



**Schicksal von Mikrokernen bzw. mikrokernhaltigen Zellen und
Bedeutung von Mikrokernen als Biomarker**

**Fate of micronuclei and micronucleated cells along with relevance of
micronuclei as biomarker**

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Biomedizin

Vorgelegt von

Hauke Reimann

aus

Lingen (Ems)

Würzburg 2021

Eingereicht am:

Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzende/r: Professor Dr. Manfred Gessler

1. Betreuer: PD Dr. Henning Hintzsche

2. Betreuer: Prof. Dr. Helga Stopper

3. Betreuer: Prof. Dr. Katrin Heinze

4. Betreuer: Prof. Dr. Markus Christmann

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Schicksal von Mikrokernen bzw. mikrokernhaltigen Zellen und Bedeutung von Mikrokernen als Biomarker

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	1
Zusammenfassung	4
Summary	6
Vorwort	8
1 Einleitung	9
1.1 Beschreibung Mikrokerne	9
1.1.1 Entstehung von Mikrokernen	10
1.1.2 Schicksal von Mikrokernen und mikrokernhaltigen Zellen	12
1.1.2.1 Degradation	13
1.1.2.2 Extrusion	14
1.1.2.3 Apoptose	15
1.1.2.4 Persistenz	16
1.1.2.5 Reinkorporation und Chromothripsis	17
1.2 Lebendzellmikroskopie	18
1.2.1 Lebendzellmikroskopie und Mikrokerne	19
1.3 Verwendung von Mikrokernen als Biomarker	20
1.3.1 Zytokinese-Block Mikrokerntest nach Thebainbehandlung	22
1.3.2 Zytokinese-Block Mikrokerntest nach Behandlung mit Celecoxib und Celecoxibderivaten	24
1.3.3 Mikrokerntest in Mundschleimhautzellen und neurodegenerative Erkrankungen	25
2 Zielsetzung	27
3 Material und Methoden	29
3.1 Chemikalien und Materialien	29
3.2 Zelllinien und -kultur	29
3.2.1 HeLa-H2B-GFP-Zellen	29
3.2.2 Erstellung weiterer Zelllinien	30
3.2.2.1 Vektorkonstruktion	30
3.2.2.2 Vektorproduktion	34
3.2.2.3 Transfektion und Transduktion	37
3.2.3 TK6-Zellen	38

Inhaltsverzeichnis

3.2.4	HepG2	38
3.3	Substanzen und Behandlungen	39
3.4	Zytokinese-Block Mikrokerntest	39
3.5	Vitalitätstest	41
3.6	Lebendzellmikroskopie	42
3.6.1	Durchführung der Lebendzellmikroskopie	42
3.6.2	Auswertung Lebendzellmikroskopie	44
3.7	Immunfärbung von γ H2AX	47
3.8	Mikrokerntest in Mundschleimhautzellen	48
3.9	Statistik	51
4	Ergebnis	52
4.1	Schicksal von Mikrokernen und mikrokernhaltigen Zellen in der Lebendzellmikroskopie	52
4.1.1	Vorversuche	52
4.1.2	Schicksal von Mikrokernen	53
4.1.2.1	Anzahl der Mikrokerne im Verlauf der Generationen	54
4.1.2.2	Persistenz, Reinkorporation, Degradation und Extrusion	57
4.1.2.3	Neubildung von Mikrokernen	59
4.1.2.4	Mikrokerngröße	60
4.1.3	Schicksal von mikrokernhaltigen Zellen	61
4.1.3.1	Anzahl Zellen im Verlauf der Generationen	61
4.1.3.2	Anteil der mikrokernhaltigen Zellen	64
4.1.3.3	Häufigkeit der Mitose	67
4.1.3.4	Häufigkeit von Zelltod	70
4.1.3.5	Häufigkeit inaktiver Zellen	73
4.1.3.6	Dauer von Interphase und Mitose	76
4.1.3.7	Häufigkeit von abnormalen Ereignissen	82
4.1.4	Weitere Untersuchung der Extrusion	84
4.2	Untersuchung von Mikrokerndegradation und Mikrokernmembranintegrität	85
4.2.1	Gentechnische Modifikation von HeLa-H2B-GFP	86
4.2.2	Untersuchung von Lamin B1 und LC3B in der Langzeitlebendzellmikroskopie	87
4.2.3	γ H2AX-Antikörperfärbung in Mikrokernen und mikrokernhaltigen Zellen	90
4.3	Gentoxizität von Thebain	95
4.3.1	Mikrokernhäufigkeit und Vitalität nach Thebainbehandlung	95
4.3.2	Einfluss durch metabolische Aktivierung	98
4.3.3	Mitose und Apoptose nach Thebainbehandlung	100
4.4	Gentoxizität von Celecoxib und Celecoxibderivaten	103

4.5	Mikrokerntest in Mundschleimhautzellen von zwei großen Kohorten mit und ohne neurodegenerative Erkrankungen	105
4.5.1	Vergleich von Referenz- und Patientengruppe	106
4.5.2	Untersuchung von möglichen Einflussfaktoren der Referenzgruppe	110
4.5.3	Lokalisierung von Mikrokernen in Mundschleimhautzellen	114
5	Diskussion	116
5.1	Mikrokernschicksal und die Bedeutung für die Kanzerogenese	116
5.1.1	Relevanz der beobachteten Ergebnisse	116
5.1.2	Eigenschaften des Mikrokerns	124
5.1.3	Konsequenzen der Mikrokernbildung	130
5.2	Mikrokerne als Marker für Gentoxizität	133
5.2.1	Gentoxizität nach Thebainbehandlung	133
5.2.2	Gentoxizität nach Behandlung mit Celecoxib und Celecoxibderivaten	136
5.2.3	Kognitive Beeinträchtigungen und ihre Bedeutung für chromosomale Instabilität in Mundschleimhautzellen	138
6	Schlussfolgerung	142
7	Literatur	144
8	Danksagung	153
9	Anhang	155
	Eidesstattliche Erklärung	164

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
Abb.	Abbildung
BaP	Benzo[a]pyren
BAS	Bovines Serumalbumin
BNF	β-Naphtoflavon
BrdU	Bromdesoxyuridin
bzw.	beziehungsweise
cDNA	komplementäre DNA
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX-2	Cyclooxygenase-2
DDR	DNA-Schadensreparatur
DHE	Dihydroethidium
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Nukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EC50	Mittlere effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFSA	Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit
FDA	Flouresceindiacetat
FITC	Flouresceinisothiocyanat
g	Gramm
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
ggf.	gegebenenfalls
Gy	Gray
h	Stunden

HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HR	Homologe Rekombination
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
IgG	Immunglobulin G
l	Liter
LB	Lysogeny Broth
LBK	Leichte kognitive Beeinträchtigung
LD ₅₀	Mittlere letale Dosis
M	Molar
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMC	Mitomycin C
MMS	Methylmethansulfonat
MMSE	Mini-Mental State Examination
ms	Millisekunden
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NaCl	Natriumchlorid
ND-filter	Neutraldichtefilter
ng	Nanogramm
NHEJ	Nicht-homologe Endverknüpfung
NK	Negativkontrolle
NO	Stickstoffmonoxid
PB	Phenobarbital
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBST	PBS mit Tween 20
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEI	Polyethylenimin
PFA	Paraformaldehyd
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunden

Abkürzungen

SOB	Super Optimal Broth
tBHP	tert-Butylhydroperoxid
T _m	Schmelztemperatur
TRITC	5(6)-Tetramethylrhodaminisothiocyanat
u. a.	unter anderem
z. B.	zum Beispiel

Zusammenfassung

Mikrokerne sind als wichtiger Biomarker in der Genotoxizitätsforschung seit langer Zeit etabliert und ihre Bildung ist mechanistisch gut verstanden, wohingegen das Mikrokernschicksal und die genaue Funktion von Mikrokernen in der Kanzerogenese unzureichend erforscht sind. Um das Schicksal von Mikrokernen und mikrokernhaltigen Zellen über einen längeren Zeitraum zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen, die mit einem GFP-markierten Histon H2B transfiziert worden sind, mittels Lebendzellmikroskopie nach Behandlung mit verschiedenen genotoxischen Agenzien für 96 h untersucht. Parameter wie die Mitose- oder Zelltodrate wurden dabei ebenso wie das Schicksal der Mikrokerne dokumentiert. Während Persistenz und Reinkorporation von Mikrokernen häufig beobachtet wurden, waren Degradation und Auswurf von Mikrokernen selten bis gar nicht zu sehen. Auch konnte ein Teil der mikrokernhaltigen Zellen über mehrere Zellteilungen persistieren und proliferieren, wodurch die in Mikrokernen manifestierte chromosomale Instabilität unverändert bleiben kann. Ein eindeutiger Substanzeinfluss auf das Mikrokernschicksal konnte nicht ausgemacht werden. Extrusion sollte weiterhin durch Behandlung mit Hydroxyurea oder Cytochalasin B in Kombination mit genotoxischer Behandlung induziert werden, es wurde jedoch kein Effekt auf die Extrusionsrate beobachtet. Degradation wurde mittels γ H2AX-Antikörperfärbung und transduziertem dsRed-markierten Autophagiemarker LC3B in HeLa-H2B-GFP-Zellen untersucht. Trotz erhöhter DNA-Degradation in Mikrokernen wurde nur selten eine Ko-Lokalisierung mit LC3B beobachtet. Dafür gab es in HeLa-H2B-GFP-Zellen, die zusätzlich mit dsRed markierten Kernmembranmarker Lamin B1 transduziert worden sind, Anzeichen für eine eingeschränkte Mikrokernmembranintegrität.

Weiterhin wurden Zytokinese-Block Mikrokerntests nach Behandlung mit Thebain mit und ohne metabolische Aktivierung sowie Celecoxib und Celecoxibderivaten durchgeführt. Hierbei wurde nach Thebainbehandlung nur ohne metabolische Aktivierung und bei Anwesenheit von Zytotoxizität mehr Mikrokerne gefunden, während nach Behandlung mit Celecoxib und Celecoxibderivaten kein Anstieg beobachtet wurde. Zusätzlich wurde der Einfluss durch neurodegenerative Veränderungen auf Mundschleimhautzellen in zwei großen Kohorten untersucht,

wobei keine Effekte auf die Häufigkeit von Mikrokernen oder mikrokernhaltigen Zellen zugeordnet werden konnten, während es teilweise bei Parametern, die auf Zytotoxizität hindeuten, zu Veränderungen kam.

Es konnte insgesamt gezeigt werden, dass Mikrokerne und mikrokernhaltige Zellen zusätzlich zu ihrer Funktion als Biomarker über wenigstens mehrere Zellteilungen bestehen bleiben können. Auf diese Weise können sie z. B. über Chromothripsis zu einer beschleunigten Kanzerogenese führen, was zu einer schlechten Prognose für Krebspatienten führen kann.

Summary

Micronuclei have been established as biomarkers long ago in genotoxicity research and although formation is mechanistically well understood, the fate of micronuclei as well as micronuclei function in carcinogenesis are poorly investigated. To explore the long-term fate of micronuclei and micronucleated cells, HeLa cells transfected with GFP-tagged histone H2B were examined via live cell imaging after treatment with various genotoxic agents for 96 h. Parameters like mitosis or cell death rate as well as the development of micronuclei were analysed. While persistence and reincorporation of micronuclei were frequently observed, degradation and extrusion of micronuclei were found only rarely or never. A subset of micronucleated cells could persist and proliferate over multiple cell divisions, so that micronuclei as manifestation of chromosomal instability also persisted. No clear substance-related effect on micronucleus fate could be determined. Extrusion of micronuclei was furthermore investigated after treatment with hydroxyurea or after combination treatment with cytochalasin B and a genotoxic agent, but no effect on the extrusion rate was observed. Degradation of micronuclei was investigated in detail by γ H2AX antibody staining and transduction of dsRed-tagged autophagy marker LC3B in HeLa-H2B-GFP-cells. Although enrichment of DNA degradation in micronuclei were identified, co-localisation with LC3B was observed only rarely. In HeLa-H2B-GFP-cells transduced with dsRed-tagged nuclear membrane marker lamin B1, evidence for impaired nuclear membrane integrity was found.

In addition, cytokinesis-block micronucleus tests after treatment with thebaine with and without metabolic activation as well as celecoxib and celecoxib derivatives were conducted. After thebaine treatment, increased micronucleus frequency was only observed without metabolic activation and together with cytotoxicity, while treatment with celecoxib and celecoxib derivatives caused no effect on micronucleus frequency. Effects of neurodegenerative disease on DNA damage in buccal cells of two large cohorts were furthermore investigated, but no effect on the frequency of micronuclei and micronucleated cells was observed, while parameters indicating cytotoxicity showed alterations.

Summary

All in all, it could be demonstrated, that micronuclei and micronucleated cells, apart from their role as biomarker, can persist for multiple cell divisions. This way, cancerogenesis can be accelerated e.g. via chromothripsis, potentially leading to poor prognosis for cancer patients.

Vorwort

Teile dieser Arbeit wurden zuvor in verschiedenen wissenschaftlichen Publikationen veröffentlicht. So finden sich Teile aus Kapitel 4.1.1, 4.1.2.1-4.1.2.3, 4.1.3.1-4.1.3.7 und 5.1.1-5.1.2 dieser Arbeit in der Publikation von Reimann et al.: Long-term fate of etoposide-induced micronuclei and micronucleated cells in Hela-H2B-GFP cells, veröffentlicht in Archives of Toxicology 2020 Band 94, Seiten 3553–3561 [1]. Inhalte aus Kapitel 1.3.2, 4.5 und 5.2.2 finden sich in der Publikation von Reimann et al.: Cytokinesis-block micronucleus assay of celecoxib and celecoxib derivatives, veröffentlicht in Toxicology Reports 2020 Band 7, Seiten 1588-1591 [2]. Der Autor dieser Dissertation hat für beide Publikationen selbstständig die Daten generiert und ausgewertet sowie die Manuskriptentwürfe geschrieben, die dann nach Einsicht durch die Ko-Autoren von ihm überarbeitet wurden. Dasselbe gilt auch für die Publikation von Reimann et al.: Micronucleus frequency in buccal mucosa cells of patients with neurodegenerative diseases, veröffentlicht in Scientific Reports 2020 Band 10, Seite 22196, aus denen sich Inhalte aus Kapitel 1.3.3, 3.8, 4.6.1-4.6.2 und 5.2.3 wiederfinden, mit Ausnahme der Probenentnahme und -vorbereitung, die wie in der Publikation und in Kapitel 3.8 zu entnehmen im Rahmen einer anderen Studie oder durch die neurologische Ambulanz der Universitätsklinik Würzburg und unter Beteiligung von Silvana Wunram und Christin Misigaiski (Universität Würzburg) durchgeführt wurden [3].

