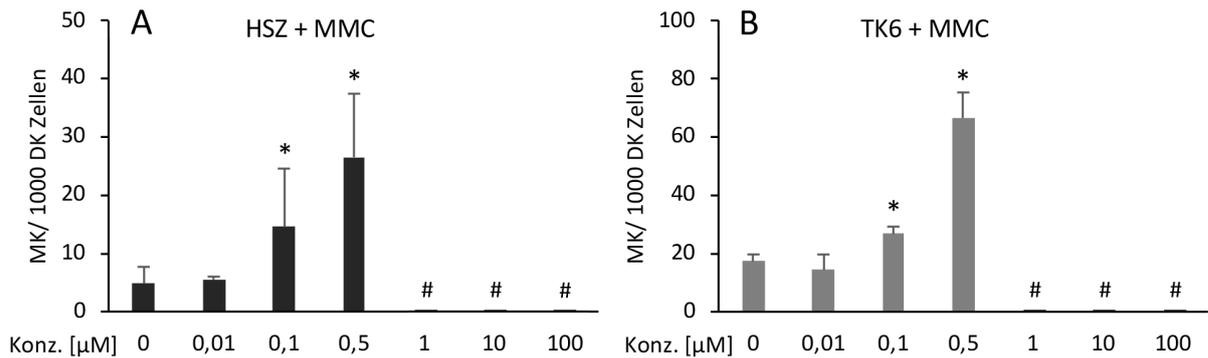


Abbildung 23: Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Detektion von Mikrokernen (MK) in hämatopoetischen Stammzellen (A) und TK6-Zellen (B) nach Behandlung mit Mitomycin C (MMC, 4 h) und Nachbehandlung mit Cytochalasin B (20 h). Auftragung des Anteils an MK-haltigen Zellen innerhalb 1.000 doppelkerniger (DK) Zellen gegen eine ansteigende Konzentration (Konz.) an MMC; \* p  $\leq$  0,05, # = nicht auswertbare Daten, da hohe Substanztoxizität einen zu geringen Anteil an DK-Zellen verursacht.

Der Effekt von Mitomycin C (MMC) auf die beiden Zellsorten war gleich und zeigte somit eine ähnliche Sensitivität unter 0,1  $\mu\text{M}$  MMC. So konnte für die Entstehung von DK-Zellen, welche einen oder mehrere MK enthielten der Faktor 1 für die effektive Dosis an MMC festgelegt werden. Sowohl bei den HSZ, als auch bei den TK6-Zellen war durch den geringen Anteil an DK-Zellen eine Auswertung in den Konzentrationsbereichen oberhalb von 1  $\mu\text{M}$  MMC nicht mehr möglich.

## 4.2 Leukämiezelllinie HL-60

In den vorangegangenen Untersuchungen wurde bisher die Sensitivität hinsichtlich der Agenzien Doxorubicin, Vinblastin, Methylmethansulfonat und Mitomycin C zwischen den humanen hämatopoetischen Stammzellen und der humanen B-lymphoblastoide Zelllinie TK6 untersucht. Da diese Substanzen zur Bekämpfung von Krebserkrankung zum Einsatz kommen, sollte der Effekt auf die humane promyelozytische Leukämiezelllinie HL-60 überprüft werden. Somit wurde im Folgenden im Besonderen auf klassische Vinca-Alkaloide, wie Vinblastin (VBL), Vincristin (VCR), Vinflunin (VFL) und Vinorelbin (VRB), aber auch auf neue bisher kaum

untersuchte von einem Kooperationspartner zur Verfügung gestellte Vinca-Alkaloide, wie 4-Chlorochablastin (4CBL) und 4-Chlorochacristin (4CCR), eingegangen. Zudem wurden erste Untersuchungsergebnisse mit den neu synthetisierten Substanzen 16a,17b und 18a erzielt.

#### 4.2.1 Vitalität

Um die Zytotoxizität der klassischen und neuen Vinca-Alkaloide auf die Zelllinie HL-60 zu untersuchen, wurden die Zellen nach 24-stündiger Substanzbehandlung geerntet und der Vitalitätstest, wie in Kapitel 3.5.9 beschrieben, durchgeführt. Die Zytotoxizitätsergebnisse nach Substanzbehandlung können Tabelle 5 entnommen werden. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchsdurchführungen mit den entsprechenden Standardabweichungen dargestellt.

Tabelle 5: Zytotoxizitätsergebnisse der HL-60-Zellen nach Behandlung mit klassischen und neuen Vinca-Alkaloiden (4CBL, 4CCR); \*  $p \leq 0,05$

Substanz	Konzentration	Vitalität [%]	Substanz	Konzentration	Vitalität [%]
<i>Kontrolle</i>	-	97,83 ± 1,44	<i>Kontrolle</i>	-	97,83 ± 1,44
<i>VBL</i>	1 nM	95,67 ± 1,26	<i>4CBL</i>	1 nM	97,33 ± 1,26
	10 nM	85,17 * ± 5,97		10 nM	97,17 ± 0,76
	100 nM	79,17 * ± 4,75		100 nM	90,83 * ± 1,04
		1.000 nM		78,33 * ± 10,40	
<i>VCR</i>	1 nM	96,50 ± 0,50	<i>4CCR</i>	1 nM	97,00 ± 2,00
	10 nM	84,33 * ± 7,01		10 nM	97,50 ± 0,50
	100 nM	73,50 * ± 8,85		100 nM	95,33 * ± 0,76
		1.000 nM		69,33 * ± 16,78	
<i>VFL</i>	1 nM	96,33 ± 1,89			
	10 nM	98,50 ± 1,00			
	100 nM	84,17 * ± 11,00			
<i>VRB</i>	1 nM	96,67 ± 1,61			
	10 nM	78,00 * ± 13,11			
	100 nM	59,67 * ± 13,88			

Nach Untersuchung der Vitalität nach Behandlung mit den verschiedenen Vinca-Alkaloiden konnte bei allen Substanzen eine Abnahme der Vitalität mit steigender Substanzdosis erzielt werden. Hinsichtlich der Vergleichbarkeit nach Substanzbehandlung mit klassischen und neuen Vinca-Alkaloiden konnte bei den Substanzen VBL, VCR und VRB ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Negativkontrolle bereits ab einer Konzentration von 10 nM nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurde bei dem in der Klinik verwendeten Zytostatikum VFL eine signifikante Abnahme der Vitalität erst bei einer Konzentration von 100 nM detektiert. Im Vergleich dazu war bei den neu synthetisierten Vinca-Alkaloiden 4CBL und 4CCR ein signifikanter Effekt ab einer Konzentration von 100 nM zu sehen, was einer Sensitivität von VFL entsprach. Die zusätzlich untersuchten Substanzen 16a und 17b zeigten trotz eines Testbereiches bis 10.000 nM lediglich eine leichte Abnahme der Vitalität, welche allerdings nicht signifikant war. Die Substanz 18a wies hingegen über den gesamten Testbereich eine signifikante Vitalitätsminderung im Vergleich zur Negativkontrolle auf. Die Untersuchungsergebnisse können Tabelle 6 entnommen werden.

Tabelle 6: Zytotoxizitätsergebnisse der HL-60-Zellen nach Behandlung mit neuen Vinca-Alkaloiden (16a, 17b, 18a); \*  $p \leq 0,05$

Substanz	Konzentration	Vitalität [%]	Substanz	Konzentration	Vitalität [%]
<i>Kontrolle</i>	-	98,50 ± 0,00	<i>Kontrolle</i>	-	98,50 ± 0,00
<i>16a</i>	1 nM	93,67 ± 2,89	<i>18a</i>	1 nM	95,50 * ± 2,18
	10 nM	94,17 ± 4,54		10 nM	93,83 * ± 3,55
	100 nM	97,50 ± 1,32		100 nM	86,83 * ± 5,96
	1.000 nM	91,17 ± 7,57		1.000 nM	78,33 * ± 9,83
	10.000 nM	86,67 ± 3,75		10.000 nM	71,33 * ± 23,07
<i>17b</i>	1 nM	94,50 ± 4,82			
	10 nM	95,33 ± 1,04			
	100 nM	94,00 ± 1,80			
	1.000 nM	93,83 ± 7,37			
	10.000 nM	91,83 ± 3,01			

#### **4.2.2 Proliferation**

Für die Beurteilung der Proliferation der jeweiligen Zellpopulationen nach Substanzbehandlung wurden die HL-60-Zellen für 24 h mit den entsprechenden Vinca-Alkaloiden behandelt. Zudem wurde simultan CytoB zugegeben, um die Zellteilung, aber nicht die Kernteilung zu inhibieren. Somit wurde an Hand des Cytochalasin B-Proliferationsindex (CBPI) die Proliferation zwischen den unterschiedlich behandelten Zellen verglichen. Die Methode der Berechnung und der Aufbringung und Färbung der Zellen kann im Detail Kapitel 3.5.10 nachvollzogen werden. Somit wurden in Abbildung 24 die entsprechenden Säulendiagramme nach 24-stündiger Inkubation mit den klassischen (A = schwarze Säulen) und den neuen (B = graue Säulen) Vinca-Alkaloiden dargestellt.

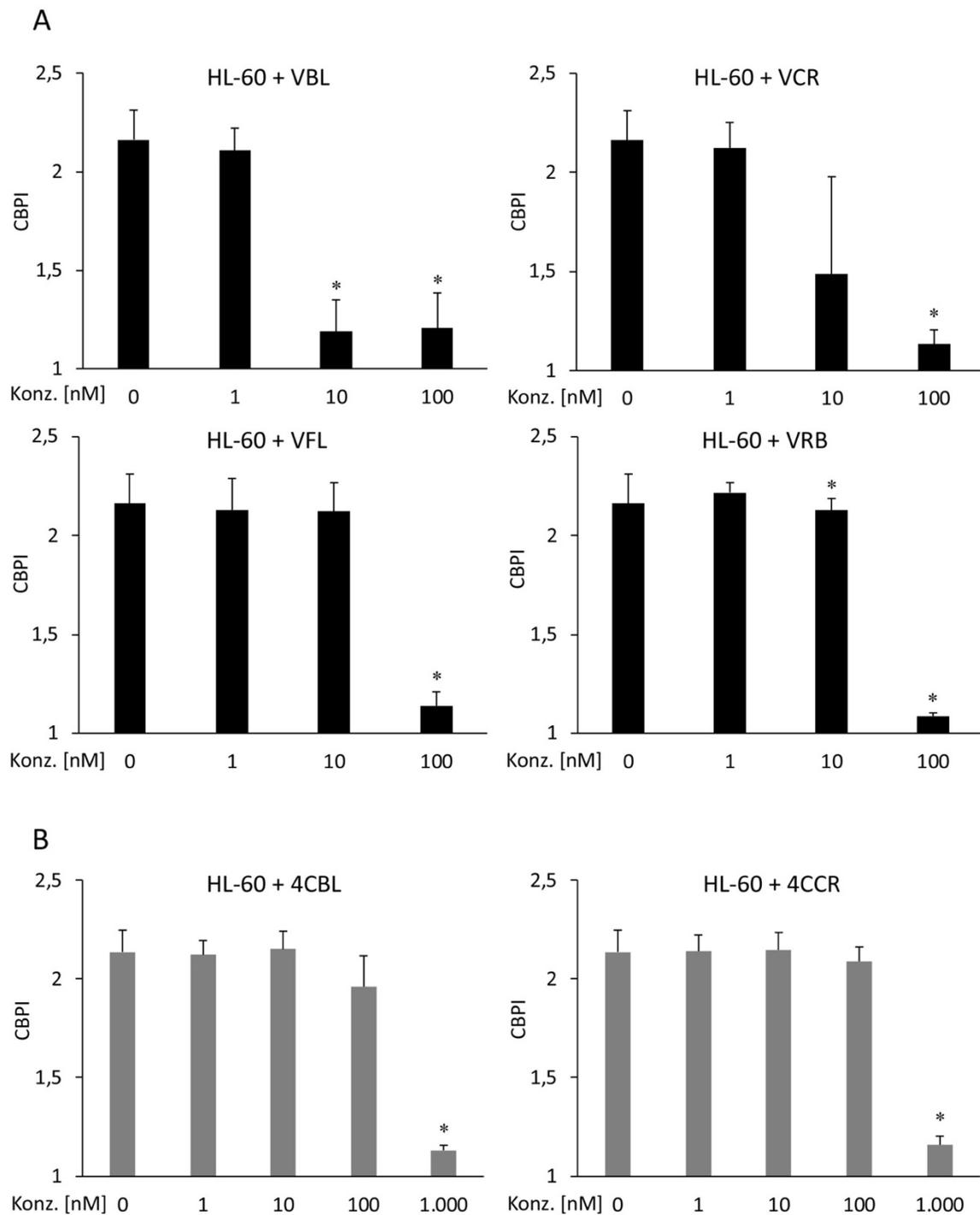


Abbildung 24: Ergebnisse der Proliferation für HL-60-Zellen nach Behandlung (24 h) mit Vinblastin (VBL), Vincristin (VCR), Vinflunin (VFL) und Vinorelbin (VRB; A) und 4-Chlorochablastin (4CBL) und 4-Chlorochacristin (4CCR; B). Auftragung des Cytochalasin B-Proliferationsindizes (CBPI) gegen eine ansteigende Konzentration (Konz.) der jeweiligen Substanz; \*  $p \leq 0,05$ .

Nach der Behandlung der HL-60-Zellen mit VBL, konnte bereits bei einer Konzentration von 10 nM eine signifikante Abnahme der Proliferation erzielt werden. Bei den anderen klassischen Vinca-Alkaloiden trat dieser Effekt erst ab einer Konzentration von 100 nM auf, wobei bei der Substanz VCR eine tendenzielle Abnahme zu sehen war, welche allerdings nicht signifikant

war. Die beiden neu synthetisierten Substanzen 4CBL und 4CCR inhibierten die Proliferation signifikant ab einer Konzentration von 1.000 nM, was ein 10-fach höherer Faktor verglichen mit den klassischen Substanzen VCR, VFL und VRB war.

#### **4.2.3 Apoptose**

Die Fähigkeit der untersuchten Vinca-Alkaloide eine Apoptose der HL-60-Zellen hervorzurufen, wurde entsprechend der in Kapitel 3.5.10 beschriebenen Methode durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen zuvor für 24 h unter Zugabe von CytoB mit den klassischen oder neuen Vinca-Alkaloiden behandelt. Nach dieser Zeit wurden die Zellen mittels Cytospin auf einem Objektträger aufgebracht, fixiert und gefärbt, bevor eine morphologische Detektion am Fluoreszenzmikroskop stattfand. Die Ergebnisse der quantitativen Auswertung können Abbildung 25 entnommen werden.

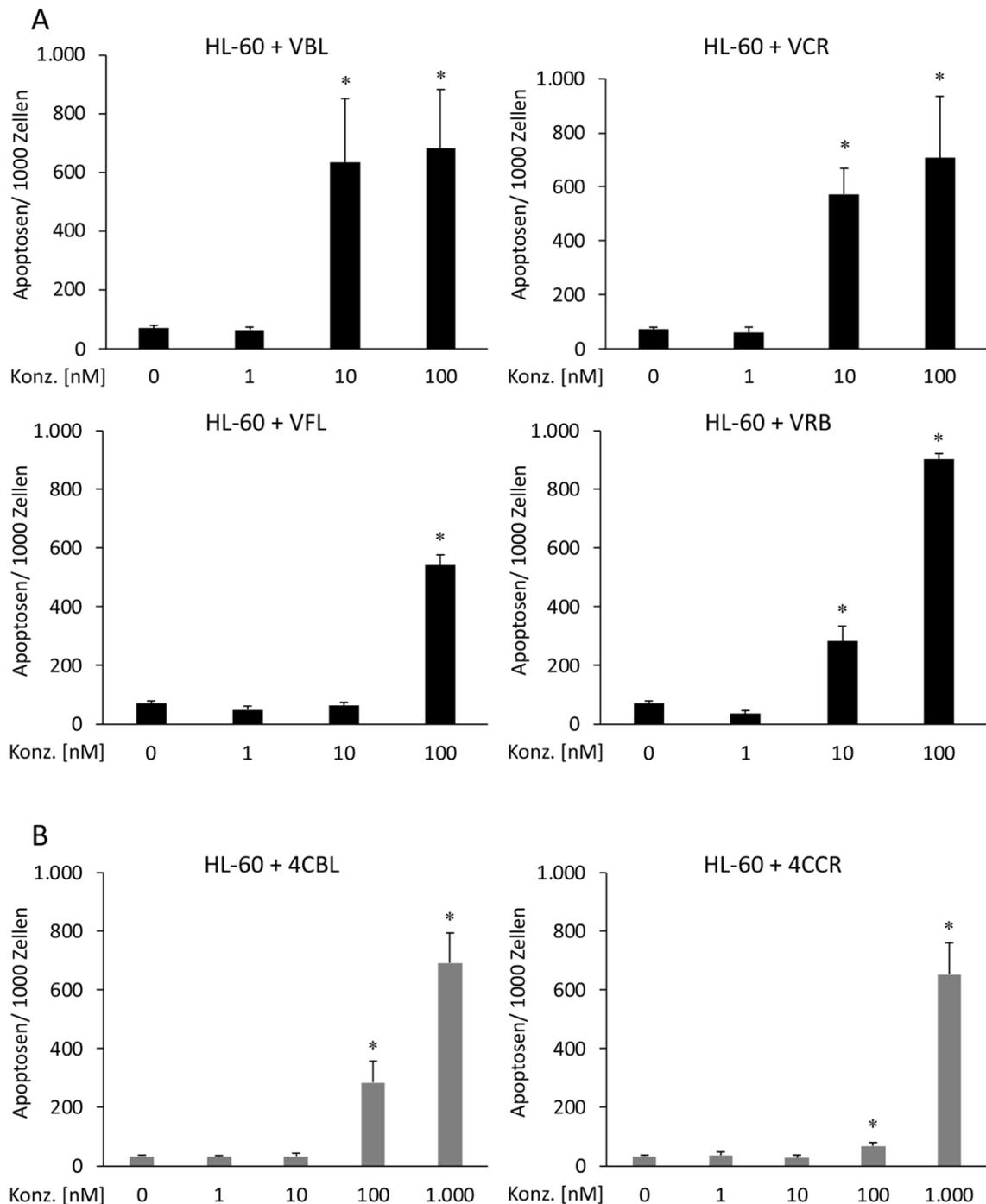


Abbildung 25: Ergebnisse der Apoptosen für HL-60-Zellen nach Behandlung (24 h) mit Vinblastin (VBL), Vincristin (VCR), Vinflunin (VFL) und Vinorelbin (VRB; A) und 4-Chlorochablastin (4CBL) und 4-Chlorochacristin (4CCR; B). Auftragung der Apoptosen/ 1.000 Zellen gegen eine ansteigende Konzentration (Konz.) der jeweiligen Substanz; \*  $p \leq 0,05$ .

Die Substanzen VBL und VCR haben bei den Konzentrationen 10 nM und 100 nM zu annähernd ähnlichen Apoptoseinduktionen von ca. 60 % geführt. Das Vinca-Alkaloid VRB verursachte unter 10 nM lediglich eine Apoptoserate von ca. 30 %, wohingegen 100 nM VRB nach 24 h mehr als 90 % Apoptosen verursacht hatten. Das Vinca-Alkaloid VFL zeigte von allen untersuchten klassischen Substanzen die schwächste Potenz, da ein in etwa 50 %iger Effekt

erst ab einer Konzentration von 100 nM ersichtlich war, welcher mit der Substanz 4CBL vergleichbar war. Hier wurden nach Behandlung mit 100 nM 4CBL ca. 30 % der Zellen und nach Inkubation mit 1.000 nM 4CBL bereits ca. 70 % der Zellen zerstört. Das neue Vinca-Alkaloid 4CCR zeigte bei 100 nM einen leichten, aber signifikanten Anstieg apoptotischer Zellen, welcher bei 1.000 nM bei mehr als 600 Apoptosen pro 1.000 Zellen lag. Somit war ersichtlich, dass 4CBL potenter bei der Behandlung der Tumorzelllinie HL-60 im Vergleich zur Substanz 4CCR war und vergleichbare Ergebnisse wie VFL hervorgerufen hatte.

#### **4.2.4 Frühe Apoptose**

Neben der mikroskopischen Apoptosedetektion wurden Ergebnisse mit Hilfe des Durchflusszytometers generiert. Hierfür wurden die HL-60-Zellen für 24 h mit den jeweiligen Vinca-Alkaloiden im Brutschrank inkubiert, bevor sie geerntet und aufgearbeitet werden konnten. Die detaillierte Methode ist in Kapitel 3.5.12 beschrieben und erfolgte für die Datenauswertung in 3-facher unabhängiger Versuchsdurchführung. Diese Methode ermöglichte die Quantifizierung lebender, früh- und spätapoptotischer Zellen/ Nekrosen, wohingegen in der nachfolgenden Abbildung 26 der Gehalt der Zellen dargestellt wurde, welche sich in der frühapoptotischen Phase des Zelltodes befanden. Diese Zellen besitzen eine intakte Zellmembran, welche das Eindringen des Propidiumiodids verhindert. Frühapoptotische Zellen, welche das Phosphatidylserin sowohl auf der inneren, als auch auf der äußeren Zellmembran tragen, interagieren mit dem Farbstoff Annexin V und ermöglichen somit eine Unterscheidung zwischen den Stadien lebender Zellen und Zellen der frühen und späten Apoptose.

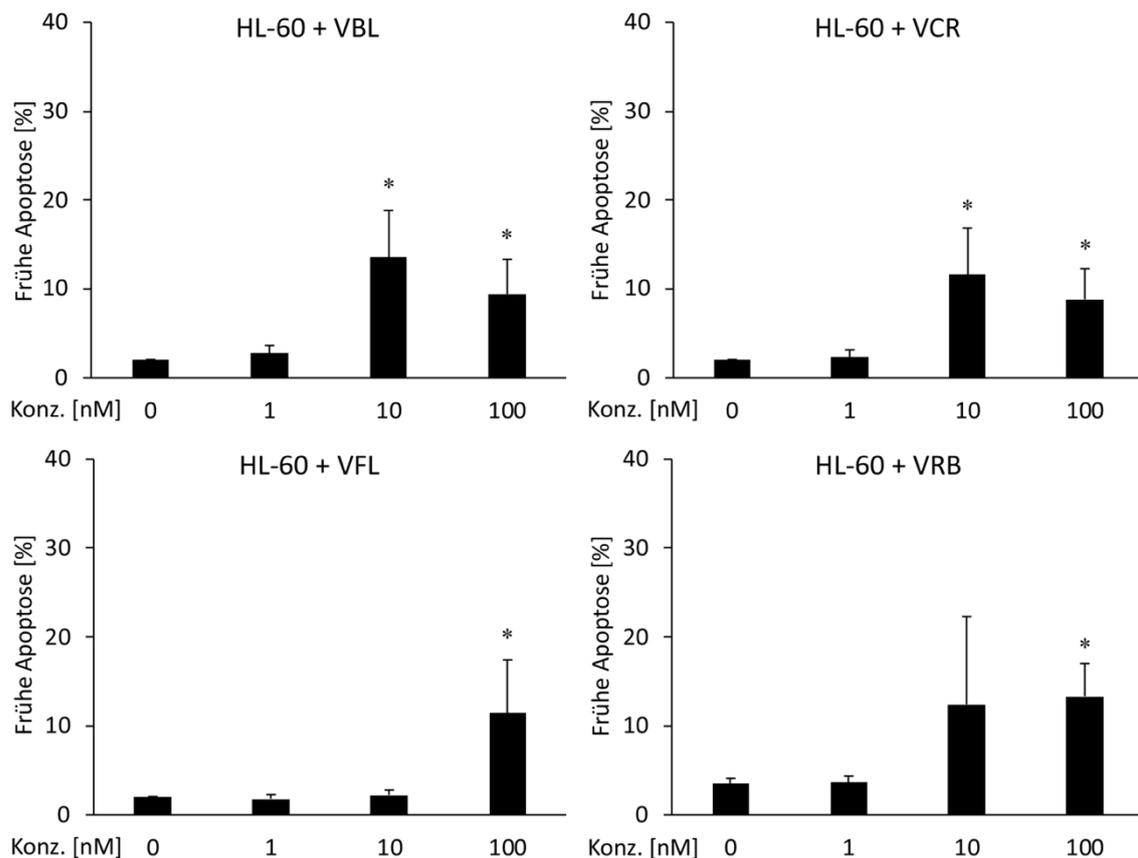


Abbildung 26: Ergebnisse des Anteils der frühen Apoptose nach durchflusszytometrischer Messung für HL-60-Zellen nach Behandlung (24 h) mit Vinblastin (VBL), Vincristin (VCR), Vinflunin (VFL) und Vinorelbin (VRB). Auftragung der frühen Apoptose in % gegen eine ansteigende Konzentration (Konz.) der jeweiligen Substanz; \*  $p \leq 0,05$ .

Es ist deutlich zu erkennen, dass sowohl VBL, als auch VCR bei 10 nM und 100 nM einen signifikanten Anstieg frühapoptotischer Zellen im Vergleich zur Kontrolle hervorgerufen haben. Dies konnte auch bei dem Vinca-Alkaloid VRB detektiert werden, wobei erst nach 24-stündiger Behandlung ab einer Konzentration von 100 nM VRB eine signifikante Induktion stattfand. Nach Behandlung mit 10 nM VFL war kein Effekt erkennbar, welcher sich jedoch bei einer Behandlung mit 100 nM VFL zeigte. Die neu synthetisierten Substanzen, welche in Abbildung 27 dargestellt sind, wurden jeweils bis zu einer Höchstkonzentration von 1.000 nM untersucht, wohingegen die Substanzen 16a, 17b und 18a sogar mit einer Konzentration von 10.000 nM behandelt wurden. Da bei einer Konzentration von 1.000 nM mittels durchflusszytometrischer Messung keine Apoptosen auftraten, wurde bis zur maximal möglichen Konzentration von 10.000 nM Substanzmenge gearbeitet, um einen Effekt zu erzielen. Die mit grauen Säulen dargestellten Diagramme zeigen die Ergebnisse nach Substanzbehandlung mit 4-Chlorochablastin (4CBL) und 4-Chlorochacristin (4CCR),

wohingegen die Substanzen 16a, 17b und 18a als Säulendiagramme mit weißen Säulen dargestellt wurden.

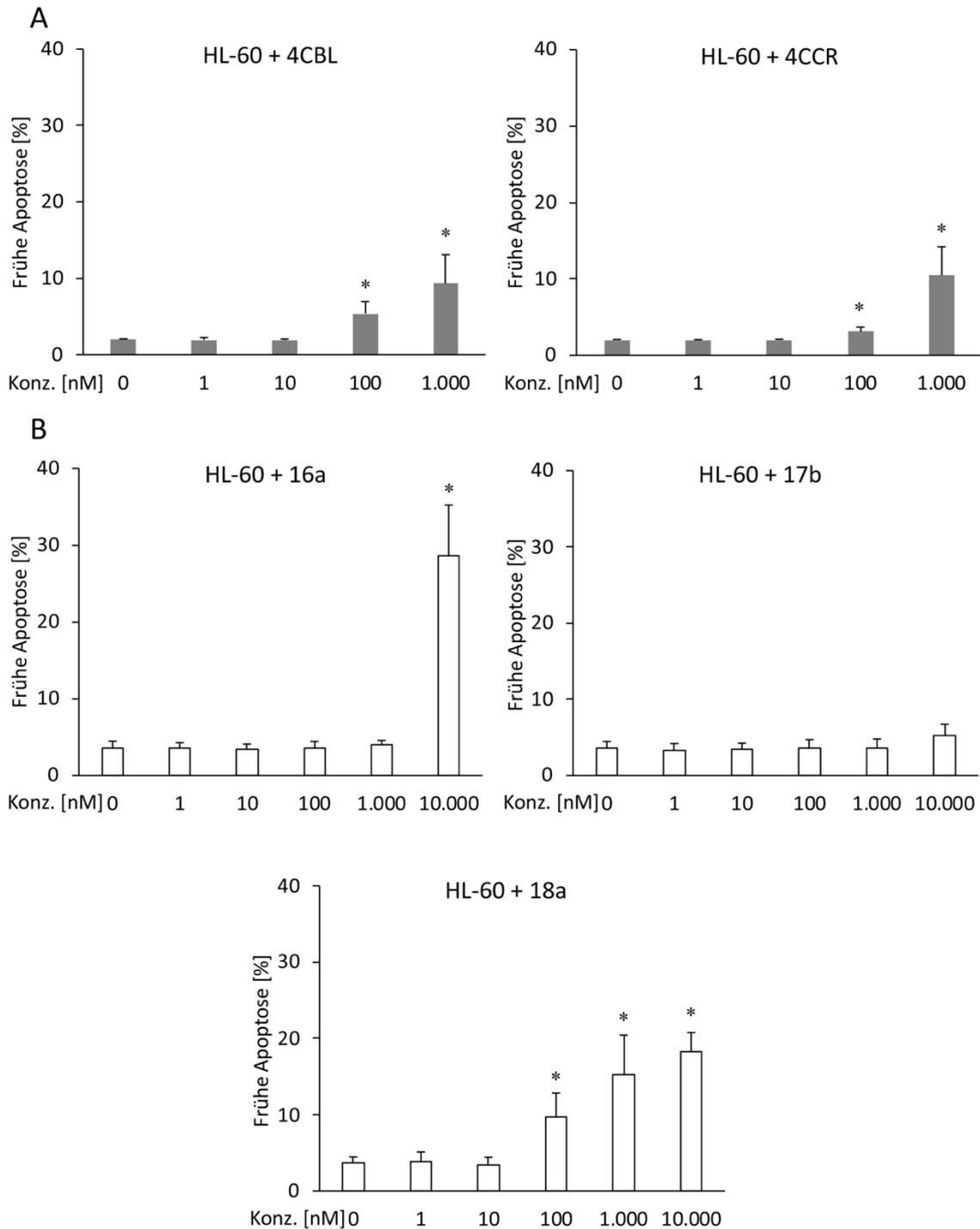


Abbildung 27: Ergebnisse des Anteils der frühen Apoptose nach durchflusszytometrischer Messung für HL-60-Zellen nach Behandlung (24 h) mit 4-Chlorochablastin (4CBL) und 4-Chlorochacristin (4CCR; A) und 16a, 17b und 18a (B). Auftragung der frühen Apoptose in % gegen eine ansteigende Konzentration (Konz.) der jeweiligen Substanz; \*  $p \leq 0,05$ .

Die neuen Vinca-Alkaloide 4CBL und 4CCR (Abbildung 27 A) wiesen erste Effekte bereits bei einer Konzentration von 100 nM auf, welche bei 1.000 nM sogar verstärkt wurden. Die Substanz 18a, welche in Abbildung 27 B dargestellt wurde, zeigte eine noch höhere Induktion bei 100 nM auf, die bis zur maximal gemessenen Konzentration von 10.000 nM bis ca. 15 % gesteigert wurde. Das Vinca-Alkaloid 16a verursachte bis zu einer Konzentration von 1.000 nM keine Apoptose, ermöglichte aber eine signifikante Apoptoseinduktion oberhalb von 10.000 nM. Trotz der maximal zugeführten Dosis von 10.000 nM der Substanz 17b konnte über den gesamten Bereich keine signifikante Zunahme der frühen Apoptose erzielt werden.

#### **4.2.5 Zellzyklusanalyse**

Da Vinca-Alkaloide durch ihre Wirkung am Tubulin die Mitose inhibieren, war eine Messung des Zellzyklus sinnvoll. Hierfür wurden die HL-60-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit diesen spindelstörenden Agenzien geerntet und die Zellen, wie in Kapitel 3.5.13 beschrieben, gewaschen, fixiert und gefärbt, bevor die Vermessung am Durchflusszytometer stattfand. Pro Konzentration wurde 10.000 Zellen untersucht und ausgewertet. Die nachfolgenden Abbildungen 28, 29 A und 29 B stellen Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchsdurchführungen dar. Die klassischen Vinca-Alkaloide (VBL, VCR, VFL und VRB) wurden bis zu einer Konzentration von 100 nM eingesetzt (Abbildung 28). So war ersichtlich, dass bei den Substanzen VBL, VCR und VRB eine Verschiebung der Anteile der Zellen von G1 nach G2/M bereits ab einer Konzentration von 10 nM stattfand. Zudem fand eine Reduktion des Anteils der Zellen in der S-Phase statt, welche bei VCR allerdings erst mit 100 nM der Substanz zu detektieren war. Das Vinca-Alkaloid VFL zeigte bei 10 nM keinen Effekt, welches sich bei 100 nM im gleichen Maße zeigte. Somit war ersichtlich, dass VFL das Vinca-Alkaloid mit der niedrigsten Potenz unter den untersuchten klassischen Substanzen darstellte.

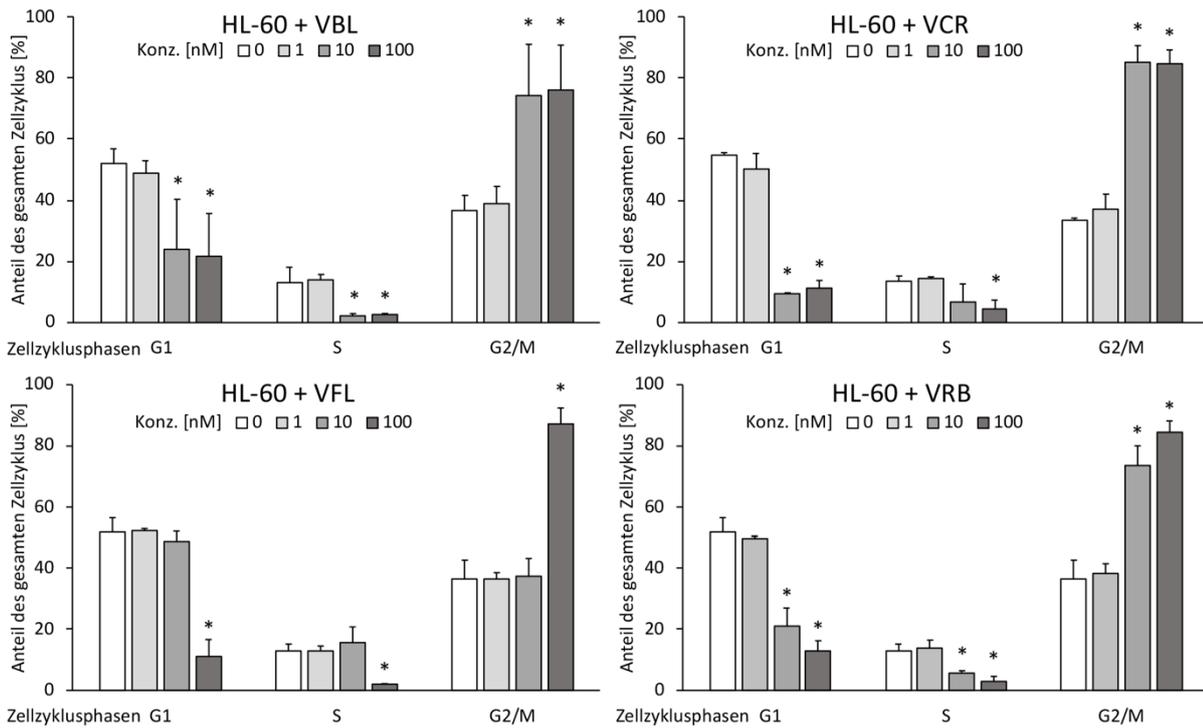


Abbildung 28: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Zellzyklusdetektion für HL-60-Zellen nach Behandlung (24 h) mit Vinblastin (VBL), Vincristin (VCR), Vinflunin (VFL) und Vinorelbin (VRB). Auftragung des prozentualen Anteils an Zellen in den Zellzyklusphasen (G1, S, G2/M) mit ansteigender Konzentration (Konz.) der jeweiligen Substanz; \*  $p \leq 0,05$ .