Neunkirchen am Brand, 20.02.2021

Hauke Reimann

1 Einleitung

1.1 Beschreibung Mikrokerne

Eine grundlegende Fähigkeit von biologischen Zellen ist die Fähigkeit zur Proliferation, welche in den meisten eukaryotischen Zellen mit der Mitose verbunden ist. Während der Mitose werden die bei der S-Phase verdoppelten Chromosomen auf die entstehenden Tochterkerne verteilt. Es kommt im Laufe dessen zuerst zu einer Kernteilung, auf der in der Regel die Zellteilung folgt. Alle 46 menschlichen Chromosomen werden normalerweise während der Anaphase gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt. Jedoch kann es in manchen Fällen auch zu Fehlern in diesem Prozess kommen, sodass Chromosomen oder Teile von Chromosomen nicht in den Kern einer Tochterzelle gelangen, sondern im Zellplasma verbleiben [4]. Analog zum Hauptkern wird während der späten Anaphase und Telophase eine Kernmembran um das zurückbleibende DNA-Fragment gebildet und es entsteht ein sogenannter Mikrokern (Abb. 1, [5]). Auf diese Weise kann eine chromosomale Instabilität der Zelle sichtbar werden, die die Entstehung von Krebs begünstigen kann [6]. Neben Mikrokernen aus Chromosomen und chromosomalen Fragmenten gibt es weiterhin Mikrokerne bestehend aus *double minutes* (DM), wobei es sich um extrachromosomale vielfach amplifizierte Genabschnitte handelt [7]. Mikrokerne können spontan gebildet werden, jedoch gibt es weiterhin eine Vielzahl von Chemikalien und anderen Einflussfaktoren, die Mikrokerne induzieren [8-12]. Aber auch eine Reihe von Krankheiten und vor allem Krebs sind mit einem Anstieg an Mikrokernen assoziiert [13-15].

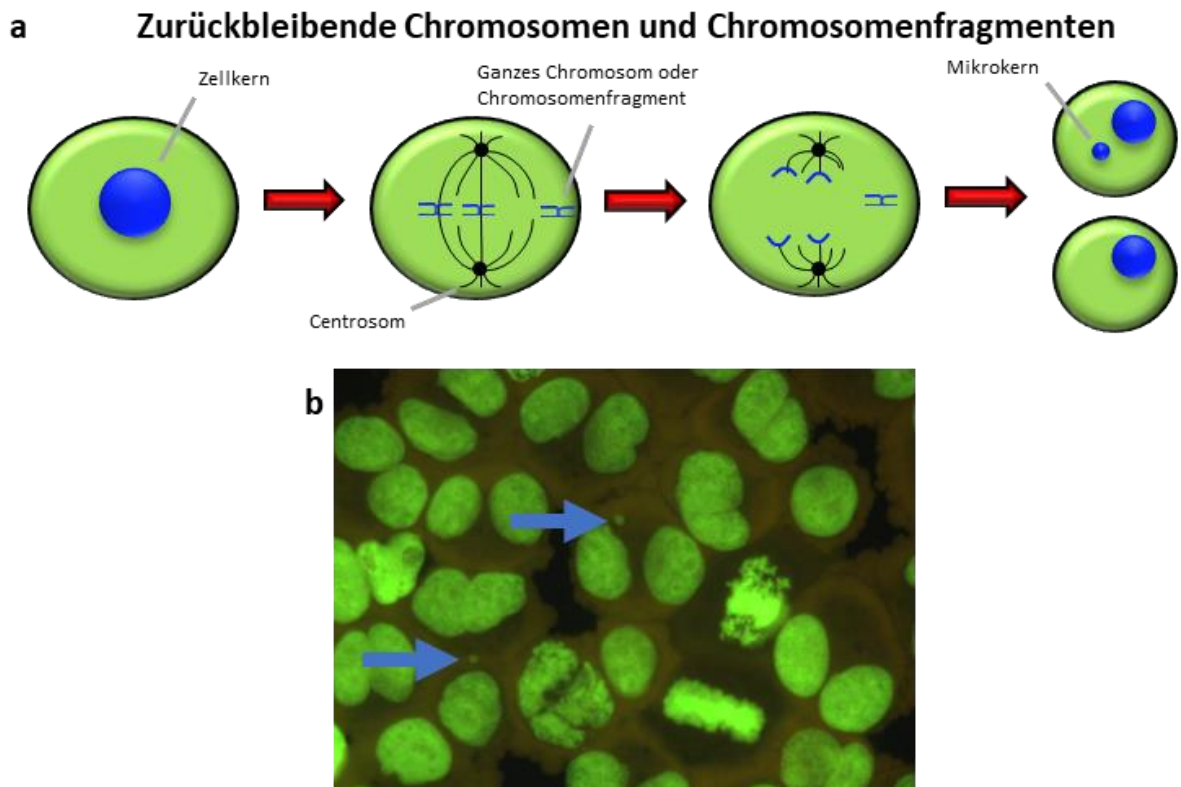


Abb. 1. Entstehung von Mikrokernen. (a) Während der Mitose lagern sich normalerweise die Chromosomen auf der Äquatorialebene der Zelle an und sind über Mikrotubuli mit den zuvor duplizierten Zentrosomen verbunden. Unter bestimmten Bedingungen erfolgt diese Bindung nicht korrekt und es bleibt ein Chromosom während der Zellteilung zurück und wird nicht gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt. Um dieses Chromosom bildet sich eine Kernmembran und es entsteht ein Mikrokern. Kommt es zu DNA-Doppelstrangbrüchen, entstehen Chromosomenfragmente, die auf Grund des Fehlens eines Centromers auch nicht mit den Zentrosomen verbunden werden können und ebenfalls zurückbleiben. (b) Mikrokerne (blaue Pfeile) in HeLa-Zellen nach Behandlung mit Etoposid und Cytochalasin B. Abbildung modifiziert nach [16].

1.1.1 Entstehung von Mikrokernen

Die Mechanismen hinter der Entstehung von Mikrokernen hängen unter anderem davon ab, ob ganze Chromosomen, chromosomale Fragmente oder DM im Mikrokern enthalten sind. Hierbei wurden zahlreiche Mechanismen zur Mikrokernbildung beobachtet, wobei neben genetischen auch epigenetische Veränderungen zur Mikrokernbildung führen können [17]:

1. Mikrokernen aus ganzen Chromosomen entstehen, wenn die korrekte Bindung der Mikrotubuli an die Kinetochore der Chromosomen während der Mitose nicht

erfolgt oder die Polymerisation und damit die Dynamik aus Wachstum und Abbau der Mikrotubuli nicht mehr möglich ist. Weiterhin können Schädigungen der Kinetochore oder der centromeren DNA eine Bindung auch bei funktionalen Mikrotubuli verhindern. Aber auch eine periphere Lokalisierung eines Chromosoms, eine verspätete Replikation oder Histonmodifikationen können zur Nichtbindung eines ganzen Chromosoms und damit zur Bildung von Mikrokernen aus ganzen Chromosomen führen (Abb. 1a, [17]).

2. Chromosomale Fragmente entstehen durch DNA-Doppelstrangbrüche, wodurch Teile des Chromosoms nicht mehr mit dem Rest verbunden bleiben. Zudem können chromosomale Brücken gebildet werden, die zerbrechen und so Chromosomenfragmente erzeugen. Eine Eliminierung dieser Fragmente kann unter Umständen über nukleäre „Knospen“ erst mit einiger Verzögerung bis in die Interphase hinein erfolgen (Abb. 1a, [17, 18]).
3. DM verteilen sich anders als Chromosomen nicht über eine Segregation während der Anaphase, sondern heften sich an Chromosomenarme und werden auf diese Weise an die Tochterzellen weitergegeben. Wie Chromosomen können aber auch DM zurückbleiben und einen Mikrokern bilden [7]. Treten nicht-reparierte DNA-Schäden auf DM auf, formieren diese Aggregate, wodurch die Elimination von DM in Form von Mikrokernen begünstigt wird [19]. Auch die Bildung von DM-haltigen Mikrokernen aus Membranbläschen während der Interphase wurde beobachtet, was auch hier einen Weg zum Auswurf von DM aus dem Hauptkern darstellt [20].

Neben einer spontanen Bildung können Mikrokerne auch durch zahlreiche Substanzen oder Bestrahlung ausgelöst werden. Hierbei unterscheidet man aneugene Substanzen, die über Mechanismen agieren, die zur Bildung von Mikrokernen mit ganzen Chromosomen führen und klastogene Substanzen (wozu auch die Bestrahlung gehört), die die Bildung von Mikrokernen mit Chromosomenfragmenten verursachen [18]. Ein wichtiger Schritt zur Mikrokernbildung ist in vielen Fällen replikativer Stress, der neben exogenen Faktoren auch endogene Ursachen (wie Sekundärstrukturen der DNA oder Chromatinkonformation) haben kann, sodass zelltypabhängig eine bestimmte Anzahl Mikrokerne auch unter physiologischen Bedingungen zu erwarten ist [21]

1.1.2 Schicksal von Mikrokernen und mikrokernhaltigen Zellen

Im Gegensatz zur Entstehung von Mikrokernen ist das Schicksal von Mikrokernen und mikrokernhaltigen Zellen vergleichsweise wenig verstanden. Es gibt nur wenige Studien, die dieses Forschungsfeld im Fokus haben, jedoch lassen sich trotzdem mögliche Schicksale aus der vorhandenen Literatur ableiten. So wurden sechs verschiedene Schicksale identifiziert, die möglicherweise für Mikrokerne relevant sein könnten: Degradation des Mikrokers, Extrusion des Mikrokers aus der Zelle, Apoptose der Zelle durch Mikrokernbildung, Persistenz des Mikrokers über mehrere Zellzyklen, Reinkorporation während einer der folgenden Mitosen sowie Chromothripsis von einzelnen Chromosomen, die durch Mikrokerne ermöglicht wird (Abb. 2, [22, 23]).

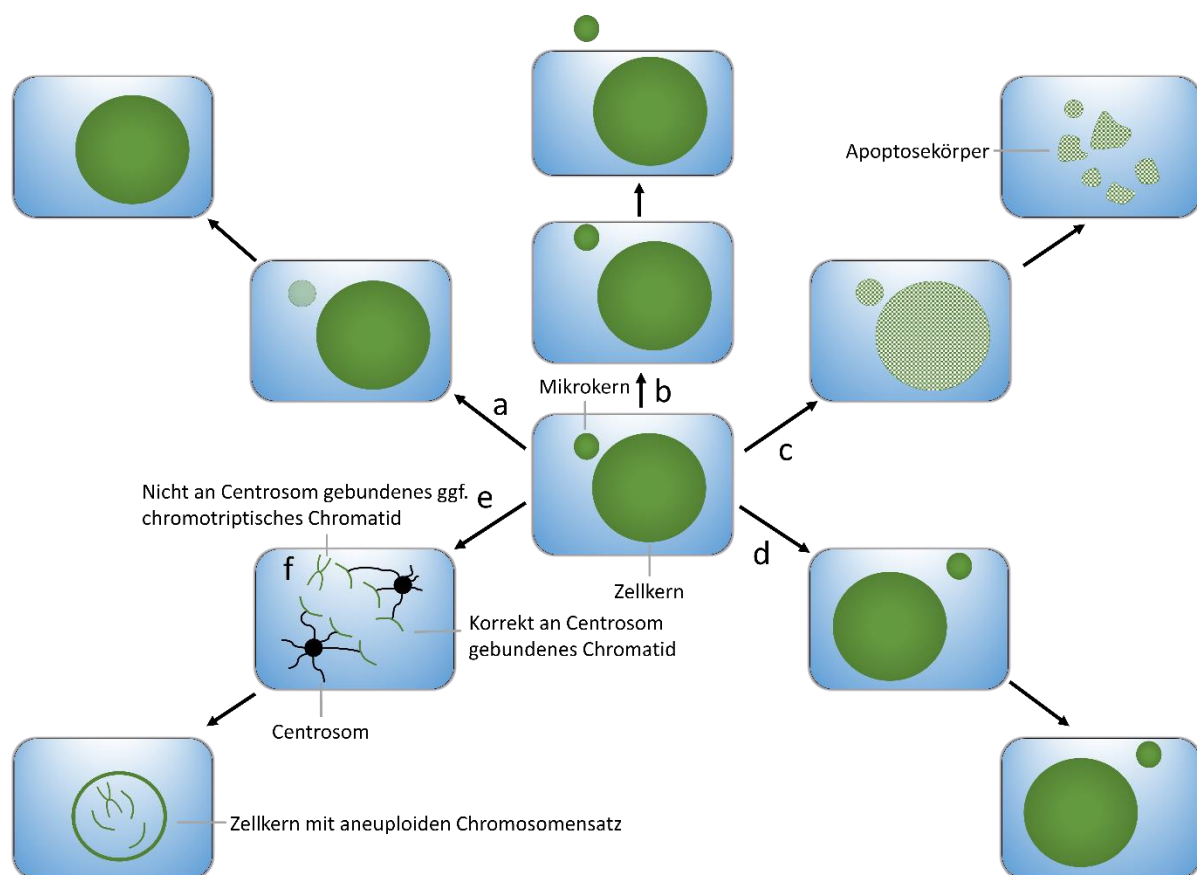


Abb. 2. Schicksale von Mikrokernen und mikrokernhaltigen Zellen. (a) Mikrokernen können degradiert, z. B. durch lysosomale Enzyme, (b) Mikrokernen können aus der Zelle ausgeworfen werden, (c) die gesamte Zelle zusammen mit dem Mikrokern kann Apoptose durchlaufen, (d) Mikrokern wie mikrokernhaltige Zelle können persistieren und (e) Reinkorporation des Mikrokerninhalts kann während einer der folgenden Mitosen auftreten, was (f) im Falle eines chromotriptischen Chromosoms zur Aufnahme verändertes DNA führen würde. Auf diese Weise können aneuploide Zellkerne mit zusätzlichem oder fehlendem Chromosom entstehen.

1.1.2.1 Degradation

Die Degradation von Mikrokernen beispielsweise durch autolysosomalen Abbau könnte einen Weg für die Zelle darstellen, chromosomale Instabilität zu reduzieren (Abb. 2a). Dies führt jedoch auch zu einem Verlust der im Mikrokern enthaltenen genetischen Information, was unter Umständen zum Zelltod oder auch zu einem abnormalen Zellwachstum führen könnte.

Anzeichen auf Degradation wurden in Fibroblasten nach Bestrahlung gefunden, da nach 24 und 48 h Postinkubationszeit eine steigende Anzahl Mikrokerne entdeckt wurden, die γ H2AX-positiv waren [10]. γ H2AX ist ein Marker für DNA-Doppelstrangbrüche, bei dem das phosphorylierte Serin 139 des Histons H2AX mit Antikörperfärbung sichtbar gemacht wird [24]. Serin 139-Phosphorylierungen stellen unter physiologischen Bedingungen einen frühen Erkennungsschritt bei der DNA-Schadensreparatur dar, findet aber auch als vielgenutzter Laborwert zur Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen Verwendung [25]. In Mikrokernen können sie einen Hinweis auf eine Degradation des Mikrokerninhalts geben.

Studien in Hefezellen konnten zeigen, dass kleinere Mikrokerne Makroautophagie unterlaufen können, bei dem der gesamte Mikrokern von Phagophoren umschlossen wird und mit Vakuolen fusionieren, während größere Mikrokerne durch die Vakuolenmembran eingestülpt und dann aufgenommen und degradiert werden [26]. In Säugerzellen wurde der Autophagiemarker LC3B mit Mikrokernen, die zahlreiche DNA-Schäden enthielten, assoziiert, sodass Autophagie die zuvor beschriebene Chromatindegradation in Mikrokernen erklären könnte [27]. Ein zentraler Schritt während der Autophagie ist die Fusion mit Lysosomen [28]. Passend dazu konnten auch die lysosomalen Marker Lamp1 und Lamp2 bei Mikrokernen lokalisiert werden [29, 30]. Eine Erklärung, wie z. B. lysosomale Enzyme an das Chromatin innerhalb der Mikrokerne kommen könnte, bietet die Ruptur von Mikrokernen auf Grund des Zusammenbruchs der Mikrokernmembran: Auf diese Weise wird die Kompartimentierung des Mikrokerns aufgehoben und das Chromatin freigelegt, was die Degradation ermöglichen könnte [5].

1.1.2.2 Extrusion

Die Extrusion des gesamten Mikrokerns aus der Zelle könnte, wie die Degradation, einen Mechanismus darstellen, den gesamten Mikrokern zu entledigen (Abb. 2b). Dies würde aber ebenso zum Verlust der genetischen Information führen, die auf der DNA gespeichert war.

Der Auswurf von Mikrokernen wurde beispielsweise nach Exposition mit hohen Dosen Cytochalasin B in Kombination mit einer genotoxischen Substanz beschrieben, die über der üblicherweise im Zytokinese-Block Mikrokerntest verwendeten Cytochalasin B-Dosis lagen. Eine derartige Exposition führte neben der Extrusion des Mikrokerns auch zu einem Auswurf des Hauptkerns [31]. Auch im In-vivo-Mikrokerntest in polychromatischen Erythrozyten der Maus wurde vor allem nach Behandlung mit Klastogenen, die vorrangig zur Bildung von Mikrokernen mit chromosomalen Fragmenten führen, Extrusion von Mikrokernen beobachtet [32, 33]. Dieser Fund legt die Vermutung nahe, dass Mikrokerne mit ganzen Chromosomen zu groß für einen Auswurf sind. Allerdings werden im Laufe der Erythropoese auch die Organellen einschließlich des Hauptkerns abgestoßen, sodass die Größe des Mikrokerninhalts allein eine verringerte Extrusion nicht erklären kann.

Extrusion scheint weiterhin relevant zu sein in Mikrokernen, die DM enthalten. Sowohl in vitro als auch in vivo konnte gezeigt werden, dass Mikrokernen mit DM aus der Zelle abgestoßen werden können und dies im Weiteren durch Behandlung mit geringen Dosen Hydroxyurea induzierbar ist [34, 35]. Eine derartige Eliminierung könnte einen protektiven Mechanismus darstellen, um die Menge an DM und damit auch eine potenziell gefährliche Genexpression zu reduzieren [36].

Zusammenfassend scheint Extrusion unter bestimmten Bedingungen vorzukommen, doch bleibt ungeklärt, inwiefern sich diese Ergebnisse verallgemeinern lassen.

1.1.2.3 Apoptose

Durch den regulierten Zelltod der Apoptose würde die gesamte Zelle und damit auch der Zellkern samt Inhalt eliminiert werden und könnte so für den Organismus keine weitere Gefahr mehr darstellen (Abb. 2c). Experimentell ist es jedoch sehr schwer zu unterscheiden, ob mikrokernhaltige Zellen die Apoptose unterlaufen, weil der Mikrokern die Apoptose auslöst oder ob die Schäden, die eine Mikrokernbildung verursacht haben, auch (mit einiger Verzögerung) zur Apoptose führen [22].

Behandlungen mit Aneugenen, die hauptsächlich Mikrokerne mit ganzen Chromosomen verursachen, führten bei Dosen unterhalb einer vorher beobachteten Gentoxizität zu Mikrokernen in der apoptotischen Fraktion, was auf einen Zusammenhang zwischen Mikrokernen und Apoptose schließen lässt [37]. Wenn Mikrokerne über Apoptose wieder reduziert werden, müsste die Inhibierung der Apoptose die Mikrokernbildung fördern. Dieser Zusammenhang konnte jedoch in einer umfangreichen Studie mit mehreren Zelllinien nicht gezeigt werden, da die Apoptoseinhibierung zu mehr Mikrokernen geführt hat, während die Apoptoseinduktion zu keinen Veränderungen oder in manchen Fällen ebenso einen Mikrokernanstieg verursachte [38]. Möglicherweise liegt ein komplizierterer Mechanismus hinter diesem Zusammenhang, der mehrere Einflussfaktoren umfasst.

Schlüsselenzyme der Apoptose sind die Caspasen, welche sich in Initiatoren und Effektoren unterscheiden lassen. In Versuchen hat sich gezeigt, dass Caspasen unterschiedliche Wirkungen auf Mikrokerne haben: Während Inhibition der Initiatorcaspasen 8 und 9 die Zahl mikrokernhaltiger Zellen erhöht hat, wurde diese Zahl durch Inhibition der Effektorcaspase 3 reduziert [39]. Vermutlich existieren mehrere Rollen für die Caspase 3, so wird eine Interaktion mit Mikrotubuli oder eine Degradation der Mikrokernmembran spekuliert [40]. Auch Speziesunterschiede scheinen eine Rolle zu spielen. So wurde ein Anstieg der Caspasen 3 und 7 zusammen mit einer erhöhten Mikrokernbildung in humanen TK6 beobachtet, nicht jedoch in murinen L5178Y-Zellen. Weiterhin wurde ein derartiger Effekt auch nur nach Curcumin aber nicht nach MMS-Behandlung gesehen, was auf eine zusätzliche Substanzabhängigkeit hinweisen könnte [41]. Auch wenn aus den vorhandenen Daten

kein eindeutiger Trend abzuleiten ist, so weisen auch TUNEL-Färbungen in Mikrokernen darauf hin, dass ein Zusammenhang zwischen Mikrokernen und Apoptose besteht [10, 42].

1.1.2.4 Persistenz

Persistenz von Mikrokernen würde den Erhalt der genetischen Information bedeuten, jedoch bleibt es fraglich, ob und inwiefern diese für die Zelle noch verfügbar ist (Abb. 2d [43]). Daneben ist weiterhin die Frage relevant, inwiefern mikrokernhaltige Zellen persistieren und so eine möglicherweise veränderte Zelle erhalten bleibt, was die Gefahr der Tumorzellenbildung bietet. Besonders Techniken der Lebendzellmikroskopie bieten sich hier an, um mehr über die Langzeitentwicklung einzelner Zellen und Mikrokerne zu erfahren.

Schon seit längerem bekannt ist, dass Mikrokerne zumindest innerhalb einer Interphase stabil bleiben und die nächste Mitose erreichen können [44-50]. Weiterhin hat sich herausgestellt, dass in HeLa-Zellen circa die Hälfte der mikrokernhaltigen Zellen mikrokernhaltige Tochterzellen nach der Mitose generieren [51]. Diese Rate ist jedoch stark abhängig von Behandlung und Zelltyp, so kam es nach Bestrahlung in verschiedenen Subtypen von CNE-Zellen in 63-88 % der Fälle zur Bildung von mikrokernhaltigen Zellen [52]. Auf der anderen Seite verblieben in HCT116-Zellen nur 3 % der Mikrokerne nach der nächsten Teilung nach Nocodazole-Behandlung [53]. In Mausembryonen hingen wurden alle Mikrokerne auf eine oder beide Tochterzellen verteilt, was die beobachtete Spannweite der Persistenzhäufigkeiten selbst innerhalb eines Zellzyklus zeigt [54]. In eine der wenigen Studien, die mehr als eine Zellteilung im Fokus hatte, konnte gezeigt werden, dass die Mikrokernrate in RPE1-Zellen nach der ersten und zweiten Zellteilung nach Mikrokerninduktion ähnlich war und im Bereich von 73-75 % lag, wodurch keine Tendenz zum Rückgang erkennbar war [55].

Ähnlich zu Mikrokernen gibt es verschiedene Funde zur Persistenz von mikrokernhaltigen Zellen. Während eine verzögerte, aber vorhandene Proliferation von manchen Autoren beobachtet wurde, konnte in anderen Studien keine lebenden

Zellen z. B. nach induziertem Verlust des ganzen Chromosoms 11 in Form von Mikrokernen beobachtet werden [56-58]. Der Zelltyp scheint wieder entscheidend zu sein, doch kann zumindest ein Subpopulation mikrokernhaltiger Zellen sich weiter teilen [10, 52] Mikrokernhaltige Erythrozyten aus peripherem Blut hingegen haben die gleiche Lebensspanne wie mikrokernfreie Erythrozyten in splenektomierten Ratten gezeigt [59]. Auch mikrokernhaltige Hepatozyten in Ratten wurden noch zwei Wochen nach Behandlung mit Diethylnitrosamin nachgewiesen [60]. Da sich sowohl Erythrozyten wie Hepatozyten nicht oder nur langsam teilen, sagen diese Ergebnisse aus Tierstudien noch nichts über die Proliferation von anderen Zellen aus. Da In-vitro-Studien selten die Proliferation über einen längeren Zeitraum im Blick haben, bleibt unklar, inwiefern mikrokernhaltige Zellen noch nach mehreren Zellzyklen vorhanden sind und proliferieren.

1.1.2.5 Reinkorporation und Chromothripsis

Die Reinkorporation von Mikrokernen während einer der folgenden Mitosen stellt vermutlich den direktesten Weg dar, wie die genetische Information des Mikrokerns der Zelle weiter zugänglich bleiben und die Anzahl der Mikrokerne wieder reduziert werden könnte (Abb. 2e).

Allerdings ist es experimentell schwierig, Reinkorporation zu verfolgen, da in den meisten Versuchen gerade während der Mitose eine eindeutige Identifizierung des Mikrokerns nicht mehr möglich ist. Dennoch kann durch eine reduzierte Mikrokernzahl nach der Mitose auf Reinkorporation geschlossen werden. Analog zur Persistenz schwankt die Rate der reinkorporierten Mikrokerne jedoch stark und reicht von gar keiner Reinkorporation in Mäuseembryos über 12-37 % in CNE-Subzelllinien und circa 50 % in Hela Zellen bis zu fast 97 % in HCT116-Zellen und verhält sich damit umgekehrt zur Häufigkeit für Persistenz [51-54]. Auch eine Studie in RPE1-Zellen über zwei Zellteilungen hat eine Rate von 25-27 % reinkorporierter Mikrokerne in der ersten bzw. zweiten Zellteilung gezeigt, die damit beinahe konstant blieb. Interessanterweise haben Zellen, die einen Mikrokern während der ersten Zellteilung reinkorporiert haben, nach der zweiten Zellteilung in keinem Fall einen neuen gebildet [55]. Reinkorporation

von DM-haltigen Mikrokernen wurde zwar diskutiert, jedoch bisher noch nicht weiter untersucht [61].

Reinkorporation von Mikrokernen spielt eine zentrale Rolle bei dem Phänomen der Chromothripsis. Hier kommt es nach der Entstehung von Mikrokernen zu weiteren massiven Chromosomenschäden und einer verzögerten Replikation. Nach der anschließenden Aufnahme des schwer geschädigten Mikrokerns kann es, sofern die Zelle trotz dieser Veränderungen überlebensfähig ist, zu einem neuen Karyotyp und beschleunigter Tumorevolution kommen (Abb. 2f [62]).

Zusammengenommen scheint Reinkorporation in vielen Fällen relevant zu sein. Jedoch bleibt es äußerst fraglich, ob man wieder von einer „normalen“ Zellen sprechen kann, wenn die Reinkorporation stattfand. Gerade bei reinkorporierten Chromosomenfragmenten ist eine korrekte Segregation auf die Tochterzellen zweifelhaft, sodass auch auf diesem Wege genetische Information verloren oder zusätzlich einer Tochterzelle hinzugefügt werden könnten.