Die in Abbildung 29 dargestellten neuen Vinca-Alkaloide 4CBL, 4CCR, 16a, 17b und 18a wurden bis zu den Konzentrationsbereichen von 1.000 nM bzw. 10.000 nM hinsichtlich ihrer Effekte auf den Zellzyklus untersucht. So zeigten die Substanzen 16a und 17b keine signifikante Veränderung der Anteile der Zellen in den Zellzyklen, wobei bei dem Vinca-Alkaloid 16a eine Tendenz erkennbar war. Substanz 18a wies erste Effekte bereits ab einer Konzentration von 1.000 nM auf. Eine 10-fach höhere Potenz konnte bei den HL-60-Zellen nach 24-stündiger Behandlung detektiert werden. Somit zeigte sich eine Verschiebung zur G2/M-Phase ab einer Konzentration von 100 nM, welche durch eine Dosissteigerung zusätzlich erhöht werden konnte. Bei beiden Substanzen erfolgte zudem eine Abnahme der Zellen, welche sich in der S-Phase des Zellzyklus befanden.

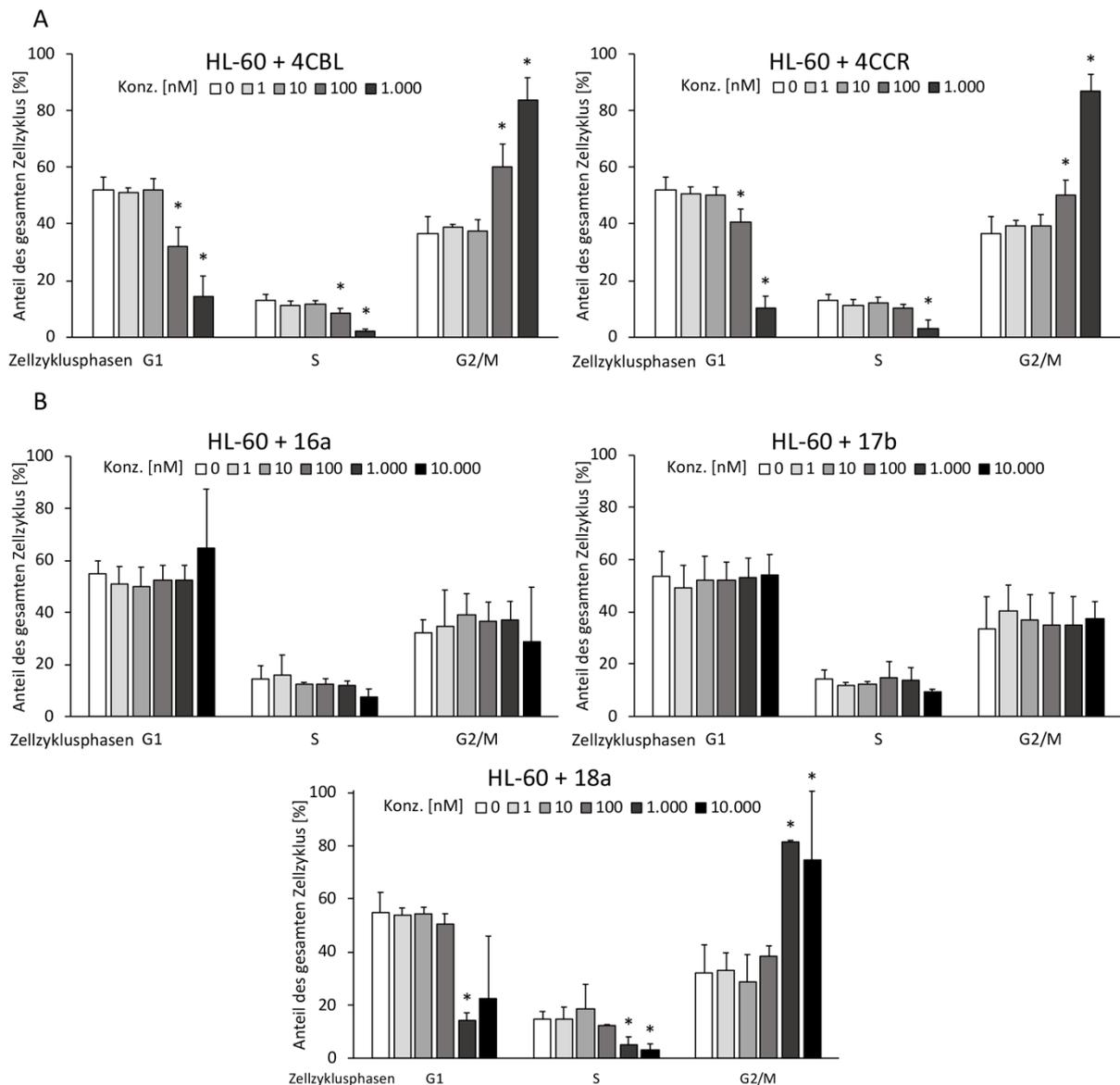


Abbildung 29: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Zellzyklusdetektion für HL-60-Zellen nach Behandlung (24 h) mit 4-Chlorochablastin (4CBL) und 4-Chlorochacristin (4CCR; A) und 16a, 17b und 18a (B). Auftragung des prozentualen Anteils an Zellen gegen die Zellzyklusphasen (G1, S, G2/M) mit ansteigender Konzentration (Konz.) der jeweiligen Substanz; \*  $p \leq 0,05$ .

Zusammengefasst kann nach durchflusszytometrischer Zellzyklusdetektion der klassischen und neu synthetisierten Vinca-Alkaloide eine Rangfolge der Effektivität festgelegt werden, welche sich wie folgt dargestellt hat: VBL/VCR/VRB > VFL > 4CBL > 4CCR > 18a > 16a/17b.

### 4.3 Exponentiell wachsende Zelllinien im Vergleich zu differenzierten Zelllinien

Um Informationen über den Einfluss genotoxischer Substanzen auf verschiedene Zellsysteme zu erhalten, war es sinnvoll Zellen in ihren verschiedenen Entwicklungsstadien zu betrachten. So wurden, wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben, bereits humane

hämatopoetische Stammzellen untersucht, welche sich bei der Zelldifferenzierung zu Beginn des Entwicklungsbaumes befanden. Außerdem wurden TK6-Zellen (humane Lymphoblasten) untersucht, welche als Vorläuferzellen der Hämatopoese galten und somit im weiteren Sinne eine differenzierte Form des blutbildenden Systems waren. Zudem wurden mit Tumorzellen (HL-60) Experimente vollzogen, welche als Zellen einer akuten myeloischen Leukämie kultiviert wurden. All diese Zellen konnten unter Zellkulturbedingungen *ex-vivo* als exponentiell wachsende Zelllinien mit kontinuierlichem Zellwachstum gehandhabt werden. Da die meisten Zellen im menschlichen Organismus unter physiologischen Bedingungen differenzieren bis keine Zellteilung mehr stattfindet, ist es erforderlich auch diese hinsichtlich der Einflüsse unterschiedlicher genotoxischer Agenzien zu testen. Somit wurden neben den Zellen der humanen Hämatopoese humane Darmzellen und murine neuronale Zellen verwendet. Zudem wurde in diesen Zellsystemen durch Zugabe von Wachstumsfaktoren oder Chemikalien oder mittels eines Zell-Zell-Kontakts eine Differenzierung hervorgerufen und dadurch Zellen herangezogen, welche nicht mehr exponentiell wuchsen.

### **4.3.1 Zelldifferenzierung und Differenzierungskontrolle**

#### *4.3.1.1 HT-22-Zellen*

Je nach Zellsorte wurde eine andere Form der Zelldifferenzierung herangezogen. Betrachtete man die neuronalen HT-22-Zellen, so konnte die Differenzierung mittels eines Austausches des ursprünglichen Wachstumsmediums mit einem Neurobasalmedium, welchem N2-Supplement zugegeben wurde, von stattem gehen. Nach dieser 24-stündigen Zelldifferenzierung wurde das Zellmedium erneuert und unter Zugabe von CytoB die Zellteilung inhibiert. Da bei diesen differenzierten Zellen davon auszugehen war, dass sie als ausdifferenzierte neuronale Zellen nicht weiter proliferieren, wurde als Vergleichskontrolle undifferenzierte HT-22-Zellen mit dem gleichen Prozedere mit CytoB behandelt und ebenso für weitere 24 h inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Zellen, wie in Kapitel 3.5.10 beschrieben, mittels Cytospin auf Objektträger aufgebracht, mit Methanol fixiert und zur mikroskopischen Auswertung mit der GelGreen-Färbelösung gefärbt. Für die Differenzierungskontrolle wurden die Objektträger codiert ausgewertet, indem pro Objektträger 1.000 Zellen anhand ihrer Morphologie als einkernige, doppelkernige, mehrkernige, mitotische oder apoptotische Zellen quantifiziert wurden. Unter Zuhilfenahme der unter 3.5.10 beschriebenen Formel für die Berechnung des Cytochalasin B-

Proliferationsindex (CBPI) konnte die jeweilige Zellproliferation bestimmt werden. Durch das Vorhandensein zwei- und mehrkerniger Zellen konnte eine Aussage darüber getroffen werden, dass die Zellen undifferenziert waren und eine Kernteilung stattgefunden hatte. Waren überwiegend einkernige Zellen innerhalb der Zellpopulation ersichtlich, konnte davon ausgegangen werden, dass bei den differenzierten HT-22-Zellen wenig Kernteilung stattgefunden hatte und sich der CBPI somit bei einem Wert von in etwa 1 belief. In Abbildung 30 ist die historische Kontrolle der HT-22-Negativkontrollen (Mittelwert aus Triplikat von 2x 1.000 Zellen) mit beispielhaften Darstellungen adhärenter undiff. und diff. Zellen anschaulich dargestellt. Eine Darstellung der Probenergebnisse ohne CytoB-Zugabe wurde graphisch nicht dargestellt, da die spontane Ausbildung zwei- und mehrkerniger Zellen so gering war, dass die CBPI Werte bei  $1,00 \pm 0,001$  (undiff. HT-22) bzw. bei  $1,01 \pm 0,003$  (diff. HT-22) lagen.

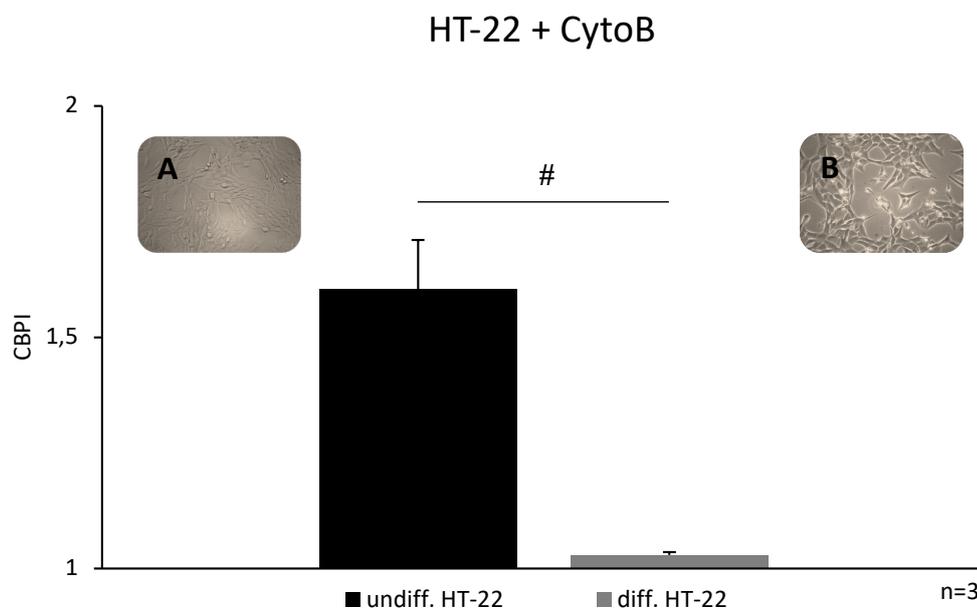


Abbildung 30: Ergebnisse fluoreszenzmikroskopischer Auswertung der Proliferation der HT-22-Zellen. 400-fache Vergrößerung unter einem FITC-Filter (Nikon GmbH; Düsseldorf, DE) für undiff. (schwarze Säule) und diff. (graue Säule) HT-22-Zellen nach Behandlung mit Cytochalasin B (24 h); Auftragung des Cytochalasin B-Proliferationsindizes (CBPI) für undiff. und diff. HT-22-Zellen; Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen (n=3) und #  $p \leq 0,05$ ; mit beispielhafter Darstellung undiff. HT-22-Zellen (A) und diff. HT-22-Zellen (B) nach 200-facher Vergrößerung unter einem Durchlichtmikroskop (Nikon GmbH; Düsseldorf, DE) und Verwendung der Fluoro Pro MP 5000 Kamera (Intas Science Imaging Instruments GmbH; Göttingen, DE) und des Programms QCapture Pro 5.0.1.26 (QImaging; Surrey, British Columbia, Kanada).

Es war deutlich zu erkennen, dass die undiff. HT-22-Zellen mit einem CBPI-Wert über 1,5 innerhalb von 24 h proliferierten, wohingegen die diff. Zellpopulation lediglich nur noch wenige Zellen enthielt, welche weiterhin proliferierten, da der Wert bei knapp über 1 lag.

Somit ergab sich nach statistischer Auswertung ein signifikanter Unterschied zwischen undiff. und diff. HT-22-Zellen und es konnte davon ausgegangen werden, dass die nachfolgenden Versuche mit zwei verschiedenen Zellsystemen stattfanden.

#### 4.3.1.2 CaCo2-Zellen

Für die Differenzierung der kolorektalen Adenokarzinomzellen CaCo2 wurden Zellkultureinsätze, sog. PET-Inlets, verwendet, in welche die Zellen für 21 d inkubiert wurden. Durch den resultierenden Platzmangel innerhalb des 24 mm großen Inlets, bildete sich ein konfluenter monoschichtiger Zellrasen aus. Oberhalb dieser Monoschicht bildeten sich zudem Zellkuppeln aus, welche quantifiziert werden konnten. Um einen Vergleich der undiff. und diff. Zellpopulation zu ermöglichen, wurde auch die Anzahl sich ausgebildeter Zellkuppeln der in einer 6-Loch-Platte befindlichen undiff. HT-22-Zellen innerhalb eines Durchmessers von 24 mm gezählt. Die Zellkuppeln der undiff. Zellpopulation waren zudem kleiner, was in Abbildung 31 A erkennbar ist.

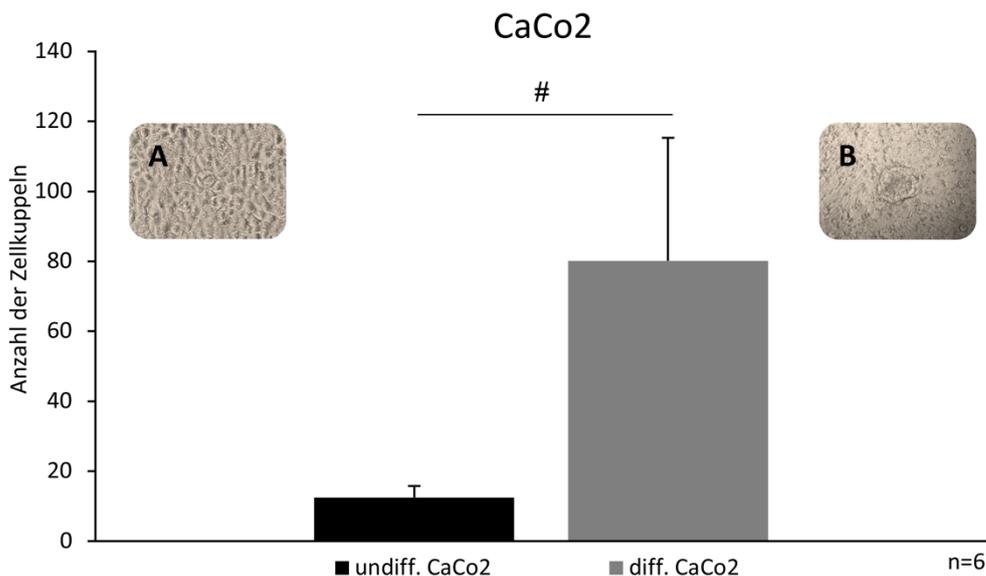


Abbildung 31: Ergebnisse durchlichtmikroskopischer Auswertung der Anzahl von Zellkuppeln in der Kultur der CaCo2-Zellen. 200-fache Vergrößerung unter einem Durchlichtmikroskop (Nikon GmbH; Düsseldorf, DE) für undiff. (schwarze Säule) und diff. (graue Säule) CaCo2-Zellen; Auftragung der Anzahl an Zellkuppeln für undiff. und diff. CaCo2-Zellen; Mittelwerte aus sechs unabhängigen Versuchen (n=6) und #  $p \leq 0,05$ ; mit beispielhafter Darstellung einer Zellkuppel von undiff. (A) und diff. CaCo2-Zellen (B) nach 400-facher Vergrößerung unter einem Durchlichtmikroskop (Nikon GmbH; Düsseldorf, DE) und Verwendung der Fluoro Pro MP 5000 Kamera (Intas Science Imaging Instruments GmbH; Göttingen, DE) und des Programms QCapture Pro 5.0.1.26 (QImaging; Surrey, British Columbia, Kanada).

Die Anzahl der Zellkuppeln lag bei den diff. CaCo2-Zellen bei  $80,18 \pm 35,15$  Stück und bei den undiff. Zellen bei  $12,5 \pm 3,27$  Stück innerhalb des Zellkulturinlets. Es ergab sich nach

statistischer Auswertung der historischen Kontrollen ein signifikanter Unterschied, sodass im weiteren Verlauf Untersuchungen mit den undiff. und diff. CaCo2-Zellen durchgeführt werden konnten, welche als zwei verschiedene Zellpopulationen angenommen werden konnten.

#### 4.3.1.3 HL-60-Zellen

Zeitgleich zu jedem Versuch wurde eine Differenzierungskontrolle mit den undiff. und diff. HL-60-Zellen durchgeführt. Eine Differenzierung der Leukämiezelllinie HL-60 wurde durch Zugabe von 1,25 % DMSO über 3 d hervorgerufen. Zudem wurde an jedem Tag das verbrauchte Wachstumsmedium durch frisches ersetzt. Nach dieser Zeit wurden sowohl undiff., als auch diff. HL-60-Zellen mittels Cytospin auf Objektträger aufgebracht, mit - 20 °C kaltem Methanol fixiert und mit GelGreen-Färbelösung für eine fluoreszenzmikroskopische Auswertung gefärbt. Zur Kontrolle des Differenzierungszustandes wurden pro Probe 2x 200 Zellen an Hand ihrer Morphologie, wie in Kapitel 3.5.6.3 beschrieben kategorisiert und statistisch ausgewertet. Somit ist in Abbildung 32 der mittlere Anteil an differenzierten Zellen innerhalb der Zellpopulationen der jeweiligen Negativkontrollen diff. und undiff. HL-60-Zellen ersichtlich.

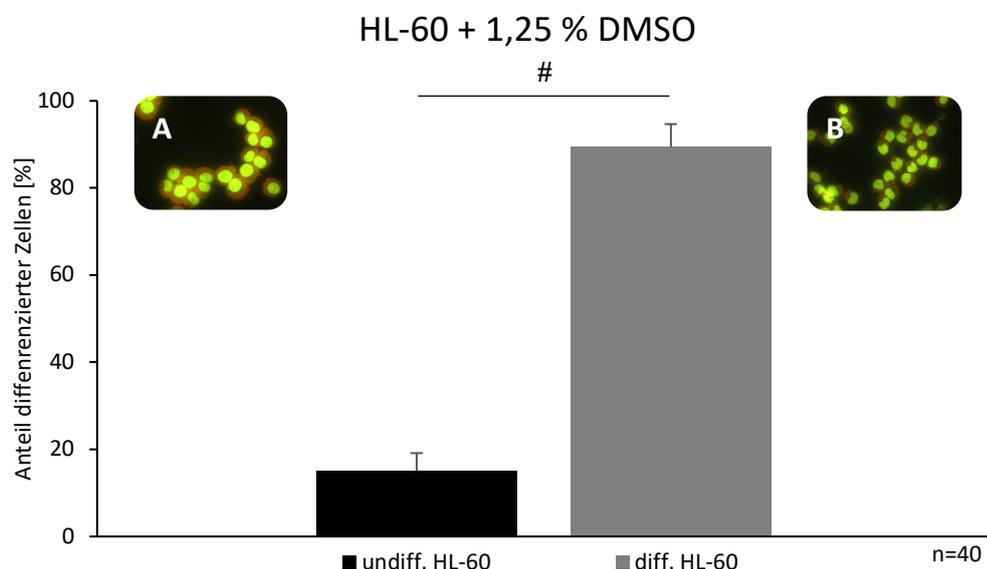


Abbildung 32: Ergebnisse fluoreszenzmikroskopischer Auswertung der Morphologie der HL-60-Zellen. 400-fache Vergrößerung unter einem FITC-Filter (Nikon GmbH; Düsseldorf, DE) für undiff. (schwarze Säule) und diff. (graue Säule) HL-60-Zellen nach Behandlung mit 1,25 % DMSO über 3 d; Auftragung des prozentualen Anteils differenzierter Zellen für undiff. und diff. HL-60-Zellen; Mittelwerte aus 40 unabhängigen Versuchen (n=40) und \*  $p \leq 0,05$ ; mit beispielhafter Darstellung undiff. (A) und diff. HL-60-Zellen (B) nach 400-facher Vergrößerung unter einem FITC-Filter (Nikon GmbH; Düsseldorf, DE) und Verwendung der Fluoro Pro MP 5000 Kamera (Intas Science Imaging Instruments GmbH; Göttingen, DE) und des Programms QCapture Pro 5.0.1.26 (QImaging; Surrey, British Columbia, Kanada).

Wie in Abbildung 32 grafisch dargestellt, war nach statistischer Auswertung ein signifikanter Unterschied an differenzierten Zellen zwischen undiff. und diff. HL-60-Zellen erkennbar. Der Wert betrug bei den undiff. Zellen lediglich  $15,00 \% \pm 4,12$ . Bei den diff. HL-60-Zellen war eine deutliche Veränderung der Morphologie (Abbildung 32B) zu sehen, welche mit einer Erhöhung an Zellen mit morphologisch veränderten Zellkernen und einem Wert von  $89,39 \% \pm 5,28$  belegt werden konnte. Somit konnte auch bei den Versuchsdurchführungen mit den HL-60-Zellen von Versuchen mit zwei verschiedenen Zelltypen ausgegangen werden.

### **4.3.2 DNS-Kondensationsdichte**

Um gewährleisten zu können, dass die verwendeten Substanzen in der Lage waren mit der DNS der zu untersuchenden Zellen zu interagieren, wurde die DNS-Kondensationsdichte der verwendeten Zelllinien untersucht. Hierfür wurden die Zellen der jeweiligen diff. und undiff. Zellen zelltypspezifisch geerntet und mittels Cytospin auf Glasobjektträger aufgebracht und fixiert, bevor sie, wie in Kapitel 3.5.7 beschrieben, mit Bisbenzimid gefärbt wurden. Pro Probe wurden nach Beendigung der Aufnahmen 200 Zellen kodiert ausgewertet, sodass eine statistische Auswertung möglich war. Somit konnten die Messergebnisse der Leuchtintensitäten zwischen undiff. und diff. Zellen verglichen und somit Aussagen über die Fähigkeit der Testsubstanzen mit der DNS zu interkalieren getroffen werden.

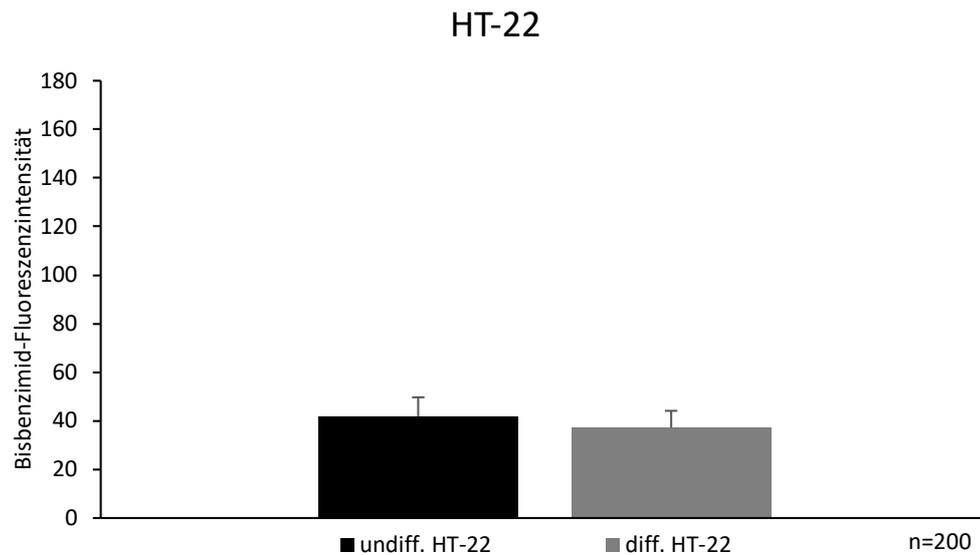


Abbildung 33: Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung der Fluoreszenzintensität nach Bisbenzimid-Färbung der HT-22-Zellen. 400-fache Vergrößerung unter UV-Licht am Nikon Eclipse 55i (Nikon GmbH; Düsseldorf, DE) und Verwendung der Fluoro Pro MP 5000 Kamera (Intas Science Imaging Instruments GmbH; Göttingen, DE) und des Programms QCapture Pro 5.0.1.26 (QImaging; Surrey, British Columbia, Kanada) für undiff. (schwarze Säule) und diff. (graue Säule) CaCo2-Zellen; Auftragung der Bisbenzimid-Fluoreszenzintensität bei undiff. und diff. HT-22-Zellen; Mittelwerte aus 200 vermessenen Zellen (n=200); kodierte Bilderauswertung mittels des Programms Image J 1.46 r.

Abbildung 33 stellt die Leuchtkraft von undiff. und diff. HT-22-Zellen nach Bisbenzimid-Färbung dar. Es konnte kein Unterschied zwischen den beiden HT-22-Zelltypen festgestellt werden, da es zu keinen signifikanten Unterschieden der Leuchtintensitäten kam. Ebenso wurde die Leuchtkraft nach Färbung mit Bisbenzimid von undiff. und diff. CaCo2-Zellen untersucht. Somit ließ sich, was in Abbildung 34 ersichtlich ist, zeigen, dass sich auch bei den CaCo2-Zellen keine Signifikanz detektieren ließ.

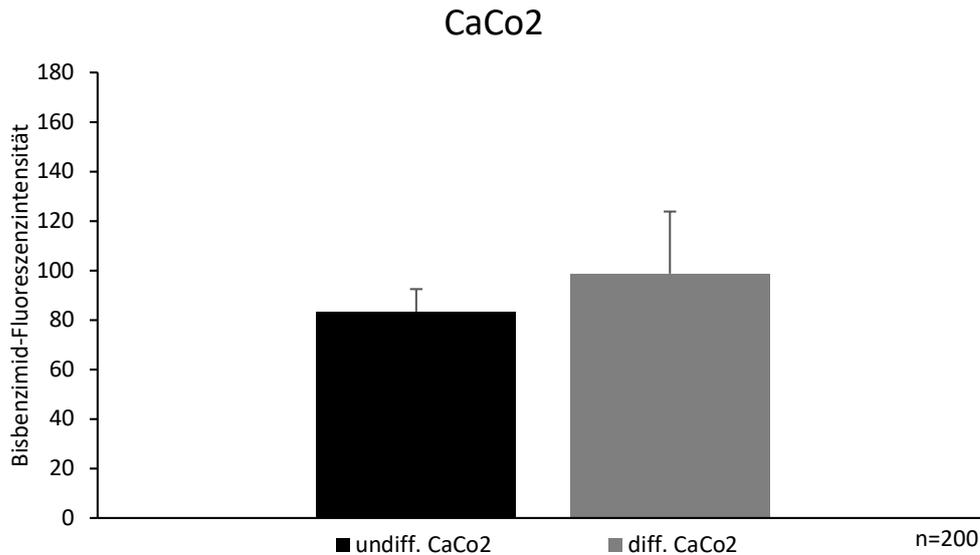


Abbildung 34: Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung der Fluoreszenzintensität nach Bisbenzimid-Färbung der CaCo2-Zellen. 400-fache Vergrößerung unter UV-Licht am Nikon Eclipse 55i (Nikon GmbH; Düsseldorf, DE) und Verwendung der Fluoro Pro MP 5000 Kamera (Intas Science Imaging Instruments GmbH; Göttingen, DE) und des Programms QCapture Pro 5.0.1.26 (QImaging; Surrey, British Columbia, Kanada) für undiff. (schwarze Säule) und diff. (graue Säule) CaCo2-Zellen; Auftragung der Bisbenzimid-Fluoreszenzintensität bei undiff. und diff. HT-22-Zellen; Mittelwerte aus 200 vermessenen Zellen (n=200); kodierte Bilderauswertung mittels des Programms Image J 1.46 r.

Als weitere differenzierte Zelllinie wurde die Leukämiezelllinie HL-60 hinsichtlich ihrer DNS-Packungsdichte untersucht. Neben den Kontrollen der undiff. und diff. HL-60-Zellen wurden zudem undiff. Zellen für 24 h mit 5-Azacytidin (5-Aza) behandelt, welches als Positivkontrolle der Reduktion der DNS-Packungsdichte fungierte. 5-Aza ist durch die Veränderung der Cytosin-Methylierung der DNS in der Lage zu einer verminderten Kondensationsdichte der DNS zu führen. Als weitere Positivkontrolle für eine Erhöhung der Packungsdichte der DNS wurden undiff. HL-60-Zellen mit Vincristin (VCR), einem spindelstörenden Vinca-Alkaloid, inkubiert. VCR verursachte eine Erhöhung mitotischer Zellen innerhalb der Zellpopulation. Da mitotische Chromosomen eine erhöhte Packungsdichte des Chromatins aufweisen, wurden zur Kontrolle des Testsystems lediglich Mitosen innerhalb dieser mit VCR behandelten Zellpopulation ausgewertet, wodurch VCR als Positivkontrolle dieses Testverfahrens galt.

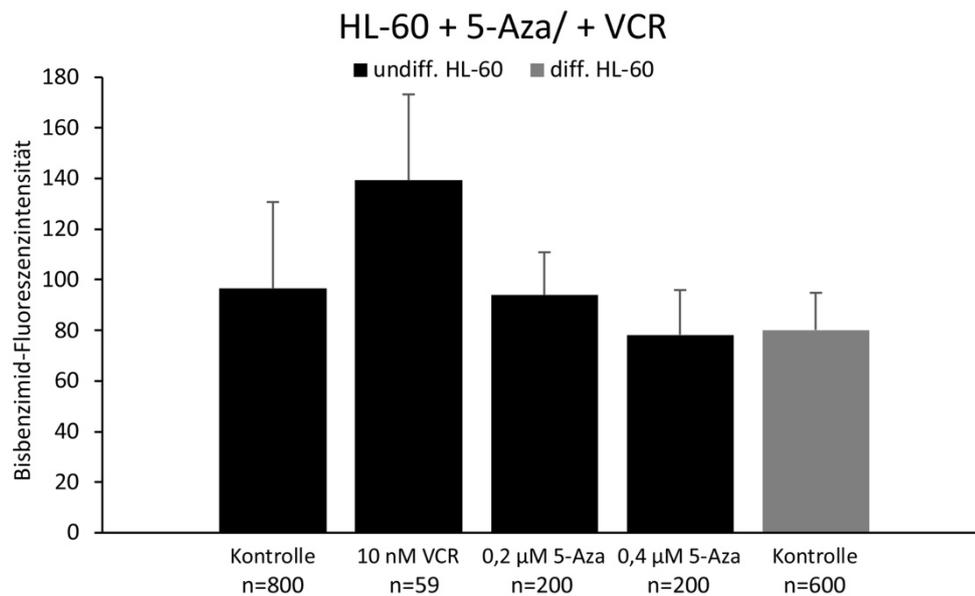


Abbildung 35: Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung der Fluoreszenzintensität nach Bisbenzimid-Färbung der HL-60-Zellen. 400-fache Vergrößerung unter UV-Licht am Nikon Eclipse 55i (Nikon GmbH; Düsseldorf, DE) und Verwendung der Fluoro Pro MP 5000 Kamera (Intas Science Imaging Instruments GmbH; Göttingen, DE) und des Programms QCapture Pro 5.0.1.26 (QImaging; Surrey, British Columbia, Kanada) für undiff. (schwarze Säule) und diff. (graue Säule) HL-60-Zellen nach Behandlung mit Vincristin (VCR) und 5-Azacytidin (5-Aza); Auftragung der Bisbenzimid-Fluoreszenzintensität bei undiff. und diff. HL-60-Zellen; Mittelwerte aus 200 vermessenen Zellen (n=200); kodierte Bilderauswertung mittels des Programms Image J 1.46 r.

Wie in Abbildung 35 ersichtlich, kam es nach Auswertung von 59 Mitosen innerhalb der mit VCR behandelten Zellpopulation zu einer nicht-signifikanten Erhöhung der Fluoreszenzintensität. Überdies hat die Positivkontrolle 5-Aza durch die Fähigkeit der Verminderung der DNS-Kondensationsdichte mit ansteigender Dosis zu einer leichten Erniedrigung der Fluoreszenzintensität nach Bisbenzimid-Färbung geführt. Die beiden Kontrollen (undiff. und diff. HL-60) wiesen zudem keine signifikanten Unterschiede zueinander auf.

#### 4.3.3 DNS-Menge

Nicht nur die Kontrolle der DNS-Kondensationsdichte der jeweiligen undiff. und diff. Zellen wurde untersucht, sondern auch ihre jeweiligen DNS-Mengen. Somit konnte kontrolliert werden, ob es im Zuge der Differenzierung zum Beispiel auf Grund von Mitosefehlern zur Zu- oder Abnahme des Chromatingehaltes der Zelle gekommen war. Neben den im weiteren Verlauf dieser Arbeit untersuchten Substanzen wurde Vincristin als Positivkontrolle dieses Testsystems verwendet. Darüber hinaus wurde in diesem Experiment der Einfluss von Testsubstanzen auf die Verteilung der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen mit

erfasst. Die Behandlungszeiten der undiff. und diff. HL-60-Zellen wurden je nach Substanz variiert. So betrug die Behandlungsdauer für 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  30 min, für 5  $\mu\text{M}$  Etoposid 1 h, für 500 nM Doxorubicin 4 h und für 10 nM VCR 24 h. Nach dieser Zeit wurden sowohl die undiff., als auch die diff. HL-60-Zellen auf die gleiche Weise geerntet, bevor die DNS-Menge verglichen wurde (Abbildung 36). Dies wurde mittels durchflusszytometrischer Analytik bewerkstelligt, welche in Kapitel 3.5.8 genauer beschrieben wurde.

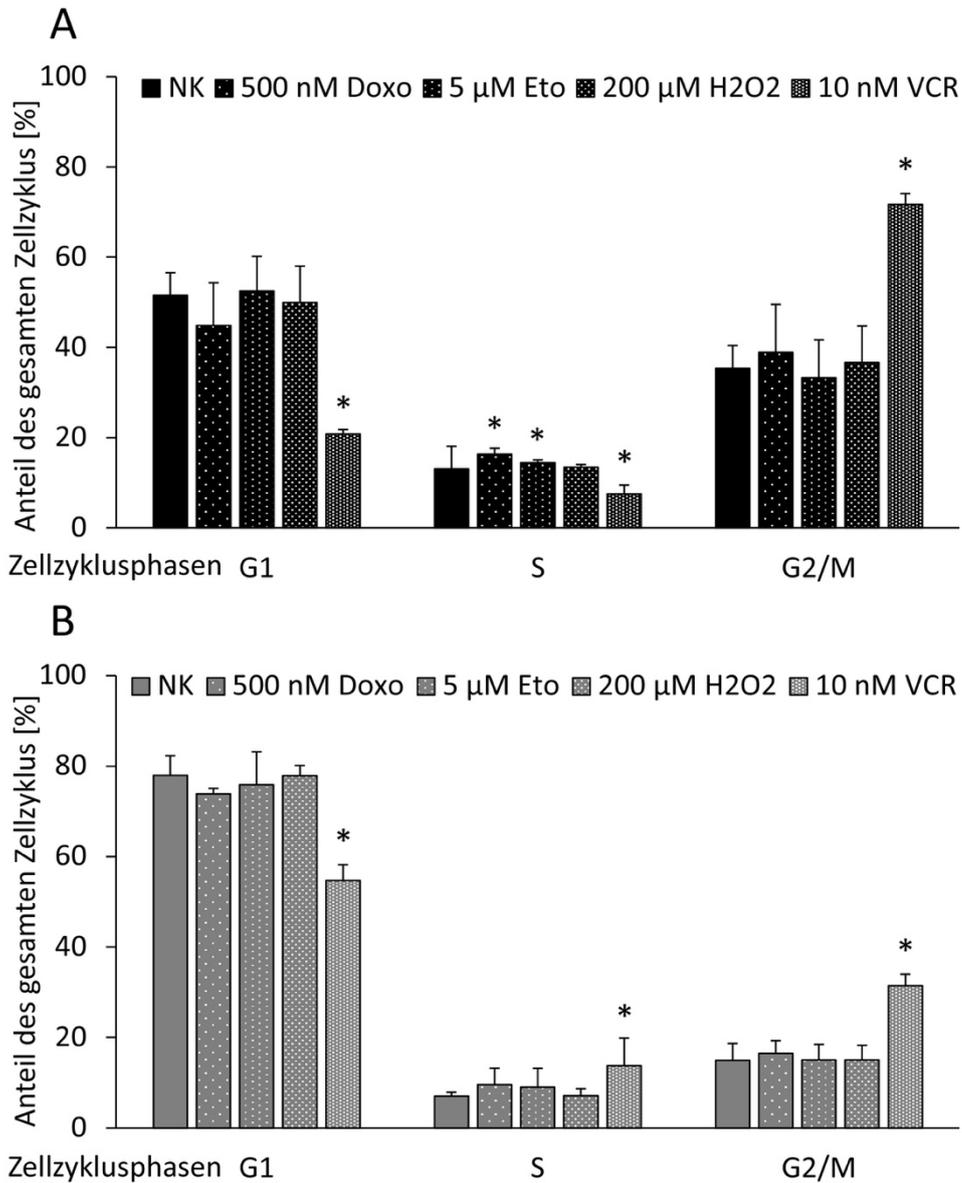


Abbildung 36: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Zellzyklusmessung der HL-60-Zellen. Bestimmung der DNS-Menge für HL-60-Zellen nach Behandlung mit 500 nM Doxorubicin (Doxo, 4 h), 5  $\mu\text{M}$  Etoposid (Eto, 1 h), 200  $\mu\text{M}$  Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , 30 min) und 10 nM Vincristin (VCR, 24 h) der undiff. (A) und der diff. (B) HL-60-Zellen; Auftragung des prozentualen Anteils an Zellen gegen die Zellzyklusphasen (G1, S, G2/M) mit der jeweiligen Substanzbehandlung; Signifikanz im Vergleich zur Negativkontrolle (NK) \*  $p \leq 0,05$ .

Die in Abbildung 36 ersichtliche Darstellung der DNS-Menge der undiff. (A) und diff. (B) HL-60-Zellen fand nach durchflusszytometrischer Detektion des Zellzyklus statt. Nach Behandlung der undiff. HL-60-Zellen (schwarze Säulen) mit 500 nM Doxorubicin, 5  $\mu$ M Etoposid und 10 nM VCR war eine signifikante Veränderung der S-Phase im Vergleich zur Negativkontrolle (NK) ersichtlich. Zudem war bei den Ergebnissen nach VCR-Behandlung eine Phasenverschiebung von der G1- zur G2/M-Phase erkennbar. Im Vergleich dazu kam es auch bei den diff. HL-60-Zellen (graue Säulen) lediglich nach Zugabe des VCR zu einer Phasenverschiebung von G1 zu G2/M und einer signifikanten Erhöhung der S-Phase im Vergleich zur entsprechenden Negativkontrolle. Die signifikanten Ergebnisse nach VCR-Zugabe gaben somit Aufschluss über die Durchführbarkeit dieser Testmethode für die beiden Zelltypen (undiff. und diff. HL-60). Um die Unterschiede zwischen der DNS-Menge der undiff. und diff. Zellen zu untersuchen, wurden die Ergebnisse der jeweiligen Negativkontrollen miteinander verglichen. Da die Zelltypen direkt aufeinanderfolgend vermessen wurden, ohne dass Veränderung der Einstellungen am Durchflusszytometer vorgenommen wurden, konnte an Hand der Position der jeweiligen Peaks auf der y-Achse (FL2-A) ein Vergleich der DNS-Menge vorgenommen werden. Bei allen drei Phasen (G1, S und G2/M) waren keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Position der Peaks ersichtlich und gaben somit Auskunft über ähnliche DNS-Menge innerhalb der jeweiligen Zellpopulationen (Abbildung 37).

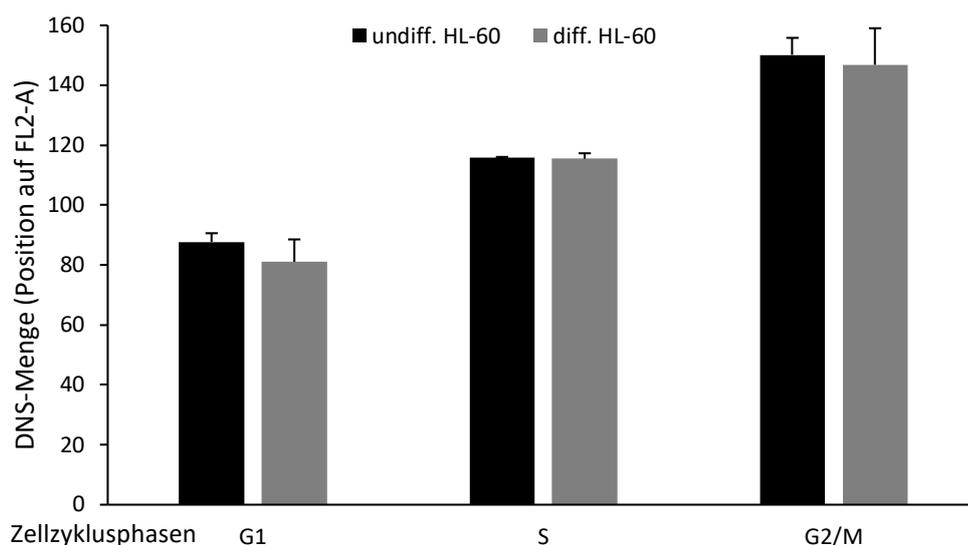


Abbildung 37: Darstellung der Ergebnisse der durchflusszytometrischen Zellzyklusmessung der HL-60-Zellen. Auswertung der Histogramme zur Bestimmung der DNS-Menge der Negativkontrollen undiff. (schwarze Säulen) und diff. HL-60-Zellen (graue Säulen); Auftragung der DNS-Menge mittels der Position auf der y-Achse (FL2-A) gegen die Zellzyklusphasen (G1, S, G2/M).

#### 4.3.4 Vitalität

Nachdem Daten zum Differenzierungszustand (Differenzierungsstatus, DNS-Kondensationsdichte und DNS-Menge) der jeweiligen Zelltypen gesammelt wurden, wurde im weiteren Verlauf die Sensitivität gegenüber verschiedenen genotoxischen Agenzien betrachtet. Somit wurden zunächst Vitalitätstests mit den Zelllinien HT-22, CaCo2 und HL-60 durchgeführt um weitere Informationen hinsichtlich der Zytotoxizität gegenüber den untersuchten Substanzen zu erhalten. Da jeweils sowohl die undifferenzierten, als auch die differenzierten Zellen getestet wurden, konnten Daten der unterschiedlichen Differenzierungsstadien gewonnen werden. Zunächst sind in Tabelle 7 die Ergebnisse des Vitalitätstests für die HT-22-Zellen ersichtlich. Die dargestellten Ergebnisse zeigten lediglich bei den diff. HT-22-Zellen (B) einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle nach Behandlung mit 250 nM Doxorubicin. Hinsichtlich der Signifikanz zwischen den undiff. und diff. Zellen waren Unterschiede bei den Konzentrationen von 100 nM und 250 nM Doxorubicin und bei 250  $\mu$ M MMS statistisch nachweisbar.

Tabelle 7: Vitalitätsergebnisse der HT-22-Zellen nach Behandlung mit Methylmethansulfonat, Doxorubicin und Etoposid; \*  $p \leq 0,05$

Substanz	HT-22	undiff. (A)	diff. (B)
	Konzentration	Vitalität [%]	Vitalität [%]
<i>Kontrolle</i>	-	96,83 $\pm$ 2,08	94,50 $\pm$ 2,64
<i>Methylmethansulfonat</i>	150 $\mu$ M	90,83 $\pm$ 6,90	93,00 $\pm$ 6,06
	250 $\mu$ M	96,67 $\pm$ 0,76	90,67 $\pm$ 4,19
<i>Doxorubicin</i>	100 nM	98,33 $\pm$ 1,15	94,00 $\pm$ 1,80
	250 nM	95,50 $\pm$ 4,77	85,67 * $\pm$ 3,06
	500 nM	91,00 $\pm$ 8,54	95,33 $\pm$ 2,93
<i>Etoposid</i>	0,5 $\mu$ M	93,50 $\pm$ 1,73	95,33 $\pm$ 1,53
	5 $\mu$ M	86,00 $\pm$ 8,76	95,00 $\pm$ 1,32

Neben den Zytotoxizitätsergebnissen der HT-22-Zellen, wurden auch Daten zur Vitalität nach Substanzbehandlung der CaCo2-Zellen gewonnen. Die verwendeten Substanzen und Behandlungsdauern entsprachen denen der HT-22-Zellen, wobei die Behandlung mit 100 nM Doxorubicin lediglich einmal durchgeführt wurde (<sup>o</sup>), da sich nach Behandlung mit dieser Substanz keine Effekte gezeigt hatten. Aus diesem Grund wurden die Versuche durch hohe

Konzentrationen ergänzt (1.000 nM, 2.500 nM und 5.000 nM Doxorubicin). Die Ergebnisse können Tabelle 8 entnommen werden.

Tabelle 8: Vitalitätsergebnisse der CaCo2-Zellen nach Behandlung mit Methylmethansulfonat, Doxorubicin und Etoposid; \*  $p \leq 0,05$ , ° = Mittelwert aus 2 unabhängigen Proben

Substanz	CaCo2	undiff. (A)	diff. (B)
	Konzentration	Vitalität [%]	Vitalität [%]
<i>Kontrolle</i>	-	92,50 ± 2,18	79,33 ± 10,79
<i>Methylmethansulfonat</i>	150 µM	90,33 ± 2,02	79,33 ± 16,54
	250 µM	92,50 ± 7,09	75,50 ± 22,40
<i>Doxorubicin</i>	100 nM	93,50 ° ± -	72,00 ° ± -
	250 nM	94,83 ± 3,40	79,33 ± 12,91
	500 nM	90,33 ± 4,07	75,33 ± 20,46
	1.000 nM	89,00 ± 3,61	73,50 ± 13,61
	2.500 nM	86,00 * ± 3,77	62,33 ± 9,75
	5.000 nM	78,17 * ± 7,59	32,67 * ± 9,75
<i>Etoposid</i>	0,5 µM	86,50 ± 14,73	79,67 ± 7,49
	5 µM	91,67 ± 5,13	71,67 ± 19,07

Die CaCo2-Zellen wiesen lediglich eine signifikante Abnahme der Vitalität nach Behandlung mit Doxorubicin auf. Bei den undiff. CaCo2-Zellen (A) war dies bei den Konzentrationen 2.000 nM und 5.000 nM ersichtlich, bei den diff. CaCo2-Zellen (B) erst bei einer Konzentration von 5.000 nM. Hinsichtlich der Vergleichbarkeit der beiden Zelllinien waren statistische Abweichungen bei den Kontrollen und bei einigen Konzentrationen an Doxorubicin (250 nM, 1.000 nM, 2.500 nM und 5.000 nM) zu erkennen. Nach Inkubation mit Etoposid oder MMS waren zwischen der undiff. und diff. Form der CaCo2-Zellen keine Unterschiede detektierbar. Bei der Untersuchung der Zelllinien HL-60 (undiff. und diff. Form) wurden neben den in den Tabellen 7 und 8 beschriebenen Substanzen weitere Substanzen hinsichtlich ihrer Zytotoxizität getestet. Dies geschah zeitgleich zur Datenerhebung mit Hilfe der Einzelzellgelelektrophorese, welche in den nachfolgenden Kapiteln genauer beschrieben wird. Somit wurde zudem die Zellvitalität nach Zugabe von Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Mitomycin C (MMC) und UV-Bestrahlung mit und ohne gleichzeitiger Aphidicolin-Behandlung (Aph) in aufsteigenden Dosisbereichen analysiert. Bei einigen Substanzen war der Effekt nicht

absehbar, sodass passende Positivkontrollen (MMS oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) mitgeführt wurden. Die Ergebnisse nach der Behandlung der undiff. und diff. HL-60-Zellen können Tabelle 9 entnommen werden.

Tabelle 9: Vitalitätsergebnisse der HL-60-Zellen nach Behandlung mit Methylmethansulfonat, Doxorubicin und Etoposid; \*  $p \leq 0,05$

Substanz	HL-60	undiff. (A)	diff. (B)
	Konzentration	Vitalität [%]	Vitalität [%]
<i>Kontrolle</i>	-	93,17 ± 5,96	91,50 ± 4,92
<i>Methylmethansulfonat</i>	25 µM	94,00 ± 4,44	93,33 ± 4,07
	50 µM	96,00 ± 3,90	92,67 ± 3,82
	75 µM	90,67 ± 4,37	93,33 ± 5,11
	100 µM	91,50 ± 7,86	91,00 ± 4,33
	150 µM	93,33 ± 0,58	94,00 ± 4,77
	250 µM	91,67 ± 3,79	89,67 ± 4,44
<i>Kontrolle</i>	-	83,50 ± 2,60	92,50 ± 2,18
<i>Doxorubicin</i>	50 nM	86,33 ± 2,25	92,50 ± 2,29
	100 nM	87,50 ± 9,84	90,17 ± 0,76
	150 nM	87,33 ± 5,69	92,50 ± 1,32
	200 nM	82,67 ± 7,01	90,33 ± 3,33
	250 nM	82,17 ± 12,55	88,33 ± 4,62
	500 nM	86,17 ± 5,62	94,17 ± 1,04
<i>PK (MMS)</i>	150 µM	83,67 ± 11,73	91,50 ± 3,97
<i>Kontrolle</i>	-	86,17 ± 5,75	92,17 ± 5,01
<i>Etoposid</i>	0,1 µM	92,33 ± 1,53	90,17 ± 6,93
	0,5 µM	88,50 ± 4,27	91,83 ± 3,33
	1 µM	88,67 ± 4,07	90,67 ± 1,61
	5 µM	83,83 ± 4,19	90,50 ± 5,07
	10 µM	85,67 ± 0,76	88,33 ± 3,75
	25 µM	79,17 ± 11,41	86,50 ± 10,83
<i>PK (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)</i>	200 µM	66,67 * ± 5,69	84,33 ± 4,25

Wie in Tabelle 9 ersichtlich, zeigten sich trotz ansteigender Konzentration an MMS keine signifikanten Unterschiede zwischen undiff. (A) und diff. (B) HL-60-Zellen. Nach Behandlung (4 h) der undiff. Zellen (B) konnte eine leichte, aber nicht signifikante Abnahme festgestellt werden. Überdies wurde die Vitalität der Zellen nach 4-stündiger Inkubation mit Doxorubicin untersucht. Auch hier konnte weder bei den undiff., noch bei den diff. HL-60-Zellen eine Signifikanz im Vergleich zur Negativkontrolle festgestellt werden. Auch die Positivkontrolle (PK, 150  $\mu$ M MMS) zeigte keinen zytotoxischen Effekt. Der Topo II-Inhibitor Etoposid verursachte eine leichte Abnahme der Vitalität mit ansteigender Konzentration, welche allerdings wiederum nicht signifikant war. Lediglich die Positivkontrolle (200  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) führte zu einer signifikanten Reduktion der Vitalität. Des Weiteren wurden die beiden HL-60-Zelllinien mit den Substanzen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 30 min, Mitomycin C (MMC) für 1 h und anschließender 30-minütiger Nachbehandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert. Außerdem wurde ein weiterer Versuch durchgeführt, bei dem die Zellen zunächst 1 h mit MMC behandelt wurden, nach Substanzentfernung mittels Zentrifugation für weitere 4 h im Inkubator belassen wurden, bevor für weitere 30 min H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugegeben wurde, um DNS-Schäden hervorzurufen. Die Vitalitätsergebnisse nach diesen Behandlungsschemata können Tabelle 10 entnommen werden.

Tabelle 10: Vitalitätsergebnisse der HL-60-Zellen nach Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, MMC/ Cisplatin + 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und MMC/ Cisplatin + Inkubation + 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; \* p ≤ 0,05

Substanz	HL-60	undiff. (A)	diff. (B)
	Konzentration	Vitalität [%]	Vitalität [%]
<i>Kontrolle</i>	-	90,50 ± 6,76	93,17 ± 2,52
<i>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></i>	25 µM	74,17 ± 9,78	93,17 ± 4,48
	50 µM	79,00 ± 13,92	92,17 ± 0,76
	75 µM	81,83 ± 12,51	84,83 ± 7,97
	100 µM	80,17 ± 10,80	90,00 ± 4,36
	125 µM	82,50 ± 6,50	90,83 ± 2,75
	150 µM	84,00 ± 8,54	88,83 ± 5,48
	175 µM	79,00 ± 12,02	84,00 * ± 7,47
<i>Kontrolle (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)</i>	200 µM	65,33 ± 11,64	80,67 ± 10,61
<i>MMC + 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></i>	0,1 µM	71,50 ± 17,30	89,00 ± 3,97
	1 µM	52,83 ± 27,41	82,17 ± 7,65
	10 µM	59,67 ± 20,82	84,17 ± 4,31
	100 µM	73,67 ± 8,22	80,33 ± 10,69
<i>NK</i>	-	74,17 ± 10,77	93,67 * ± 3,18
<i>PK (Cisplatin + 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)</i>	166,7 µM	46,67 ± 25,06	74,67 ± 11,07
<i>PK (Cisplatin)</i>	166,7 µM	72,17 ± 16,30	93,50 * ± 0,87
<i>Kontrolle (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)</i>	200 µM	75,00 ± 13,11	89,50 ± 5,63
<i>MMC + Inkubation + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></i>	0,1 µM	73,00 ± 17,32	89,83 ± 1,61
	1 µM	65,00 ± 16,52	90,50 ± 1,00
	10 µM	72,50 ± 21,29	91,33 ± 3,01
	100 µM	69,83 ± 25,74	85,50 ± 3,61
<i>NK</i>	-	86,17 ± 13,66	91,83 ± 1,53
<i>PK (Cisplatin + 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)</i>	166,7 µM	74,33 ± 14,46	88,50 ± 5,07
<i>PK (Cisplatin)</i>	166,7 µM	84,17 ± 16,30	92,17 ± 0,76

Nach der 30-minütigen Behandlung der undiff. und diff. HL-60-Zellen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> war lediglich bei dem diff. Zelltyp eine signifikante Abnahme der Vitalität ersichtlich. Bei dem Behandlungsschema mit MMC bzw. Cisplatin, bei dem die Zellen zunächst für 1 h entweder

mit dem Crosslinker MMC oder der Positivkontrolle Cisplatin behandelt wurden und anschließend für 30 min mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nachbehandelt wurden, konnte bei der Negativkontrolle der diff. HL-60-Zellen (ohne Substanzzugabe) ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle nachgewiesen werden. Bei diesem Versuch fungierte die alleinige Behandlung mit 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Kontrolle der statistischen Signifikanz. Eine weitere signifikante Abweichung konnte nach alleiniger Behandlung mit 166,7 µM Cisplatin erzielt werden. Zwischen den undiff. und diff. Zellen wurden signifikante Unterschiede bei den Negativkontrollen (ohne Substanzzugabe) und nach alleiniger Zugabe von 166,7 µM Cisplatin festgestellt.

Neben diesem Versuchsablauf wurde die Zellen nach einstündiger Behandlung mit MMC oder Cisplatin zunächst mittels Zentrifugation von der Substanz befreit, bevor sie für 4 h im Brutschrank inkubiert wurden. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Nachbehandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Weder bei den undiff. HL-60-Zellen, noch bei den diff. HL-60-Zellen konnte eine signifikante Verminderung der Vitalität im Vergleich zur Kontrolle (200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) nachgewiesen werden. Zwischen den beiden Zelltypen konnte allerdings eine Signifikanz nach Behandlung mit 0,1 µM MMC, 1 µM MMC und 10 µM MMC mit anschließender 4-stündiger Inkubation und Nachbehandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detektiert werden. Dieser Effekt wurde nach Behandlung mit der Positivkontrolle Cisplatin nicht erzielt. Zudem erfolgte eine bzw. keine UV-Bestrahlung der HL-60-Zellen, welche zeitgleich entweder mit oder ohne Aphidicolin (Aph) behandelt wurden (Tabelle 11).

Tabelle 11: Vitalitätsergebnisse der HL-60-Zellen nach Behandlung mit und ohne UV-Licht, mit und ohne Aphidicolin und nach direkter Kontrolle bzw. Kontrolle nach 2-stündiger Inkubation

Substanz	HL-60	undiff. (A)	diff. (B)
	Konzentration	Vitalität [%]	Vitalität [%]
- UV / - Aph / dir (Kontrolle)	- / -	86,16 ± 4,07	92,83 ± 5,51
- UV / + Aph / dir	- / 15 µM	85,00 ± 5,29	95,00 ± 2,65
- UV / - Aph / 2 h	- / -	84,67 ± 1,76	90,83 ± 5,53
- UV / + Aph / 2 h	- / 15 µM	86,00 ± 5,68	92,33 ± 6,43
+ UV / - Aph / dir (Kontrolle)	15 J/m <sup>2</sup> / -	88,83 ± 3,88	90,00 ± 3,61
+ UV / + Aph / dir	15 J/m <sup>2</sup> / 15 µM	88,83 ± 4,80	92,17 ± 2,52
+ UV / - Aph / 2 h	15 J/m <sup>2</sup> / -	86,17 ± 4,65	93,00 ± 3,91
+ UV / + Aph / 2 h	15 J/m <sup>2</sup> / 15 µM	87,00 ± 1,73	93,67 ± 4,16

Zur Untersuchung der Vitalität mit und ohne UV-Bestrahlung, wurden die undiff. und diff. HL-60-Zellen mit  $15 \text{ J/m}^2$  bestrahlt. Bei einem Teil der Proben wurde zudem Aphidicolin (Aph) zugegeben, welches für das Offenhalten der DNS-Strangbrüche verantwortlich war. Hierbei wurde der Zellpopulation Aph zugegeben, sodass eine Endkonzentration von  $15 \text{ }\mu\text{M}$  Aph erreicht wurde. Zudem wurden die Zellvitalität entweder direkt nach der UV-Bestrahlung oder nach 2-stündiger Inkubationspause untersucht. Somit ergab sich weder für die undiff. HL-60-Zellen, noch für die diff. HL-60-Zellen eine signifikante Abnahme der Vitalität. Auch das Hinzufügen von Aph hatte keinen Einfluss auf die Zytotoxizität. Hinsichtlich der Unterschiede zwischen den beiden Zelltypen (undiff. und diff. HL-60) konnten signifikante Differenzen der Zytotoxizität bei alleiniger Zugabe von Aph und direkter Untersuchung und nach simultaner Zugabe von Aph und UV-Bestrahlung nach 2-stündiger Nachinkubation erzielt werden.

### **4.3.5 DNS-Schaden**

Um die schadeninduzierende Wirkung der verwendeten Substanzen zu untersuchen, wurde die Einzelzellgelelektrophorese angewendet. Der genaue Versuchsablauf, bei dem stets undiff. und diff. Zellen gleichzeitig untersucht wurden, kann Kapitel 3.5.11.1 entnommen werden. Wie in Abbildung 38 dargestellt, wurden zunächst sowohl die undiff. als auch die diff. HT-22-Zellen untersucht. Die verwendeten Substanzen waren Doxorubicin (Doxo), Etoposid (Eto) und Methylmethansulfonat (MMS). Die Behandlungsdauer unterschied sich je nach Substanz und betrug bei Doxo und MMS 4 h und bei Eto 1 h. Direkt im Anschluss an die jeweiligen Behandlungen wurden die durch die Substanzen verursachten DNS-Schäden mittels Einzelzellgelelektrophorese und anschließender Färbung mit GelRed-Färbelösung miteinander verglichen. Es wurde an Hand des prozentualen Gehaltes an DNS im Kometenschweif sowohl die Ergebnisse der Substanzbehandlungen mit der jeweiligen Negativkontrolle (NK), als auch die Zelltypen (undiff. und diff. HT-22-Zellen) miteinander verglichen.

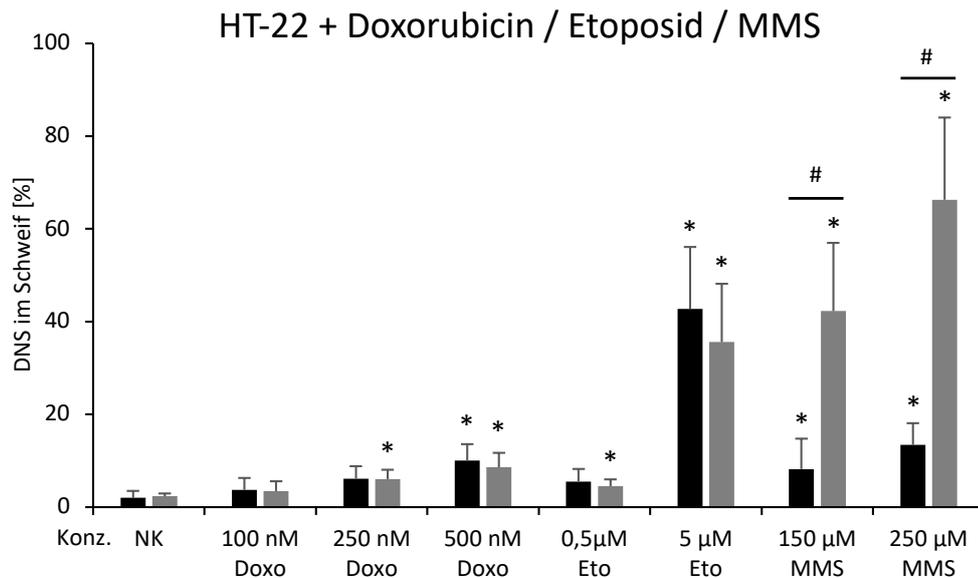


Abbildung 38: Ergebnisse der Einzelzellgelelektrophorese für HT-22-Zellen. Die Zellen wurden mit Doxorubicin (Doxo, 4 h), mit Etoposid (Eto, 1 h) und Methylmethansulfonat (MMS, 4 h) behandelt. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch am Labophot-2 unter 200-facher Vergrößerung unter einem TRITC-Filter (Nikon GmbH; Düsseldorf, DE) unter Verwendung der Software Komet 5 (BFI Optilas; Dietzenbach, DE). Auftragung der Substanzkonzentrationen nach Behandlung der undiff. (schwarze Säulen) und diff. HT-22-Zellen (graue Säulen) gegen den prozentualen DNS-Gehalt im Schweif. \*  $p \leq 0,05$  zur Negativkontrolle (NK); #  $p \leq 0,05$  zwischen undiff. und diff. HT-22-Zellen.

Sowohl nach Behandlung der undiff., als auch der diff. HT-22-Zellen konnten signifikante Zunahmen an DNS-Schäden im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. Bei den undiff. Zellen war ein signifikanter Anstieg bei 500 nM Doxorubicin, 5 µM Etoposid, 150 µM und 250 µM MMS erkennbar. Bei den diff. HT-22-Zellen stellte sich sogar ein Unterschied im Vergleich zur Negativkontrolle nach Behandlung mit 250 nM und 500 nM Doxorubicin, 0,5 µM und 5 µM Etoposid und 150 µM und 250 µM MMS ein. Untereinander wiesen die Zelltypen keine signifikanten Unterschiede nach Behandlung mit Doxorubicin und Etoposid in den behandelten Dosisintervallen auf. Lediglich nach 4-stündiger Behandlung mit 150 µM MMS und 250 µM MMS konnte eine Signifikanz festgestellt werden. Die diff. HT-22-Zellen wiesen dabei eine in etwa 5-fach höhere Sensitivität im Vergleich zu den undiff. HT-22-Zellen gegen das Alkylanz MMS auf.

Des Weiteren wurden auch die Adenokarzinomzelllinie CaCo2 hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber der DNS-schädigenden Wirkung von Doxorubicin, Etoposid und MMS untersucht. Die Behandlung und Zellaufbereitung entsprach dem Schema, mit dem auch die HT-22-Zellen analysiert wurden. Allerdings wurden zusätzlich höhere Dosierungen an Doxorubicin (1.000 nM, 2.500 nM und 5.000 nM) untersucht. Die Ergebnisse der Einzelzellgelelektrophorese zur Detektion des DNS-Schadens kann Abbildung 39 entnommen werden.

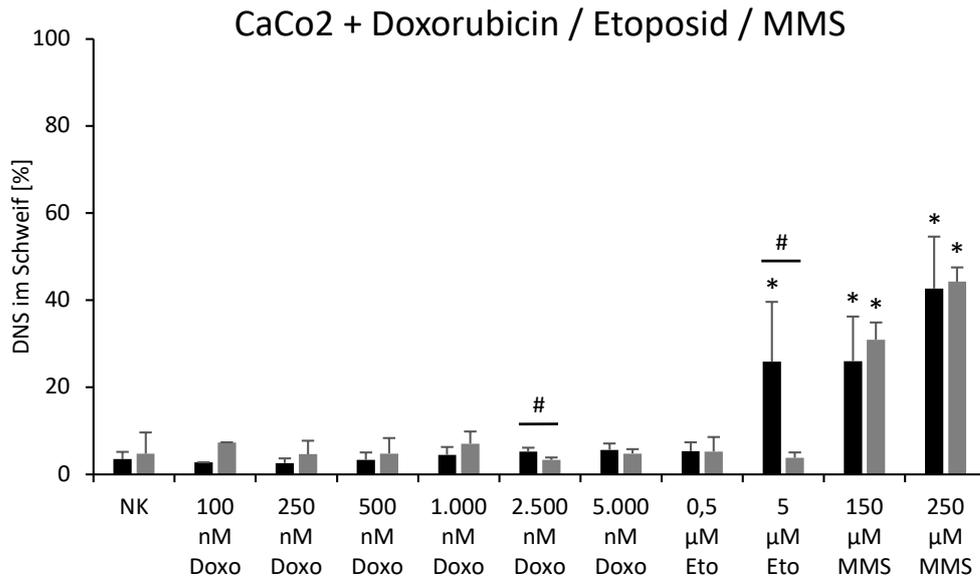


Abbildung 39: Ergebnisse der Einzelzellgelelektrophorese für CaCo2-Zellen. Die Zellen wurden mit Doxorubicin (Doxo, 4 h), mit Etoposid (Eto, 1 h) und Methylmethansulfonat (MMS, 4 h) behandelt. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch am Labophot-2 unter 200-facher Vergrößerung unter einem TRITC-Filter (Nikon GmbH; Düsseldorf, DE) unter Verwendung der Software Komet 5 (BFI Optilas; Dietzenbach, DE). Auftragung der Substanzkonzentrationen nach Behandlung der undiff. (schwarze Säulen) und diff. CaCo2-Zellen (graue Säulen) gegen den prozentualen DNS-Gehalt im Schweif. \*  $p \leq 0,05$  zur Negativkontrolle (NK); #  $p \leq 0,05$  zwischen undiff. und diff. CaCo2-Zellen.

Nach Behandlung mit Doxorubicin konnten weder bei den undiff., noch bei den diff. CaCo2-Zellen signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden, obwohl der Dosisbereich auf bis zu 5.000 nM Doxorubicin erhöht wurde. Hingegen bei MMS wurden bei beiden Zelltypen signifikante Unterschiede erzielt, sodass gezeigt werden konnte, dass sowohl die undiff., als auch die diff. CaCo2-Zellen sensitiv auf das Alkylanz MMS reagiert haben und ein DNS-Schaden hervorgerufen wurde. Nach Substanzbehandlung mit dem Topo II-Inhibitor Etoposid (5 µM) konnte lediglich bei den undiff. CaCo2-Zellen ein signifikanter Anstieg des DNS-Gehaltes im Schweif festgestellt werden. In Abbildung 39 ist ersichtlich, dass zwischen den undiff. und diff. CaCo2-Zellen eine leichte Signifikanz bei 2.500 nM Doxorubicin detektiert wurde. Bei 5 µM Etoposid wurde ein fast 7-fach höherer Schaden bei den undiff. CaCo2-Zellen induziert.

Bei der Leukämiezelllinie HL-60 wurden die diff. und undiff. Zellen in einem engeren Dosispektrum unter Verwendung der Substanzen MMS, Doxorubicin und Etoposid untersucht. Somit sind in Abbildung 40 die Ergebnisse der Einzelzellgelelektrophorese der HL-60-Zellen nach Behandlung mit MMS ersichtlich.

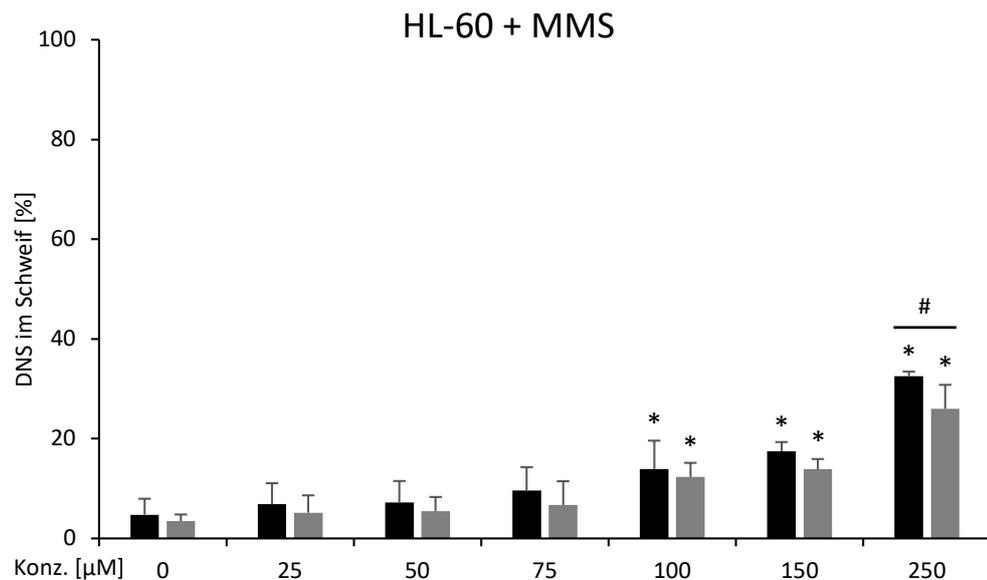


Abbildung 40: Ergebnisse der Einzelzellgelelektrophorese für HL-60-Zellen + MMS. Die Zellen wurden mit Methylmethansulfonat (MMS, 4 h) behandelt. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch am Labophot-2 unter 200-facher Vergrößerung unter einem TRITC-Filter (Nikon GmbH; Düsseldorf, DE) unter Verwendung der Software Komet 5 (BFI Optilas; Dietzenbach, DE). Auftragung der Substanzkonzentrationen nach Behandlung der undiff. (schwarze Säulen) und diff. HL-60-Zellen (graue Säulen) gegen den prozentualen DNS-Gehalt im Schweif. \*  $p \leq 0,05$  zur Negativkontrolle; #  $p \leq 0,05$  zwischen undiff. und diff. HL-60-Zellen.

Mittels der Einzelzellgelelektrophorese konnte bei beiden HL-60-Zelltypen ein signifikanter Anstieg des DNS-Schadens nach Behandlung mit MMS detektiert werden. Dies fand oberhalb einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  MMS statt. Ein signifikanter Unterschied zwischen den undiff. und diff. HL-60-Zellen erfolgte lediglich bei einer Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  MMS. Neben dem Alkylanz MMS wurden die beiden Topo II-Hemmer Doxorubicin und Etoposid untersucht. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 41 und 42 dargestellt.