1.2 Lebendzellmikroskopie

Um das Schicksal von Mikrokernen und mikrokernhaltigen Zellen zu untersuchen bietet die Lebendzellmikroskopie viel Potenzial. Mit dieser Technik ist es möglich, die zeitliche und räumliche Lokalisation von markierten Proteinen auch über einen längeren Zeitpunkt zu verfolgen, da durch eine Kammer um das Mikroskop eine für die Zellkultur geeignete Umgebung geschaffen werden kann [63]. Ein gut etabliertes Fluoreszenzprotein, was zur Markierung genutzt werden kann, ist das grün fluoreszierende Protein (GFP). Hierbei handelt es sich um ein Protein aus der Qualle *Aequorea victoria*, welches beispielsweise als Marker zur Untersuchung der Genexpression genutzt werden kann [64]. Durch Isolierung weiterer Fluorophore aus anderen Spezies und Mutagenese der natürlich vorkommenden Proteine wurden mehrere neue Varianten erschaffen, die andere Spektren beispielsweise im gelben oder roten Bereich abdecken können [65, 66].

Eine geeignete etablierte Zelllinie für die Lebendzellmikroskopie ist HeLa-H2B-GFP, bei der das GFP an das Carboxylende des Histons H2B hinzugefügt und in HeLa-Zellen transfiziert wurde [67]. Histone sind Teil des Proteinbestandteil des Chromatins und als Oktamere in sogenannten Nukleosomen um die DNA gewickelt [68]. Dieser Ansatz stellt eine einfache Möglichkeit dar, um die Lokalisation der DNA in Haupt- und Mikrokern zu verfolgen.

Grundsätzlich gibt es vier Hauptkriterien, die bei der Lebendzellmikroskopie beachtet werden sollten: Phototoxizität durch die in der Fluoreszenzmikroskopie eingesetzte Lichtenergie, Signal-Rausch-Verhältnis sowie die zeitliche und räumliche Auflösung. Da sich keine dieser Punkte optimieren lässt, ohne einen der anderen zu beeinträchtigen, ist jeder Versuchsaufbau ein Kompromiss [69]. Die Reduzierung der Phototoxizität sollte in den meisten Experimenten Vorrang haben, da ansonsten eine Verzerrung der Ergebnisse stattfinden kann. Allerdings gibt es keinen generell gültigen und anwendbaren Test zur Untersuchung der Phototoxizität, sondern für jeden Versuch muss individuell sichergestellt werden, dass durch das eingesetzte Licht keine negativen Effekte auf das Untersuchungsobjekt zu erwarten sind [69]. Möglichkeiten, die Belastung durch das Licht zu reduzieren sind unter anderem die Verwendung von Schmalbandfiltern, Reduzierung der Lichtintensität sowie die Verwendung von Fluorophoren, die von langwelligem Licht angeregt werden [70, 71]. Das Signal-Rausch-Verhältnis und die räumliche und zeitliche Auflösung sind zusätzlich gerade bei der Untersuchung von Mikrokernen wegen dessen geringer Größe herausfordernd.

1.2.1 Lebendzellmikroskopie und Mikrokern

Zur Untersuchung von Mikrokernen hat sich die Lebendzellmikroskopie bereits in einigen Studien bewährt. So konnten beispielsweise vier neue Mechanismen der Bildung von Mikrokernen gefunden und drei zuvor bekannte Mechanismen bestätigt werden, was erst durch ein genaues Verfolgen von einzelnen Mikrokernen und mikrokernhaltigen Zellen möglich wurde [72]. Auch Versuche zum Schicksal von Mikrokernen wurden mit der Lebendzellmikroskopie in verschiedenen transfizierten

Zelllinien durchgeführt, auch wenn hierbei das Mikrokernschicksal häufig nicht im Zentrum der Untersuchungen lag: So wurde das Mikrokernschicksal nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung oder nach Behandlung mit Hydroxyurea untersucht [51, 52]. Mittels eines via lac-Operons spezifisch gefärbten Chromosoms war es auch möglich, das Schicksal einzelner Chromosomen über Lebendzellmikroskopie zu beobachten, ebenso wäre die Erforschung der Rolle von Mikrokernen bei der Chromothripsis im letzten Jahrzehnt ohne diese Technik unvorstellbar gewesen [53, 62]. Jedoch gibt es bisher kaum umfangreiche Untersuchungen, die den Fokus auf das Mikrokernschicksal auch nach mehreren Zellzyklen legt. Dies ist jedoch notwendig, um abschätzen zu können, ob Mikrokerne und mikrokernhaltige Zellen weiter bestehen und proliferieren könnten, wodurch eine Tumorzellenbildung erfolgen könnte oder ob sie lediglich persistieren oder gar sterben, wodurch nur eine geringe Gefahr für die Tumorbildung und damit auch nur geringe Relevanz von Mikrokernen für die Kanzerogenese bestehen würde. Für die Langzeitlebendzellmikroskopie von Mikrokernen und mikrokernhaltigen Zellen ist neben dem passenden Protein-Fluorophor-Konstrukt eine adhärente Zelllinie sinnvoll, die sich schnell teilt, um so viele Zellteilungen beobachten zu können wie möglich. Auf diese Weise kann untersucht werden, wie sich mehrere Zellteilungen auf Mikrokerne auswirken, da beispielsweise die Reinkorporation nur in der Mitose stattfinden kann und auch eine Neubildung von Mikrokernen fast ausschließlich nach einer Mitose zu erwarten ist. Eine geeignete Zelllinie ist beispielsweise die HeLa-Zelllinie, die diese Eigenschaften vereint und auch schon in Lebendzellmikroskopiestudien zum Mikrokernschicksal, häufig in Kombination mit einem H2B-GFP-Konstrukt, zum Einsatz kam [51, 62]. Während das GFP ein Fluorophor ist, welches zuvor in zahlreichen Experimenten verwendet wurde, bietet das Histon H2B als markiertes Protein den Vorteil, dass auf diese Weise DNA im Haupt- wie Mikrokern indirekt sichtbar wird [67].

1.3 Verwendung von Mikrokernen als Biomarker

Auch wenn die Entwicklung zu einem standardisierten Test ein längerer Weg war, so ist die Feststellung, dass Mikrokerne als Marker für bestimmte Arten von

DNA-Schäden geeignet sind, recht alt und erste Studien mit Mikrokernen wurden schon vor circa 50 Jahren durchgeführt [73]. Heutzutage haben sich zahlreiche Protokolle in verschiedenen Zelllinien für die unterschiedlichsten Anwendungsgebiete etabliert [74]. Wesentliche Vorteile des Mikrokerntests sind, dass eine in den meisten Laboren vorhandene Standardausstattung reicht und der Test schnell durchführbar ist. Weiterhin können neben Mikrokernen auch weitere Zelltypen, wie mitotische oder apoptotische Zellen gezählt werden [75]. Ein Nachteil ist, dass zelltypabhängig eine konsistente Bewertung zwischen verschiedenen Laboren schwierig ist [76]. Eine vielgenutzte Variante ist beispielsweise der Mikrokerntest in Erythrozyten, der zur Testung von Chemikalien oder zum Biomonitoring verwendet werden kann. Ein Vorteil hier ist, dass die Probennahme mit geringem Aufwand verbunden ist und sowohl in Tieren wie auch mit menschlichen Probanden durchgeführt werden kann [77].

Neben der Untersuchung der genotoxischen Wirkung von einer großen Bandbreite an Substanzen von Industriechemikalien über Pharmazeutika bis zu Lebensmittelkontaminationen können Mikrokerne auch als Biomarker für die Bewertung von Krankheiten benutzt werden. Das wahrscheinlich prominenteste Beispiel ist das Krebsrisiko. Es hat sich gezeigt, dass die Mikrokernzahl in peripheren Lymphozyten eine gute Vorhersage über das Risiko liefern kann, nach einigen Jahren an Krebs zu sterben [78]. Da die in Form von Mikrokernen beobachtete chromosomale Instabilität häufig in Krebszellen vorkommt, ist eine Auswertung von Mikrokernen ein schneller Weg, um insbesondere das frühe Krebsrisiko zu erkennen [79]. Mikrokerne zeigen weiterhin Potential für die Diagnose von Krankheiten wie Fanconi Anämie oder Autoimmunerkrankungen, aber auch neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Alzheimer (siehe Abschnitt 1.3.3) gehen oft mit einem Anstieg an Mikrokernen einher [80-82].

Eine der wichtigsten Varianten ist der Zytokinese-Block Mikrokerntest. Hierbei folgt zum Beispiel nach Exposition mit einer Testsubstanz eine Behandlung mit Cytochalasin B. Cytochalasin B inhibiert die Polymerisation von Aktinfilamenten, wodurch die Zellteilung, aber nicht die Kernteilung verhindert wird [4]. Auf diese Weise entstehen in proliferierenden Zellen nach der Dauer eines Zellzyklus zweikernige Zellen. Diese werden als Indikator für die Proliferation seit Jahrzehnten genutzt, um nur Mikrokerne in nach der Behandlung gebildeten Zellen zu identifizieren und auszuwerten [83]. Neben Mikrokernen können auch andere nukleäre Aberrationen wie nukleoplasmische Brücken oder nukleäre „Knospen“ ausgewertet werden. Zusätzlich

werden üblicherweise ein- und mehrkernige, sowie mitotische, apoptotische und nekrotische Zellen gezählt [84]. Außer der Mikrokernhäufigkeit als wichtigsten Marker für Genotoxizität kann als Maß für die Proliferation bzw. zur Messung einer möglicherweise reduzierten Proliferation auf Grund von zytotoxischen Einflüssen der Cytochalasin B-Proliferationsindex (CBPI) gebildet werden. Dieser setzt sich aus den Häufigkeiten von ein-, zwei- und mehrkernigen Zellen zusammen.

Während der Zytokinese-Block ursprünglich vor allem in peripheren Lymphozyten nach Behandlung mit einem Mitogen wie Phytohämagglutinin durchgeführt wurde, kann mittlerweile der Test in fast jeder sich teilenden Zelllinie durchgeführt werden, die sich zumindest für eine bestimmte Zeit kultivieren lässt [85]. Durch die Verwendung unterschiedlicher Markierungen lässt sich die Aussagekraft des Zytokinese-Block Mikrokerntests erweitern und so Hinweise über die Mechanismen der Mikrokernbildung oder der Entstehung von chromosomaler Instabilität erhalten [86].

Eine weitere Modifikation bietet die Verwendung eines S9-Mix. Dabei handelt es sich um die post-mitochondriale Fraktion, die aus dem Überstand von zentrifugierten homogenisierten Rattenlebern gewonnen wird. Die Ratten wurden vorher mit Aroclor 1254 oder einer Kombination aus Phenobarbital (PB) und β -Naphthoflavon (BNF) behandelt, wodurch die am Fremdstoffmetabolismus beteiligten Enzyme induziert werden. Der S9-Mix muss vor Anwendung noch mit den nötigen Ko-Faktoren zur Aktivierung supplementiert werden [85].

1.3.1 Zytokinese-Block Mikrokerntest nach Thebainbehandlung

Thebain oder Paramorphine ist ein Alkaloid, welches in *Papaver somniferum* (Schlafmohn) produziert wird und wie Morphin im getrockneten Milchsaft, dem Opium, gefunden werden kann [87]. Es ist strukturell dem Morphin sehr ähnlich. Beide Substanzen teilen sich das gleiche Grundgerüst, wobei Thebain über Methoxygruppen an den Positionen 3 und 6 verfügt, während es sich bei Morphin um ein Diol handelt (Abb. 3a/b). Die Metabolisierung von Thebain in Säugern beginnt mit

O⁶-Demethylierung durch Cytochrom P450 3A-Enzyme und kann anschließend über mehrere Zwischenschritte in der Bildung von Oripavin, Codein und Morphin resultieren [88, 89]. Im Gegensatz zu anderen Alkaloiden (wie Morphin) aus *P. somniferum* zeigt Thebain keine signifikante Aktivität am μ -Opioidrezeptor, während die Aktivität am δ - und κ -Opioidrezeptor nur sehr gering ist [90]. Andere Studien haben zwar eine wenigstens teilweise Aktivierung am μ -Opioidrezeptor durch Thebain gefunden, deren EC₅₀ lag jedoch circa um den Faktor 1.000 über dem von Morphin [91]. Relevanter scheint ein möglicher antagonistischer Effekt am γ -Aminobuttersäure- und Glycinrezeptor zu sein, der einige der zuvor beobachteten strychninartigen Symptome in Katzen und Kaninchen erklären könnte [92, 93].

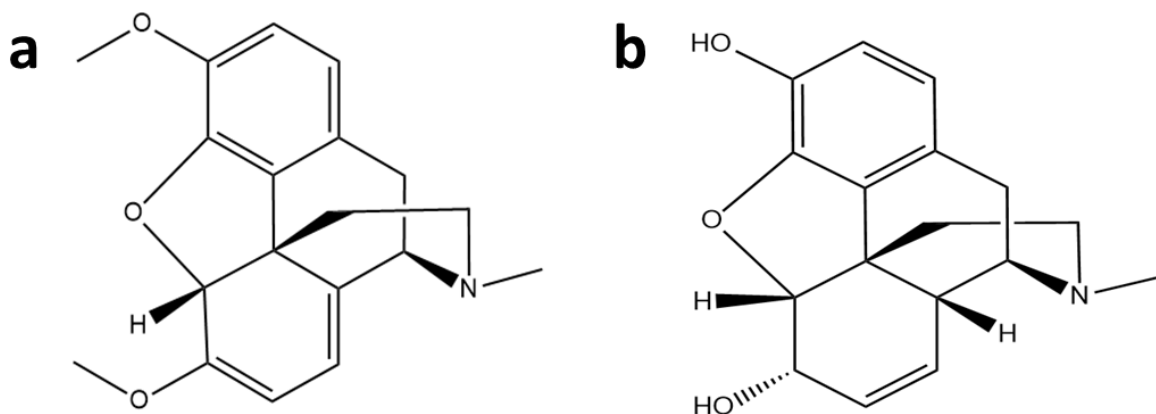


Abb. 3. Chemische Struktur von Thebain (a) und Morphin (b).

Da thebainhaltige Mohnsamen im Umlauf sind und auch verzehrt werden, werden Thebaingehalte in Nahrungsmitteln von nationalen und internationalen Behörden untersucht und überwacht [94, 95]. Jedoch ist eine Bewertung im Moment nur äußerst schwierig, da sowohl die Thebaingehalte in Mohnsamen als auch die Höhe des Verzehrs von Mohnsamen starken Schwankungen unterworfen sind [94]. Hinzu kommt, dass über das toxikologische Profil von Thebain bisher nicht viel bekannt ist. So scheint die akute systemische Toxizität in Nagern im Vergleich zu Morphin höher zu sein, doch gibt es keinerlei Studien zur chronischen Toxizität oder Kanzerogenität und auch die Gentoxizität wurde bisher noch nicht untersucht [96]. Aus diesen Gründen lässt sich derzeit, gerade auch nach Aufnahme möglicher hoher Thebainmengen, ein Gesundheitsrisiko nicht ausschließen [95].

1.3.2 Zytokinese-Block Mikrokerntest nach Behandlung mit Celecoxib und Celecoxibderivaten

Celecoxib ist ein nichtsteroidales Antirheumatikum mit vielfältigen Indikationen von der akuten Schmerzbehandlung bis hin zu Anwendungen in anderen schmerzlindernden Therapien wie bei rheumatoider Arthritis oder Osteoarthritis [97-99]. Bei Celecoxib handelt es sich um einen selektiven Inhibitor der Cyclooxygenase-2 (COX-2), die bei der Synthese von Prostaglandinen eine wichtige Rolle spielt [100]. Zusätzlich zur Anwendung als schmerzstillendes Medikament hat Celecoxib auch eine mögliche Anwendung in der Chemoprävention zum Beispiel in der Vorbeugung gegen Brust- oder Lungenkrebs [101]. Es hat sich herausgestellt, dass die Inhibierung von COX-2 und die Unterdrückung des Tumorwachstums mit verschiedenen Strukturregionen des Moleküls assoziiert sind. Dadurch könnten theoretisch neue Derivate synthetisiert werden, die von Celecoxib abgeleitet sind und über gewünschte Eigenschaften wie Tumorunterdrückung verfügen, aber ohne eine für diese Anwendung unerwünschte COX-2-Inhibierung [102]. Dies wäre von Vorteil um bekannte Nebenwirkungen durch langfristige COX-2-Inhibierung, wie eine Zunahme kardiovaskulärer Erkrankungen, vorzubeugen [103].

Einige Derivate von Celecoxib wurden kürzlich synthetisiert und ihr zytotoxisches Potential in drei verschiedenen Krebszelllinien untersucht. Zusätzlich wurde die Inhibierung von Stickstoffmonoxid als Biomarker für das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen analysiert. Als Ergebnis wurden neuartige Derivate identifiziert, die das Wachstums der verschiedenen Krebszelllinien supprimiert haben, während die Inhibition von Stickstoffmonoxid ähnlich oder sogar niedriger als bei Celecoxib war [104]. Diese Derivate könnten einen interessanten Ansatz für die Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten in der Chemoprävention bieten, die eine breitere therapeutische Breite und damit eine sicherere Anwendung ermöglichen. Da eine in diesem Fall gewünschte Verbesserung der COX-2-Inhibition und eine höhere Selektivität zuvor schon durch andere Celecoxibderivate erreicht wurde, zeigt dies das Potential der Verbesserung von Celecoxib durch Synthese neuer Derivate [105]. Dennoch muss das Sicherheitsprofil dieser neuen Substanzen validiert werden. Einer

der ersten Schritte hierfür ist die Untersuchung der Genotoxizität, da dies einer der kritischsten Punkte für eine sichere Anwendung eines neuen Arzneistoffs ist.

1.3.3 Mikrokerntest in Mundschleimhautzellen und neurodegenerative Erkrankungen

Für eine weitere Variante des Mikrokerntests werden Mundschleimhautzellen ausgewertet. Hierbei können neben der Häufigkeit von Mikrokernen und nukleären „Knospen“ auch ein- und zweikernige Zellen sowie karyorrhektische, pyknotische, karyolytische und Zellen mit kondensiertem Chromatin gezählt werden, wobei gegebenenfalls einkernige Zellen noch in basal und differenziert unterschieden werden. Vermutlich handelt es sich bei den letzten vier Zelltypen um verschiedene Stadien der Apoptose oder des Zelltodes [106, 107]. Die Häufigkeit von Mikrokernen in Mundschleimhautzellen ist äußerst niedrig im Vergleich zu vielen anderen Zelltypen, was eine Auszählung fehleranfällig machen kann [76, 108].

Auch wenn zuerst die Untersuchung von lokalen Expositionen und Erkrankungen, wie Rauchen oder Krebserkrankungen im Rachenraum, auf die genetische Stabilität in Mundschleimhautzellen im Vordergrund stand, wurden mittlerweile der Einfluss einer großen Bandbreite an weiteren Lebensstilfaktoren, Umweltexpositionen und systemischen Erkrankungen in Mundschleimhautzellen untersucht [109, 110].

Eine auch volkswirtschaftlich bedeutende Krankheit, die zunehmend weite Teile der älteren Bevölkerung betrifft, ist Morbus Alzheimer [111, 112]. Hierbei handelt es sich um eine neurodegenerative Erkrankung, die sich vor allem in kognitiven Einschränkungen und Gedächtnisverlust bis zur Demenz zeigt. Typische Zeichen dieser Krankheit sind amyloide Plaques und neurofibrilläre Bündel im Gehirngewebe [113]. Jedoch ist eine definitive Diagnose derzeit nur post mortem nach Autopsie möglich, wodurch der Bedarf an frühzeitigen Erkennungsmethoden dieser Krankheit erklärbar wird [114, 115]. Ein vielversprechender Biomarker, nicht nur für die Diagnose, sondern auch für die Erforschung von Morbus Alzheimer, sind DNA-Schäden [114]. Gründe hierfür liegen in der Ätiologie der Krankheit: Eine der

mutmaßlich ersten Schritte in der Entstehung von Morbus Alzheimer und wichtig u. a. für die Bildung von amyloiden Plaques ist oxidativer Stress [116]. Eine Erkennung von frühzeitig ausgelösten Schäden oder Veränderungen hätte den Vorteil, dass eine frühe Behandlung verbunden mit einer höheren Chance für einen Therapiererfolg möglich wäre [117]. Bisher ist ein häufig genutzter Standardtest zur Erkennung von Morbus Alzheimer die *Mini-Mental State Examination* (MMSE), bei der über eine Art Interview auf schnelle und einfache Weise sowohl Morbus Alzheimer als auch mit der leichten kognitiven Beeinträchtigung (LKB) eine Vorstufe dieser Erkrankung untersucht werden können. Bei der MMSE können bis zu 30 Punkte erreicht werden, wobei weniger als 27 Punkte auf eine kognitive Beeinträchtigung schließen lassen. Jedoch ist nur mit dieser Untersuchung allein keine Unterscheidung zwischen Morbus Alzheimer oder LKB möglich. Die MMSE ist weiterhin nicht sehr sensitiv oder spezifisch und vor allem im Bereich der Früherkennung ungenau [118].

Die Untersuchung von DNA-Schäden in Form von Mikrokernen von älteren Probanden ohne neurodegenerative Vorerkrankungen könnte einen erfolgsversprechenden Ansatz bieten, auch frühe Stufen der Krankheit ohne auftretende Symptome zu untersuchen [114, 119]. Hierfür bieten sich der Mikrokerntest in Mundschleimhautzellen an, da schnell und ohne invasive Eingriffe zahlreiche Proben genommen und ausgewertet werden können. Weiterhin können neben der Mikrokernanzahl auch weitere Parameter untersucht und analysiert werden.

2 Zielsetzung

Mit dieser Doktorarbeit sollte das Schicksal von Mikrokernen und mikrokernhaltigen Zellen erforscht werden. Hierfür sollten in der ersten Phase mittels Langzeitlebendzellmikroskopie mikrokernhaltige HeLa-H2B-GFP-Zellen über 96 h untersucht werden. Neben der Entwicklung des Mikrokerns war auch das Schicksal der mikrokernhaltigen (Tochter-)Zellen Fokus der Experimente. So sollten die Häufigkeiten von Mitosen oder Zelltod sowie die Dauer von bzw. bis zur nächsten Mitose ausgewertet werden, um den Einfluss der Mikrokernbildung auf diese Zellparameter zu bewerten. Dabei sollten unterschiedliche gentoxische Agenzien und Dosen verwendet werden, um den Einfluss dieser Behandlungen auf das Schicksal von Mikrokernen und mikrokernhaltigen Zellen zu untersuchen. Die so gewonnenen Daten wurden in Relation zu mikrokernhaltigen und mikrokernfreien Zellen ohne gentoxische Behandlung gesetzt, um auf diese Weise Effekte durch das Vorhandensein von Mikrokernen zu identifizieren.

In einer zweiten Phase sollten einzelne Mikrokernschicksale mechanistisch genauer charakterisiert werden. Hierfür wurde unter speziellen Behandlungsbedingungen, die zuvor in der wissenschaftlichen Literatur beschrieben worden sind, versucht, einen Auswurf von Mikrokernen auszulösen. Zusätzlich sollte die Lokalisation von Mikrokernen in Mundschleimhautzellen untersucht werden, um Hinweise auf Extrusion zu erhalten. Neben der Extrusion war auch die Degradation von Mikrokernen wie Hauptkernen in Form von γ H2AX-Antikörperfärbungen über einen längeren Zeitraum, analog zur Dauer in den vorherigen Experimenten, Untersuchungsobjekt dieser Arbeit. Die genauere Untersuchung einer möglichen Mikrokerndegradation sollte weiterhin durch die weitere gentechnische Veränderung der zuvor verwendeten HeLa-H2B-GFP-Zelllinie ermöglicht werden. Hierbei wurden zwei weitere Proteine, der Autophagiemarker LC3B und die Kernmembrankomponente Lamin B1, mittels des hieran gekoppelten Fluorophors dsRed sichtbar gemacht. Durch Verfolgung von LC3B sollte eine mögliche Autophagie von Mikrokernen und anschließende Mikrokerndegradation beobachtet werden, während Lamin B1 als Marker für die Integrität der Mikrokernhülle üblich ist. Durch ein besseres Verständnis der Mechanismen von Extrusion und Degradation würde eine

mögliche Erklärung von teilweise widersprüchlichen Studienergebnissen sowie eine bessere Charakterisierung des Mikrokernschicksals möglich sein, während die Mikrokernmembranintegrität neben einer mutmaßlichen Rolle für die Stabilität des Mikrokerns auch essenziell für die Funktion von Mikrokernen in der Kanzerogenese zu sein scheint.

Zusätzlich zu diesen Versuchen sollten Mikrokerne als Biomarker für die genotoxische Bewertung der Opiats Thebain sowie von Celecoxib und weiteren Celecoxibderivaten verwendet werden. Auf diese Weise sollte geklärt werden, inwiefern Thebain in Lebensmitteln bzw. Celecoxib und seine Derivate in Arzneimitteln ein Gesundheitsrisiko darstellen. Mikrokerne in Mundschleimhautzellen von Individuen mit und ohne neurodegenerative Erkrankungen sollten außerdem ausgewertet werden, um einen möglichen Nutzen von Mundschleimhautzellen für die Diagnose oder Untersuchung von Vorstufen von neurodegenerativen Erkrankungen zu erforschen.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Materialien

Alle Chemikalien, Reagenzien und Medien wurden, sofern nicht anders angegeben, von Sigma-Aldrich, Teil von Merck (Darmstadt) oder Carl Roth (Karlsruhe) bezogen. Alle Zellkulturgefäße wurden, sofern nicht anders angegeben, von Sarstedt (Rheinbach) bezogen.

3.2 Zelllinien und -kultur

Alle Zelllinien wurden bei 37 °C und in einer feuchten Atmosphäre inkubiert, die mit 5 % CO₂ versorgt wurde. Nach dem Auftauen wurden die Zellen innerhalb der ersten 1-2 Wochen zwei- bis dreimal passagiert bevor Experimente durchgeführt wurden. Regelmäßig wurden die Zellen auf eine Kontamination mit Mykoplasmen getestet. Hierbei wurden Zellen mit der Zytozentrifuge Cytospin 3 (Fisher Scientific, Schwerte) bei 1.000 rpm für 5 min auf einen Objektträger gebracht und mindestens 2 h bei -20 °C in Methanol fixiert. Nach Entnahme des Objektträgers wurden die noch nicht völlig trockenen Zellen für 3 min mit 20 µL DNA-Farbstoff Hoechst 33342 gefärbt und nach Eindeckung mit Dabcolösung (250 mg Dabco gelöst in 90 ml Glycerol und 10 ml PBS) bei 400-facher Vergrößerung mit UV-Filter an einem Nikon TE2000-E untersucht.

3.2.1 HeLa-H2B-GFP-Zellen

Die HeLa-H2B-GFP-Zellen wurden von Prof. Noriaki Shimizu (Hiroshima University, Japan) zur Verfügung gestellt. Diese wurden von einer anderen Arbeitsgruppe

transfiziert, wie zuvor beschrieben [67]. Hierbei wurde die *complementary DNA* (cDNA) des humanen Histons H2B am Carboxylende des Proteins mit der kodierenden DNA von GFP aus *Aequorea victoria* über Subklonierung der cDNA in den Expressionsvektor pEGFPN1 verknüpft. Der Vektor wurde in HeLa stabil transfiziert und mittels Antibiotikaselektion erfolgreich transfizierte Kolonien weiterkultiviert. Anschließende Untersuchungen konnte zeigen, dass in den so kultivierten Zellen H2B-GFP in die Nukleosomen eingebaut wurde und ein detektierbares Signal ergibt, wobei das Zellwachstum durch diesen Eingriff nicht verringert wurde [67].