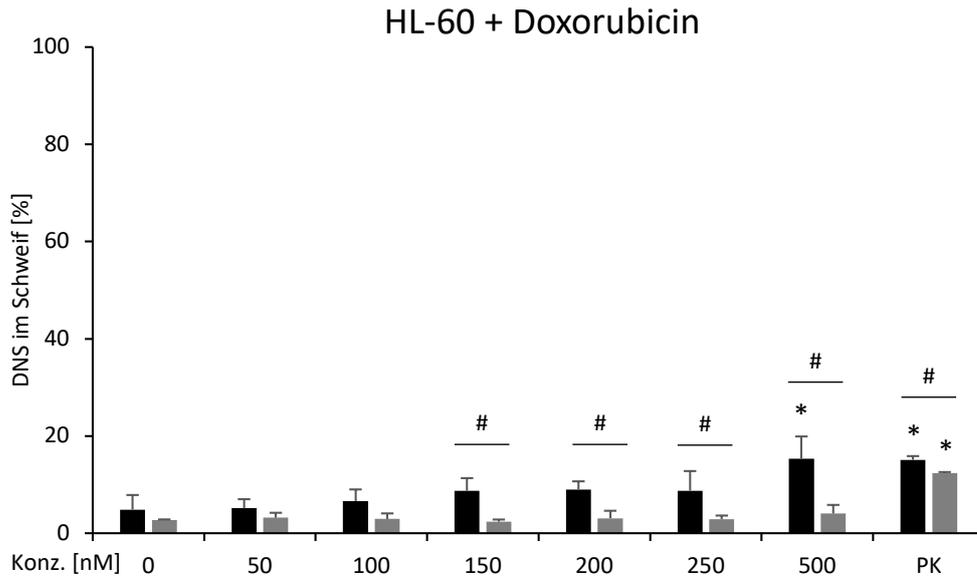


Abbildung 41: Ergebnisse der Einzelzellgelelektrophorese für HL-60-Zellen + Doxorubicin. Die Zellen wurden mit Doxorubicin (4 h) oder der Positivkontrolle (PK; 150  $\mu$ M MMS, 4 h) behandelt. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch am Labophot-2 unter 200-facher Vergrößerung unter einem TRITC-Filter (Nikon GmbH; Düsseldorf, DE) unter Verwendung der Software Komet 5 (BFI Optilas; Dietzenbach, DE). Auftragung der Substanzkonzentrationen nach Behandlung der undiff. (schwarze Säulen) und diff. HL-60-Zellen (graue Säulen) gegen den prozentualen DNS-Gehalt im Schweif. \*  $p \leq 0,05$  zur Negativkontrolle; #  $p \leq 0,05$  zwischen undiff. und diff. HL-60-Zellen.

Das Zytostatikum Doxorubicin führte bei den undiff. HL-60-Zellen zu einem signifikanten Anstieg im Vergleich zur Kontrolle. Dies konnte durch die Erhöhung des DNS-Schadens nach Behandlung mit 500 nM Doxorubicin festgestellt werden, bei den diff. HL-60-Zellen allerdings nicht. Die Positivkontrolle (PK; 150  $\mu$ M MMS, 4 h) erzielte bei beiden Zelltypen eine signifikante Erhöhung des DNS-Schadens. Zwischen den undiff. und den diff. HL-60-Zellen waren signifikante Unterschiede des DNS-Schadens bereits bei einer Konzentration von 150 nM Doxorubicin sichtbar und erstreckten sich bis zur höchsten getesteten Konzentration von 500 nM Doxorubicin. Die undiff. HL-60-Zellen wiesen dabei einen fast 4-fach höheren Schaden im Vergleich zu den diff. HL-60-Zellen auf. Der Topo II-Hemmer Etoposid führte zu einer höheren Schadensinduktion, welche in Abbildung 42 ersichtlich ist.

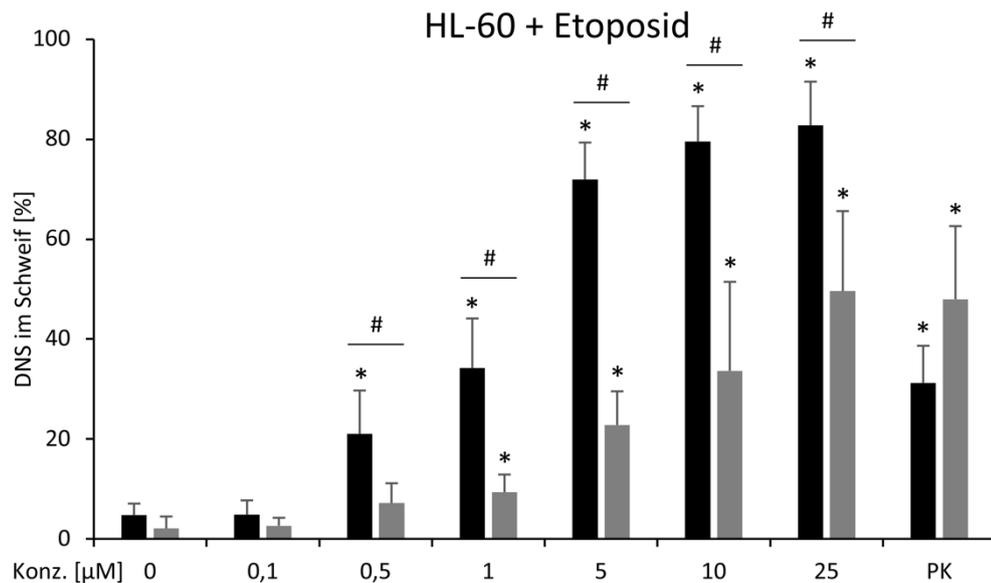


Abbildung 42: Ergebnisse der Einzelzellelektrophorese für HL-60-Zellen + Etoposid. Die Zellen wurden mit Etoposid (1 h) oder der Positivkontrolle (PK; 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30 min) behandelt. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch am Labophot-2 unter 200-facher Vergrößerung unter einem TRITC-Filter (Nikon GmbH; Düsseldorf, DE) unter Verwendung der Software Komet 5 (BFI Optilas; Dietzenbach, DE). Auftragung der Substanzkonzentrationen nach Behandlung der undiff. (schwarze Säulen) und diff. HL-60-Zellen (graue Säulen) gegen den prozentualen DNS-Gehalt im Schweif. \* p ≤ 0,05 zur Negativkontrolle; # p ≤ 0,05 zwischen undiff. und diff. HL-60-Zellen.

Nach der 4-stündigen Behandlung mit Etoposid konnte bei den undiff. HL-60-Zellen ein DNS-Schaden oberhalb von 0,5 µM Etoposid, bei den diff. HL-60-Zellen oberhalb von 1 µM Etoposid kenntlich gemacht werden. Dieser Effekt stieg mit steigender Substanzkonzentration bis zur maximal untersuchten Konzentration von 25 µM Etoposid stetig an. Auch nach Behandlung mit der Positivkontrolle (PK; 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) für 30 min zeigte für beide Zelltypen einen signifikanten Effekt. Da die undiff. HL-60-Zellen bei 25 µM Etoposid einen über 80 %-igen Schaden aufwiesen und bei den diff. HL-60-Zellen der DNS-Anteil am Schweif knapp 50 % betrug, konnten signifikante Unterschiede zwischen den beiden Zelltypen detektiert werden. Somit erstreckte sich der Konzentrationsbereich, in dem signifikante Schadensunterschiede gezeigt werden konnten, von 0,5 µM bis 25 µM Etoposid.

#### 4.3.6 DNS-Schadensreparatur

Zur Untersuchung der Schadensreparatur wurden unterschiedliche Agenzien verwendet. Einerseits wurden die HL-60-Zellen mit UV-Strahlung behandelt und zusätzlich Aphidicolin zugegeben, um bei zellvermittelter Reparatur der durch das UV-Licht induzierten Fotoläsionen die DNS-Strangbrüche offen zu halten. Andererseits wurden DNS-DNS-Quervernetzungen durch die Substanz Mitomycin C hervorgerufen. Quervernetzte DNS weist nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung der Zellen mittels Einzelzellelektrophorese einen geringeren DNS-Schaden auf,

was sich in einer geringeren Schweifausbildung widerspiegelt, als bei Zellen ohne DNS-Quervernetzungen. Es wurden zunächst Konzentrationsbereiche identifiziert, welche eine schädigende Wirkung auf die DNS ausüben. Hierfür wurde  $\text{H}_2\text{O}_2$  verwendet, welches durch seine Fähigkeit Radikale auszubilden zu einer Entstehung von reaktiver Sauerstoffspezies führt. Die Ergebnisse nach Behandlung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  können Abbildung 43 entnommen werden.

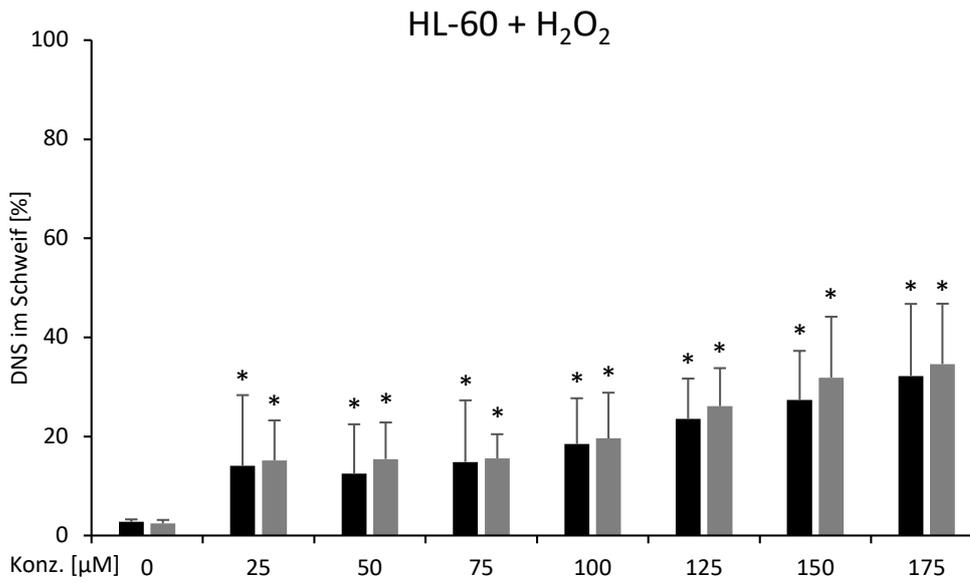


Abbildung 43: Ergebnisse der Einzelzellgelelektrophorese für HL-60-Zellen +  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Die Zellen wurden mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30 min) behandelt. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch am Labophot-2 unter 200-facher Vergrößerung unter einem TRITC-Filter (Nikon GmbH; Düsseldorf, DE) unter Verwendung der Software Komet 5 (BFI Optilas; Dietzenbach, DE). Auftragung der Substanzkonzentrationen nach Behandlung der undiff. (schwarze Säulen) und diff. HL-60-Zellen (graue Säulen) gegen den prozentualen DNS-Gehalt im Schweif. \*  $p \leq 0,05$  zur Negativkontrolle.

Nachdem die undiff. und diff. HL-60-Zellen für 30 min mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  behandelt wurden, konnte bei allen untersuchten Konzentrationen eine signifikante DNS-Schadenserhöhung nachgewiesen werden. Somit erstreckte sich der Bereich von 25  $\mu\text{M}$  bis 175  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Untereinander zeigten die Zellen allerdings keine Unterschiede auf, sodass es zu keiner Signifikanz zwischen den beiden Zelltypen kam. Um für die weiteren Tests mit dem Crosslinker MMC einen Schaden bzw. eine Schadensabnahme detektieren zu können, wurden die Zellen in den nachfolgenden Versuchen mit 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  nachbehandelt. Die Ergebnisse der DNS-Schadensreparatur nach MMC-Behandlung können den Abbildungen 44 und 45 entnommen werden.

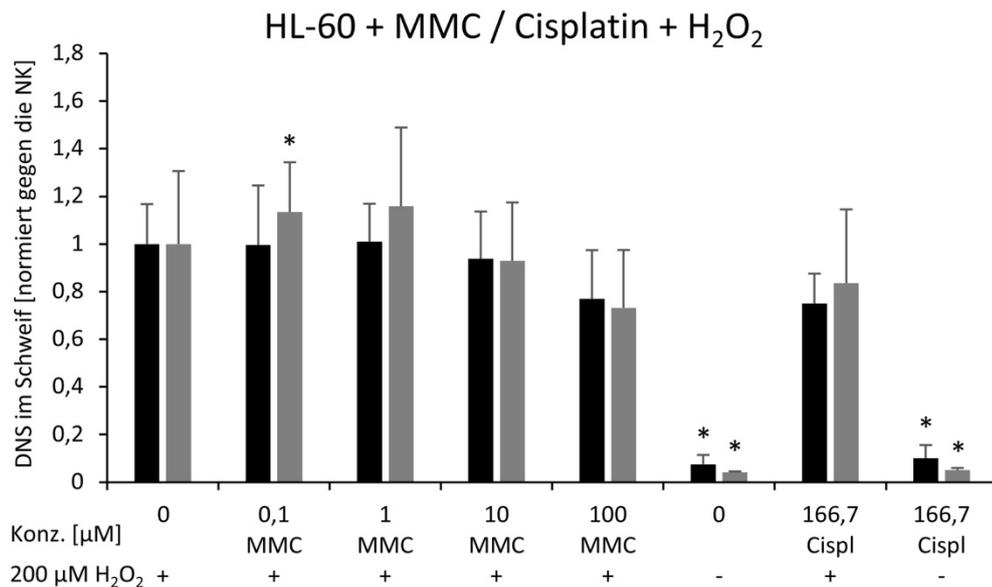


Abbildung 44: Ergebnisse der Einzelzellgelelektrophorese für HL-60-Zellen + MMC/ Cisplatin + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Die Zellen wurden mit Mitomycin C (MMC) bzw. mit der Positivkontrolle Cisplatin (Cispl) für 1 h behandelt und anschließend mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 min) nachbehandelt. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch am Labophot-2 unter 200-facher Vergrößerung unter einem TRITC-Filter (Nikon GmbH; Düsseldorf, DE) unter Verwendung der Software Komet 5 (BFI Optilas; Dietzenbach, DE). Auftragung der Substanzkonzentrationen nach Behandlung der undiff. (schwarze Säulen) und diff. HL-60-Zellen (graue Säulen) gegen den normierten DNS-Gehalt im Schweiß. \* p ≤ 0,05 zur Negativkontrolle.

Nachdem die undiff. bzw. diff. HL-60-Zellen für 1 h mit MMC oder Cisplatin behandelt wurden, wurde im Anschluss für weitere 30 min 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugegeben. Die Crosslinker MMC/ Cisplatin haben zu einer DNS-DNS-Vernetzung geführt. Durch die Zugabe von 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurde ein DNS-Schaden induziert, welcher mittels Einzelzellgelelektrophorese nachgewiesen werden konnte. Da durch die Vernetzung der DNS eine Erniedrigung des durch das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verursachten Schadens erzeugt werden sollte, wurde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Negativkontrolle festgelegt. Cisplatin fungierte in dieser Versuchsreihe als Positivkontrolle und wurde somit alleine oder in Kombination mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugegeben. Bei den diff. HL-60-Zellen fand eine signifikante Erhöhung des DNS-Schadens nach Zugabe von 0,1 µM MMC und 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> statt. Eine Verminderung des DNS-Schadens im Vergleich zur alleinigen Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurde nach Inkubation der undiff. und diff. HL-60-Zellen in Medium alleine und durch die Positivkontrolle Cisplatin ohne Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> erzielt. Zwischen den Zelltypen zeigten sich nach der Behandlung keine signifikanten Unterschiede.

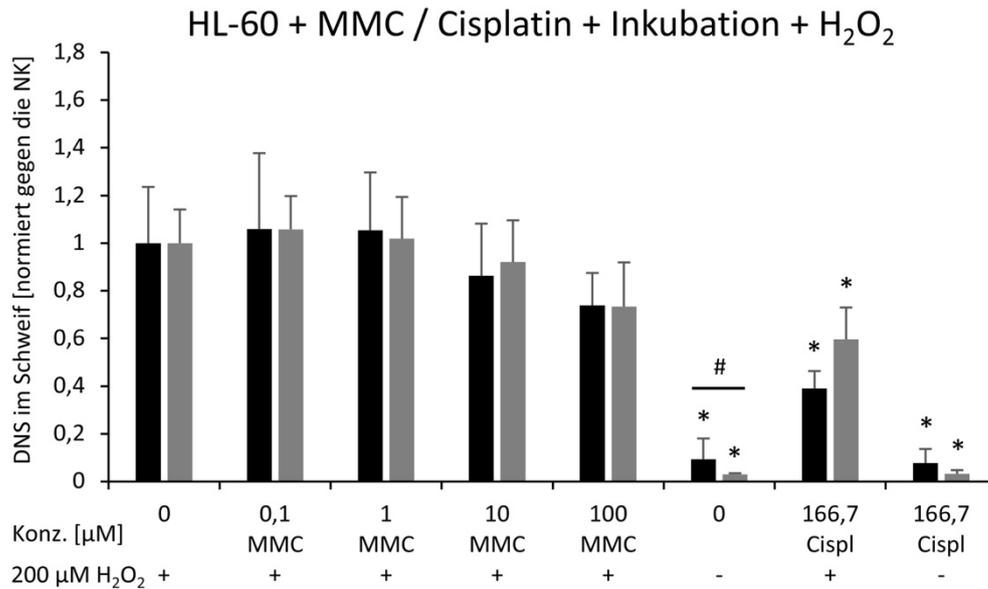


Abbildung 45: Ergebnisse der Einzelzellgelelektrophorese für HL-60-Zellen + MMC/ Cisplatin + Inkubation (4 h) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Die Zellen wurden mit Mitomycin C (MMC) bzw. mit der Positivkontrolle Cisplatin (Cispl) für 1 h behandelt. Nach Entfernung der Substanz mittels Zentrifugation fand eine 4-stündige Inkubation statt bevor mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 min) nachbehandelt wurde. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch am Labophot-2 unter 200-facher Vergrößerung unter einem TRITC-Filter (Nikon GmbH; Düsseldorf, DE) unter Verwendung der Software Komet 5 (BFI Optilas; Dietzenbach, DE). Auftragung der Substanzkonzentrationen nach Behandlung der undiff. (schwarze Säulen) und diff. HL-60-Zellen (graue Säulen) gegen den normierten DNS-Gehalt im Schweiß. \* p ≤ 0,05 zur Negativkontrolle; # p ≤ 0,05 zwischen undiff. und diff. HL-60-Zellen.

Neben der eben beschriebenen Testmethode, wurde die Zellen nach Behandlung mit MMC oder Cisplatin (1 h) von den Substanzen mittels Zentrifugation befreit, bevor eine 4-stündige Inkubation im Brutschrank folgte. Nach dieser Zeit wurden die Zellen für 30 min mit 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt. Die anschließende Einzelzellgelelektrophorese ermöglichte die Darstellung der DNS-Schäden. Sowohl bei den undiff., als auch bei den diff. HL-60-Zellen wurde eine signifikante Abnahme des DNS-Gehaltes im Schweiß bei den Proben detektiert, die mit Medium alleine, Cisplatin alleine und Cisplatin in Kombination mit 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt wurden. Zwischen den Zelltypen zeigte sich lediglich ein signifikanter Unterschied zwischen den Zellen, welche mit Medium alleine inkubiert wurden.

Eine Möglichkeit die Fähigkeit der Zellen hinsichtlich einer DNS-Schadensreparatur zu untersuchen wurde mittels UV-Strahlung und simultaner Behandlung mit Aphidicolin untersucht.

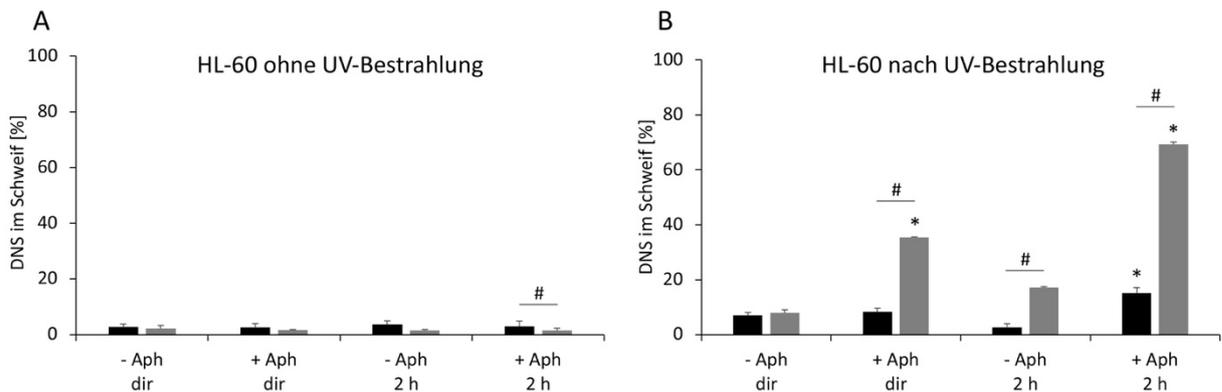


Abbildung 46: Ergebnisse der Einzelzellgelelektrophorese für HL-60-Zellen +/- UV-Bestrahlung und +/- Aphidicolin. Die Zellen wurden mit (+) bzw. ohne (-) Aphidicolin (Aph) behandelt und die nachfolgende Einzelzellgelelektrophorese wurde direkt (dir) oder nach 2-stündiger Nachinkubation im Brutschrank (2 h) durchgeführt. Die Untersuchung des DNS-Anteils im Schweiß wurde zwischen Zellen ohne UV-Behandlung (A) und mit UV-Behandlung (B) verglichen. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch am Labophot-2 unter 200-facher Vergrößerung unter einem TRITC-Filter (Nikon GmbH; Düsseldorf, DE) unter Verwendung der Software Komet 5 (BFI Optilas; Dietzenbach, DE). Auftragung der Proben nach Behandlung mit und ohne Aphidicolin und direkter Untersuchung bzw. nach 2-stündiger Inkubation der undiff. (schwarze Säulen) und diff. HL-60-Zellen (graue Säulen) gegen den prozentualen DNS-Gehalt im Schweiß. \*  $p \leq 0,05$  zur Negativkontrolle; #  $p \leq 0,05$  zwischen undiff. und diff. HL-60-Zellen.

Wie in Abbildung 46 A ersichtlich wurden die undiff. und diff. HL-60-Zellen zunächst ohne UV-Bestrahlung verglichen. Lediglich die Zellen nach Behandlung mit 15  $\mu\text{M}$  Aphidicolin und 2-stündiger Inkubation im Brutschrank führte zu einem signifikanten Unterschied zwischen den beiden Zelltypen. Hinsichtlich einer Signifikanz innerhalb eines Zelltyps kam es weder bei den undiff. HL-60-Zellen, noch bei den diff. HL-60-Zellen zu einem signifikanten Unterschied ohne UV-Bestrahlung. Hingegen nach UV-Bestrahlung (Abbildung 46 B) der Zellen mit 15  $\text{J}/\text{m}^2$  konnte eine signifikante Zunahme des DNS-Schadens unter Anwesenheit von Aphidicolin sowohl nach direkter Untersuchung (dir), als auch nach 2-stündiger Inkubation in Brutschrank (2 h) bei den diff. HL-60-Zellen festgestellt werden. Bei den undiff. HL-60-Zellen erfolgte eine Zunahme des prozentualen DNS-Anteils im Schweiß im Vergleich zur unbehandelten Probe lediglich bei den Zellen, welche mit 15  $\mu\text{M}$  Aphidicolin behandelt wurden und vor der Untersuchung für 2 Stunden inkubiert wurden. Zwischen den beiden Zelltypen konnte ohne Zugabe von Aphidicolin, aber nach 2-stündiger Inkubationsphase, eine Signifikanz festgestellt werden. Nach Behandlung mit Aphidicolin (15  $\mu\text{M}$ ) wurde sowohl nach 2-stündiger Inkubation unter simultaner UV-Bestrahlung (15  $\text{J}/\text{m}^2$ ), als auch bei direkter Kontrolle des DNS-Schadens ein signifikanter Unterschied zwischen den undiff. und diff. HL-60-Zellen festgestellt werden.

### 4.3.7 Reaktive Sauerstoffspezies

Um das Maß von Genomschäden durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu untersuchen, wurden die undiff. und diff. HL-60-Zellen mit den beiden Topo II-Inhibitoren Doxorubicin (4 h) und Etoposid (1 h) behandelt. Die Vermessung der ROS erfolgte auf zwei unterschiedliche Weisen, enzymabhängig und -unabhängig. Hierfür wurden die Zellen nach der Behandlung mittels durchflusszytometrischer enzymabhängiger Detektion mit der DCF-Methode oder mikroskopischer Analyse mittels der enzymunabhängigen DHE-Methode untersucht.

#### 4.3.7.1 DCF-Färbung

Für die Untersuchung der ROS, wurden die HL-60-Zellen mit Doxorubicin für 4 h oder mit Etoposid für 1 h behandelt. 15 Minuten vor Ende der Behandlungszeiten wurde zu jeder Probe 2',7'-Dichlorofluoresceindiacetat mit einer Endkonzentration von 10 µM zugegeben und die Zellen im Inkubator weiter inkubiert. Die weitere methodische Aufarbeitung der Zellen zur Vermessung der ROS am FACS kann Kapitel 3.5.14 entnommen werden. In Abbildung 47 sind die Ergebnisse nach 4-stündiger Behandlung der undiff. und diff. HL-60-Zellen mit Doxorubicin und der Positivkontrolle 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 min) dargestellt.

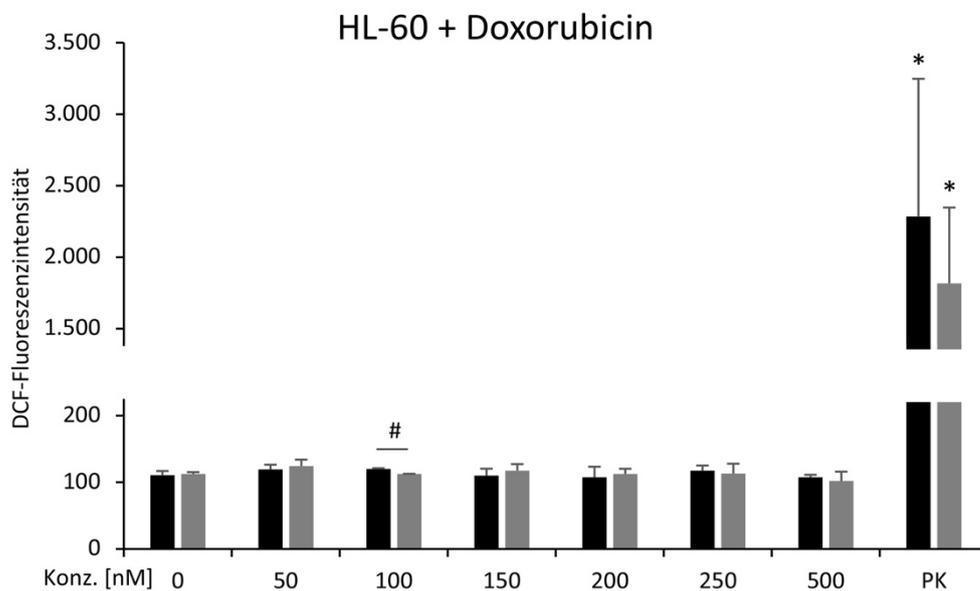


Abbildung 47: Ergebnisse der DCF-Fluoreszenzintensität für HL-60-Zellen nach Doxorubicinbehandlung. Auftragung der Proben nach 4-stündiger Behandlung mit Doxorubicin oder 30-minütiger Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> der undiff. (schwarze Säulen) und diff. HL-60-Zellen (graue Säulen) gegen die DCF-Fluoreszenzintensität. Darstellung von insgesamt 20.000 Ereignissen mit BD-LSR I unter Verwendung des Programms BD CellQuest™ Pro 4.0. \* p ≤ 0,05 zur Negativkontrolle; # p ≤ 0,05 zwischen undiff. und diff. HL-60-Zellen.

Wie in Abbildung 47 ersichtlich, konnte nach Vermessung der reaktiven Sauerstoffspezies am Durchflusszytometer lediglich bei den beiden Positivkontrollen (PK, 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ein signifikanter ROS-Anstieg im Vergleich zur Negativkontrolle detektiert werden. Zwischen den beiden Zelltypen wurde ein signifikanter Unterschied nach Behandlung mit 100 nM Doxorubicin festgestellt. Zudem wurden die HL-60-Zellen mit dem selektiven Topo II-Inhibitor Etoposid für 1 h behandelt und der Effekt auf die undiff. und diff. HL-60-Zellen verglichen. Die Ergebnisse können Abbildung 48 entnommen werden.

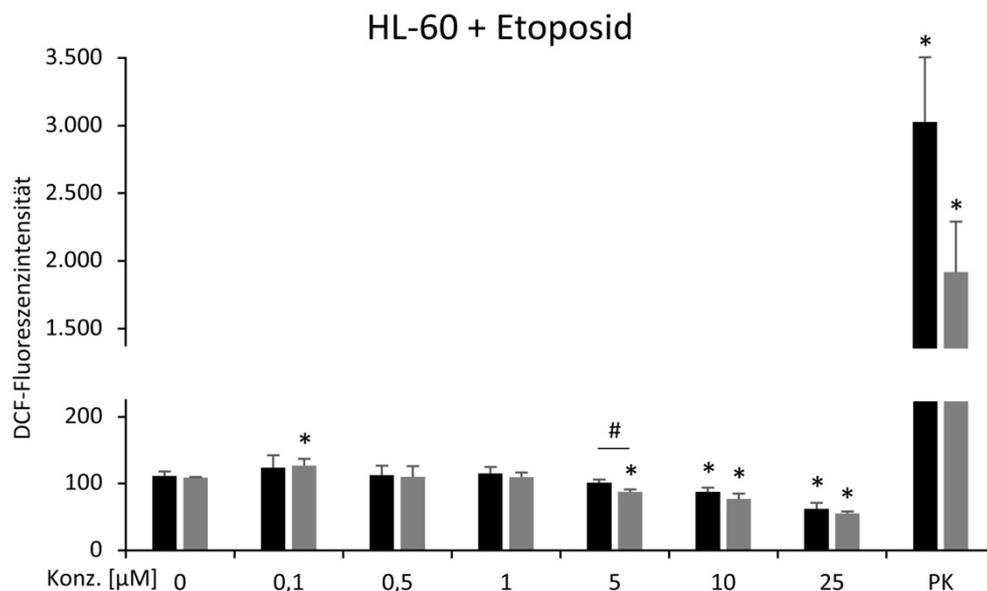


Abbildung 48: Ergebnisse der DCF-Fluoreszenzintensität für HL-60-Zellen nach Etoposidbehandlung. Auftragung der Proben nach 1-stündiger Behandlung mit Etoposid oder 30-minütiger Behandlung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  der undiff. (schwarze Säulen) und diff. HL-60-Zellen (graue Säulen) gegen die DCF-Fluoreszenzintensität. Darstellung von insgesamt 20.000 Ereignissen mit BD-LSR I unter Verwendung des Programms BD CellQuest™ Pro 4.0. \*  $p \leq 0,05$  zur Negativkontrolle; #  $p \leq 0,05$  zwischen undiff. und diff. HL-60-Zellen.

Nachdem die HL-60-Zellen für 1 h mit Etoposid behandelt wurden, zeigte sich für die undiff. HL-60-Zellen eine signifikante Abnahme der DCF-Fluoreszenzintensität oberhalb von 10  $\mu\text{M}$  Etoposid. Nach Behandlung mit der Positivkontrolle (200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ) konnte bei beiden Zelltypen eine Erhöhung der enzymabhängigen DCF-Fluoreszenzintensität nachgewiesen werden. Bei den diff. HL-60-Zellen wurden signifikante Unterschiede nach Behandlung mit 0,1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  und 25  $\mu\text{M}$  Etoposid nachgewiesen. Außerdem konnte eine Signifikanz zwischen den beiden Zelltypen nach Behandlung mit 5  $\mu\text{M}$  Etoposid gezeigt werden, welcher in Abbildung 48 ersichtlich ist.

#### 4.3.7.2 DHE-Färbung

Neben der enzymabhängigen Methode zur ROS-Detektion (DCF-Methode), kann die reaktive Sauerstoffspezies enzymunabhängig bestimmt werden. Hierfür wurde die DHE-Färbung angewandt, welche bereits im Detail in Kapitel 3.5.15 beschrieben wurde. So ergaben sich nach mikroskopischer Auswertung der undiff. und diff. HL-60-Zellen nach Behandlung mit Doxorubicin für 4 h die Versuchsergebnisse, welche Abbildung 49 entnommen werden können.

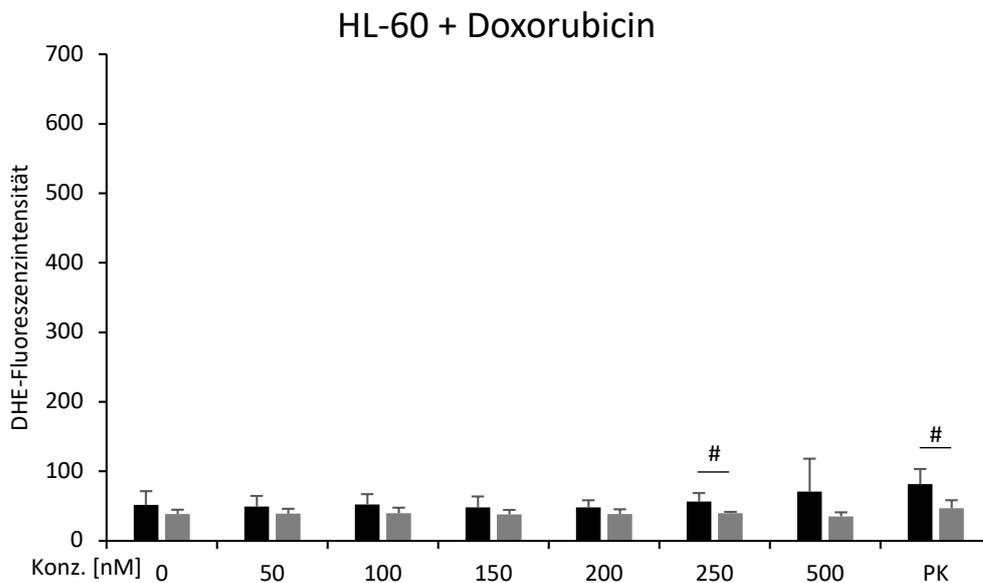


Abbildung 49: Ergebnisse der DHE-Fluoreszenzintensität für HL-60-Zellen nach Doxorubicinbehandlung. Auftragung der Proben nach 4-stündiger Behandlung mit Doxorubicin oder 30-minütiger Behandlung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  der undiff. (schwarze Säulen) und diff. HL-60-Zellen (graue Säulen) gegen die DCF-Fluoreszenzintensität. Darstellung von insgesamt 200 Zellen ( $n=200$ ) nach mikroskopischer Auswertung der Fluoreszenzintensität nach DHE-Färbung unter TRITC-Licht (400-fache Vergrößerung) am Nikon Eclipse 55i (Nikon GmbH; Düsseldorf, DE) und Verwendung der Fluoro Pro MP 5000 Kamera (Intas Science Imaging Instruments GmbH; Göttingen, DE) und des Programms QCapture Pro 5.0.1.26 (QImaging; Surrey, British Columbia, Kanada) für undiff. (schwarze Säulen) und diff. (graue Säulen) HL-60-Zellen. Kodierte Bilderauswertung mittels des Programms Image J 1.46 r. #  $p \leq 0,05$  zwischen undiff. und diff. HL-60-Zellen.

Die Ergebnisse der Auswertung der DHE-Fluoreszenzintensität nach Behandlung mit Doxorubicin ergab für die diff. HL-60-Zellen keine signifikante Veränderung im Vergleich zur Negativkontrolle. Obwohl mit steigender Substanzkonzentration oder Behandlung mit der PK ( $200 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ ) bei den undiff. HL-60-Zellen eine leichte Zunahme der Fluoreszenzintensität ersichtlich war, war diese nicht signifikant. Es konnten allerdings signifikante Unterschiede zwischen den undiff. und diff. Zelltypen nach Inkubation mit  $200 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$  und nach 4-stündiger Behandlung mit  $250 \text{ nM Doxorubicin}$  nachgewiesen werden.