In der vorliegenden Arbeit wurden HeLa-H2B-GFP-Zellen in DMEM-Medium (4,5 g/l Glucose) ohne Phenolrot unter Zugabe von 10 % fötales Kälberserum, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 25 mM HEPES sowie 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin kultiviert. Zum Passagieren der adhärennten Zellen wurden diese nach Entfernen des Mediums und Waschens mit PBS mit 37 °C warmen Trypsin-EDTA für 10 min behandelt, wobei auf eine ausreichende Bedeckung des Zellrasens mit Trypsinlösung zu achten war. Anschließend wurde die Reaktion mit der doppelten Menge Medium mit Zusätzen gestoppt, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die resuspendierten Zellen wurden gezählt und weiterkultiviert bzw. für Experimente verwendet.

3.2.2 Erstellung weiterer Zelllinien

3.2.2.1 Vektorkonstruktion

Zur RNA-Isolierung wurden am Vortag 4 Millionen HeLa-H2B-GFP-Zellen ausgesät und die RNA mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) isoliert. Hierfür wurden die Zellen dreimal mit kaltem PBS gewaschen und zur Lyse 600 µl RLT-Puffer (enthält Guanidiniumthiocyanat, weitere Zusammensetzung nicht bekannt) zugegeben. Mittels Zellschaber wurden die Zellen gelöst und in ein RNase-freies Reagiergefäß überführt.

3 Material und Methoden

Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. 1 Volumen 70 % Ethanol wurde anschließend hinzugefügt und kräftig pipettiert. Die Lösung wurde in eine Filtersäule gegeben und 30 s bei 10.000 g zentrifugiert. Zum Waschen wurde zuerst 700 µl RW1-Puffer (enthält Guanidiniumthiocyanat, weitere Zusammensetzung nicht bekannt) gefolgt von zweimal 500 µl ethanolhaltigem RPE-Puffer (weitere Zusammensetzung nicht bekannt) auf die Säulen gegeben, wobei nach jeder Pufferzugabe 30 s bei 10.000 g zentrifugiert wurde. Ausnahme hiervon war der letzten Waschschrift, bei dem 2 min zentrifugiert wurde. Eluiert wurde in 30 µl RNase-freiem Wasser für 1 min bei 10.000 g. RNA-Konzentration (und später auch DNA-Konzentrationen) und Reinheit wurden immer mittels NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) gemessen.

Als nächstes wurde aus der RNA cDNA synthetisiert. Dies geschah unter Verwendung des RevertAid H Minus Erststrang-cDNA-Synthesekit (Thermo Fisher Scientific, Schwerte). Hierbei wurden zuerst 1 µl RNA (entsprach 0,8 µg RNA) mit 1 µl oligo(dt)-Primern und 12 µl nukleasefreiem Wasser pipettiert. Danach wurden 4 µl 5x Reaktionspuffer (250 mM Tris-HCl, 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTT, pH 8,3 bei 25 °C), 1 µl Ribolock RNaseinhibitor (20 U/µl) und 2 µl 10 mM dNTP dazugegeben, bevor zum Schluss 1 µl der Revert Aid H Minus Reverse Transkriptase (200 U/µl) pipettiert wurde. Die Synthese wurde im Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg) bei 42 °C für 60 min und 70 °C für 5 min durchgeführt. Die cDNA-Konzentration und Reinheit wurden gemessen.

Vor der folgenden Amplifizierung mittels *Polymerase Chain Reaction* (PCR) wurden Primer synthetisiert, die einerseits spezifisch für die cDNA der beiden Proteine von Interesse (LC3B und Lamin B1) waren, aber zusätzlich für den späteren Einbau in den Vektor einen Überhang einfügten. Auch der Gerüstvektor wurde mittels PCR amplifiziert. Hierbei handelte es sich um pHAGE-CMV-dsRed-UBC-GFP-W, welcher ein Ampicillinresistenzgen sowie die Reportergene dsRed und GFP trug. Der CMV-Promoter erlaubte in Säugerzellen die Expression des gewünschten Reportergenkonstruktes (Anhang 1, freundlicherweise bereitgestellt von Viktoria Kunz, Universität Würzburg). Durch die PCR wurde dieser lentivirale Vektor linearisiert und das nicht benötigte GFP-Gen mit Promoter UBC nicht vervielfältigt. Die

Primersequenzen der beiden Proteine von Interesse sowie des Vektors finden sich in Tabelle 1.

Tabelle 1. Verwendete Primer zur Amplifizierung der cDNA-Sequenzen von Interesse.

	LC3B	Lamin B1	Gerüstvektor
<i>forward</i> -Primer	5'-tggtcctgtatggatcc atgccgctcggagaag-3'	5'-tggtcctgtatggatcc atggcgactgcgacc-3'	5'-atcgatagatc ctaatacaacctctg-3'
<i>reverse</i> -Primer	5'-attaggatctatcgatt aactgacaattt catcccgaacgtc-3'	5'-attaggatctatcgatt acataattgcacagctt ctattggatgctcttgg-3'	5'-ggatcataca ggaacaggtg-3'
Fragmentlänge	378 Nukleotide	1761 Nukleotide	7,116 Nukleotide

Die Synthese wurde von der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg) durchgeführt und die Primerfragmente mittels nukleasefreiem Wasser in einer Konzentration von 100 µM resuspendiert. Für die PCR der cDNA wurden folgende Bestandteile in 50 µl zusammenpipettiert:

28 µl H₂O

4 µl cDNA (1:20 Verdünnung der Produkte der cDNA-Synthese)

2,5 µl je Primer (*forward/reverse*)

1 µl dNTP (Enthalten in Phusion High-Fidelity DNA Polymerase-Kit, New England Biolabs, Frankfurt am Main)

10 µl 5x Phusion HF Puffer (enthält 7,5 mM MgCl₂, weitere Zusammensetzung nicht bekannt. Enthalten in Phusion High-Fidelity DNA Polymerase-Kit, New England Biolabs, Frankfurt am Main)

0,5 µl Phusion DNA-Polymerase (Enthalten in Phusion High-Fidelity DNA Polymerase-Kit, New England Biolabs, Frankfurt am Main)

2,5 µl 5 M Betain (nur für Lamin B1, H₂O-Menge wurde entsprechend reduziert)

Folgendes Programm wurde im Mastercycler gradient für die PCR-Ansätze durchgeführt:

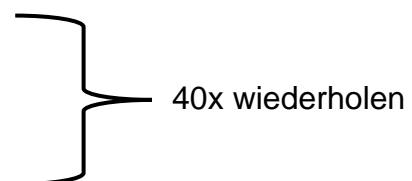
1. 98 °C für 30 s

2. 98 °C für 10 s

3. 71 °C (für Lamin B1) bzw. 72 °C (für LC3B) für 30 s

4. 72 °C für 3 min

5. 72 °C für 10 min



3 Material und Methoden

6. 4 °C bis zum nächsten Schritt

Für die PCR des Vektors wurde folgende Bestandteile in 50 µl pipettiert:

32,5 H₂O

1 µl Vektor (entsprach 5 ng DNA)

2,5 µl je Primer (*forward/reverse*)

1 µl dNTP

10 µl 5x Q5 Puffer (enthält 10 mM Mg⁺⁺, weitere Zusammensetzung nicht bekannt. Enthalten in Q5 High-Fidelity DNA Polymerase-Kit, New England Biolabs, Frankfurt am Main)

0,5 µl Q5 (Enthalten in Q5 High-Fidelity DNA Polymerase-Kit, New England Biolabs, Frankfurt am Main)

Hierbei wurde folgendes Programm benutzt:

1. 98 °C für 30 s

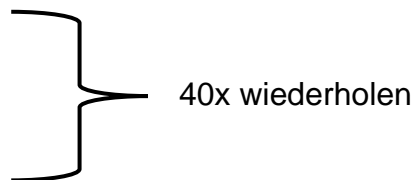
2. 98 °C für 10 s

3. 64 °C für 30 s

4. 72 °C für 2:20 min

5. 72 °C für 2 min

6. 4 °C bis zum nächsten Schritt



Zur Überprüfung und Aufreinigung der PCR-Produkte wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Hierfür wurde 1 % Agarose in 40 ml TAE-Puffer (40 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8) unter Erwärmung gelöst und nach Abkühlung mit 4 µl Etidiumbromid (1 mg/ml) zur Färbung der DNA versetzt. Das Gemisch wurde nun in eine Gelschale zur weiteren Abkühlung und Aushärtung gegeben, wobei mit einem Kamm Taschen für die PCR-Produkte freigehalten wurden. Die Gelschale wurde in ein EasyCast Electrophoresis System (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) gegeben, mit 500 ml TAE-Puffer bedeckt und die Taschen mit 10 µl (zur Überprüfung) bzw. 40 µl (zur Aufreinigung) des jeweiligen PCR-Produkts beladen. Zusätzlich wurde zur Größenabschätzung der PCR-Produkte der 1 µl Marker Gene Ruler 100 bp Plus (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) in 1 µl 6xLadepuffer (2,5 % Ficoll-400, 11 mM EDTA, 3,3 mM Tris-HCl, 0,017 % SDS, 0,015 % Bromphenolblau, pH 8, New England Biolabs, Frankfurt am Main) sowie 4 µl H₂O zugegeben. Die Kammer mit Gel wurde nun an ein PowerPac Basic Netzteil (Bio-Rad, Feldkirchen) angeschlossen und für

90-120 min bei 55 V laufen gelassen. Die Gele wurden im E.A.S.Y. Doc plus (Herolab, Wiesloch) analysiert und die amplifizierte DNA ggf. für die Gelaufreinigung mittels eines Skalpell aus geschnitten und überführt. Hierbei wurde das Kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Düren) genutzt:

Das ausgeschnittene Gelstück mit dem PCR-Produkt wurde gewogen und pro 100 mg Gel 200 µL NTI-Puffer (enthält 30-60 % Guanidiniumthiocyanat, weitere Zusammensetzung nicht bekannt) zugegeben, worin bei 50 °C für 5-10 min das Gel gelöst wurde. Die gelöste DNA wurde in eine Filtersäule gegeben und zur Bindung an die Säule für 30 s bei 11.000 g zentrifugiert. Daraufhin folgten zwei Waschschriffe mit 700 µl ethanolhaltigen NT3-Puffer (weitere Zusammensetzung nicht bekannt) jeweils gefolgt einem weiteren Zentrifugationsschritt für 30 s bei 11.000 g. Die Membran mit der DNA wurde mittels Zentrifugation für 1 min bei 11.000 g getrocknet, bevor nach Zugabe von 15 µl NE-Puffer (5 mM Tris/HCL, pH 8,5) bei 11.000 g für 1 min eluiert wurde. Konzentration und Reinheit der DNA wurden gemessen.

Die Konstruktion des finalen Vektors aus linearisiertem Gerüstvektor und PCR-Produkt geschah unter Verwendung des Gibson Assembly Master Mix (New England Biolabs, Frankfurt am Main). Hierbei wurden 7 µl des jeweiligen Fragments mit 3 µl des linearisierten Vektors und 10 µl des 2xMaster Mix (bestehend aus einer DNA-Exonuklease, einer DNA-Polymerase und einer DNA-Ligase, Spezifikation und Konzentration vom Hersteller geheim gehalten) vermischt. Nach 45 min bei 50 °C wurden die komplementären Überhänge von Vektor und PCR-Produkt geschnitten, verbunden und mittels DNA-Polymerase fehlende Basen aufgefüllt und die Stränge verbunden. Die konstruierten Vektoren pHAGE-CMV-dsRed-LC3B und pHAGE-CMV-dsRed-LMNB1 sind in Anhang 2 und Anhang 3 dargestellt.

3.2.2.2 Vektorproduktion

Die Vektoren wurden zur weiteren Überprüfung in *Escherichia coli* transformiert, welche als 5-alpha Competent E.coli (High Efficiency) von New England Biolabs (Frankfurt am Main) bezogen wurden. Je 50 µl der aufgetauten Zellen wurden mit 2 µl

3 Material und Methoden

des zuvor konstruierten Vektors für 30 min auf Eis vermengt. Anschließend folgte ein Hitzeschock für 30 s bei 42 °C und 300 rpm, bevor die Zellen wieder 10 min auf Eis inkubiert wurden. Danach wurde zu den Zellen 950 µl mitgeliefertes SOB-Medium pipettiert und eine Stunde bei 1.000 rpm inkubiert. Mit einem Drigalskispatel wurden die Zellen auf 37 °C warme Agarplatten plattiert. Für die Platten wurde 7,5 g Agar in 500 ml LB-Medium (25 g/l LB in Wasser) gegeben und autoklaviert. Anschließend wurde in die noch warme Agarlösung 100 µg/ml Carbenicillin dazugegeben und die Platten zur Aushärtung und bis zur Verwendung kühl gelagert. Am nächsten Tag waren auf Platten mit erfolgreicher Transformation Bakterienkolonien zu erkennen. Von diesen wurden einige mit einem Zahnstocher gepickt, in ein Glasröhrchen mit 3 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Carbenicillin überführt und bei 37 °C kultiviert. Während jeweils 1 ml der Bakterienlösung am nächsten Tag für die Plasmidisolierung verwendet wurde, wurde der Rest für die spätere Verwendung bei 4 °C gelagert. Zur Plasmidisolierung wurde das GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) benutzt. Hierbei wurden alle Zentrifugationsschritte bei 11.000 rpm durchgeführt. Die Bakterienlösung wurde mit 250 µl Resuspensionslösung (RNase A-haltig, weitere Zusammensetzung nicht bekannt) resuspendiert und die Suspension übertragen. Anschließend wurde 250 µl Lyselösung (Zusammensetzung vom Hersteller geheim gehalten) hinzugefügt und vier- bis sechsmal invertiert. Als nächstes wurde das Gemisch mit 350 µl Neutralisationslösung (Zusammensetzung vom Hersteller geheim gehalten) versetzt und wieder vier- bis sechsmal invertiert, gefolgt von 5 min Zentrifugation. Der Überstand wurde in eine Filtersäule übertragen und für 1 min zentrifugiert, bevor 500 µl ethanolhaltige Waschlösung (weitere Zusammensetzung nicht bekannt) zugegeben und zentrifugiert wurde. Der Waschschrift wurde wiederholt und anschließend 1 min ohne Zugabe einer weiteren Lösung zentrifugiert. Eluiert wurde mit 30 µl Elutionspuffer, wobei 2 min inkubiert und 2 min zentrifugiert wurde. Die Konzentration und Reinheit der Plasmid-DNAs wurden gemessen. Anschließend wurden mittels Sangersequenzierung die Plasmide von Eurofins Genomics (Ebersberg) sequenziert. Hierfür wurden jeweils 15 µl Plasmid mit einer Konzentration von 50-100 ng/µl eingeschickt. Zur Sequenzierung wurden die Primer *dsRed-forward* (5'-gaggcctccaccgagcgcctgt-3'), *CMV-forward* (5'-cgcaaatgggcggttaggcgtg-3') und *WPRER-reverse* (5'-catatgcgtaaaaggagcaaca-3') benutzt und die sequenzierten Plasmide auf Korrektheit überprüft.