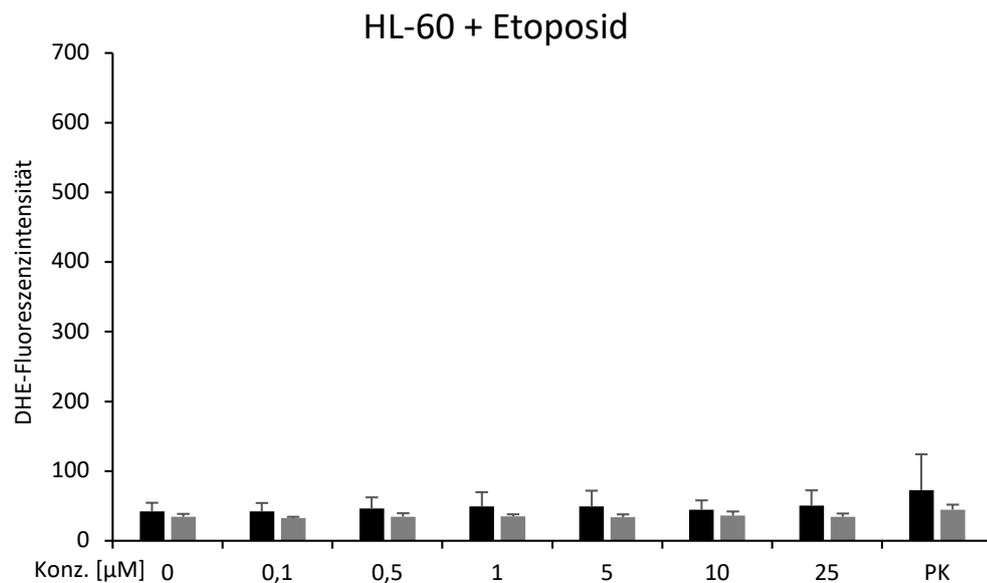


Abbildung 50: Ergebnisse der DHE-Fluoreszenzintensität für HL-60-Zellen nach Etoposidbehandlung. Auftragung der Proben nach 1-stündiger Behandlung mit Etoposid oder 30-minütiger Behandlung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  der undiff. (schwarze Säulen) und diff. HL-60-Zellen (graue Säulen) gegen die DCF-Fluoreszenzintensität. Darstellung von insgesamt 200 Zellen ( $n=200$ ) nach mikroskopischer Auswertung der Fluoreszenzintensität nach DHE-Färbung unter TRITC-Licht (400-fache Vergrößerung) am Nikon Eclipse 55i (Nikon GmbH; Düsseldorf, DE) und Verwendung der Fluoro Pro MP 5000 Kamera (Intas Science Imaging Instruments GmbH; Göttingen, DE) und des Programms QCapture Pro 5.0.1.26 (QImaging; Surrey, British Columbia, Kanada) für undiff. (schwarze Säulen) und diff. (graue Säulen) HL-60-Zellen. Kodierte Bilderauswertung mittels des Programms Image J 1.46 r.

Die Ergebnisse nach Behandlung der HL-60-Zellen mit Etoposid (1 h), welche in Abbildung 50 dargestellt sind, zeigen lediglich bei den undiff. HL-60-Zellen einen leichten Anstieg der enzymunabhängigen DHE-Fluoreszenzintensität, welcher im Vergleich zur Negativkontrolle allerdings nicht signifikant erhöht war. Auch zwischen den beiden Zelltypen konnten keine signifikanten Unterschiede detektiert werden.

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Hämatopoetische Stammzellen im Vergleich zu TK6-Zellen

Krebserkrankungen treten in der heutigen Gesellschaft vermehrt auf und werden somit auch gehäuft diagnostiziert. So hat die WHO die Zahl der Krebsneuerkrankungen in Europa in weltweitem Vergleich als häufigste Erkrankung nachgewiesen [19]. Aus diesem Grund ist es nicht verwunderlich, dass an neuen Therapien zur Krebstherapie geforscht wird. So haben Kadia et al. beispielsweise neue Chemotherapeutika zur Bekämpfung der akuten myeloischen Leukämie verglichen, welche sich bereits in unterschiedlich weit fortgeschrittenen Phasen klinischer Studien befinden [113]. Allerdings wird auch bei der Untersuchung dieser Substanzen lediglich auf den Effekt der Agenzien auf Krebszellen, jedoch nicht auf Vorläuferzellen, wie Primär- oder Stammzellen, eingegangen. Somit ist es von großer Bedeutung die Auswirkung auf Zellen zu untersuchen, welche sich in der Hierarchie-Ebene vor den entarteten Krebszellen befinden. Da die hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) als Vorläufer aller Blutzellen an oberster Stelle der Hierarchie-Ebene stehen, ist davon auszugehen, dass sich die HSZ von immortalisierten Zelllinien oder differenzierten Zellen unterscheiden. Die HSZ besitzen das Potenzial, zu allen Zellen des blutbildenden Systems auszureifen. Dementsprechend wurden diese zunächst mit der humanen B-lymphoblastoiden Zelllinie TK6 verglichen. Um einen Vergleich zwischen hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) und TK6-Zellen zu ermöglichen, wurden die äußeren Faktoren bei allen durchgeführten Versuchen möglichst gleich gehalten. So wurde sowohl die Zelldichte (100.000 Zellen/ml) für die jeweiligen Substanzbehandlungen der Zellen, als auch der Proteingehalt des Mediums durch Zugabe von humanem Serumalbumin (HSA; 2 mg/ml) zum Stammzellmedium an das Medium der TK6-Zellen angepasst. Diese resultierende Konzentration an HSA wurde mittels von Vorversuchen ermittelt. Es ist bekannt, dass die Zelldichte bzw. der Proteingehalt eine toxische Wirkung auf Zellen *in vitro* aufweisen können [114-116], welcher durch die durchgeführten Anpassungen unterbunden wurden. Vandevorde et al., die ebenfalls CD34+ HSZ aus humanem Nabelschnurblut untersucht hatten, verglichen die Effekte nach Bestrahlung der HSZ mit T-Lymphozyten von Neugeborenen und Erwachsenen. Der Proteingehalt der jeweiligen Medien spielte hierbei keine Rolle, da die Zellen nicht mit Substanzen, sondern eine Bestrahlung der Zellen stattgefunden hat. Somit konnte es zu

keinen Wechselwirkungen zwischen den Substanzen und den in den Medien enthaltenen Proteinen kommen. Zudem umgingen sie die Problematik einer zu geringen Zellzahl, indem sie eine Mikrokultur mit einem Volumen von 200 µl in 96-Lochplatten mit einer Zelldichte von 500.000 Zellen/ml nutzten [117]. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen wurde die Einschränkung durch eine zu geringe Zellzahl dadurch umgangen, dass vor dem Mikrokerntest die HSZ 4 d lang vorkultiviert wurden und somit eine ausreichend hohe Zellzahl zur Versuchsdurchführung erreicht werden konnte.

### **5.1.1 Vitalität**

Bei der Untersuchung der Vitalität der HSZ und TK6-Zellen zeigten sich nach 4-stündiger Substanzbehandlung und 20-stündiger Nachinkubation mit Cytochalasin B (CytoB) signifikante Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Zelltypen. So wiesen die TK6-Zellen eine höhere Empfindlichkeit im Vergleich zu den HSZ nach Behandlung mit den Substanzen Doxorubicin, Vinblastin (VBL) und Methylmethansulfonat (MMS) auf. Lediglich die Inkubation der HSZ mit Mitomycin C (MMC) wies eine größere Abnahme der Vitalität im Vergleich zu der humanen B-lymphoblastoiden Zelllinie TK6 auf. Diese Abnahme der Vitalität von TK6-Zellen bei ansteigender Konzentration an MMC konnten auch Kimura et al. durch Färbung der TK6-Zellen mittels Trypanblau nachweisen [118], allerdings konnten bisher keine Erkenntnisse für HSZ gewonnen werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit ermöglichen zunächst keine abschließende Aussage über den Verlust der Lebensfähigkeit der HSZ nach MMC-Behandlung. Es müssten diesbezüglich weitere Untersuchungen durchgeführt werden um eine Aussage tätigen zu können, ob diese Beobachtung auf den chemischen oder mechanistischen Eigenschaften der untersuchten Substanzklasse beruhen.

### **5.1.2 Proliferation**

Des Weiteren konnten mit Hilfe des durchgeführten Mikrokerntests Aussagen über die Proliferation nach Substanzbehandlung und nachfolgender CytoB-Behandlung getroffen werden. Zur Ermittlung der Proliferation kam der Cytochalasin B-Proliferationsindex (CBPI) zum Einsatz, welcher den Anteil der Zellpopulation aufzeigt, der eine Mitose durchlaufen hat. Bei der Durchführung der Mikrokernversuche wurde nach der 4-stündigen Substanzbehandlung eine Nachinkubationszeit mit CytoB von 20 h gewählt. Als Proliferationsindex der Negativkontrolle der HSZ konnte ein Durchschnittswert für den CBPI von  $1,58 \pm 0,10$  bestimmt werden, welcher fast identisch mit dem Wert der von Vandevoorde

et al. untersuchten CD34+ HSZ ( $1,58 \pm 0,13$ ) übereinstimmte, obwohl dessen Behandlungszeit mit CytoB 49 h betrug [117]. Zudem wurde die Proliferation nach Behandlung mit Doxorubicin, Vinblastin, MMS und MMC für die HSZ und die TK6-Zellen dargestellt. Auch bei der Darstellung des Proliferationsindex nach Substanzbehandlung konnte eine signifikante Abnahme detektiert werden, wobei die TK6-Zellen nach Behandlung mit Doxorubicin, VBL und MMS empfindlicher waren als die HSZ. Eine Ausnahme waren wiederum die Zellen nach 4-stündiger MMC-Inkubation und 20-stündiger Nachinkubation mit CytoB. Die HSZ, wie auch die TK6-Zellen zeigten bei einer Konzentration von  $0,5 \mu\text{M}$  MMC einen signifikanten Abfall des CBPI. Somit war auch hier ersichtlich, dass die HSZ und die TK6-Zellen ähnliche Sensitivität gegenüber der DNS-DNS-quervernetzenden Substanz MMC aufwiesen.

### **5.1.3 Apoptose**

Um die Fähigkeit der Testsubstanzen die behandelten Zellen abzutöten, zu untersuchen, wurden sowohl die HSZ, als auch die TK6-Zellen für 4 h behandelt und anschließend für 20 h mit CytoB nachinkubiert. Der nachfolgende Mikrokerntest ermöglichte eine mikroskopische Auswertung des Zellanteils einer Population, welcher nicht mehr als lebende Zellen deklariert werden konnte, da sie apoptotische Körperchen mit kondensierter DNS enthielten und weder einkernige, zweikernige, mehrkernige noch mitotische Zellen waren. Die Zellzahl der Apoptosen wurde innerhalb  $2 \times 1.000$  Zellen quantifiziert. Es konnte eine erhöhte Sensitivität der TK6-Zellen im Vergleich zu den HSZ nach 4-stündiger Behandlung mit Doxorubicin, VBL und MMS nachgewiesen werden. Lediglich nach Behandlung der Zellen mit MMC konnte bei beiden Zelltypen (HSZ und TK6) ein signifikanter Anstieg unter  $1 \mu\text{M}$  MMC im Vergleich zur jeweiligen Kontrollen gezeigt werden. Bei den HSZ wurden sogar höhere Apoptosezahlen pro  $1.000$  Zellen im Vergleich zu den TK6-Zellen bestimmt. Auch Sobol et al. konnten einen leichten Anstieg an apoptotischen Zellen nach 20-stündiger MMC-Behandlung (ca.  $60 \mu\text{M}$  MMC) feststellen, indem sie die apoptotischen Zellen mittels Annexin V am Durchflusszytometer bestimmt hatten. Der prozentuale Wert lag lediglich bei 2 % innerhalb der Zellpopulation [119]. Trotz dieser Erkenntnis sind bisher allerdings kaum Apoptose-Daten zur Behandlung von HSZ bekannt und somit lässt sich zum jetzigen Standpunkt der Untersuchungslage keine endgültige Aussage über die mechanistischen Hintergründe der HSZ nach MMC-Behandlung treffen.

#### 5.1.4 Mitose

Nach Behandlung der HSZ und TK6-Zellen mit Doxorubicin, VBL, MMS und MMC wurden die Zellen nicht nur hinsichtlich ihrer Vitalität, Proliferation und Apoptosezahlen, sondern auch der Mitosezahlen untersucht. Die Zellen wurden entsprechend des Mikrokerntests behandelt, geerntet und ausgewertet. Für die mikroskopische Bestimmung der Mitosen wurden die Zellen innerhalb einer Zellpopulation gezählt, welche sich gerade innerhalb der Zellteilung befanden (Mitosen/ 1.000 Zellen). Das Auftreten von Mitosen im Mikrokerntest gibt Aufschluss über die Fähigkeit der Zelle eine korrekte mitotische Teilung zu vollziehen, Transportprozesse innerhalb der Zelle durchzuführen und Zellbewegungen zu bewerkstelligen [120]. Da diese überlebensnotwendigen Vorgänge für eine Zelle sind, sind jegliche Abweichungen von der Kontrolle als kritisch anzusehen. So wurde bei den Negativkontrollen der HSZ durchschnittlich eine in etwa halb so hohe Zellzahl an Mitosen im Vergleich zu den TK6-Zellen festgestellt. Nach Behandlung der Zellen mit Doxorubicin, MMS und MMC konnte bei beiden Zelltypen eine Abnahme der Mitosezahlen festgestellt werden. Die TK6-Zellen zeigten einen leicht höheren Anteil an mitotischen Zellen nach Behandlung mit Doxorubicin und MMC im Vergleich zu den HSZ. Nach Behandlung der TK6-Zellen für 4 h mit MMS zeigte sich aber bereits bei einer deutlich niedrigeren Konzentration (100  $\mu\text{M}$ ) ein signifikanter Effekt, welcher bei den HSZ erst bei einer Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  MMS ersichtlich war. Somit konnte das Alkylanz MMS einen größeren Effekt auf die TK6-Zellen auswirken, als auf die HSZ. Nach Inkubation der Zellen mit dem Mitosehemmer VBL zeigte sich eine Zunahme der mitotischen Zellen, welcher allerdings bei beiden Zelltypen nicht signifikant ausfiel. Dieser Effekt kann einem Mitosearrest der Zellen nach Substanzbehandlung mit VBL zugeschrieben werden. Da Vinca-Alkaloide bei der Chemotherapie nur eine enge therapeutische Breite mit einem schmalen Wirkungsspektrum besitzen, in dem sie zwar wirksam sind, aber noch zu keinen oder zu geringen Nebenwirkungen führen [121], wurde dieses schmale Konzentrationsfenster bei der Behandlung der Zellen womöglich nicht optimal erfasst. Es ist allerdings deutlich zu erkennen, dass die TK6-Zellen einen höheren Anteil an Mitosen innerhalb der Zellpopulation im Vergleich zu den HSZ aufgewiesen haben. Somit lässt sich auch nach der quantitativen Auswertung der Mitosezahlen die Tendenz erkennen, dass die TK6-Zellen empfindlicher als HSZ auf gentoxische Agenzien reagieren.

### 5.1.5 Mikrokerne

Die Durchführung des Mikrokerntests ermöglicht es eine Aussage über die genotoxischen Eigenschaften der untersuchten Substanzen zu treffen, da die Mikrokernelinduktion als eine Art der chromosomalen Mutation angesehen wird [122]. Da für die Mutagenitätstestung seit langem bekannte Zelllinien, wie die TK6-Zellen verwendet werden, ist es von großer Bedeutung die Durchführbarkeit des Mikrokerntests auch mit hämatopoetischen Stammzellen zu gewährleisten, da diese bisher kaum untersucht wurden.

Bisher haben Vandevorde et al. und Abernathy et al. Mikrokerntestansätze mit HSZ durchgeführt. Vandevorde et al. haben im Gegensatz zu den für diese Arbeit durchgeführten Untersuchungen (50.000 Zellen/ 0,5 ml) den Mikrokerntest lediglich als einen Assay in einer Mikrokultur durchgeführt. Die HSZ wurden in einem Volumen von nur 200 µl inkubiert. Auch die Nachinkubationszeit mit CytoB betrug 49 h [117], wohingegen in dieser Arbeit eine Substanzbehandlungszeit von 4 h und eine Nachinkubationszeit mit CytoB von 20 h stattgefunden hat. Auch Abernathy et al. haben den Versuch mittels einer variablen Form des Mikrokerntests, allerdings ohne CytoB-Zugabe, durchgeführt. Die Beschränkungen einer zu niedrigen Zellzahl wurde dadurch umgangen, indem alle Zellen einer Zellpopulation auf das Vorhandensein von Mikrokerneln untersucht wurden und nicht nur die Zellen, welche tatsächlich eine Mitose durchlaufen hatten [123]. Der in dieser Arbeit durchgeführte Test beschränkte sich allerdings lediglich auf Zellen, welche genau eine Mitose durchlaufen haben, da diese doppelkernigen (DK) Zellen den Mikrokerneln ohne das Vorhandensein von CytoB an die Tochterzelle weitergegeben hätten [124, 125]. Die basale Mikrokernelrate lag bei den HSZ bei  $5,5 \pm 2,8$  nach 20-stündiger Inkubation mit CytoB. Vandevorde et al. fanden in ihren CD34+ HSZ 11 Mikrokerne pro 1.000 DK-Zellen, was eine doppelt so hohe Rate im Vergleich zu den durch uns aufgezeigten HSZ darstellt [117]. Abernathy et al. detektierten  $1,9 \pm 0,3$  Mikrokerne/ 1.000 HSZ-Zellen, welche dem Blut von zehn Spendern entnommen wurden. Diese Zahl kann allerdings nicht mit den anderen Untersuchungsdaten verglichen werden, da kein CytoB zugegeben wurde. Die Zugabe von CytoB kann die Zellproliferation zwar nicht beeinflussen, allerdings ist die Auswertung einer Zellpopulation mit guter Proliferation deutlich einfacher, da ein hoher Prozentsatz an DK-Zellen bei quantitativer Auswertung der Objektträger schneller erreicht werden konnte. Bei den TK6-Zellen wurde eine höhere Mikrokernelrate von  $17,2 \pm 4,5$  Mikrokerneln/ 1.000 DK-Zellen festgestellt. Je nach Behandlungsschema können unterschiedliche basale Raten an mikrokernelhaltigen Zellen

auftreten. Lovell et al. zeigten für TK6-Zellen unterschiedliche Bereiche auf, welche sich von 3,2 - 13,8 Mikrokernen/ 1.000 DK-Zellen erstrecken können [126]. Für Mutagenitätsuntersuchungen werden genetisch stabile Zelllinien bevorzugt verwendet, die weniger als 20 Mikrokern/ 1.000 Zellen enthalten. Die Untersuchung der mikrokernhaltigen Zellen zeigte je nach Substanz unterschiedliche Ergebnisse. Sowohl nach Behandlung der TK6-Zellen mit Doxorubicin, VBL und MMS konnte eine deutlich höhere Mikrokernrate nach Substanzbehandlung im Vergleich zu den HSZ nachgewiesen werden. So zeigten die TK6-Zellen nicht nur einen Anstieg bei niedrigeren Substanzkonzentrationen, sondern erzielten auch höhere prozentuale Werte innerhalb der Zellpopulationen. Dies konnte auch nach Behandlung mit MMC gezeigt werden, allerdings zeigten sowohl die HSZ, als auch die TK6-Zellen eine vergleichbare Sensitivität ab einer Konzentration von 0,1  $\mu\text{M}$  MMC.

Da die hier getesteten HSZ in gewissem Maße bereits differenziert sind, kann es auch im Verlauf der Kultivierung zu weiteren Differenzierungsvorgängen gekommen sein. Milyavsky et al. postulierten, dass die DNS-Schadensreaktion in HSZ durch den Reifegrad innerhalb der noch heterogenen Zellpopulation beeinflusst wird [127]. Die für Untersuchungszwecke verwendete Zelllinie TK6 ist eine humane B-lymphoblastoide Zelllinie, welche sich in der Zellhierarchie viele Entwicklungsstadien nach den HSZ befinden. Nach vollständiger Genomsequenzierung sind die TK6-Zellen allerdings sehr nahe an einem menschlichen Standardgenom, da sie Mutationen beinhalten, welche auch als Polymorphismen in der menschlichen Bevölkerung auftreten [128]. Somit kann davon ausgegangen werden, dass ein Vergleich zwischen den HSZ und den TK6-Zellen als möglich erscheint. Die beschriebenen Effekte, dass die TK6-Zellen empfindlicher als HSZ auf genotoxische Agenzien reagieren, konnte in einigen Studien mit Hilfe einer modifizierten Form der Einzelzellgelelektrophorese nachgewiesen werden. So zeigten TK6-Zellen eine höhere Empfindlichkeit für Aphidicolin als andere Zelllinien. Der detektierte DNS-Schaden zeigte eine Anhäufung von DNS-Einschnitten auf und dadurch konnte eine gehemmte DNS-Reparatursynthese der TK6-Zellen postuliert werden [129]. Von Stammzellen wird angenommen, dass sie ihre genomische Integrität kontrollieren [130, 131], obwohl die Chromatin-Neugestaltung innerhalb der Differenzierungs- oder Proliferationsprozesse Phasen oder Situationen erhöhter DNS-Schäden beinhalten können. Dieser Effekt scheint mit einem Wandel der DNS-Schadensreaktionssysteme in Verbindung zu stehen. Wie von Vandevoorde et al. diskutiert, häufen sich die Beweise dafür, dass Stammzellen mit einer sehr effizienten DNS-

Schadensreparatur ausgestattet sind [117]. In humanen HSZ, bei denen phosphorylierte Histone ( $\gamma$ -H2AX) als Marker für DNS-Schäden verwendet wurden, konnte festgestellt werden, dass die DNS-Reparaturkapazität im Vergleich zu reifen Lymphozyten erhöht war [132]. Zudem erfolgte durch eine erhöhte Aktivierung der CHK1-Signalisierung eine Kontrolle der Zellen und somit eine Inhibierung der Proliferation, falls keine fehlerfreie DNS-Reparatur stattgefunden hat [133]. Dies kann eine Erklärung dafür sein, dass die Proliferation der HSZ nach Behandlung mit MMC in gleichem Maß wie bei den TK6-Zellen vermindert war. Auch die Häufigkeit von mikrokernhaltigen Zellen, die als Basalniveau nachgewiesen wurde, kann durch den Differenzierungszustand oder durch die Zellkulturbedingungen beeinflusst werden, die den physiologischen Bedingungen in Stammzellnischen im menschlichen Körper oder im Blutkreislauf nicht ausreichend ähneln. Insbesondere die Konzentration an Sauerstoff und oxidativem Stress hat sich als sehr relevant erwiesen, da die Rekrutierung von Stammzellen zur Proliferation und Differenzierung zumindest teilweise durch reaktive Sauerstoffspezies vermittelt wird [134, 135]. Durch die Aktivierung von hämatopoetischen Stammzellen von Mäusen und dem daraus resultierenden Eintritt der Zellen in den Zellzyklus wurde ein Anstieg an DNS-Strangbrüchen und eine erhöhte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies beobachtet [136]. Zudem hat die Glukosekonzentration des Kulturmediums einen Einfluss auf die zellulären ROS-Werte. Diese üben einen Effekt auf die Mitochondrien in menschlichen mesenchymalen Stammzellen aus [137]. Auch andere undiff. Zellen, wie die Stromazellen des menschlichen Knochenmarks benötigen eine Selenergänzung, um die antioxidative Kapazität wiederherzustellen und die basale Mikrokernfrequenz während der *In-vitro*-Kultur zu reduzieren [138]. Da hohe ROS-Werte dafür bekannt sind DNS-Schäden zu verursachen [139], erscheint es nicht verwunderlich, dass immortalisierte pluripotente Stammzellen (iPSCs) als Träger hochregulierter antioxidativer Proteine gefunden wurden [140]. Daher ist die Aufrechterhaltung des ROS-Spiegels für Stammzellen noch entscheidender als für normale Primärzellen oder transformierte Zelllinien.

Insgesamt konnte durch die Versuchsergebnisse dieser Arbeit eine geringere Empfindlichkeit der HSZ gegenüber den genotoxischen Substanzen Doxorubicin, Vinblastin und Methylmethansulfonat im Vergleich zur Zelllinie TK6 nachgewiesen werden. Lediglich das Alkylanz Mitomycin C zeigte vergleichbare Effekte bei den beiden Zelltypen nach Substanzbehandlung auf. Zudem konnte mit Hilfe der Untersuchungen eine Widerlegung der

Befürchtung ermöglicht werden, dass die lymphoblastoide Zelllinie TK6 als Standard für Genotoxizitätsuntersuchungen nicht genügen würde. Wenn HSZ für ein Standard-Mikrokerntestprotokoll weiterentwickelt werden sollen, wäre allerdings eine tiefergehende Charakterisierung der Sensitivitäten von Subtypen sinnvoll.

## 5.2 Leukämiezelllinie HL-60

Die Effekte der zytotoxischen Substanzen Doxorubicin, Vinblastin, Methylmethansulfonat und Mitomycin C auf hämatopoetische Stammzellen und humane B-lymphoblastoide TK6-Zellen wurden untersucht und beschrieben. Da diese Substanzen allerdings zur Bekämpfung von Krebserkrankungen zum Einsatz kommen, wurden ausführliche Untersuchungen an der Leukämiezelllinie HL-60 durchgeführt. Es wurde zunächst insbesondere der Einfluss der Substanzklasse der Vinca-Alkaloide auf die Vitalität, die Proliferation, die Apoptose, die frühe Apoptose und auf den Zellzyklus der HL-60-Zellen analysiert. Klassische Vinca-Alkaloide, wie Vinblastin (VBL), Vincristin (VCR) oder Vinorelbin (VRB), zeigen eine Reihe von Nebenwirkungen, wie Knochenmarks- und Neurotoxizität, welche je nach Ausprägung häufig zu Therapieabbrüchen führen [141]. Diese Nebenwirkungen beruhen wahrscheinlich auf unterschiedlichen Wirkungsmechanismen, wobei die Interferenz mit Mikrotubuli mit Sicherheit die wichtigste ist [49, 142]. Mikrotubuli sind an den Transportprozessen innerhalb einer Zelle, der korrekten mitotischen Teilung und der Zellbewegung beteiligt [120]. Substanzen, wie Vinca-Alkaloide, die eine tubulinstörende Wirkung haben, destabilisieren Mikrotubuli und verhindern gleichzeitig die Tubulinpolymerisation [64, 143]. Vinca-Alkaloide, vor allem aber Vincristin, sind mit peripherer Neuropathie assoziiert, die eine Woche nach der Therapie mit einer Inzidenz von mehr als 50 % einhergeht. Sie beruht auf der Blockade von axonalen Transportprozessen und führt zu einer axonalen Degeneration. Gidding et al. beschrieben die kumulative Toxizität von Vincristin auch als Ursache der Neuropathie und dass die einzige Möglichkeit, Neurotoxizität zu verhindern, eine Dosisreduktion oder eine Unterbrechung der Therapie sei [49, 142]. Aus diesem Grund ist es notwendig, neuartige Vinca-Alkaloide zu entwickeln, welche weniger Nebenwirkungen aber zugleich eine ähnliche Wirksamkeit aufweisen. 4-Chlorochablastin (4CBL) und 4-Chlorochacristin (4CCR) sind zwei Beispiele für solche neuartigen Vinca-Alkaloide. Ihre  $\alpha,\beta$ -ungesättigten aromatischen Seitenketten könnten möglicherweise einen Einfluss auf die Halbwertszeiten haben, dadurch die Intervalle zwischen den Therapien verlängern und somit weniger neuronale

Nebenwirkungen hervorrufen. Hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität wurden diese neuartigen Alkaloide neben anderen neu synthetisierten Vinca-Alkaloiden durch Ngo et al. bisher lediglich hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Zellzahl einiger getesteter Zelllinien charakterisiert [64]. Aus diesem Grund wurden zwei ausgewählte Verbindungen, 4-Chlorochablastin und 4-Chlorochacristin detaillierter untersucht, aber auch die Substanzen 16a, 17b und 18a in die Untersuchungen einbezogen. Dabei wurde ein besonderes Augenmerk auf die Vitalität, die Proliferation, die Apoptose und den Zellzyklus nach Substanzbehandlung der HL-60-Zellen gelegt.

### 5.2.1 Vitalität

Die Vitalität der Zellen nach Substanzbehandlung kann als Maß der Zytotoxizität angenommen werden. Je geringer der Gehalt an vitalen Zellen innerhalb einer Zellpopulation war, desto zytotoxischer war die Substanz. Aus diesem Grund wurde die Vitalität der HL-60-Zellen nach Behandlung mit den verschiedenen Vinca-Alkaloiden verglichen. So zeigten VBL, VCR und VRB ähnliche Effekte bereits bei einer Konzentration von 10 nM. Innerhalb der klassischen Vinca-Alkaloide bewirkte lediglich Vinflunin (VFL) eine signifikante Vitalitätsabnahme ab einer Konzentration von 100 nM. Dieser Effekt ist vergleichbar mit den Untersuchungen der murinen Urothel-Karzinom-Zelllinie MB-49, welche eine in etwa 7-fach schwächere Zytotoxizität durch VFL im Vergleich zu VRB aufwies. Die  $IC_{50}$ -Werte lagen bei VRB bei 60 nM und bei VFL bei 400 nM. Zudem starben laut Bonfil et al. bei den weiblichen C57Bl/6-Mäusen mit Blasenkarzinom die meisten mit VRB behandelten Mäuse vor dem 32. Tag, wohingegen von den Mäusen, welche mit VFL behandelt wurden nur in etwa 50 % der Mäuse nach dem 60. Tag verstarben [144]. Zhang et al. haben ebenfalls mit drei neuen Vinca-Alkaloiden, den monoterpenoiden Indolalkaloiden Vinmajorin C, D und E und 18 weiteren Analoga erste Zytotoxizitätsuntersuchungen an fünf verschiedenen Zelllinien durchgeführt. Sie konnten allerdings nur mit zwei Substanzen (Vinmajorin C und E) bei der humanen Adenokarzinom-Zelllinie der Lunge A-549 eine moderate Zytotoxizität ( $IC_{50}$  19,86  $\mu$ M und 34,89  $\mu$ M) nach Durchführung des MTT-Assays nachweisen. Bei den HL-60-Zellen und den anderen drei Zelllinien wurde keine Zytotoxizität detektiert [145]. Vergleicht man allerdings die Ergebnisse der Vitalitätstests der neu synthetisierten Substanzen 4CBL und 4CCR mit den Daten der klassischen Vinca-Alkaloide, so kann von ähnlicher Zytotoxizität ausgegangen werden, da auch hier erste vielversprechende Effekte bei 100 nM ersichtlich waren. Die

Substanz 18a zeigte hingegen bereits ab der ersten getesteten Konzentration signifikante Daten, sodass diese Substanz als das potentestes neu synthetisiertes Vinca-Alkaloid eingestuft werden konnte. Die beiden anderen Substanzen (16a und 17b) zeigte kaum Effekte, sodass sie durch die in dieser Arbeit durchgeführten Vitalitätsuntersuchung nicht als zytotoxisch eingestuft werden können.

### 5.2.2 Proliferation

Ein weiterer Indikator für die Zytotoxizität sind Veränderungen des Cytochalasin B-Proliferationsindex (CBPI). So zeigten die klassischen Vinca-Alkaloide VBL, VCR und VRB eine Verminderung bereits bei 10 nM. Auch hier zeigte VFL die niedrigste Potenz, da erste Effekte bei 100 nM erzielt werden konnten. Ähnliche Ergebnisse für die klassischen Substanzen wurden auch von Jean-Decoster et al. nachgewiesen. Sie setzten die männliche Ratten-Känguru-Nierenepithelzelllinie PtK2 über einen Zeitraum von 48 h einer Reihe von Konzentrationen aus und ermittelten die Proliferation mit Hilfe eines MTT-basierten kolorimetrischen Assays. VBL zeigte die höchste Zytotoxizität, gefolgt von VCR und VRB. Im Vergleich dazu zeigte VFL ähnliche Ergebnisse erst bei 10-fach höheren Konzentrationen [146]. Die beiden Substanzen 4CBL und 4CCR zeigten erst bei einer Konzentration von 1.000 nM eine signifikant verminderte Proliferation auf, sodass von einer 10x niedrigeren Zytotoxizität der Substanzen im Vergleich zu VLF und einer 100x niedrigeren Potenz im Vergleich zu den klassischen Vinca-Alkaloiden VBL, VCR und VRB ausgegangen werden kann.

### 5.2.3 Apoptose

Für die Auswertung der Fähigkeit der Vinca-Alkaloide eine Apoptose zu induzieren, wurden die HL-60-Zellen wie für einen Mikrokerntest behandelt, auf Objektträger aufgebracht und morphologisch am Mikroskop ausgewertet. Innerhalb der klassischen Vinca-Alkaloide zeigte VBL bereits bei einer Konzentration von 10 nM maximale Wirkung in Bezug auf morphologisch nachgewiesene apoptotische Zellen. Die anderen Substanzen wiesen unterschiedliche Wirkungsgrößen auf, die von nahezu maximaler bis hin zu keiner Wirkung reichten. Die Substanz mit der geringsten Potenz war wiederum VFL, welche signifikante Effekte erst ab einer Konzentration von 100 nM aufwies. Die neuartigen Substanzen zeigten ähnliche Effekte bei einer 10-fach höheren Konzentration im Vergleich zu den anderen klassischen Vinca-Alkaloiden, wobei 4CBL eine etwas höhere Wirkung zeigte als 4CCR. Ngo et al. beschrieben ähnliche  $IC_{50}$ -Werte in KB-Tumorzellen (humanes Epidermoidkarzinom) für 4CBL ( $0,06 \mu\text{M} \pm$

0,003), 4CCR (0,03  $\mu\text{M} \pm 0,004$ ), VBL (0,02  $\mu\text{M} \pm 0,005$ ) und VCR (0,02  $\mu\text{M} \pm 0,001$ ) nach einer Inkubationszeit von 72 h. Für andere Zelllinien, wie LU-1 (menschlicher Lungenkrebs), MCF7 (menschlicher Brustkrebs) oder HepG2 (hepatozelluläres Karzinom) waren die Medikamentenkonzentrationen, welche für die Hemmung der 50%igen Zellproliferation durch die neuartigen Vinca-Alkaloide erforderlich waren viel höher, um die gleichen Effekte zu erzielen [64, 143].

#### 5.2.4 Frühe Apoptose

Um eine Aussage über die frühe Apoptose treffen zu können, wurde die Leukämiezelllinie HL-60 mit den entsprechenden Vinca-Alkaloiden für 24 h behandelt, bevor eine durchflusszytometrische Apoptosedetektion stattfand. Hier zeigten die neuartigen Vinca-Alkaloide 4CBL und 4CCR eine Zunahme der apoptotischen Zellen bei 100 und 1.000 nM, während dies bei den klassischen Vinca-Alkaloiden Vinblastin, Vincristin und Vinorelbin bereits bei 10 nM und 100 nM beobachtet wurde. Vinflunin zeigte wiederum eine geringere Wirksamkeit als die anderen klassischen Vinca-Alkaloide und war dementsprechend mit den neu synthetisierten Substanzen vergleichbar. Für die Substanz 18a konnte ein vergleichbarer Effekt wie bei den VFL, 4CBL oder 4CCR aufgezeigt werden. Die neuartige Substanz 16a konnte erst bei einer Konzentration von 10.000 nM einen signifikanten Anstieg frühapoptotischer Zellen induzieren, welcher bei dem Vinca-Alkaloid 17b komplett ausblieb. Die Ergebnisse dieser Methode entsprachen den Daten der morphologischen Apoptosedetektion, wobei für diese Auswertung eine höhere Zellzahl (30.000 Zellen) untersucht werden konnte. Zellen, welche der frühen Apoptose zugeordnet werden, können von Zellen unterschieden werden, welche der Kategorie einer Nekrose oder späten Apoptose zugeordnet werden könnten. Somit lässt sich darüber hinaus eine Aussage über die Membranintegrität und die Lokalisation des Phosphatidylserins (PS) treffen und eine aussagekräftige Unterscheidung zwischen den Kategorien treffen. So besitzen die frühapoptotischen Zellen eine intakte Membran, allerdings ist die Asymmetrie der PS-Lokalisation verloren gegangen, da diese Zellen das PS sowohl auf der Innenseite, als auch auf der Außenseite der Membran tragen und somit ein Signal für eine Infiltration durch die Phagozyten darstellen. Dieser Mechanismus ermöglicht eine frühzeitige Befreiung des Organismus von nicht vitalen Zellen [109].

### 5.2.5 Zellzyklusanalyse

In der Zellzyklusanalyse lag der relative Anteil für die Negativkontrolle (und die niedrigen Konzentrationen der Vinca-Alkaloide) zwischen den verschiedenen Zellzyklusphasen bei etwa 55:15:30 für die Zellen in der G1-, S- und G2/M-Phase. Ähnliche Werte für G1 wurden von Zucker et al. gemessen. Sie testeten Zellzyklusveränderungen in der promyelozytischen Zelllinie HL-60 nach 21 h Inkubationszeit, wohingegen die Inkubationszeit bei den Versuchen für diese Arbeit 24 h betrug. Sie zeigten, dass Substanzen wie DMSO, Buttersäure oder Retinsäure aufgrund der Differenzierung zu einem partiellen G1-Stillstand führten. Daher haben wir eine maximale DMSO-Konzentration von 0,1 % verwendet, um diesen G1-Phasenstopp zu verhindern [147]. Zudem sollten Differenzierungsprozesse der HL-60-Zellen verhindert werden, welche durch Collins et al. für eine DMSO-Konzentration von über 1 % beschrieben wurden [80]. Die Behandlung mit den verschiedenen Vinca-Alkaloiden in höheren Konzentrationen (10 nM und 100 nM VBL, VCR und VRB und 100 nM VFL und 100 nM und 1.000 nM 4CBL und 4CCR und 1.000 und 10.000 nM 18a) führten zu einem graduellen Rückgang der Zellen in den Phasen G1 und S und zu einem Anstieg der Zellen in den Phasen G2/M, was darauf hindeutet, dass die Zellen in G2/M arretiert waren. Bei den klassischen Vinca-Alkaloiden wurde dies durch Studien bereits belegt [148]. Die Substanzen 16a und 17b übten keinen Einfluss auf die akute promyelozytische Leukämiezelllinie HL-60 aus und führten somit auch zu keiner Zellzyklusverschiebung nach Substanzbehandlung.

Insgesamt zeigten die neuartigen Vinca-Alkaloide 4-Chlorochablastin und 4-Chlorochacristin Wirkungen, die qualitativ mit denen der klassischen Vinca-Alkaloide vergleichbar sind. Die Substanz 18a spiegelte diese Effekte anteilig wieder. Im Allgemeinen ist die Potenz allerdings niedriger als bei Vinblastin, Vincristin und Vinorelbin, aber ungefähr im gleichen Bereich wie Vinflunin, welches allerdings auch in der klinischen Praxis für die Behandlung von transitionalem Urothelzellkarzinom, nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom und Brustkrebs eingesetzt wird, aber auch eine hohe Aktivität in einem weiten Spektrum von soliden Tumoren zeigt. Die Ergebnisse dieser Arbeit können als erste Indikation in vitro genommen werden, dass sich diese Substanzen in der Krebstherapie als wirksam erweisen könnten. Wenn sie weniger Nebenwirkungen zeigen würden, könnten 4-Chlorochablastin, 4-Chlorochacristin und womöglich auch das Vinca-Alkaloid 18a für die Entwicklung von therapeutischen Alternativen in Betracht gezogen werden. Weitere Forschungsarbeiten müssten sich mit der Frage

befassen, ob es zelltypspezifische Unterschiede gibt, welche insbesondere bei neuronalen Zellen auftreten, und ob diese Ergebnisse auch in vivo beobachtet werden.

### **5.3 Exponentiell wachsende Zelllinien im Vergleich zu differenzierten Zelllinien**

Da genotoxische Substanzen, wie zum Beispiel Zytostatika, nicht nur die Krebszellen, sondern auch die gesunden Zellen des menschlichen Körpers angreifen, ist es besonders wichtig den Effekt dieser Substanzen auf Zellen zu untersuchen, welche weiter ausdifferenziert sind. Aus diesem Grund wurden neben Zelllinien, welche üblicherweise zu Testzwecken verwendet werden, auch weiter ausdifferenzierte Formen dieser Zellen untersucht. Es kamen neben Krebszelllinien, wie der humanen akuten promyelozytische Leukämiezelllinie HL-60 und der humanen kolorektalen Adenokarzinomzelllinie CaCo2 auch die Zelllinie HT-22 zum Einsatz, welche eine immortalisierte murine Hippocampuszelllinie ist, die nicht aus Tumorgewebe extrahiert wurde. Diese Zellsysteme wurden durch Zugabe von Wachstumsfaktoren oder Chemikalien oder mittels eines Zell-Zell-Kontakts zur Differenzierung angeregt. Neben der absichtlich hervorgerufenen Zelldifferenzierung kann es bei der Kultivierung von Zellen in vitro zu unerwünschten Differenzierungsprozessen kommen. Durch eine regelmäßige Subkultivierung der Zellen und die Unterbindung äußerer Faktoren, wie Behandlung der Zellen mit Substanzen, welche eine Differenzierung hervorrufen, wird versucht die Homogenität einer Zellpopulation aufrecht zu erhalten. Da Zellpopulationen durch diese Faktoren dennoch heterogen werden können und eine Mischung von diff. und undiff. Zellen vorherrschen kann, ist es von großem Interesse für die Mutagenitätsforschung Zellpopulationen zu untersuchen, welche zu nicht-exponentiell wachsenden Zellen differenziert sind. Sollten signifikante Unterschiede zwischen undiff. und diff. Zellen auftreten, so könnten Ergebnisse aus heterogenen Zellpopulationen an Aussagekraft verlieren und die Ergebnisse vieler Mutagenitätstests in Frage gestellt werden.

#### **5.3.1 Differenzierung und Differenzierungskontrolle**

Alle drei untersuchten Zelllinien wurden vor Durchführung der Versuche auf deren Differenzierungsstatus hin untersucht. Bonaterra et al. führten die Differenzierung der HT-22-Zellen durch Zugabe des N2-Supplements durch, ließen die Zellen allerdings für 48 h im Differenzierungsmedium, bevor die Differenzierung mittels Kontrolle des Neuritenauswuchses mikroskopisch untersucht wurde [149]. Auch Xu et al. verwendeten das

gleiche Medium mit gleicher prozentualer Zusammensetzung der Zusätze, führten die Differenzierung allerdings über einen Zeitraum von 12 h durch [77]. Die HT-22-Zellen, welche in dieser Arbeit durch 24-stündige Inkubation in Neurobasalmedium und Zugabe von N2-Supplement differenziert wurden, zeigten nach fluoreszenzmikroskopischer Auswertung einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Zelltypen. Die Kontrolle einer erfolgreichen Differenzierung der HT-22-Zellen wurde durch Zugabe von CytoB für weitere 24 h mit Hilfe des CBPI nachgewiesen, da im Anschluss kaum doppelkernige Zellen in der Kultur nachweisbar waren und somit keine Proliferation stattfand, was bei den vorliegenden Kulturbedingungen mit nicht konfluentem Wachstum und trotz häufigem Mediumwechsel nur durch eine Differenzierung zu erklären war. Die Differenzierungskontrolle der CaCo2-Zellen erfolgte durch quantitative Auswertung der Zellkuppeln. Es konnte zwischen den Zellpopulationen ein signifikanter Unterschied der Zahl der Zellkuppeln festgestellt und damit sichergestellt werden, dass eine Untersuchung zweier verschiedener Zelltypen erfolgt war. Ferruzza et al. detektierten die Differenzierung der CaCo2-Zellen mittels der Lokalisation des F-Aktins und einer parallelen Zellkernfärbung. Da für die Versuche in dieser Arbeit die gleichen PET-Zellkultureinsätze und eine gleiche Vorgehensweise wie bei Ferruzza et al. verwendet wurden [150], wurde die Annahme einer erfolgreichen Zelldifferenzierung weiter unterstützt. Bereits im Jahr 1978 machten Collins et al. darauf aufmerksam, dass DMSO und andere polare Chemikalien zur Differenzierung von HL-60-Zellen führen. Somit differenzieren undiff. HL-60-Zellen durch die Zugabe von DMSO zu Granulozyten [80] und durch Buttersäure zu Neutrophilen oder Monozyten [151]. Die Differenzierung der Leukämiezelllinie HL-60 erfolgte durch Zugabe von 1,25 % DMSO. Die Kontrolle der Differenzierung erfolgte nach GelGreen-Färbung durch die Untersuchung der Morphologie der Zellkerne. Es konnten vor Versuchsdurchführung stets zwei signifikant unterschiedliche HL-60-Zelltypen nachgewiesen werden.

### **5.3.2 DNS-Kondensationsdichte**

Die Vermessung der DNS-Kondensationsdichte wurde durchgeführt, um sicherzustellen, dass die verwendeten Substanzen auf gleiche Weise mit der DNS des Zellkerns interagieren bzw. in diese interkalieren können. Aus diesem Grund wurden die undiff. mit den diff. Zellen verglichen. Die Beurteilung erfolgte nach Färbung der DNS mit Bisbenzimid und ermöglichte nach Auswertung der Aufnahmen die Leuchtintensität der Zellen miteinander zu vergleichen. Die Durchführbarkeit des Tests wurde mittels Zugabe von Vincristin (VCR) nachgewiesen.

Hierfür wurden undiff. HL-60-Zellen mit 10 nM VCR behandelt. Da bei der Probe, welche mit dem Mitoseinhibitor VCR behandelt wurde lediglich die Zellen vermessen wurden, welche sich in der Mitose befanden und somit eine höhere DNS-Kondensationsdichte besaßen, konnte eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität nachgewiesen werden und die Durchführbarkeit des Testverfahrens belegt werden. Sowohl bei den HT-22-Zellen, den CaCo2-Zellen als auch bei den HL-60-Zellen konnten allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen den jeweiligen undiff. und diff. Zellen nachgewiesen werden. Daraus konnte geschlossen werden, dass weder die undiff. noch die diff. Form der HL-60-Zellen, der HT-22- oder CaCo2-Zellen detektierbare Unterschiede hinsichtlich ihrer DNS-Kondensationsdichte aufgewiesen haben. Lediglich die Leuchtintensität zwischen den jeweiligen Zellarten wiesen Unterschiede auf. Die CaCo2-Zellen und die HL-60-Zellen zeigten nach Auswertung eine Bisbenzimid-Fluoreszenzintensität zwischen 80 - 100 artifizieller Einheiten, wohingegen diese bei den HT-22-Zellen in etwa 40 artifizielle Einheiten betrug. Da Bisbenzimid bevorzugt mit Adenin und Thymin wechselwirkte, kann postuliert werden, dass die murinen HT-22-Zellen einen geringeren Adenin-/ Thymin-Anteil im Vergleich zu den humanen CaCo2 oder humanen HL-60-Zellen besitzen [88]. Auch durch Zugabe von 5-Azacytidin (5-Aza) konnte eine leichte Verminderung der Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Kontrolle hervorrufen, da hierdurch die Chromatindichte verändert wurde und es zu einer Unterkondensation der DNS kam. Auch Stopper et al. wiesen eine Hypomethylierung in SHE-Zellen nach. Sie untersuchte Konzentrationsbereiche zwischen 0,2  $\mu\text{M}$  bis 2  $\mu\text{M}$  5-Aza, allerdings zeigten nur die Konzentrationen 0,2  $\mu\text{M}$  und 0,4  $\mu\text{M}$  5-Aza eine Zellvitalität über 80 % [87], sodass die gleichen Konzentrationen für die Testung innerhalb dieser Arbeit verwendet wurden. Mit steigender Konzentration der Positivkontrolle an 5-Aza (0,2  $\mu\text{M}$  und 0,4  $\mu\text{M}$ ) sank die Bisbenzimid-Fluoreszenz in den undiff. HL-60-Zellen ab. Somit kann bei der Beurteilung der murinen HT-22-Zellen davon ausgegangen werden, dass diese entweder einen geringeren Anteil an Adenin bzw. Thymin besitzen oder aber eine geringere Methylierung der DNS im Vergleich zu den humanen Zelllinien HL-60 oder CaCo2 aufweisen.

### 5.3.3 DNS-Menge

Eine weitere Möglichkeit der Untersuchung, ob die diff. Zellen sich von den undiff. Zellen unterscheiden, lag in der Überprüfung der DNS-Menge. Es wurde beispielsweise kontrolliert, ob durch die Differenzierungsvorgänge der Zellen Ploidieveränderungen auftraten. Hierfür

wurde die Methode der Zellzyklusvermessung verwendet und zur Überprüfung des Testsystems kam neben Doxorubicin, Etoposid und Wasserstoffperoxid das spindlestörende Agens Vincristin (VCR) zum Einsatz. Es ist bekannt, dass VCR als klassisches Vinca-Alkaloid zu einem Zellzyklusarrest in G2/M führt [148]. Da es sich bei den undiff. HL-60-Zellen um exponentiell wachsende Zellen handelt, zeigten sie eine starke Phasenverschiebung von G1 zu G2/M nach Behandlung mit der Positivkontrolle VCR. Da Zellen, welche sich in der G2/M-Phase befinden einen doppelten Chromosomensatz besitzen, wies diese Zellpopulation somit eine doppelt so großen DNS-Gehalt auf [110]. Zudem konnte auch eine leichte Verschiebung zur G2/M-Phase der diff. HL-60-Zellen nachgewiesen werden. Da es sich bei den diff. HL-60-Zellen um Zellen handelt, welche nicht exponentiell wachsen, sollte keine Verschiebung ersichtlich sein. Dieses Ergebnis kann allerdings dadurch belegt werden, dass nicht alle Zellen der Zellpopulation differenziert waren. Bei der Differenzierungskontrolle der HL-60-Zellen waren innerhalb der diff. HL-60-Zellpopulation lediglich in etwa 85 % der Zellen differenziert. Somit konnten ca. 15 % dieser Zellpopulation eine Mitose durchlaufen und zu einer signifikanten Erhöhung der Zellen in G2/M und einem somit einhergehenden verdoppelten Chromosomensatz führen. Hollander et al. wiesen die Proliferation von CD4+ Lymphozyten bereits 1988 mittels durchflusszytometrischer Zellzyklusdetektion nach und zogen aus den Ergebnissen Rückschlüsse über den DNS-Gehalt der untersuchten Zellen [152]. Ergänzend wurden die Kontrollen der undiff. und diff. HL-60-Zellen direkt miteinander verglichen. Hierfür wurden die Einstellungen am Durchflusszytometer für beide Zelltypen unverändert belassen. Da es zwischen den undiff. und diff. HL-60-Zellen zu keinen Unterschieden der Position der Peaks (G1, S, G2/M) kam, ist davon auszugehen, dass beide Zelltypen den gleichen DNS-Gehalt aufweisen.

#### **5.3.4 Vitalität**

Um die nachfolgenden Einzelzellgelelektrophoreseversuche durchführen zu können, wurde die Zytotoxizität der untersuchten Substanzen auf die jeweiligen undiff. und diff. Zellen untersucht. Hierfür wurden die Zellen jeweils mit den zu untersuchenden Substanzen behandelt, zelltypspezifisch geerntet und der Vitalitätstest unter Verwendung der GelGreen-Färbelösung untersucht. Pro Zellpopulation wurden 200 Zellen quantitativ ausgewertet und ermöglichten somit eine Aussage über Vitalität der Zellpopulationen zu treffen. Diese sollte für den Comet-Assay bei  $\geq 80\%$  liegen, um eine optimale Auswertung des DNS-Schadens zu gewährleisten. So zeigten weder die undiff. HT-22-Zellen, noch die diff. HT-22-Zellen nach

Inkubation mit MMS, Doxorubicin oder Etoposid eine signifikante Abnahme der Vitalität. Somit erschienen die Zellen nicht sensitiv gegenüber der Behandlung mit dem Alkylanz MMS oder den Topo II-Hemmern Doxorubicin oder Etoposid zu sein. Im Gegensatz dazu konnten Rossi et al. eine Abnahme der Vitalität mit einhergehenden Verminderung der Proliferation der undiff. HT-22-Zellen nachweisen. Allerdings betrug die Behandlungszeit 48 h und wurde mit Hilfe des MTS-Assays nachgewiesen. Somit betrug der  $IC_{50}$ -Wert von Etoposid 1,64  $\mu$ M [153].

Auch die kolorektale adenokarzinomale Zelllinie CaCo2 zeigte keine Effekte gegenüber der Behandlung mit MMS oder Etoposid. Allerdings konnte eine Vitalitätsabnahme bei hohen Doxorubicinkonzentrationen nachgewiesen werden. Hinsichtlich der Sensitivität gegenüber Doxorubicin waren die undiff. CaCo2-Zellen empfindlicher als die diff. CaCo2-Zellen, da bei den undiff. CaCo2-Zellen ein Effekt oberhalb von 2.500 nM, bei den diff. CaCo2-Zellen bei 5.000 nM Doxorubicin ersichtlich war. Allerdings fiel die Vitalität nach 4 h Inkubationszeit mit 5.000 nM Doxorubicin bei den diff. CaCo2-Zellen auf knapp 33 % und betrug bei den undiff. CaCo2-Zellen noch ca. 78 %. Ein Absinken der Vitalität auf ca. 80 % konnten Patel et al. auch nach 24-stündiger Inkubation der undiff. CaCo2-Zellen bei einer Konzentration von 0,5  $\mu$ g/ml Doxorubicin erreichen [154], was einer Molarität von 864 nM entsprach.

Da weder die undiff. noch die diff. Leukämiezelllinie HL-60 eine signifikante Verminderung der Vitalität unter 80 % nach Inkubation mit MMS (4 h), Doxorubicin (4 h), Etoposid (1 h) oder UV-Bestrahlung aufgewiesen haben, konnte im weiteren Verlauf die Auswertung der Einzelzellgelelektrophorese mit diesen Proben stattfinden. Eine erhöhte Zytotoxizität konnte allerdings nach Behandlung mit  $H_2O_2$  detektiert werden. Dieser Effekt war allerdings auch für die weiterführenden Versuche mit den Quervernetzenden Substanzen Mitomycin C und Cisplatin wünschenswert, da eine steigende Konzentration an MMC zu einem verminderten DNS-Schaden im Comet-Assay führen sollte. Somit wurde bei allen undiff. HL-60-Zellen, welche mit 200  $\mu$ M  $H_2O_2$  behandelt wurden, eine Vitalität von unter 80 % erreicht. Bei den diff. HL-60-Zellen wurde lediglich bei der Negativkontrolle und der Positivkontrolle (166,7  $\mu$ M Cisplatin) eine signifikant unterschiedliche Vitalität im Vergleich zur Kontrolle (200  $\mu$ M  $H_2O_2$ ) nachgewiesen. Nagy et al. konnten bei HL-60-Zellen, welche ebenfalls mittels DMSO differenziert wurden, eine höhere Aktivität der Superoxid-Dismutase (SOD) und Katalase nachweisen. Tumorzellen, wie die undiff. HL-60-Zellen, weisen in der Regel eine niedrigere SOD-Aktivität auf [155]. Da die SOD in der Lage ist Hyperoxid-Radikale zu  $H_2O_2$  und Sauerstoff

zu katalysieren, ist sie notwendig um oxidativem Stress vorzubeugen und das Altern von Zellen zu unterbinden. Da Nagy et al. davon ausgingen, dass Radikale eine komplexere Rolle in der Zellphysiologie spielten als lediglich oxidative Schäden zu verursachen, waren wahrscheinlich mehrere Faktoren dafür verantwortlich, dass Zytotoxizitätsunterschiede zwischen der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung der undiff. und diff. HL-60-Zellen mit und ohne gleichzeitiger Behandlung mit MMC einhergingen.

### 5.3.5 DNS-Schaden

Die Vermessung des DNS-Schadens erfolgte mittels Einzelzellgelelektrophorese, indem die DNS-Fragmente computergestützt quantifiziert wurden. Nach Untersuchung der neuronalen Zelllinie HT-22 wurden sowohl bei den undiff., als auch bei den diff. HT-22-Zellen signifikante Anstiege an DNS-Schäden im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen. Allerdings bewirkte nur das Alkylanz MMS eine signifikante Abweichung zwischen den Zellen mit verschiedenen Differenzierungsstadien. Obwohl auch die undiff. HT-22-Zellen einen erhöhten DNS-Schaden aufwiesen, zeigten die diff. HT-22-Zellen eine mehr als doppelt so hohe Sensitivität im Vergleich zu den undiff. HT-22-Zellen. He et al. vollzogen die Differenzierung der HT-22-Zellen ebenso über 24 h in Neurobasalmedium unter Zugabe des N2-Supplements, wie in den Versuchen innerhalb dieser Arbeit. Damit erreichten die diff. Zellen das Stadium von reifen Hippocampusneuronen. Die Autoren wiesen eine höhere Sensitivität dieser Zellen im Vergleich zu den undiff. HT-22-Zellen nach, welches durch die Expression von NMDA-Rezeptoren belegt werden konnte. Die undiff. HT-22-Zellen waren im Gegensatz zu den diff. Zellen nicht in der Lage NMDA-Rezeptoren zu exprimieren und zeigten somit eine erhöhte Exzitotoxizität [156]. Neben der unterschiedlichen Fähigkeit Rezeptoren und Proteine zu exprimieren, könnten Reparaturmechanismen, wie die Basenexzisionsreparatur (BER) nach MMS-Behandlung einen Einfluss auf die Unterschiede der DNS-Schäden hervorrufen. So könnten alkylierende Substanzen, so wie MMS, Läsionen in der DNS hervorrufen, welche mittels der durchgeführten Einzelzellgelelektrophorese nachgewiesen werden konnte. Kaina et al. nahmen an, dass das Fehlen der O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNS-Methyltransferase (MGMT) ursächlich dafür sein könnte, warum diese Läsionen, welche hauptsächlich durch Einzelstrangbrüche in Zellen wie den diff. HT-22-Zellen erhöht auftreten auf das Alkylanz MMS zurückgeführt werden könnten. Auch das Vorkommen von Doppelstrangbrüchen (DSB) wurde durch sie postuliert [157], was Nikolova et al. in ihrer Studie nachwies. Sie führten das Vorhandensein der DSB darauf zurück, wenn die Replikationsgabel auf temporär vorhandene

Einzelstrangbrüche traf. Da dies gehäuft in der S-Phase der Zellteilung auftrat, entwickelte MMS dann seine Hauptwirkung [42]. Diese Ansätze müssten allerdings durch weiterführenden Untersuchungen speziell in den diff. und undiff. HT-22-Zellen nachgewiesen werden.

Auch bei den CaCo2-Zellen wurden DNS-Schäden nach MMS-Behandlung nachgewiesen. Allerdings zeigten sich keine Unterschiede zwischen den undiff. und den diff. Zellen. Ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Zelltypen konnte allerdings nach Behandlung mit Etoposid nachgewiesen werden. So zeigten lediglich die undiff. CaCo2-Zellen einen DNS-Schaden nach einstündiger Etoposid-Behandlung (5  $\mu$ M), wohingegen die diff. CaCo2-Zellen unverändert zur Kontrolle waren. Auch nach Behandlung der Zellen mit dem unselektiven Topo II-Inhibitor Doxorubicin konnten trotz hoher Konzentration an Doxorubicin (bis zu 5.000 nM) keine DNS-Schäden im Comet-Assay nachgewiesen werden. Ursächlich für die unterschiedliche Wirkungsweise der beiden Topo II-Inhibitoren könnte eine Resistenz der CaCo2-Zellen gegenüber Doxorubicin sein. Da Doxorubicin mit einer hohen Affinität in die DNS interkaliert, ist es in der Lage die Topo II zu inhibieren. Entgegen der ursprünglichen Annahme, dass Etoposid mit der DNS wechselwirkt, entfaltet es seine Wirkung hingegen erst unter Anwesenheit der Topo II [158]. Zudem hat das Gesamtniveau an Topo II einen Einfluss auf die Medikamentenempfindlichkeit. So konnten Nitiss et al. mit Hilfe einer Bibliothek von shRNA (small hairpin RNA) Gene identifizieren, welche verantwortlich waren, dass Resistenzen gegen Doxorubicin entwickelt wurden. Diese drei Gene haben Einfluss auf die Ausbildung der Proteine für p53, Chk2 und Topo II $\alpha$  [97]. Um eine endgültige Aussage über den Einfluss dieser drei Gene treffen zu können, müsste eine PCR durchgeführt werden, welche die Expression der Gene in den undiff. und diff. CaCo2-Zellen nachweisen würde.

Auch der Einfluss einiger genotoxischer Substanzen auf die Leukämiezelllinie HL-60 wurde mit Hilfe des Comet-Assays untersucht. So hat sich lediglich bei hoher Konzentration an MMS (250  $\mu$ M) ein leichter Unterschied zwischen den beiden Zelltypen gezeigt, wohingegen nach Behandlung mit Doxorubicin bereits ab einer Konzentration oberhalb von 150 nM ein 2- bis 3-fach höherer Schaden bei den undiff. HL-60-Zellen auftrat. Die undiff. HL-60-Zellen wiesen somit eine leicht erhöhte Sensitivität gegenüber Doxorubicin im Vergleich zu den diff. HL-60-Zellen auf. Die undiff. HL-60-Zellen zeigten allerdings keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle, welcher bei den diff. HL-60-Zellen auch erst bei einer Konzentration von 500 nM Doxorubicin ersichtlich war. Im Einklang damit wiesen Ganapathi et al. eine Resistenz von mit Retinsäure differenzierten HL-60-Zellen gegenüber Doxorubicin nach [159].

Sugimoto et al. verglichen undiff. HL-60-Zellen mit diff. HL-60-Zellen, welche durch Behandlung mit All-trans-Retinsäure zur Differenzierung angeregt wurden. Mittels durchflusszytometrischer Bestimmung konnte er bei den diff. Zellen eine Reduktion der Topo II $\alpha$ , aber ein gleichbleibendes Niveau der Topo II $\beta$  nachweisen. Bei den undiff. Zellen, welche exponentiell wuchsen war der Gehalt der Topo II $\beta$  unverändert, obwohl der Anteil an Topo II $\alpha$  deutlich erhöht war [160]. Da die Expressierung der Topo II $\alpha$  in den diff. HL-60-Zellen vermindert war, konnte Doxorubicin keinen Einfluss auf die Topo II $\alpha$  auswirken und seine inhibierende Wirkung war vermindert. Aus diesem Grund wurde kein signifikanter DNS-Schaden bei den diff. HL-60-Zellen detektiert. Da die exponentiell wachsenden undiff. HL-60-Zellen Mitosen mit erhöhter Aktivität der Topo II $\alpha$  durchliefen [160], konnte sowohl Doxorubicin, als auch Etoposid mit der Topo II $\alpha$ -Untereinheit interagieren und die DNS-Schäden hervorrufen. Auch Liu et al. zeigten zudem ein Resistenzverhalten der diff. HL-60-Zellen nach Behandlung mit All-trans-Retinsäure auf. Diese Zellen zeigten im Vergleich zu den undiff. HL-60-Zellen neben einer Widerstandsfähigkeit gegen Doxorubicin auch eine Resistenz gegenüber Etoposid auf. Die undiff. HL-60-Zellen zeigten nach Behandlung mit Doxorubicin oder Etoposid eine verminderte Proliferation und erhöhte Apoptose, was auch mittels MTT-Assay nachgewiesen wurde. Die Autoren erklärten diese Ergebnisse mittels chromosomaler Unterschiede zwischen den beiden Zelltypen, da die diff. HL-60-Zellen drei zusätzliche Chromosomenbereiche (4q34, 9q12, 19q13) besitzen und einen Chromosomenbereich (Yq12) weniger aufweisen, als die undiff. Zellart. Die überexprimierten Gene der diff. HL-60-Zellen stehen im Zusammenhang mit der DNS-Reparatur, Stressreaktionen, Arzneimittelresistenzen, der Proteinsynthese und der oxidativen Phosphorylierung. Zudem konnte die Hochregulierung von sieben Genen (FEN1, RFC5, EXO1, XRCC5, PARP1, POLR2F, GTF2H3) gezeigt werden, welche mit der Mismatch-Reparatur in Eukaryonten, der DNS-Doppelstrangbruchreparatur und den Nukleotid-Exzisionsreparaturpfaden in Verbindung gebracht wurden [161]. Somit lässt sich gut erklären, dass auch der selektive Topo II-Inhibitor Etoposid sowohl bei den undiff., als auch bei den diff. HL-60-Zellen zu einer Erhöhung des DNS-Schadens in den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen führte. Zudem waren die Unterschiede zwischen den beiden Zelltypen so groß, dass eine Signifikanz nachgewiesen werden konnte. Im Allgemeinen zeigte auch hier die undiff. Zellart eine höhere Sensitivität fast über den kompletten Untersuchungsbereich (0,5 - 25  $\mu$ M Etoposid) auf. Um nachweisen zu können, dass auch die

HL-60-Zellen, welche mit DMSO differenziert wurden die unterschiedlichen Gene besitzen, müsste eine Genomsequenzierung der diff. Zellen durchgeführt werden.

### 5.3.6 DNS-Schadensreparatur

Da durch die bisherigen Versuchsdurchführungen lediglich das Vorhandensein von DNS-Schäden detektiert werden konnte, wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit mögliche Reparaturmechanismen untersucht. So wurden die undiff. und die diff. HL-60-Zellen zunächst mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  behandelt, um einen DNS-Schaden hervorzurufen.  $\text{H}_2\text{O}_2$  zeigte bei allen getesteten Konzentrationen (25 - 175  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ) eine signifikante Erhöhung des DNS-Schadens im Vergleich zur Kontrolle. Allerdings wurde zwischen den beiden Zelltypen kein Unterschied nachgewiesen. Nogueira-Pedro et al. untersuchten die Wirkung von oxidativem Stress auf die hämatopoetische Zellhomöostase. Die Wirkungen von  $\text{H}_2\text{O}_2$  reiche insbesondere von der hämatopoetischen Zellproliferation bis zum Zelltod, je nach Konzentration an  $\text{H}_2\text{O}_2$  innerhalb des intrazellulären Milieus. Sie verglichen HSZ, welche aus humanem Nabelschnurblut gewonnen wurden, mit der myeloischen Leukämiezelllinie HL-60 und konnten nachweisen, dass  $\text{H}_2\text{O}_2$  keinen Einfluss auf die HSZ hatte, wohingegen die HL-60-Zellen einen deutlichen Anstieg an Apoptosen aufwiesen. Allerdings stieg der Prozentsatz der leukämischen Stammzellen als Reaktion auf die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Behandlung, während die klonogene Fähigkeit dieser Zellen, myeloische Klone zu erzeugen, gehemmt wurde. Leukämische Stammzellen sind eine seltene primitive Zellpopulation der Leukämie, welche Merkmale gesunder HSZ enthalten und eine erhöhte Resistenz gegen Krebsbehandlungen aufweisen [162]. Da sowohl die undiff., als auch die diff. HL-60-Zellen Tumorzellen sind, welche sich in der Zellhierarchie aus den HSZ differenziert haben, kann angenommen werden, dass sie ähnliche Reaktionen auf den durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  verursachten oxidativen Stress zeigen, was durch die Ergebnisse dieser Arbeit belegt werden konnte.

Im weiteren Verlauf der Versuchsreihe wurde mittels Mitomycin C (MMC) und der Positivkontrolle Cisplatin eine DNS-DNS-Quervernetzung hervorgerufen. Die beiden Crosslinker interkalieren in die DNS und hemmen somit die DNS-Synthese. Dieser Mechanismus wird sich bei der Tumorthherapie zu Nutze gemacht. Der für diese Arbeit durchgeführte Versuch zielte hingegen der Kontrolle der Reparaturfähigkeit ab. Dafür wurden die HL-60-Zellen zunächst für 1 h mit MMC behandelt, bevor mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  ein Schaden induziert wurde. Mit ansteigender Konzentration an MMC wurden mehr Quervernetzungen

ausgebildet. Dieser Mechanismus ermöglichte dann eine Verminderung des DNS-Schadens nach  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Behandlung, welche durch die Einzelzellelektrophorese nachgewiesen werden konnte. Während das Wiederzusammenfügen von Einzelstrangbrüchen ein einfacher Prozess ist, der in weniger als einer halben Stunde abgeschlossen sein kann, dauert die Reparatur von Doppelstrangbrüchen oder oxidierten Basen mehrere Stunden. Daher kann es erforderlich sein die Schadensmessung zu mehreren Zeitpunkten zu überwachen, um die Reparaturkapazität zur Beseitigung von Schäden zu bestimmen [163]. So wurden die HL-60-Zellen nach Inkubation mit den Crosslinkern Mitomycin C (MMC) und Cisplatin und der nachstehenden Behandlung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  entweder direkt vermessen oder zwischen den Behandlungen (MMC/ Cisplatin und  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) eine 4-stündige Inkubationszeit gewährt, bevor der DNS-Schaden erneut vermessen wurde. Die Wanderung der DNS im elektrischen Feld der Elektrophorese wurde durch die quervernetzenden Substanzen blockiert. Auch Spanswick et al. hatten diese Modifikation des zellulären Reparatur-Assays angewandt. Statt  $\text{H}_2\text{O}_2$  verwendeten sie Röntgenstrahlen um den Schaden zu induzieren. Die Reparatur konnte durch eine Erhöhung der Intensität des Kometenschweifes ersichtlich gemacht werden, da sich die Blockade der röntgeninduzierten Migration nach und nach gelöst hatte [164]. Bei den Versuchen innerhalb dieser Arbeit wurde nach direkter Kontrolle des DNS-Schadens lediglich bei einer Konzentration von  $0,1 \mu\text{M}$  MMC bei den diff. HL-60-Zellen eine erhöhte Schadensinduktion detektiert. Mit steigender MMC-Konzentration nahm der DNS-Schaden stetig ab und auch die Positivkontrolle Cisplatin führte zu einer leichten Schadensabnahme. Die Proben, welche nur Cisplatin alleine oder keine Substanzbehandlung erhielten, zeigten einen signifikant geringeren Schaden im Vergleich zu den Kontrollen ( $200 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ) der undiff. und diff. HL-60-Zellen. Obwohl die Zellen nach 4-stündiger Behandlung mit MMC bzw. Cisplatin im Inkubator inkubiert wurden und erst anschließend die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Behandlung stattfand, zeigten lediglich die substanzunbehandelte Probe und die beiden Positivkontrollen Cisplatin alleine und Cisplatin mit  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Behandlung einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle ( $200 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ) auf. Es konnten auch keine großen Unterschiede zwischen den Behandlungsschemata ohne und mit 4-stündiger Nachinkubationszeit nachgewiesen werden. Lediglich die Positivkontrolle Cisplatin +  $200 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  führte nach 4 h zu einem verminderten DNS-Schaden, was darauf schließen lässt, dass die 4-stündige Nachinkubation zu einer verstärkten Ausbildung des Crosslinks geführt hatte. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Zelltypen konnte nach Substanzbehandlung nicht nachgewiesen werden, da weder die

undiff., noch die diff. HL-60-Zellen in der Lage waren die Quervernetzung der DNS, welche durch den Crosslinker MMC verursacht wurde, zu entfernen und eine erhöhte Schadensinduktion hervorzurufen. Merk et al. erzielten ähnliche Effekte nach direkter Vermessung des DNS-Schadens und wiesen mit ihrem Versuch mit V79-Zellen (Hamsterfibroblasten) darauf hin, dass im Standard-Alkali-Comet-Assay nur MMC zu einem leichten Anstieg der DNS-Migration bei hohen toxischen Konzentrationen führte. Cisplatin induzierte unter den verwendeten Testbedingungen keine DNS-Migration. Die V79-Zellen wurden mit MMC (2 h) oder Cisplatin (2 h) inkubiert und anschließend mit  $\gamma$ -Strahlen (3 Gray unter 4 Gray/min) behandelt. Die Zellen wurden während der Bestrahlung auf Eis gehalten, um eine Reparatur zu unterbinden. Eine marginale Reduktion der DNS-Migration trat bereits bei 0,1 und 1  $\mu$ M MMC auf, eine eindeutige Abnahme trat bei 10  $\mu$ M MMC auf, welche allerdings Zytotoxizität und eine vollständige Hemmung des klonalen Zellwachstums verursachte. Ein Schwesterchromatidenaustausch fand bereits bei ungiftigen Konzentrationen (0,05  $\mu$ M MMC) statt und auch Mutationen an der Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) wurden parallel zum zytotoxischen Effekt induziert und traten bei MMC-Konzentrationen (5,0 und 7,5  $\mu$ M) auf, welche das klonale Zellwachstum auf unter 50 % reduziert hatten [98]. Das HPRT-Enzym übt einen Einfluss auf den Purinstoffwechsel aus und kann beim Menschen zu Stoffwechselerkrankungen führen.