Es wurde in beiden Fällen jeweils ein korrektes Plasmid identifiziert und die entsprechenden Bakterien in 500 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Carbenicillin überführt sowie bei 37 °C für einen Tag kultiviert. Am nächsten Tag wurden Plasmide nach Angaben des Kits NucleoBond Xtra Maxi (Macherey-Nagel, Düren) isoliert. Hierfür wurde die Bakterienlösung bei 6000 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Pellet mit 12 ml Resuspensionspuffer (RNase A-haltig, weitere Zusammensetzung nicht bekannt) resuspendiert und die Lyse mit 12 ml Lysepuffer (Natriumhydroxid/SDS-haltig, weitere Zusammensetzung nicht bekannt) für 5 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Anschließend folgte 12 ml Neutralisierungspuffer, um die Lyse zu beenden (Zusammensetzung vom Hersteller geheim gehalten). Zusätzlich wurde eine große Säule mit einem Filter versehen und dieser mit 25 ml Äquilibrierungspuffer (Zusammensetzung vom Hersteller geheim gehalten) versetzt und drei Mal invertiert. Anschließend wurde das Lysat auf die Säule gegeben. Nachdem die Flüssigkeit durchgelaufen ist, wurde ein erster Waschschrift mit 15 ml Äquilibrierungspuffer durchgeführt und nach Durchlaufen der Flüssigkeit der Filter entfernt. Mit 25 ml Waschpuffer wurde danach der zweite Waschschrift (Zusammensetzung vom Hersteller geheim gehalten) durchgeführt. Die Elution fand mit 15 ml Elutionspuffer (Zusammensetzung vom Hersteller geheim gehalten) statt. Zur Präzipitation wurde 10,5 ml Isopropranol gegeben, invertiert und bei 8.000 rpm und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand entfernt und ein Waschschrift mit 4 ml 70 % Ethanol durchgeführt, bevor wiederum bei 8.000 rpm und Raumtemperatur für 10 min zentrifugiert wurde. Anschließend wurden das Ethanol entfernt und das Pellet für 2 h bei 37 °C getrocknet. 400 (für pHAGE-CMV-dsRed-LC3B) oder 500 µl (für pHAGE-CMV-dsRed-LMNB1) endotoxinfreies Wasser wurde auf das Pellet pipettiert und über Nacht im Kühlschrank gelagert. Am nächsten Tag wurde das Pellet vorsichtig resuspendiert und die Konzentration und Reinheit der Plasmid-DNAs gemessen.

3.2.2.3 Transfektion und Transduktion

Die Produktion der Lentiviren mit den konstruierten Vektoren pHAGE-CMV-dsRed-LC3B und pHAGE CMV dsRed-LMNB1 fand in HEK293-Zellen statt. Diese wurden in DMEM-Medium (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) versetzt mit 10 % FBS (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) + 0,1 % Gentamycin (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) und 1 % Natriumpyruvat (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) kultiviert. Die adhärennten Zellen wurden für 1-2 min mit kaltem Trypsin-EDTA (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) behandelt. Die Trypsinisierung wurde mit der doppelten Menge Medium mit Zusätzen gestoppt, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die resuspendierten Zellen wurden entweder weiterkultiviert oder für Experimente verwendet. Für die Transfektion wurden 400,000 Zellen am Vortag in eine 6-Well-Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, wobei für die Transfektion antibiotikafreies Medium gewählt wurde. 20 µg jedes Plasmids mit jeweils 10 bzw. 5 µg der Plasmide psPAX2 sowie pMD2.G (beide freundlicherweise bereitgestellt von Viktoria Kunz, Universität Würzburg) wurden mit der vierfachen Menge Polyethylenimin für 15 min in 500 µl DMEM ohne Zusätze inkubiert, bevor sie auf die Zellen getropft wurden. Am nächsten Tag wurde das Medium wieder gewechselt, wobei hier DMEM mit allen Zusätzen eingesetzt wurde. Zusätzlich wurde 1 % Natriumbutyrat dazugegeben. An den folgenden zwei Tagen wurden das virushaltige Medium abgenommen, 15 min bei 350 g zentrifugiert und unter Verwendung von 250 ml Nalgene Rapid-Flow Sterilen Einweg-Filtrationsgeräten mit PES-Membran (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) mit einer Porengröße von 0,45 µm und 50 mm Durchmesser sterilfiltriert. Danach wurde das gefilterte virushaltige Medium entweder bei 4 °C gelagert oder eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Hierfür wurde 1-2 ml 20 % sterilfiltrierte Sucrose (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) zu 35 ml virushaltiges Medium in sterilen Ultrazentrifugenröhrchen gegeben. Anschließend wurde unter Vakuum 2 h bei 25,000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und auf Eis 100 µl eiskaltes PBS über Nacht dazugegeben. Am nächsten Tag wurden die Viruspartikel vorsichtig resuspendiert, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Für die Transduktion wurden jeweils 150,000 HeLa-H2B-GFP-Zellen in einer 6-Well-Platte am Vortag ausgesät. Am nächsten Tag wurde 5 µl Viruslösung und 2 µl Polybren pipettiert und die Platte 1 h bei 2700 rpm zentrifugiert. Nach 3 Tagen wurden das Medium gewechselt und die Zellen weiterkultiviert. Die erfolgreiche Transduktion wurde mittels der Fluoreszenzmikroskopie Nikon TE2000-E mit TRITC-Filtersets auf das Vorhandensein eines dsRed-Signals überprüft.

3.2.3 TK6-Zellen

TK6-Zellen wurden in RPMI-1640-Medium ohne Phenolrot unter Zugabe von 10 % fötales Kälberserum, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 25 mM HEPES sowie 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin kultiviert. Zum Passagieren der Suspensionszellen wurde einige Zellen entnommen, gezählt und weiterkultiviert bzw. für Experimente verwendet. Alle zwei Wochen wurden die Zellen vor dem Zählen zentrifugiert und in neuem Medium resuspendiert.

3.2.4 HepG2

HepG2-Zellen wurden in RPMI-1640-Medium ohne Phenolrot unter Zugabe von 10 % fötales Kälberserum, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 25 mM HEPES sowie 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin kultiviert. Zum Passagieren der adärenten Zellen wurden diese nach Entfernen des Mediums und Waschens mit PBS mit 37 °C warmen Trypsin-EDTA für 10 min behandelt, wobei auf eine ausreichende Bedeckung des Zellrasens mit Trypsinlösung zu achten war. Anschließend wurde die Reaktion mit der doppelten Menge Medium mit Zusätzen gestoppt, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die resuspendierten Zellen wurden gezählt und weiterkultiviert bzw. für Experimente verwendet.

3.3 Substanzen und Behandlungen

Zur Untersuchung des Schicksals von Mikrokernen und mikrokernhaltigen Zellen wurden Zellen mit Etoposid (Teva, Ulm), tBHP, Doxorubicin (Teva, Ulm), Hydroxyurea und Vinblastin (Teva, Ulm) behandelt. Weiterhin wurden Zellen am CP160 (Faxitron, Tucson, USA) Röntgenstrahlen ausgesetzt. Die Induktion von Mikrokernen wurde in Abhängigkeit der Behandlung von Thebain, Celecoxib und Celecoxibderivaten 1-4 untersucht. Celecoxib und Celecoxibderivate 1-4 wurden von Quoc Anh Ngo (Vietnam Academy of Science and Technology, Hanoi, Vietnam) bereitgestellt. tBHP, Doxorubicin, Vinblastin und Hydroxyurea wurden in Wasser gelöst, alle anderen Substanzen in DMSO. Die jeweiligen Lösungsmittel wurden als Negativkontrolle (NK) verwendet. Alle Behandlungen fanden, wenn nicht anders angegeben, für eine Dauer von 4 h statt. Ausnahmen von dieser Regel bestanden für tBHP und Etoposid, welche 30 min bzw. 3 h angewandt wurden. Ausgehend von einer Messung der Strahlendosis am CP160 (0,654 Gy/min), konnte die Zeit berechnet werden, die für eine Bestrahlung der Proben mit den gewünschten Dosen notwendig war. Die Exposition von Zellen fand in Petrischalen statt, in denen die Zellen ausgesät und anschließend trypsinisiert, zentrifugiert und mit neuem Medium in eine neue Zellkulturplatte überführt wurden. Dies wurde bei allen folgenden Versuchen mit Bestrahlung so gehandhabt. Es wurde dabei immer die gleiche Zellzahl in Petrischalen ausgesät sowie am Ende mit dem gleichem Medienvolumina in die Zellkulturplatte überführt, wie für die anderen Behandlungen. Im Folgenden wird daher diese Abweichung auf Grund der technischen Begebenheiten der Bestrahlung nicht mehr jedes Mal erwähnt.

3.4 Zytokinese-Block Mikrokerntest

Für den Zytokinese-Block Mikrokerntest wurden 100.000 Zellen/ml ausgesät und am nächsten Tag behandelt bzw. bestrahlt. Nach der Behandlung wurden 3 µg/ml Cytochalasin B dazugegeben. Nach Ablauf der Verdopplungszeit der jeweiligen Zelllinie (HeLa-H2B-GFP: 22-24 h, TK6: 16-18 h) wurden die Zellen trypsinisiert und in

PBS resuspendiert bzw. im Falle der Suspensionszelllinie TK6 nur zentrifugiert und mit PBS resuspendiert. Die Zellen wurden gezählt und mit PBS verdünnt, sodass eine Konzentration von 150.000 Zellen/ml vorlag. Anschließend wurden mit 100 µl, entsprechend 15.000 Zellen, der Zellsuspension unter Verwendung des Cytospin 3 bei 1.000 rpm auf einen Objektträger gebracht. Die Zellen samt Objektträger wurden für mindestens zwei Stunden bei -20 °C fixiert.

Für die anschließende Färbung wurden die Objektträger dem Methanol entnommen und bei Raumtemperatur getrocknet, bis sich jegliches Methanol verflüchtigt hat. Die Färbung wurde mit 1,25 % GelGreen (Biotium, Fremont, USA) in Wasser durchgeführt, wobei 11 µl der Färbelösung exakt auf die Zellen gegeben werden mussten. Mit einem Deckglas wurden die Färbelösung verteilt und für 7 min bei Raumtemperatur im Dunkeln einwirken gelassen. Anschließend wurden Deckglas samt Färbelösung mittels PBS abgespült und die gefärbten Zellen kurz getrocknet. Nach Eindeckung mit Dabcolösung konnten die Zellen bei 400-facher Vergrößerung mit einem FITC-Filterblock an einem Nikon TE2000-E ausgezählt.

Die Auszählung basiert auf den Kriterien, die Fenech et al. veröffentlicht haben [84]. Hierbei werden ein-, zwei- und mehrkernige sowie mitotische und apoptotische Zellen in insgesamt 1.000 Zellen gezählt (Abb. 4a-e). Weiterhin wurden Mikrokerne in 1.000 ausschließlich zweikernigen Zellen ausgewertet. Jede Auswertung erfolgte als Duplikat auf zwei verschiedenen Objektträgern. Folgende Kriterien mussten bei der Bewertung als Mikrokern berücksichtigt werden:

- Durchmesser von 1/16 bis 1/3 des Hauptkerns
- Keine Verbindung zum Hauptkern
- Mikrokerngrenzen sollen eindeutig von der Hauptkerngrenze unterscheidbar sein
- Ähnliche Färbintensität wie der Hauptkern, vor allem sollte der Mikrokern nicht-refraktil sein, da dies auf Färbepartikel hinweisen könnte

Neben der Mikrokernfrequenz wurde auch der CBPI als Maß für die Zellproliferation nach der Behandlung berechnet. Hierbei kam folgende Formel zum Einsatz:

$$CBPI = \frac{1 * (EK) + 2 * (ZK) + 3 * (MK)}{(EK) + (ZK) + (MK)}$$

(EK) = einkernige Zellen
(ZK) = zweikernige Zellen
(MK) = mehrkernige Zellen

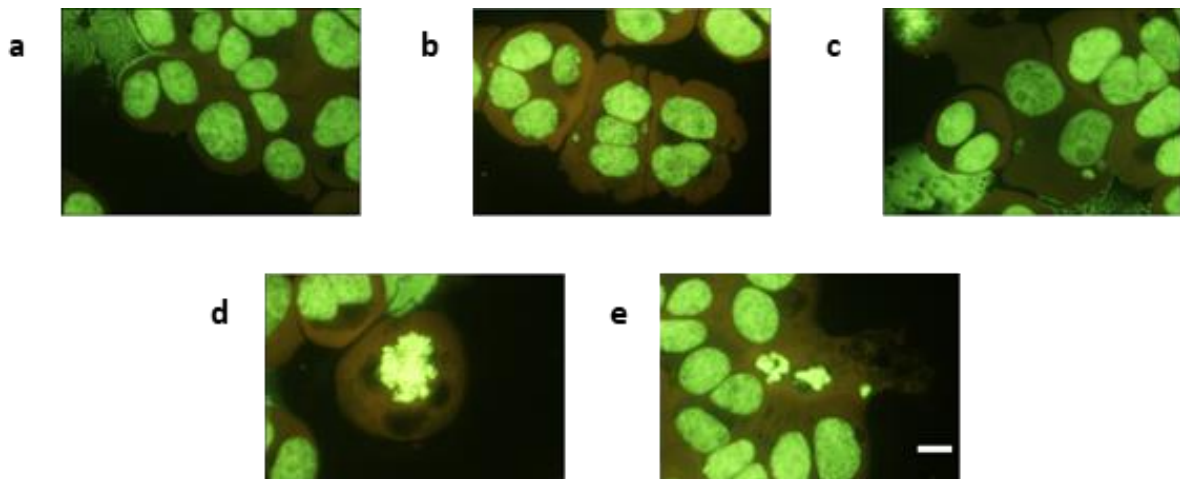


Abb. 4. Zellpopulationen im Mikrokerntest nach Färbung mit GelGreen in TK6-Zellen. (a) Ein- und zweikernige Zelle, (b) mehrkernige Zelle, (c) zweikernige Zellen mit mehreren Mikrokernen, (d) mitotische Zellen und (e) apoptotische Zellen. Maßstab: 10 µm.