Auch DNS-Schäden, welche durch UV-Strahlen induziert wurden, können mittels Einzelzellgelelektrophorese detektiert werden. Hierfür werden die Zellen mit UV-Licht bestrahlt und die aus der zellulären Reparatur der UV-Schäden resultierenden DNS-Brüche mittels Zugabe von Reparaturinhibitoren offengehalten. Cytosin-Arabinosid oder Aphidicolin (Aph) sind in der Lage diese Reparatur zu blockieren, indem die DNS-Polymerase  $\alpha$  inhibiert wird [105, 165, 166]. Um tiefere Einblicke in die Reparaturfähigkeit der undiff. und diff. HL-60-Zellen zu gewinnen, wurden unterschiedliche Einflussfaktoren, wie UV-Strahlung, Aphidicolin-Behandlung und direkte Kontrolle des DNS-Schadens und 2-stündige Nachinkubationszeit vor Kontrolle des DNS-Schadens, auf die Zellen untersucht. So konnte nachgewiesen werden, dass in diff. HL-60-Zellen sowohl nach direkter Kontrolle des DNS-Schadens, als auch nach 2-stündiger Inkubationszeit unter UV-Bestrahlung und Anwesenheit von Aph DNS-Schäden ersichtlich waren. Obwohl die undiff. HL-60-Zellen nach UV-Behandlung unter Aph (15  $\mu$ M) und nach 2 h einen leichten Schaden gezeigt haben, war er so gering, dass zwischen den beiden Zelltypen ein signifikanter Unterschied nachweisbar war. Somit konnte

geschlussfolgert werden, dass die diff. HL-60-Zellen nach UV-Behandlung und unter Anwesenheit von Aph (direkt und nach 2 h), aber auch ohne Aph nach 2 h deutlich empfindlicher waren, als die undiff. HL-60-Zellen. Dieser Effekt könnte trotz gegensätzlicher Annahme ein Hinweis darauf sein, dass die diff. Zellen eine höhere Nukleotidexzisionsreparatur (NER)-Fähigkeit im Vergleich zu den undiff. Zellen besitzen. Speit et al. verwendeten den Aphidicolin-Block-Nukleotid-Exzisionsreparatur-Assay zur Detektion von DNS-Strangbrüchen in mononukleären peripheren Blutzellen nach Behandlung mit Benzo[a]pyrendiol-Epoxid in Gegenwart von Aph. Diese Methode ermöglichte die Messung der DNS-Inzision unter Verwendung der individuellen Reparaturkapazität. Sie konnte rechnerisch bestimmt werden, indem von der Menge der substanzinduzierten DNS-Schäden unter Anwesenheit von Aph und Benzo[a]pyrendiol-Epoxid der Schaden ohne Aph oder Benzo[a]pyrendiol-Epoxid subtrahiert wurde. So zeigten die stimulierten Blutzellen, welche sich teilten, einen leicht erniedrigten Schaden im Vergleich zu den unstimulierten Zellen auf [107]. Diese proliferieren nicht mehr und könnten mit den diff. nicht exponentiell wachsenden HL-60-Zellen verglichen werden. Diese Ergebnisse entsprachen den Versuchsergebnissen dieser Arbeit. Allerdings stellt sich die Frage, ob die Schäden, welche durch das UV-Licht mit der Wellenlänge von 254 nm verursacht wurden lediglich zu Einschnitten in der DNS geführt haben, oder ob tatsächlich mehr DNS-Stücke herausgeschnitten und somit detektiert wurden. Speit et al. nahmen auch an, dass höhere Schäden bei der Einzelzellgelelektrophorese nicht zwangsläufig auf eine bessere Reparatur hindeuteten, sondern könnten auch auf eine Bruchakkumulation durch ineffizientes Wiederausammenfügen von Brüchen zurückzuführen sein [107]. Zudem untersuchten Cipollini et al. die individuelle Reparaturkinetik von Lymphozyten nach UV(C)-Bestrahlung in Gegenwart des Polymerase  $\alpha$ -Inhibitors Aph zu unterschiedlichen Zeitpunkten. UV-Licht alleine führte bereits nach 20 min zu einer signifikanten Zunahme der DNS-Migration, wobei der Höhepunkt bei 60 - 90 min lag. Ein rascher Rückgang des detektierbaren Schadens wurde zwischen 180 - 240 min beobachtet, welcher sich dem basalen Niveau näherte. Unter Anwesenheit von Aph kam es bereits nach 60 min zu einem starken Anstieg der UV-induzierten Schäden, wodurch die Autoren annahmen, dass der Prozess der Lückenfüllung bereits voll funktionsfähig war. Da dieser Effekt nach 240 min weiter erhöht war, ließ sie darauf schließen, dass in der zweiten Phase der Kinetik, bei dem ein Rückgang des Schadens zu erwarten gewesen wäre, auf den NER-Signalweg zurückzuführen war [167].

### 5.3.7 Reaktive Sauerstoffspezies

Sowohl Doxorubicin, als auch Etoposid inhibieren die Topo II, allerdings ist nur über Doxorubicin bekannt, dass es zudem zur Entstehung von reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) kommt. Da auch ROS einen Basenexzisions-Reparaturmechanismus nach sich ziehen [163], galt es die beiden Topo II-Inhibitoren Doxorubicin und Etoposid und deren Effekt auf undiff. und diff. HL-60-Zellen zu untersuchen. Somit wurde die Vermessung der ROS sowohl mittels enzymabhängiger durchflusszytometrischer Detektion (DCF-Färbung), als auch mittels enzymunabhängiger mikroskopischer Untersuchung (DHE-Färbung) miteinander verglichen.

#### 5.3.7.1 DCF-Färbung

Die DCF-Färbung ermöglichte einen Nachweis der ROS, unter Verwendung eines Farbstoffes, welcher enzymabhängig zur Fluoreszenz angeregt wurde. So wurde nach Behandlung mit Doxorubicin weder bei den undiff., noch bei den diff. HL-60-Zellen ein Anstieg der DCF-Fluoreszenzintensität nachgewiesen. Da die Positivkontrolle (200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ) zu einer starken Fluoreszenzanregung geführt hatte, kann davon ausgegangen werden, dass die Testmethode valide war. Nach Behandlung der Zellen mit dem selektiven Topo II-Inhibitor Etoposid, wurde mit steigender Substanzkonzentration (ab 5  $\mu\text{M}$  bei den diff. Zellen und ab 10  $\mu\text{M}$  bei den undiff. Zellen) eine signifikante Abnahme der Fluoreszenzintensität gezeigt. Zwischen den beiden Zelltypen kam es allerdings lediglich bei 5  $\mu\text{M}$  Etoposid zu einem signifikanten Unterschied zueinander, wobei die undiff. HL-60-Zellen einen höheren ROS-Anteil im Zytosol hatten. Die Abnahme des ROS-Anteils bei höheren Konzentrationen könnte womöglich darauf beruhen, dass die Substanz Etoposid an Proteine gebunden wurde, somit nicht mehr frei im Zytosol vorlag und keinen weiteren Effekt mehr ausüben konnte. Zudem weisen Hu und Brindle darauf hin, dass eine Verlängerung der Inkubationszeit von Doxorubicin und Etoposid zu einer höheren DCF-Fluoreszenzintensität führen würden. Sie inkubierten die Zelllinie EL-4 (murine T-Lymphomazellen) mit Etoposid für 18 h und wiesen dadurch eine stark erhöhte DCF-Fluoreszenzintensität nach [168].

#### 5.3.7.2 DHE-Färbung

Neben der enzymabhängigen Testmethode, kam auch die enzymunabhängige mikroskopische Testmethode zum Einsatz. Hierfür wurde die DHE-Fluoreszenzintensität der undiff. und der diff. HL-60-Zellen nach Behandlung mit Doxorubicin (4 h) und Etoposid (1 h) verglichen. Allerdings zeigte weder Etoposid, noch Doxorubicin einen starken konzentrationsabhängigen

Anstieg im Vergleich zur Kontrolle. Nach Behandlung der Zellen mit Doxorubicin konnte lediglich ein leichter Unterschied zwischen den beiden Zelltypen festgestellt werden. Sowohl die Positivkontrolle (200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ), als auch bei 250 nM Doxorubicin zeigten bei den undiff. HL-60-Zellen einen signifikant höheren ROS-Anstieg auf. Covacci et al. fanden bei der Untersuchung von undiff. und mit DMSO differenzierten HL-60-Zellen eine leichte Erhöhung des ROS-Anteils in diff. HL-60-Zellen, welcher allerdings bei einer Konzentration von 300  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  ca. 7-fach höher bei den undiff. HL-60-Zellen war. Da die Zellen allerdings 1 h lang mit  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  behandelt wurden, könnte das eine Erklärung für den außerordentlichen Unterschied sein [79].

Insgesamt konnten nach vergleichender Untersuchung verschiedener exponentiell wachsender Zelllinien mit differenzierten Zelllinien eine Vielzahl an Unterschieden nachgewiesen werden. So zeigten die diff. HT-22-Zellen im Vergleich zur undiff. Form der immortalisierten murinen Hippocampuszellen, welche keinem Tumorgewebe entstammen, eine höhere Sensitivität gegenüber dem Alkylanz Methylmethansulfonat. Ebenso konnte eine gesteigerte Empfindlichkeit der diff. Adenokarzinomzelllinie CaCo2 nach Behandlung mit dem selektiven Topo-II-Inhibitor Etoposid im Vergleich zur undiff. Form der CaCo2-Zellen nachgewiesen werden. Der unselektive Topo-II-Hemmer Doxorubicin hingegen zeigte keinen Unterschied nach Substanzbehandlung der beiden Zelltypen. Bei der Leukämiezelllinie HL-60 konnten sowohl nach Behandlung mit Doxorubicin, als auch mit Etoposid, signifikante Sensitivitätsunterschiede zwischen den undiff. und diff. Zellformen nachgewiesen werden. Die Klärung des Sachverhaltes, ob die festgestellten Unterschiede zellartspezifisch oder auf das Enzym Topoisomerase II zurückzuführen waren, sollte durch weitere Versuche geklärt werden. Neben der in dieser Arbeit untersuchten Reparaturkapazitäten müssten zudem ausführlichere Tests durchgeführt werden, um weitere Informationen über die zu Grunde liegenden Reparaturmechanismen zu erhalten.

## ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden die Einflüsse verschiedener genotoxischer Substanzen auf Säugertierzellen untersucht. Da ein Organismus der Ontogenese unterliegt und sich Zellen aus Stamm- und Vorläuferzellen entwickelt, gilt es diese ursprünglichen Zellen vor äußeren Einflüssen zu schützen. Da bisher kaum Untersuchungen von Zellen in verschiedenen Differenzierungsstadien durchgeführt wurden, wurden unter Verwendung vieler unterschiedlicher biologischer Endpunkte Effekte auf die Vitalität, Proliferation, Mitose und Apoptose dieser Zellen untersucht. Zudem erfolgte eine Interpretation der Ausbildung von Mikrokernen, Entstehung von DNS-Schäden und der zugrundeliegenden Reparaturmechanismen.

So konnte mit Hilfe der Untersuchungen der hämatopoetischen Stammzellen und der TK6-Zellen postuliert werden, dass hämatopoetische Stammzellen weitestgehend weniger empfindlich gegenüber Zytostatika (Doxorubicin, Vinblastin, Methylmethansulfonat und Mitomycin C) sind als die lymphoblastoide Zelllinie TK6, welche in der Entwicklungshierarchie den Stammzellen folgt. Die Befürchtung, dass der Mikrokerntest in immortalisierten TK6-Zellen als Grundlage für Genotoxizitätsuntersuchungen nicht genügen würden, konnte mit Hilfe der Versuchsergebnisse dieser Arbeit widerlegt werden. Die Ergebnisse belegen, dass der Mikrokerntest in TK6-Zellen relevant ist, da TK6-Zellen empfindlicher auf genotoxische Agentien im Vergleich zu hämatopoetischen Stammzellen reagieren.

Bei der Untersuchung der Leukämiezelllinie HL-60 wurden die Effekte klassischer (Vinblastin, Vincristin, Vinflunin und Vinorelbin) mit neu synthetisierten Vinca-Alkaloiden (4-Chlorochablastin, 4-Chlorochacristin, 16a, 17b und 18a) verglichen. Vinca-Alkaloide werden sehr häufig mit Nebenwirkungen, wie Neuropathien assoziiert, welche während einer Chemotherapie oftmals zu Therapieabbrüchen durch die Patienten führen. Aus diesem Grund war es erstrebenswert, neuartige Vinca-Alkaloide zu entwickeln, welche weniger Nebenwirkungen aber zugleich eine ähnliche Wirksamkeit aufweisen. Obwohl die Potenz der neuen Substanzen niedriger war als bei Vinblastin, Vincristin und Vinorelbin, zeigte ein Teil eine ähnliche Wirkung wie das Vinca-Alkaloid Vinflunin auf die Krebszelllinie HL-60 auf. Die Ergebnisse dieser Arbeit können als erste Indikation in vitro genommen werden, dass sich diese Substanzen in der Krebstherapie als wirksam erweisen könnten und nach weiteren Ergebnissen in vivo als therapeutische Alternativen in Betracht gezogen werden.

Auch bei der vergleichenden Untersuchung von exponentiell wachsenden mit differenzierten Zelllinien konnten Unterschiede detektiert werden. Die Zelllinie HT-22, welche selbst keine Krebszelllinie ist, zeigte nach Differenzierung zu nicht exponentiell wachsenden Zellen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber dem Alkylanz Methylmethansulfonat, was auf einer verminderten Basenexzisionsreparatur beruhen könnte. Auch die differenzierte Form der Adenokarzinom-Zelllinie CaCo2 zeigte eine gesteigerte Sensitivität gegenüber dem Topoisomerase II-Inhibitor Etoposid auf, wohingegen der unselektive Topoisomerase II-Hemmer Doxorubicin keinen Effekt aufwies. Um den Sachverhalt zu klären ob die festgestellten Unterschiede auf das Enzym Topoisomerase II zurückzuführen oder zellartspezifisch waren, wurden weitere Analysen der Zelllinien HL-60 und deren differenzierten Zellart durchgeführt. Auch hier konnten signifikante Unterschiede bei der Einzelzellgelelektrophorese nach Behandlung mit Doxorubicin und Etoposid festgestellt werden. Neben den in dieser Arbeit nachgewiesenen Unterschieden bei der Reparatur zwischen den Zelltypen, könnten aber auch weitere Faktoren zu Varianzen führen und die Mutagenitätsforschung beeinflussen. Folglich ist davon auszugehen, dass zukünftige Testungen bei der pharmakologischen Substanzentwicklung in verschiedenen Zellsystemen von Nöten sind, bevor neue Substanzen zugelassen werden.

Alles in allem konnte die Komplexität der Ergebnisse zwischen Zellen der verschiedenen Differenzierungsstadien in dieser Arbeit aufgezeigt werden. Deswegen sollte auch bei weiteren Forschungsvorhaben insbesondere ein Augenmerk auf den Differenzierungszustand der zu untersuchenden Zellpopulation geworfen werden.

## SUMMARY

In the present study, the influences of different genotoxic substances on mammalian cells were investigated. Given that organisms develop on the basis of ontogenesis and cells develop from stem cells and progenitor cells, it is important to protect these original cells from external influences. Due to the fact so far only few studies have been carried out on cells in different differentiation stages, many different biological endpoints, like effects on vitality, proliferation, mitosis and apoptosis of these cells have been investigated. In addition, the formation of micronuclei, the development of DNA damage and the underlying repair mechanisms were interpreted.

The investigations of hematopoietic stem cells and TK6 cells have shown that hematopoietic stem cells are predominantly less sensitive to cytostatic drugs (doxorubicin, vinblastine, methyl methanesulfonate and mitomycin C) than the lymphoblastoid cell line TK6, which follows the stem cells in the development hierarchy. The fear that the micronucleus test in immortalized TK6 cells would not be sufficient as a basis for genotoxicity studies could be refuted with the results of this work. The results show that the micronucleus test in TK6 cells is relevant because TK6 cells are more sensitive to genotoxic agents than hematopoietic stem cells.

During the investigation of the leukemia cell line HL-60, the effects of classic vinca alkaloids (vinblastine, vincristine, vinflunine and vinorelbine) were compared with novel synthesized vinca alkaloids (4-chlorochablastine, 4-chlorochacristine, 16a, 17b and 18a). Vinca alkaloids are very often associated with side effects, such as neuropathies, which often lead to discontinuation of therapy by patients during chemotherapy. For this reason, it was desirable to develop novel vinca alkaloids with fewer side effects but similar efficacy. Although the potency on the cancer cell line HL-60 of the new substances was lower than in vinblastine, vincristine and vinorelbine, some showed a similar effect to the vinca alkaloid vinflunine. The results of this work can be taken as a first indication *in vitro* that these substances may prove effective in cancer therapy and will be considered as therapeutic alternatives *in vivo* according to further results.

Differences were also detected in comparative investigations of exponentially growing with differentiated cell lines. The cell line HT-22, which itself is not a cancer cell line, showed an increased sensitivity to the alkylating agent methyl methanesulfonate after differentiation to non-exponentially growing cells, which could be due to reduced base excision repair. The

differentiated form of the adenocarcinoma cell line CaCo2 also showed an increased sensitivity to the topoisomerase II inhibitor etoposide, whereas the non-selective topoisomerase II inhibitor doxorubicin had no effect. In order to clarify whether the found differences due to the enzyme topoisomerase II or were cell-type-specific, further analyses were carried out with the cell line HL-60 and their differentiated cell type. Again, significant differences in single cell gel electrophoresis after treatment with doxorubicin and etoposide were detected. In addition to the differences in repair between cell types shown in this study, other factors could also lead to variances and influence mutagenicity research.

Therefore, it is reasonable to assume that future testings in different cell systems are necessary for the development of pharmacologically active substances before new substances will be approved.

Altogether, the complexity of the results between cells in the different differentiation stages becomes apparent in this work, which also means that further research projects would pay particular attention to the differentiation stage of the investigated cell population.

## LITERATURVERZEICHNIS

1. Toth, B., *Fehlgeburten Totgeburten Frühgeburten: Ursachen, Prävention und Therapie*. Vol. 1. 2017, Berlin: Springer. 368 p. 19-24.
2. Hayes, M., et al., *Clinical review: Stem cell therapies for acute lung injury/acute respiratory distress syndrome - hope or hype?* Crit Care, 2012. **16**(2): p. 205.
3. Shemin, D. and D. Rittenberg, *The life span of the human red blood cell*. J Biol Chem, 1946. **166**(2): p. 627-36.
4. Mizuno, N.S., et al., *Life span of thrombocytes and erythrocytes in normal and thrombocytopenic calves*. Blood, 1959. **14**(6): p. 708-19.
5. Seita, J. and I.L. Weissman, *Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation*. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, 2010. **2**(6): p. 640-53.
6. da Silva Meirelles, L., A.I. Caplan, and N.B. Nardi, *In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells*. Stem Cells, 2008. **26**(9): p. 2287-99.
7. Quesenberry, P.J. and J.M. Aliotta, *The paradoxical dynamism of marrow stem cells: considerations of stem cells, niches, and microvesicles*. Stem Cell Rev, 2008. **4**(3): p. 137-47.
8. Morrison, S.J. and A.C. Spradling, *Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life*. Cell, 2008. **132**(4): p. 598-611.
9. Hoggatt, J. and D.T. Scadden, *The stem cell niche: tissue physiology at a single cell level*. J Clin Invest, 2012. **122**(9): p. 3029-34.
10. Fuchs, E. and T. Chen, *A matter of life and death: self-renewal in stem cells*. EMBO Rep, 2013. **14**(1): p. 39-48.
11. Zhang, C.C. and H.F. Lodish, *Cytokines regulating hematopoietic stem cell function*. Curr Opin Hematol, 2008. **15**(4): p. 307-11.
12. Geginat, J., F. Sallusto, and A. Lanzavecchia, *Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory, and effector memory CD4(+) T cells*. J Exp Med, 2001. **194**(12): p. 1711-9.
13. Gharibi, B. and F.J. Hughes, *Effects of medium supplements on proliferation, differentiation potential, and in vitro expansion of mesenchymal stem cells*. Stem Cells Transl Med, 2012. **1**(11): p. 771-82.
14. Simon, J.C., et al., *Phorbol myristate acetate-activated keratinocytes stimulate proliferation of resting peripheral blood mononuclear lymphocytes via a MHC-independent, but protein kinase C- and intercellular adhesion molecule-1-dependent, mechanism*. J Immunol, 1991. **146**(2): p. 476-84.
15. Yen, A. and S. Varvayanis, *DMSO, sodium butyrate, and TPA induce hypophosphorylation of RB with HL-60 cell differentiation*. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal, 1995. **31**(3): p. 164-167.
16. Choi, Y.S., et al., *Optimization of ex vivo hematopoietic stem cell expansion in intermittent dynamic cultures*. Biotechnol Lett, 2010. **32**(12): p. 1969-75.
17. Ogawa, M., *Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells*. Blood, 1993. **81**(11): p. 2844-53.
18. IMS Health. *Weltweite Verteilung pharmakologischer Wirkstoffe in einem späten Entwicklungsstadium\* nach Therapiegebiet im Jahr 2016*. 2016 [cited 2018 30.01.]; Available from: <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/651523/umfrage/verteilung->

- [pharmakologischer-wirkstoffe-in-einem-spaeten-entwicklungsstadium-nach-therapiegebiet/](#).
19. WHO World Health Organization. *Weltweite Verteilung von Krebsneuerkrankungen nach Weltregionen im Jahr 2012*. 2012 [cited 2018 30.01.]; Welt-Krebsbericht 2014 der International Agency for Research on Cancer]. Available from: <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/289712/umfrage/verteilung-von-krebsneuerkrankungen-nach-weltregionen/>.
  20. Bazzocco, S., et al., *Highly Expressed Genes in Rapidly Proliferating Tumor Cells as New Targets for Colorectal Cancer Treatment*. Clin Cancer Res, 2015. **21**(16): p. 3695-704.
  21. Broustas, C.G. and H.B. Lieberman, *DNA damage response genes and the development of cancer metastasis*. Radiat Res, 2014. **181**(2): p. 111-30.
  22. Taurozzi, A.J., et al., *Spontaneous development of Epstein-Barr Virus associated human lymphomas in a prostate cancer xenograft program*. PLoS One, 2017. **12**(11): p. e0188228.
  23. Moller, M., et al., *Cytotoxicity and genotoxicity induced by the photochemical alkoxy radical source N-tert-butoxypyridine-2-thione in L5178Y mouse lymphoma cells under UVA irradiation*. Free Radic Biol Med, 2005. **39**(4): p. 473-82.
  24. Hennings, H., et al., *Critical aspects of initiation, promotion, and progression in multistage epidermal carcinogenesis*. Proc Soc Exp Biol Med, 1993. **202**(1): p. 1-8.
  25. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
  26. Swift, L.H. and R.M. Golsteyn, *Genotoxic anti-cancer agents and their relationship to DNA damage, mitosis, and checkpoint adaptation in proliferating cancer cells*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(3): p. 3403-31.
  27. Ng, J. and I. Shuryak, *Minimizing second cancer risk following radiotherapy: current perspectives*. Cancer Manag Res, 2015. **7**: p. 1-11.
  28. Forrest, D.L., et al., *Second malignancy following high-dose therapy and autologous stem cell transplantation: incidence and risk factor analysis*. Bone Marrow Transplant, 2003. **32**(9): p. 915-23.
  29. Cowherd, S.M., *Tumor Staging and Grading: A Primer*, in *Molecular Profiling: Methods and Protocols*, V. Espina and L.A. Liotta, Editors. 2012, Humana Press: Totowa, NJ. p. 1-18.
  30. Pfreundschuh, M., *Prinzipien der medikamentösen Tumorthherapie*, in *Kompendium Internistische Onkologie: Standards in Diagnostik und Therapie*, H.-J. Schmoll, K. Höffken, and K. Possinger, Editors. 2006, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 651-702.
  31. Ansaloni, L., et al., *Evaluation of extensive cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) in patients with advanced epithelial ovarian cancer*. Int J Gynecol Cancer, 2012. **22**(5): p. 778-85.
  32. Menegola, E., M.L. Broccia, and F.D. Renzo, *Teratogenic effects of Doxorubicin in rats at midgestation and at term*. Teratog Carcinog Mutagen, 2001. **21**(4): p. 283-93.
  33. Barpe, D.R., D.D. Rosa, and P.E. Froehlich, *Pharmacokinetic evaluation of doxorubicin plasma levels in normal and overweight patients with breast cancer and simulation of dose adjustment by different indexes of body mass*. Eur J Pharm Sci, 2010. **41**(3-4): p. 458-63.
  34. Berger, D.P., Engelhardt R., Mertelsmann R., *Das Rote Buch*. Hämatologie und Internistische Onkologie. Vol. 6. 2017: Ecomed. 1400 p.
  35. Du Bois, D. and E.F. Du Bois, *A formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known*. 1916. Nutrition, 1989. **5**(5): p. 303-11; discussion 312-3.

36. Statistisches Bundesamt (Destatis). *Körpermaße nach Altersgruppen und Geschlecht*. 2018 [25.01.2018]; Ergebnisse des Mikrozensus 2013]. Available from: <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Gesundheit/zustandRelevantesVerhalten/Tabellen/Koerpermasse.html>.
37. Hakovirta, H., M. Parvinen, and J. Lahdetie, *Effects of etoposide on stage-specific DNA synthesis during rat spermatogenesis*. *Mutat Res*, 1993. **301**(3): p. 189-93.
38. Ashby, J., et al., *Potent clastogenicity of the human carcinogen etoposide to the mouse bone marrow and mouse lymphoma L5178Y cells: comparison to Salmonella responses*. *Environ Mol Mutagen*, 1994. **24**(1): p. 51-60.
39. Ezoë, S., *Secondary leukemia associated with the anti-cancer agent, etoposide, a topoisomerase II inhibitor*. *Int J Environ Res Public Health*, 2012. **9**(7): p. 2444-53.
40. Redaktion Gelbe Liste Online, *Fachinformation: Eto-GRY® 20 mg/ml Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung, 50 ml*. 2017, Medizinische Medien Informations GmbH: Neu-Isenburg.
41. Puyo, S., D. Montaudon, and P. Pourquier, *From old alkylating agents to new minor groove binders*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2014. **89**(1): p. 43-61.
42. Nikolova, T., et al., *Homologous recombination protects mammalian cells from replication-associated DNA double-strand breaks arising in response to methyl methanesulfonate*. *DNA Repair (Amst)*, 2010. **9**(10): p. 1050-63.
43. Decordier, I., et al., *Automated image analysis of cytokinesis-blocked micronuclei: an adapted protocol and a validated scoring procedure for biomonitoring*. *Mutagenesis*, 2009. **24**(1): p. 85-93.
44. Prendergast, G.C. and E.M. Jaffee, *Cancer immunotherapy : immune suppression and tumor growth*. 2007, Amsterdam ; Boston: Academic Press/Elsevier. xiii, 409 p., 4 p. of plates p.
45. Redaktion Gelbe Liste Online, *Fachinformation: Mitomycin 2 medac*. 2017, Medizinische Medien Informations GmbH: Neu-Isenburg.
46. Adler, I.D., *New approaches to mutagenicity studies in animals for carcinogenic and mutagenic agents. II. Clastogenic effects determined in transplacentally treated mouse embryos*. *Teratog Carcinog Mutagen*, 1983. **3**(4): p. 321-34.
47. Muller, L., *Stage-related induction of chromosomal aberrations and SCE in mouse embryos treated transplacentally during organogenesis with MMC and DMBA*. *Teratog Carcinog Mutagen*, 1988. **8**(2): p. 95-105.
48. Deans, A.J. and S.C. West, *DNA interstrand crosslink repair and cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2011. **11**(7): p. 467-80.
49. Moudi, M., et al., *Vinca alkaloids*. *Int J Prev Med*, 2013. **4**(11): p. 1231-5.
50. Noble, R.L., C.T. Beer, and J.H. Cutts, *Role of chance observations in chemotherapy: Vinca rosea*. *Ann N Y Acad Sci*, 1958. **76**(3): p. 882-94.
51. Lee, J.C., D. Harrison, and S.N. Timasheff, *Interaction of Vinblastine with Calf Brain Microtubule protein*. *J Biol Chem*, 1975. **250**(24): p. 9276-82.
52. Bennouna, J., et al., *Vinflunine: a new microtubule inhibitor agent*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(6): p. 1625-32.
53. Cammerer, Z., et al., *Comparison of the peripheral blood micronucleus test using flow cytometry in rat and mouse exposed to aneugens after single-dose applications*. *Mutagenesis*, 2007. **22**(2): p. 129-34.
54. Ferm, V.H., *Congenital malformations in hamster embryos after treatment with vinblastine and vincristine*. *Science*, 1963. **141**(3579): p. 426.

55. Redaktion Gelbe Liste Online, *Fachinformation: Vinblastinsulfat Teva 1 mg/ml Injektionslösung*, in *Gelbe Liste Online*. 2017, Medizinische Medien Informations GmbH: Neu-Isenburg.
56. Gregory, R.K. and I.E. Smith, *Vinorelbine--a clinical review*. Br J Cancer, 2000. **82**(12): p. 1907-13.
57. Cline, M.J., *Effect of vincristine on synthesis of ribonucleic acid and protein in leukaemic leucocytes*. Br J Haematol, 1968. **14**(1): p. 21-9.
58. Redaktion Gelbe Liste Online, *Fachinformation: Vincristinsulfat-Teva® 1mg/ml Inj.-Lsg., 1ml*. 2017, Medizinische Medien Informations GmbH: Neu-Isenburg.
59. Therapeutic Goods Administration, *Australian Public Assessment Report for Vinflunine ditartrate*. 2011, Australian Government, Department of Health.
60. Redaktion Gelbe Liste Online, *Fachinformation: Javlor 25 mg/ml Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung, 10 ml*. 2017, Medizinische Medien Informations GmbH: Neu-Isenburg.
61. Wilkes, G.M., Barton-Burke M., *Oncology nursing drug handbook*. The Jones and Bartlett series in oncology. 2011, Boston: Jones and Bartlett Publishers. 1368 p.
62. Tiburi, M., et al., *Comparative genotoxic effect of vincristine, vinblastine, and vinorelbine in somatic cells of Drosophila melanogaster*. Mutat Res, 2002. **519**(1-2): p. 141-9.
63. Redaktion Gelbe Liste Online, *Fachinformation: Vinorelbin-Actavis 10 mg/ml Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung, 5 ml*. 2017, Medizinische Medien Informations GmbH: Neu-Isenburg.
64. Ngo, Q.A., et al., *Synthesis and antiproliferative activity of new vinca alkaloids containing an alpha,beta-unsaturated aromatic side chain*. Bioorg Med Chem Lett, 2015. **25**(23): p. 5597-600.
65. Vukovic, J., et al., *Production of 3', 4'-Anhydrovinblastine - a Unique Chemical Synthesis*. Tetrahedron, 1988. **44**(2): p. 325-331.
66. Lonza Walkersville Inc. *Certificate of analysis*. 2015 [cited 2018 27.01.]; Product Code: 2C-101B, Lot Number: 0000458849]. Available from: <https://www.lonza.com/layouts/CertificatesOfAnalysisDownload.aspx?catnum=2C-101B&lotnum=0000458849>.
67. Glaser, K., et al., *Effect of Radiofrequency Radiation on Human Hematopoietic Stem Cells*. Radiat Res, 2016. **186**(5): p. 455-465.
68. Levy, J.A., M. Virolainen, and V. Defendi, *Human lymphoblastoid lines from lymph node and spleen*. Cancer, 1968. **22**(3): p. 517-24.
69. Skopek, T.R., et al., *Isolation of a human lymphoblastoid line heterozygous at the thymidine kinase locus: possibility for a rapid human cell mutation assay*. Biochem Biophys Res Commun, 1978. **84**(2): p. 411-6.
70. Davis, J.B. and P. Maher, *Protein kinase C activation inhibits glutamate-induced cytotoxicity in a neuronal cell line*. Brain Res, 1994. **652**(1): p. 169-73.
71. Gallagher, R., et al., *Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia*. Blood, 1979. **54**(3): p. 713-33.
72. Bennett, J.M., et al., *Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group*. Br J Haematol, 1976. **33**(4): p. 451-8.
73. Jaffe, E.S., *Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Classification of Tumours. Vol. 3rd. 2001, Geneva: World Health Organization. 351 p.

74. Martens, M.G., et al., *Presence of Chlamydia, Mycoplasma, ureaplasma, and other bacteria in the upper and lower genital tracts of fertile and infertile populations*. Infect Dis Obstet Gynecol, 1993. **1**(2): p. 85-90.
75. Nikfarjam, L. and P. Farzaneh, *Prevention and detection of Mycoplasma contamination in cell culture*. Cell J, 2012. **13**(4): p. 203-12.
76. Razin, S., D. Yogev, and Y. Naot, *Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas*. Microbiol Mol Biol Rev, 1998. **62**(4): p. 1094-156.
77. Xu, Y., et al., *Corticosterone induced morphological changes of hippocampal and amygdaloid cell lines are dependent on 5-HT7 receptor related signal pathway*. Neuroscience, 2011. **182**: p. 71-81.
78. Lea, T., *Caco-2 Cell Line*, in *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*, K. Verhoeckx, et al., Editors. 2015, Springer International Publishing: Cham. p. 103-111.
79. Covacci, V., et al., *DNA oxidative damage during differentiation of HL-60 human promyelocytic leukemia cells*. Chem Res Toxicol, 2001. **14**(11): p. 1492-7.
80. Collins, S.J., et al., *Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1978. **75**(5): p. 2458-62.
81. Collins, S.J., et al., *Normal functional characteristics of cultured human promyelocytic leukemia cells (HL-60) after induction of differentiation by dimethylsulfoxide*. J Exp Med, 1979. **149**(4): p. 969-74.
82. Collins, J.M. and K.A. Foster, *Differentiation of promyelocytic (HL-60) cells into mature granulocytes: mitochondrial-specific rhodamine 123 fluorescence*. J Cell Biol, 1983. **96**(1): p. 94-9.
83. Foa, P., et al., *Growth pattern of the human promyelocytic leukaemia cell line HL60*. Cell Tissue Kinet, 1982. **15**(4): p. 399-404.
84. Fenech, M. and A.A. Morley, *Measurement of micronuclei in lymphocytes*. Mutat Res, 1985. **147**(1-2): p. 29-36.
85. Alberts, B., *Molecular biology of the cell*. 4th ed. 2002, New York: Garland Science. p. 1548 p. 191-234.
86. Stopper, H., et al., *Micronuclei Induced by Modulators of Methylation - Analogs of 5-Azacytidine*. Carcinogenesis, 1995. **16**(7): p. 1647-1650.
87. Stopper, H., R. Pechan, and D. Schiffmann, *5-azacytidine induces micronuclei in and morphological transformation of Syrian hamster embryo fibroblasts in the absence of unscheduled DNA synthesis*. Mutat Res, 1992. **283**(1): p. 21-8.
88. Martin, R.M., H. Leonhardt, and M.C. Cardoso, *DNA labeling in living cells*. Cytometry A, 2005. **67**(1): p. 45-52.
89. Holtfreter, H.B. and N. Cohen, *Fixation-associated quantitative variations of DNA fluorescence observed in flow cytometric analysis of hemopoietic cells from adult diploid frogs*. Cytometry, 1990. **11**(6): p. 676-85.
90. Shapiro, H.M., *Flow cytometric probes of early events in cell activation*. Cytometry, 1981. **1**(5): p. 301-12.
91. Rotman, B. and B.W. Papermaster, *Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1966. **55**(1): p. 134-41.
92. Huang, Q., L. Baum, and W.L. Fu, *Simple and practical staining of DNA with GelRed in agarose gel electrophoresis*. Clin Lab, 2010. **56**(3-4): p. 149-52.
93. OECD, *Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test*. OECD Publishing.

94. Ostling, O. and K.J. Johanson, *Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1984. **123**(1): p. 291-8.
95. Singh, N.P., et al., *A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells*. Exp Cell Res, 1988. **175**(1): p. 184-91.
96. Nitiss, J.L., *DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(5): p. 327-37.
97. Nitiss, J.L., *Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(5): p. 338-50.
98. Merk, O. and G. Speit, *Detection of crosslinks with the comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity*. Environ Mol Mutagen, 1999. **33**(2): p. 167-72.
99. Oliver, R.T., *Testicular cancer*. Curr Opin Oncol, 1994. **6**(3): p. 285-91.
100. Kelland, L.R., et al., *Preclinical antitumor evaluation of bis-acetato-ammine-dichloro-cyclohexylamine platinum(IV): an orally active platinum drug*. Cancer Res, 1993. **53**(11): p. 2581-6.
101. Chvalova, K., V. Brabec, and J. Kasparkova, *Mechanism of the formation of DNA-protein cross-links by antitumor cisplatin*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(6): p. 1812-21.
102. Paz, M.M., et al., *A new mechanism of action for the anticancer drug mitomycin C: mechanism-based inhibition of thioredoxin reductase*. Chem Res Toxicol, 2012. **25**(7): p. 1502-11.
103. Andreoli, C., et al., *Processing of DNA damage induced by hydrogen peroxide and methyl methanesulfonate in human lymphocytes: analysis by alkaline single cell gel electrophoresis and cytogenetic methods*. Mutagenesis, 1999. **14**(5): p. 497-504.
104. Rastogi, R.P., et al., *Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair*. J Nucleic Acids, 2010. **2010**: p. 592980.
105. Vande Loock, K., et al., *An aphidicolin-block nucleotide excision repair assay measuring DNA incision and repair capacity*. Mutagenesis, 2010. **25**(1): p. 25-32.
106. Baranovskiy, A.G., et al., *Structural basis for inhibition of DNA replication by aphidicolin*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(22): p. 14013-21.
107. Speit, G., et al., *Further investigations on the modified comet assay for measuring aphidicolin-block nucleotide excision repair*. Mutagenesis, 2013. **28**(2): p. 145-51.
108. Kumar, S., *Caspase function in programmed cell death*. Cell Death Differ, 2007. **14**(1): p. 32-43.
109. Fink, S.L. and B.T. Cookson, *Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells*. Infect Immun, 2005. **73**(4): p. 1907-16.
110. Darzynkiewicz, Z., H.D. Halicka, and H. Zhao, *Analysis of cellular DNA content by flow and laser scanning cytometry*. Adv Exp Med Biol, 2010. **676**: p. 137-47.
111. Schieber, M. and N.S. Chandel, *ROS function in redox signaling and oxidative stress*. Curr Biol, 2014. **24**(10): p. R453-62.
112. Wang, X., et al., *Imaging ROS signaling in cells and animals*. J Mol Med (Berl), 2013. **91**(8): p. 917-27.
113. Kadia, T.M., et al., *New drugs in acute myeloid leukemia*. Ann Oncol, 2016. **27**(5): p. 770-8.
114. Kramer, N.I., et al., *Quantifying processes determining the free concentration of phenanthrene in Basal cytotoxicity assays*. Chem Res Toxicol, 2012. **25**(2): p. 436-45.
115. Blaauboer, B.J., *Biokinetic modeling and in vitro-in vivo extrapolations*. J Toxicol Environ Health B Crit Rev, 2010. **13**(2-4): p. 242-52.

116. Broeders, J.J., B.J. Blaauboer, and J.L. Hermens, *In vitro biokinetics of chlorpromazine and the influence of different dose metrics on effect concentrations for cytotoxicity in Balb/c 3T3, Caco-2 and HepaRG cell cultures*. Toxicol In Vitro, 2013. **27**(3): p. 1057-64.
117. Vandevoorde, C., et al., *Radiation Sensitivity of Human CD34(+) Cells Versus Peripheral Blood T Lymphocytes of Newborns and Adults: DNA Repair and Mutagenic Effects*. Radiat Res, 2016. **185**(6): p. 580-90.
118. Kimura, A., A. Miyata, and M. Honma, *A combination of in vitro comet assay and micronucleus test using human lymphoblastoid TK6 cells*. Mutagenesis, 2013. **28**(5): p. 583-90.
119. Sobol, Z., et al., *Impact of cell cycle delay on micronucleus frequency in TK6 cells*. Environ Mol Mutagen, 2014. **55**(1): p. 64-9.
120. Detrich, H.W., 3rd, et al., *Cold adaptation of microtubule assembly and dynamics. Structural interpretation of primary sequence changes present in the alpha- and beta-tubulins of Antarctic fishes*. J Biol Chem, 2000. **275**(47): p. 37038-47.
121. Said, R. and A.M. Tsimberidou, *Pharmacokinetic evaluation of vincristine for the treatment of lymphoid malignancies*. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2014. **10**(3): p. 483-94.
122. Fenech, M., *The micronucleus assay determination of chromosomal level DNA damage*. Methods Mol Biol, 2008. **410**: p. 185-216.
123. Abernethy, D.J., et al., *Human CD34+ hematopoietic progenitor cells are sensitive targets for toxicity induced by 1,4-benzoquinone*. Toxicol Sci, 2004. **79**(1): p. 82-9.
124. Hintzsche, H., et al., *Fate of micronuclei and micronucleated cells*. Mutat Res, 2017. **771**: p. 85-98.
125. Kirsch-Volders, M., et al., *The in vitro MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance*. Arch Toxicol, 2011. **85**(8): p. 873-99.
126. Lovell, D.P., et al., *Analysis of negative historical control group data from the in vitro micronucleus assay using TK6 cells*. Mutat Res, 2018. **825**: p. 40-50.
127. Milyavsky, M., et al., *A distinctive DNA damage response in human hematopoietic stem cells reveals an apoptosis-independent role for p53 in self-renewal*. Cell Stem Cell, 2010. **7**(2): p. 186-97.
128. Revollo, J., et al., *Whole genome and normalized mRNA sequencing reveal genetic status of TK6, WTK1, and NH32 human B-lymphoblastoid cell lines*. Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen, 2016. **795**: p. 60-9.
129. U.S.-Environmental-Protection-Agency, *Lymphohematopoietic Cancers Induced by Chemicals and Other Agents: Overview and Implications for Risk Assessment*. 2012: Washington DC.
130. Wyles, S.P., E.B. Brandt, and T.J. Nelson, *Stem cells: the pursuit of genomic stability*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(11): p. 20948-67.
131. Fu, X., et al., *DNA repair mechanisms in embryonic stem cells*. Cell Mol Life Sci, 2017. **74**(3): p. 487-493.
132. Vasilyev, S.A., et al., *DNA damage response in CD133 + stem/progenitor cells from umbilical cord blood: low level of endogenous foci and high recruitment of 53BP1*. Int J Radiat Biol, 2013. **89**(4): p. 301-9.
133. Chlon, T.M., et al., *Overcoming Pluripotent Stem Cell Dependence on the Repair of Endogenous DNA Damage*. Stem Cell Reports, 2016. **6**(1): p. 44-54.
134. Sart, S., L. Song, and Y. Li, *Controlling Redox Status for Stem Cell Survival, Expansion, and Differentiation*. Oxid Med Cell Longev, 2015. **2015**: p. 105135.

135. Golan, K., O. Kollet, and T. Lapidot, *Dynamic Cross Talk between S1P and CXCL12 Regulates Hematopoietic Stem Cells Migration, Development and Bone Remodeling*. Pharmaceuticals (Basel), 2013. **6**(9): p. 1145-69.
136. Walter, D., et al., *Exit from dormancy provokes DNA-damage-induced attrition in haematopoietic stem cells*. Nature, 2015. **520**(7548): p. 549-52.
137. Lo, T., et al., *Glucose reduction prevents replicative senescence and increases mitochondrial respiration in human mesenchymal stem cells*. Cell Transplant, 2011. **20**(6): p. 813-25.
138. Ebert, R., et al., *Selenium supplementation restores the antioxidative capacity and prevents cell damage in bone marrow stromal cells in vitro*. Stem Cells, 2006. **24**(5): p. 1226-35.
139. Cadet, J. and K.J.A. Davies, *Oxidative DNA damage & repair: An introduction*. Free Radic Biol Med, 2017. **107**: p. 2-12.
140. Dannenmann, B., et al., *High glutathione and glutathione peroxidase-2 levels mediate cell-type-specific DNA damage protection in human induced pluripotent stem cells*. Stem Cell Reports, 2015. **4**(5): p. 886-98.
141. Mohamed, E.Y., et al., *Patients' Satisfaction with Primary Health Care Centers' Services, Majmaah, Kingdom of Saudi of Saudi Arabia*. Int J Health Sci (Qassim), 2015. **9**(2): p. 163-70.
142. Gidding, C.E., et al., *Vincristine revisited*. Crit Rev Oncol Hematol, 1999. **29**(3): p. 267-87.
143. Kingston, D., Cragg, G. M., Newmann, D., *Anticancer Agents from Natural Products*. 2 ed, ed. G.M. Cragg. 2012, Boca Raton: CRC Press. 767 p. 177-198.
144. Bonfil, R.D., et al., *Higher antitumor activity of vinflunine than vinorelbine against an orthotopic murine model of transitional cell carcinoma of the bladder*. Urol Oncol, 2002. **7**(4): p. 159-66.
145. Zhang, Z.J., et al., *Vinmajorines C-E, Monoterpenoid Indole Alkaloids from Vinca major*. Helvetica Chimica Acta, 2016. **99**(2): p. 157-160.
146. Jean-Decoster, C., et al., *Vinflunine, a new vinca alkaloid: cytotoxicity, cellular accumulation and action on the interphasic and mitotic microtubule cytoskeleton of PtK2 cells*. Anticancer Drugs, 1999. **10**(6): p. 537-43.
147. Zucker, R.M., K. Whittington, and B.J. Price, *Differentiation of HL-60 cells: cell volume and cell cycle changes*. Cytometry, 1983. **3**(6): p. 414-8.
148. Kolomeichuk, S.N., et al., *Distinct signaling pathways of microtubule inhibitors--vinblastine and Taxol induce JNK-dependent cell death but through AP-1-dependent and AP-1-independent mechanisms, respectively*. FEBS J, 2008. **275**(8): p. 1889-99.
149. Bonaterra, G.A., et al., *Neurotrophic, Cytoprotective, and Anti-inflammatory Effects of St. John's Wort Extract on Differentiated Mouse Hippocampal HT-22 Neurons*. Front Pharmacol, 2017. **8**: p. 955.
150. Ferruzza, S., et al., *A protocol for differentiation of human intestinal Caco-2 cells in asymmetric serum-containing medium*. Toxicol In Vitro, 2012. **26**(8): p. 1252-5.
151. Hoessly, M.C., R.M. Rossi, and S.A. Fischkoff, *Factors responsible for variable reported lineages of HL-60 cells induced to mature with butyric acid*. Cancer Res, 1989. **49**(13): p. 3594-7.
152. Hollander, Z. and M.R. Loken, *Simultaneous analysis of DNA content and surface antigens in human bone marrow*. Cytometry, 1988. **9**(5): p. 485-90.

153. Rossi, A., et al., *New pyrazolo-[3,4-d]-pyrimidine derivative Src kinase inhibitors lead to cell cycle arrest and tumor growth reduction of human medulloblastoma cells*. *FASEB J*, 2010. **24**(8): p. 2881-92.
154. Patel, K., et al., *Cytotoxicity of folic acid conjugated hollow silica nanoparticles toward Caco2 and 3T3 cells, with and without encapsulated DOX*. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2016. **140**: p. 213-222.
155. Nagy, K., et al., *Induction of granulocytic maturation in HL-60 human leukemia cells by free radicals: a hypothesis of cell differentiation involving hydroxyl radicals*. *Free Radic Res Commun*, 1993. **19**(1): p. 1-15.
156. He, M., et al., *Differentiation renders susceptibility to excitotoxicity in HT22 neurons*. *Neural Regen Res*, 2013. **8**(14): p. 1297-306.
157. Kaina, B., et al., *MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents*. *DNA Repair (Amst)*, 2007. **6**(8): p. 1079-99.
158. McClendon, A.K. and N. Osheroff, *DNA topoisomerase II, genotoxicity, and cancer*. *Mutat Res*, 2007. **623**(1-2): p. 83-97.
159. Ganapathi, R., et al., *Acquisition of doxorubicin resistance in human leukemia HL-60 cells is reproducibly associated with 7q21 chromosomal anomalies*. *Cancer Genet Cytogenet*, 1996. **86**(2): p. 116-9.
160. Sugimoto, K., et al., *Temporal and spatial distribution of DNA topoisomerase II alters during proliferation, differentiation, and apoptosis in HL-60 cells*. *Blood*, 1998. **91**(4): p. 1407-17.
161. Liu, S.M., W. Chen, and J. Wang, *Distinguishing between cancer cell differentiation and resistance induced by all-trans retinoic acid using transcriptional profiles and functional pathway analysis*. *Sci Rep*, 2014. **4**: p. 5577.
162. Nogueira-Pedro, A., et al., *Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) induces leukemic but not normal hematopoietic cell death in a dose-dependent manner*. *Cancer Cell Int*, 2013. **13**(1): p. 123.
163. Azqueta, A., et al., *Comet assay to measure DNA repair: approach and applications*. *Front Genet*, 2014. **5**: p. 288.
164. Spanswick, V.J., J.M. Hartley, and J.A. Hartley, *Measurement of DNA interstrand crosslinking in individual cells using the Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay*. *Methods Mol Biol*, 2010. **613**: p. 267-82.
165. Gedik, C.M., S.W. Ewen, and A.R. Collins, *Single-cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells*. *Int J Radiat Biol*, 1992. **62**(3): p. 313-20.
166. Azqueta, A. and A.R. Collins, *The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair*. *Arch Toxicol*, 2013. **87**(6): p. 949-68.
167. Cipollini, M., et al., *Can individual repair kinetics of UVC-induced DNA damage in human lymphocytes be assessed through the comet assay?* *Mutat Res*, 2006. **601**(1-2): p. 150-61.
168. Hu, D.E. and K.M. Brindle, *Immune cell-induced synthesis of NO and reactive oxygen species in lymphoma cells causes their death by apoptosis*. *FEBS Lett*, 2005. **579**(13): p. 2833-41.

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Stammzellhierarchie ausgehend von der totipotenten befruchteten Eizelle bis hin zu ausdifferenzierten adulten Zellen.....	6
Abbildung 2: Statistische Darstellung der weltweiten Verteilung von Krebsneuerkrankungen (Inzidenz) nach Weltregionen im Jahr 2012. ....	9
Abbildung 3: Beispielhafte mikroskopische Darstellung undiff. HL-60-Zellen und diff. HL-60-Zellen. ....	37
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Durchführung einer Einzelzellgelelektrophorese mit zwei Proben (undiff. und diff. Zellen) pro Objektträger.....	42
Abbildung 5: Beispielhafte Darstellung von HL-60-Zellen nach Durchführung einer Einzelzellgelelektrophorese. ....	44
Abbildung 6: Schematische Darstellung eines Dot-Plot-Diagramms nach durchflusszytometrischer Apoptosedetektion von HL-60-Zellen nach Anfärben mit Annexin-V-FLUOS und PI.....	48
Abbildung 7: Schematische Darstellung zweier Histogramme nach durchflusszytometrischer Zellzyklusdetektion von HL-60-Zellen nach Anfärben mit PI.....	49
Abbildung 8: Ergebnisse der Proliferation hämatopoetischer Stammzellen (A = HSZ) und TK6-Zellen (B = TK6) nach Behandlung mit Doxorubicin (4 h) und Nachbehandlung mit Cytochalasin B (20 h).....	56
Abbildung 9: Ergebnisse der Proliferation hämatopoetischer Stammzellen (A) und TK6-Zellen (B) nach Behandlung mit Vinblastin (VBL, 4 h) und Nachbehandlung mit Cytochalasin B (20 h). ....	57
Abbildung 10: Ergebnisse der Proliferation hämatopoetischer Stammzellen (A) und TK6-Zellen (B) nach Behandlung mit Methylmethansulfonat (MMS, 4 h) und Nachbehandlung mit Cytochalasin B (20 h). ....	57
Abbildung 11: Ergebnisse der Proliferation hämatopoetischer Stammzellen (A) und TK6-Zellen (B) nach Behandlung mit Mitomycin C (MMC, 4 h) und Nachbehandlung mit Cytochalasin B (20 h).....	58

Abbildung 12: Ergebnisse der mikroskopischen Apoptosedetektion hämatopoetischer Stammzellen (A) und TK6-Zellen (B) nach Behandlung mit Doxorubicin (4 h) und Nachbehandlung mit Cytochalasin B (20 h).....	59
Abbildung 13: Ergebnisse der mikroskopischen Apoptosedetektion hämatopoetischer Stammzellen (A) und TK6-Zellen (B) nach Behandlung mit Vinblastin (VBL, 4 h) und Nachbehandlung mit Cytochalasin B (20 h).....	60
Abbildung 14: Ergebnisse der mikroskopischen Apoptosedetektion hämatopoetischer Stammzellen (A) und TK6-Zellen (B) nach Behandlung mit Methylmethansulfonat (MMS, 4 h) und Nachbehandlung mit Cytochalasin B (20 h).....	60
Abbildung 15: Ergebnisse der mikroskopischen Apoptosedetektion hämatopoetischer Stammzellen (A) und TK6-Zellen (B) nach Behandlung mit Mitomycin C (MMC, 4 h) und Nachbehandlung mit Cytochalasin B (20 h).....	61
Abbildung 16: Ergebnisse der mikroskopischen Mitosedetektion hämatopoetischer Stammzellen (A) und TK6-Zellen (B) nach Behandlung mit Doxorubicin (4 h) und Nachbehandlung mit Cytochalasin B (20 h).....	62
Abbildung 17: Ergebnisse der mikroskopischen Mitosedetektion hämatopoetischer Stammzellen (A) und TK6-Zellen (B) nach Behandlung mit Vinblastin (VBL, 4 h) und Nachbehandlung mit Cytochalasin B (20 h).....	63
Abbildung 18: Ergebnisse der mikroskopischen Mitosedetektion hämatopoetischer Stammzellen (A) und TK6-Zellen (B) nach Behandlung mit Methylmethansulfonat (MMS, 4 h) und Nachbehandlung mit Cytochalasin B (20 h).....	63
Abbildung 19: Ergebnisse der mikroskopischen Mitosedetektion hämatopoetischer Stammzellen (A) und TK6-Zellen (B) nach Behandlung mit Mitomycin C (MMC, 4 h) und Nachbehandlung mit Cytochalasin B (20 h).....	64
Abbildung 20: Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Detektion von Mikrokernen (MK) in hämatopoetischen Stammzellen (A) und TK6-Zellen (B) nach Behandlung mit Doxorubicin (4 h) und Nachbehandlung mit Cytochalasin B (20 h).....	65
Abbildung 21: Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Detektion von Mikrokernen (MK) in hämatopoetischen Stammzellen (A) und TK6-Zellen (B) nach Behandlung mit Vinblastin (VBL, 4 h) und Nachbehandlung mit Cytochalasin B (20 h).....	66

Abbildung 22: Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Detektion von Mikrokernen (MK) in hämatopoetischen Stammzellen (A) und TK6-Zellen (B) nach Behandlung mit Methylmethansulfonat (MMS, 4 h) und Nachbehandlung mit Cytochalasin B (20 h).....	66
Abbildung 23: Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Detektion von Mikrokernen (MK) in hämatopoetischen Stammzellen (A) und TK6-Zellen (B) nach Behandlung mit Mitomycin C (MMC, 4 h) und Nachbehandlung mit Cytochalasin B (20 h). ....	67
Abbildung 24: Ergebnisse der Proliferation für HL-60-Zellen nach Behandlung (24 h) mit Vinblastin (VBL), Vincristin (VCR), Vinflunin (VFL) und Vinorelbin (VRB; A) und 4-Chlorochablastin (4CBL) und 4-Chlorochacristin (4CCR; B). ....	71
Abbildung 25: Ergebnisse der Apoptosen für HL-60-Zellen nach Behandlung (24 h) mit Vinblastin (VBL), Vincristin (VCR), Vinflunin (VFL) und Vinorelbin (VRB; A) und 4-Chlorochablastin (4CBL) und 4-Chlorochacristin (4CCR; B). ....	73
Abbildung 26: Ergebnisse des Anteils der frühen Apoptose nach durchflusszytometrischer Messung für HL-60-Zellen nach Behandlung (24 h) mit Vinblastin (VBL), Vincristin (VCR), Vinflunin (VFL) und Vinorelbin (VRB). ....	75
Abbildung 27: Ergebnisse des Anteils der frühen Apoptose nach durchflusszytometrischer Messung für HL-60-Zellen nach Behandlung (24 h) mit 4-Chlorochablastin (4CBL) und 4-Chlorochacristin (4CCR; A) und 16a, 17b und 18a (B). ....	76
Abbildung 28: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Zellzyklusdetektion für HL-60-Zellen nach Behandlung (24 h) mit Vinblastin (VBL), Vincristin (VCR), Vinflunin (VFL) und Vinorelbin (VRB). ....	78
Abbildung 29: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Zellzyklusdetektion für HL-60-Zellen nach Behandlung (24 h) mit 4-Chlorochablastin (4CBL) und 4-Chlorochacristin (4CCR; A) und 16a, 17b und 18a (B).....	79
Abbildung 30: Ergebnisse fluoreszenzmikroskopischer Auswertung der Proliferation der HT-22-Zellen. ....	81
Abbildung 31: Ergebnisse durchlichtmikroskopischer Auswertung der Anzahl von Zellkuppeln in der Kultur der CaCo2-Zellen.....	82
Abbildung 32: Ergebnisse fluoreszenzmikroskopischer Auswertung der Morphologie der HL-60-Zellen. ....	83
Abbildung 33: Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung der Fluoreszenzintensität nach Bisbenzimid-Färbung der HT-22-Zellen. ....	85

Abbildung 34: Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung der Fluoreszenzintensität nach Bisbenzimid-Färbung der CaCo2-Zellen.....	86
Abbildung 35: Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung der Fluoreszenzintensität nach Bisbenzimid-Färbung der HL-60-Zellen. ....	87
Abbildung 36: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Zellzyklusmessung der HL-60-Zellen. ....	88
Abbildung 37: Darstellung der Ergebnisse der durchflusszytometrischen Zellzyklusmessung der HL-60-Zellen. ....	89
Abbildung 38: Ergebnisse der Einzelzellgelelektrophorese für HT-22-Zellen.....	97
Abbildung 39: Ergebnisse der Einzelzellgelelektrophorese für CaCo2-Zellen. ....	98
Abbildung 40: Ergebnisse der Einzelzellgelelektrophorese für HL-60-Zellen + MMS. ....	99
Abbildung 41: Ergebnisse der Einzelzellgelelektrophorese für HL-60-Zellen + Doxorubicin. ....	100
Abbildung 42: Ergebnisse der Einzelzellgelelektrophorese für HL-60-Zellen + Etoposid.....	101
Abbildung 43: Ergebnisse der Einzelzellgelelektrophorese für HL-60-Zellen + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	102
Abbildung 44: Ergebnisse der Einzelzellgelelektrophorese für HL-60-Zellen + MMC/ Cisplatin + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . ....	103
Abbildung 45: Ergebnisse der Einzelzellgelelektrophorese für HL-60-Zellen + MMC/ Cisplatin + Inkubation (4 h) + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	104
Abbildung 46: Ergebnisse der Einzelzellgelelektrophorese für HL-60-Zellen +/- UV-Bestrahlung und +/- Aphidicolin. ....	105
Abbildung 47: Ergebnisse der DCF-Fluoreszenzintensität für HL-60-Zellen nach Doxorubicinbehandlung.....	106
Abbildung 48: Ergebnisse der DCF-Fluoreszenzintensität für HL-60-Zellen nach Etoposidbehandlung.....	107
Abbildung 49: Ergebnisse der DHE-Fluoreszenzintensität für HL-60-Zellen nach Doxorubicinbehandlung.....	108
Abbildung 50: Ergebnisse der DHE-Fluoreszenzintensität für HL-60-Zellen nach Etoposidbehandlung.....	109

**TABELLENVERZEICHNIS**

Tabelle 1: Zusammenfassung der verwendeten Lösungen .....	22
Tabelle 2: Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien entsprechend der Zelllinien .....	27
Tabelle 3: Zusammensetzung der verwendeten Kulturmedien für den Auftau- und Kultivierungsvorgang der hämatopoetischen Stammzellen.....	29
Tabelle 4: Zytotoxizitätsergebnisse nach Substanzbehandlung der HSZ und der TK6-Zellen..	54
Tabelle 5: Zytotoxizitätsergebnisse der HL-60-Zellen nach Behandlung mit klassischen und neuen Vinca-Alkaloiden (4CBL, 4CCR) .....	68
Tabelle 6: Zytotoxizitätsergebnisse der HL-60-Zellen nach Behandlung mit neuen Vinca-Alkaloiden (16a, 17b, 18a) .....	69
Tabelle 7: Vitalitätsergebnisse der HT-22-Zellen nach Behandlung mit Methylmethansulfonat, Doxorubicin und Etoposid.....	90
Tabelle 8: Vitalitätsergebnisse der CaCo2-Zellen nach Behandlung mit Methylmethansulfonat, Doxorubicin und Etoposid.....	91
Tabelle 9: Vitalitätsergebnisse der HL-60-Zellen nach Behandlung mit Methylmethansulfonat, Doxorubicin und Etoposid.....	92
Tabelle 10: Vitalitätsergebnisse der HL-60-Zellen nach Behandlung mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , MMC/ Cisplatin + 200 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> und MMC/ Cisplatin + Inkubation + 200 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	94
Tabelle 11: Vitalitätsergebnisse der HL-60-Zellen nach Behandlung mit und ohne UV-Licht, mit und ohne Aphidicolin und nach direkter Kontrolle bzw. Kontrolle nach 2-stündiger Inkubation .....	95

## DANKSAGUNG

Ich möchte mich herzlich bei **Prof. Dr. Helga Stopper** für die Möglichkeit der Anfertigung und die Betreuung dieser Doktorarbeit, die freundliche Aufnahme im Arbeitskreis und die zahlreichen fachlichen Gespräche bedanken.

Sehr großer Dank gebührt auch **Dr. Henning Hintzsche** für die Bereitstellung des interessanten Themas in seiner Arbeitsgruppe, seinen stets freundschaftlich motivierenden Worten und seiner sehr guten Betreuung während dieser Zeit. Außerdem möchte ich mich bei ihm und bei **Prof. Dr. Angela Mally** für die Betreuung meiner Weiterbildung zur Fachapothekerin für Toxikologie und Ökologie bedanken.

In gleicher Weise möchte ich mich bei **Prof. Dr. Thomas Haaf** und **Prof. Dr. Markus Christmann** als Zweit- und Drittgutachter bedanken, dass Sie in mir die Begeisterung für wissenschaftliche Fragestellungen geweckt haben und Zeit für gemeinsame spannende Diskussionsrunden gefunden haben.

Ein weiterer Dank gilt der **Graduate School of Life Sciences**, welche mir durch viele Kursangebote ein breites Spektrum an Weiterbildungsmöglichkeiten und durch Reisestipendien die Vorstellung meiner Forschungsergebnisse auf Fachtagungen ermöglicht hat.

Weiterhin möchte ich mich bei **allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Toxikologie** für die gute Zusammenarbeit bedanken. Ein großer Dank gilt dabei besonders **Silvana, Betty, Simon, Jonas, Laura** und **Janina**, welche mir durch chaotische Minuten des Laboralltags geholfen haben und **Elizabeth** und **Sebastian**, die auch die Zeit außerhalb des Labors durch schöne und lustige Momente bereichert haben.

Meinen lieben Freundinnen **Annette, Anne** und **Silvana** möchte ich für die Unterstützung, die vielen Gespräche und die stets offenen Ohren danken.

Meinen **Schwiegereltern** und meinem **Schwager Alexander** danke ich für ihre Liebe und ihr Vertrauen und meiner **Schwägerin Katharina** für die Erstkorrektur dieser Arbeit in Akkordzeit. Aus tiefstem Herzen Danke ich meinen **Eltern Christine und Siegmund**, meinem **Bruder Martin** mit **ganzer Familie** für die Unterstützung während meiner gesamten Ausbildung und meines bisherigen Lebens.

Meinen größten Dank möchte ich meinem Mann **Maximilian** aussprechen. Deine Liebe, dein Rückhalt und deine immer positive Art haben diese Arbeit erst ermöglicht.

## PUBLIKATIONSLISTE

### Publikation

**Montag G.**, Stopper H., Ngo Q.A., Hintzsche H.; Biological activity of the novel vinca alkaloids 4-chlorochablastine and 4-chlorochacristine, *Current Cancer Drug Targets*, 2018 Apr 30. doi: 10.2174/1568009618666180430142233

Hintzsche, H., **Montag, G.**, Stopper, H. „Induction of micronuclei by four cytostatic compounds in human hematopoietic stem cells and human lymphoblastoid TK6 cells.“ *Scientific Reports*, 2018 Feb 20;8(1):3371. doi: 10.1038/s41598-018-21680-8.

### Beiträge auf wissenschaftlichen Fachtagungen (Vorträge)

**Montag, G.**, Stopper, H. „Differentiated and exponentially growing HL-60 and CaCo2 cells exhibit different sensitivity for genotoxic agents in the comet-assay.“ Vortrag, 84. Jahrestagung der Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), Göttingen, Deutschland, Febr 2018

Stopper, H., **Montag, G.** “Differentiated and exponentially growing HL-60 cells exhibit different sensitivity for genotoxic agents in the comet-assay.“ Vortrag, 12. Internationaler Comet Assay Workshop (ICAW), Pamplona, Spanien, Aug 2017

**Kukielka, G.**, Hintzsche, H., Stopper, H. „Toxicity of novel and classical vinca alkaloids in vitro.“ Vortrag, 4. GUM-Workshop Nachwuchsförderung der Gesellschaft für Umwelt-Mutationsforschung, München, Deutschland, Okt 2016

**Kukielka, G.**, Hintzsche, H., Stopper, H. „Sensitivity of hematopoietic stem cells and leukemia cell types against genotoxic agents.“ Vortrag, 4. GUM-Workshop Nachwuchsförderung der Gesellschaft für Umwelt-Mutationsforschung, Potsdam, Deutschland, Juli 2015

### Beiträge auf wissenschaftlichen Fachtagungen (Poster)

**Montag, G.**, Hintzsche H., Stopper H. Induction of micronuclei by four cytostatic compounds in human hematopoietic stem cells and human lymphoblastoid TK6 cells.“ Posterpräsentation, Jährliches Meeting der United Kingdom Environmental Mutagen Society (UKEMS), Leuven, Belgien, Jun 2017

**Kukielka, G.**, Hintzsche, H., Stopper, H. „Sensitivity of hematopoietic stem cells towards genotoxic agents in vitro.“ Posterpräsentation, 83. Jahrestagung der Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), Heidelberg, Deutschland, Mrz 2017

**Kukielka, G.**, Hintzsche, H., Stopper, H. „Toxicity of classical vinca alkaloids in vitro.“ Posterpräsentation, Symposium „DNA damage response, genetic instability and cancer“, Mainz, Deutschland, Nov 2016

Hintzsche H., **Kukielka, G.**, Stopper, H. „Toxicity of novel vinca alkaloids in vitro.“ Posterpräsentation, Symposium „DNA damage response, genetic instability and cancer“, Mainz, Deutschland, Nov 2016

**Kukielka, G.**, Hintzsche, H., Stopper, H. „Toxicity of classical vinca alkaloids in vitro.“ Posterpräsentation, GUM-Meeting der Gesellschaft für Umwelt-Mutationsforschung, München, Deutschland, Okt 2016

Hintzsche H., **Kukielka, G.**, Stopper, H. „Toxicity of novel vinca alkaloids in vitro.“ Posterpräsentation, GUM-Meeting der Gesellschaft für Umwelt-Mutationsforschung, München, Deutschland, Okt 2016

**Kukielka, G.**, Hintzsche, H., Stopper, H. „Sensitivity of different cell types of the hematopoietic system towards genotoxic agents.“ Posterpräsentation, 82. Jahrestagung der Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), Berlin, Deutschland, Mrz 2016

**Kukielka, G.**, Hintzsche, H., Stopper, H. „Sensitivity of hematopoietic stem cells and leukemia cell types against genotoxic agents.“ Posterpräsentation, GUM-GSLS workshop „Applied Genotoxicity research“, Würzburg, Deutschland, Nov 2015

**Kukielka, G.**, Hintzsche, H., Stopper, H. „Sensitivity of hematopoietic stem cells and leukemia cell types against genotoxic agents.“ Posterpräsentation, 10. Internationales GSLS Studenten Symposium „EUREKA!“, Würzburg, Deutschland, Okt 2015

## LEBENS LAUF



## **EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Rolle des Differenzierungszustandes für die Empfindlichkeit von Säugerzellen gegenüber genotoxischen Agenzien“ eigenständig, d. h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg, 18. Mai 2018

Ort, Datum

---

Gracia Montag

## **AFFIDAVIT**

I hereby confirm that my thesis entitled „Role of the differentiation status for the sensitivity of mammalian cells to genotoxic agents“ is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultant. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor similar form.

Würzburg, 18<sup>th</sup> May 2018

Place, Date

---

Gracia Montag

## ANHANG

## Proteingehälter der verwendeten Zellmedien

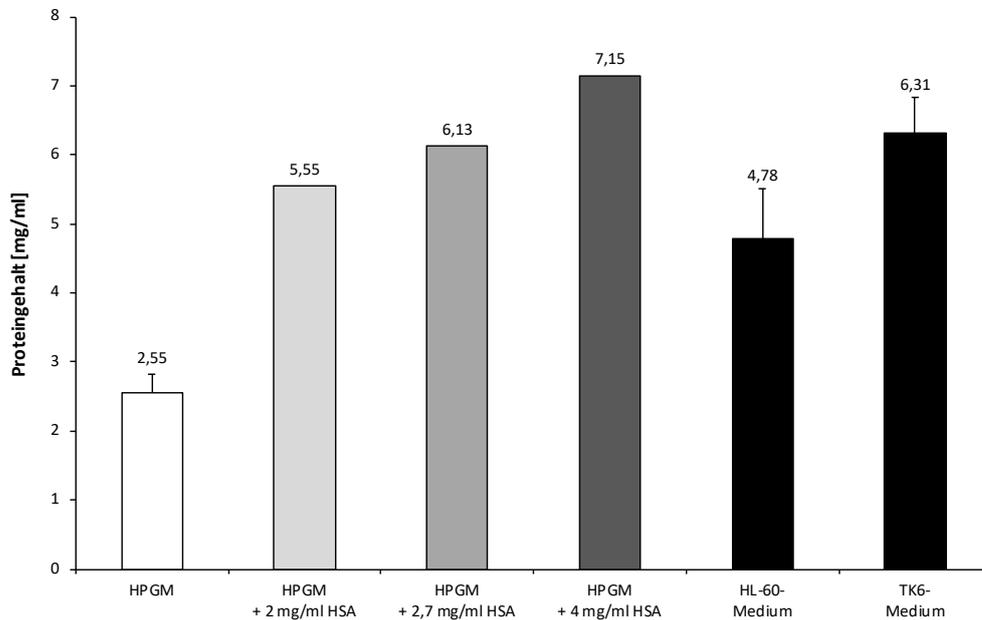


Abbildung A 1: Darstellung der Proteingehalte der verwendeten Zellkulturmedien nach photometrischer Bestimmung. Dem Stammzellmedium (HPGM) wurden vor der Vermessung 0 mg/ml (weiß) humanes Serumalbumin (HSA), 2 mg/ml HSA (hellgrau), 2,7 mg/ml HSA (middlegrau) und 4 mg/ml HSA (dunkelgrau) zugegeben. Die jeweiligen Zelllinienmedien für HL-60- und TK6-Zellen sind schwarz dargestellt.