Um die Metabolisierung zu untersuchen, wurde 0,25 % S9-Mix verwendet. Dies geschah unter Verwendung von Mutazyme 5 % S9-Mix aus mit PB/BNF behandelten Ratten (Trinova Biochem, Gießen), welches bereits alle nötigen Ko-Faktoren enthielt. Dieses wurde in RPMI-1640-Medium gelöst und jeweils 50 µl dem Zellmedium zugegeben.

3.5 Vitalitätstest

Für die Vitalitätstests wurden 100.000 Zellen/ml ausgesät und am nächsten Tag behandelt. Nach Behandlung der Zellen wurden bei Suspensionszellen direkt 35 µl und 15 µl aus der Zellkulturplatte entnommen bzw. bei adhärennten Zellen diese vorher trypsiniert, zentrifugiert und in altem Medium resuspendiert. Die 35 µl Zellsuspension wurde mit 15 µl FDA-Lösung (12 µl FDA-Stammlösung (5 mg/ml in Aceton) und 2 µl GelRed (Biotium, Fremont, USA) in 2 ml PBS) vermischt und jeweils 20 µl auf zwei Objektträger gegeben. Diese wurden mit einem FITC-Filterblock bei 200-facher

Vergrößerung an einem Leica Diavert ausgewertet. Hierbei wurde jeweils von 200 Zellen der Anteil der grünen (viablen) und roten (toten) Zellen bestimmt (Abb. 5a).

Die 15 μl Zellsuspension wurde mit 15 μl 0,4 % Trypanblaulösung vermischt und für wenige Minuten stehen gelassen. Anschließend wurde 10 μl der Zell/Trypanblaulösung in eine Neubauerzählkammer gegeben und bei 100-facher Vergrößerung an einem Nikon TMS Lichtmikroskop ausgezählt. Hierbei waren viable Zellen weiß gefärbt, während blaue Zellen als tot gewertet wurden (Abb. 5b).

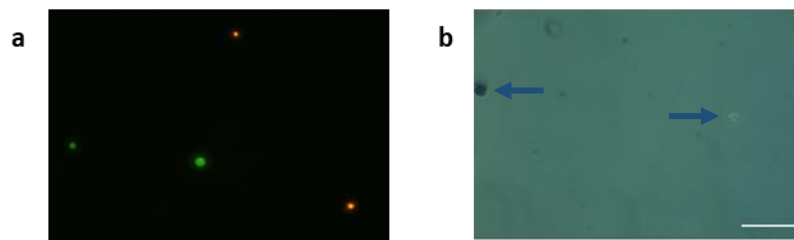


Abb. 5. Vitalitätstest in TK6-Zellen. (a) Färbung mit FD und (b) Färbung mit Trypanblau. Blauer Pfeil markiert gefärbte Zellen. Maßstab: 100 μm .

3.6 Lebendzellmikroskopie

3.6.1 Durchführung der Lebendzellmikroskopie

Für die Lebendzellmikroskopie wurden 15.000 Hela-H2B-GFP-Zellen/Well in eine 12-Well-Glassbodenplatte Nr. 1.5H (Cellvis, Mountain View, USA) ausgesät. Am nächsten Tag fand die Behandlung oder Bestrahlung mit anschließenden Mediumwechsel statt, gefolgt von einer Inkubation für einen weiteren Zellzyklus, um die so verursachte Mikrokerninduktion abzuwarten. Zusätzlich wurden auch Zellen ohne Behandlung kultiviert, die später als Kontrolle dienten. Anschließend fand ein letzter Mediumwechsel statt, sodass sich am Ende in jedem Well 3 ml Medium befanden. Vor Beginn der Mikroskopie wurden die Platte mit den Zellen für circa 3 h im Mikroskop bei laufender Temperatur- und Gasversorgung äquilibriert.

3 Material und Methoden

Alle Module für die Lebendzellmikroskopie wurden von Okolab (Pozzuoli, Italien), alle anderen Geräte und Software wurden, sofern nicht anders angegeben, von Nikon (Düsseldorf) bereitgestellt. Basis für das Lebendzellmikroskop war das inverse Fluoreszenzmikroskop Ti-S (Abb. 6 Nr. 1). Dieses verfügte über ein Plastikgehäuse, um eine stabile Temperatur im Inneren zu erhalten (Abb. 6 Nr. 2). Die Temperatureinstellung und -regelung erfolgte mit einer Temperatureinheit (Abb. 6 Nr. 3) und wurde schon am Vortag eines jeden Versuchs auf 37 °C eingestellt, um eine gleichmäßige Erwärmung sowohl der Innenatmosphäre als auch der optischen Teile des Mikroskops zu erreichen. Die Glasbodenplatte wurde in das Innere einer verschließbaren Gaskammer gestellt (Abb. 6 Nr. 4). In dieser Kammer konnte durch einen Gasmischer und Befeuchtungsmodul eine feuchte Atmosphäre mit 5 % CO₂ erzeugt werden (Abb. 6 Nr. 5). Vor jedem Versuch wurde Gaskammer und Befeuchtungsmodul mit Ethanol gereinigt und neues autoklaviertes, bidestilliertes Wasser verwendet. Die Platte befand sich auf einen motorisierten Tisch, wodurch einzelne Punkte genau gespeichert und wieder angefahren werden konnten. Die Steuerung war über Software oder über Joystick (xy-Ebene, Abb. 6 Nr. 6) und Controller (z-Ebene, Abb. 6 Nr. 7) ermöglicht. Die Beleuchtung erfolgte mit einer langlebigen 100W-Metallhalidlampe (Abb. 6 Nr. 8). Die Mikroskopie fand bei 400-facher Vergrößerung und unter Verwendung eines FITC-Filterblocks statt. Zur Aufnahme der Zellen wurde eine Andor Luca S (Oxford Instruments, Abingdon, Großbritannien, Abb. 6 Nr. 9) verwendet.

Für die Aufnahmen wurden ausschließlich Ausschnitte mit mikrokernhaltigen Zellen gewählt. Bei den Kontrollzellen wurden analog zu den Behandlungsgruppen einerseits mikrokernhaltige Zellen gewählt (KonMK+), aber auch nicht-mikrokernhaltige Zellen aufgenommen (KonMK-). Von diesen wurden alle 10 min für 96 h Aufnahmen gemacht, sodass am Ende von jedem Ausschnitt am Ende Sequenzen aus 577 Bilder entstanden. Die Expositionszeit betrug 100 ms, wobei ein ND-Filter von 64 angewandt wurde. Die Steuerung des gesamten Systems erfolgte mit der Software NIS-Elements Advanced Research Version 5.10.01.

Die Versuche mit HeLa-H2B-GFP-dsRed-LC3B und HeLa-H2B-GFP-dsRed-LMNB1 wurden mit dem gleichen Aufbau und Ablauf durchgeführt, wobei die Zellen zusätzlich noch mit einem Orange H-Filterset aufgenommen wurden. Die Belichtungsdauer mit

diesem Filter betrug 300 ms, wozu zusätzlich ein 2x2-Binning durchgeführt wurde. Weiterhin wurden z-Stapel á 5 Ebenen (Fokusebene \pm 2 Ebenen in 2,5 μm -Abständen) und die Dauer für einen Durchlauf auf 35 min erhöht, was zu 165 Aufnahmen innerhalb einer Sequenz führte. Ein ND-Filter von 8 wurde bei Versuchen mit diesen beiden Zelllinien gewählt.

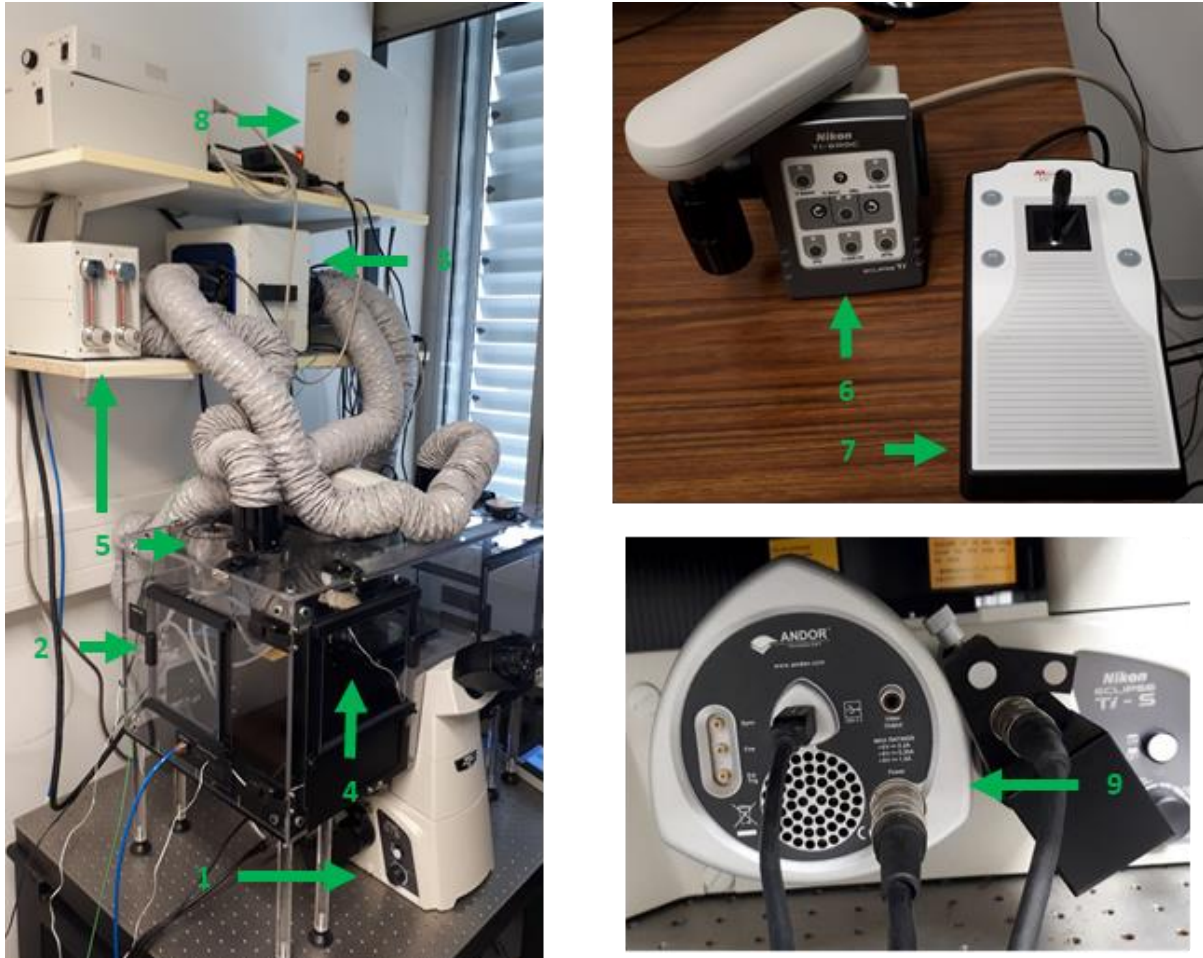


Abb. 6. Lebendzellmikroskop (links) mit Steuerung des motorisierten Tisches (rechts oben) und Kamera (rechts unten).

3.6.2 Auswertung Lebendzellmikroskopie

Von jedem Versuch mit HeLa-H2B-GFP, der fünfmal wiederholt wurde, wurden 30 Sequenzen von mikrokernhaltigen Zellen (Generation F0) und ihren Tochterzellen (Generation F1 bis maximal F5) ausgewertet. Ausnahme hiervon war nur KonMN-, wovon nur 10 Sequenzen pro Versuch ausgewertet wurden. Hierbei wurden jene

3 Material und Methoden

Sequenzen ausgeschlossen, in der z. B. durch Fokusverlust die Zellen und Mikrokerne unscharf geworden sind und sich nicht mehr verfolgen ließen. Die Sequenzen wurden mit der Software Fiji Version 1.52 durchgeführt. Zur besseren Erkennung von Mikrokernen wurde ggf. der Kontrast verstärkt. Durch das Fusionsprotein H2B-GFP waren das Chromatin von Haupt- und Mikrokern sichtbar, wobei diese hauptsächlich durch die Größe unterscheidbar waren.

Die bei der Auswertung der mikrokernhaltigen Zellen entscheidenden Parameter lassen sich prinzipiell in die Kategorien Zelle und Mikrokern unterscheiden.

Mikrokern:

- Anzahl Mikrokerne in der Zelle abhängig von der Zellgeneration
- Persistenz des Mikrokerns bis zum nächsten Zellzyklus. Dies wurde definiert als Auftreten des Mikrokerns vor und nach der Mitose
- Reinkorporation des Mikrokerns. Wenn ein Mikrokern vor aber nicht mehr nach der Mitose erkennbar war, wurde dies als Reinkorporation gewertet
- Extrusion des Mikrokerns aus der Zelle. Wenn ein Mikrokern sich vom Hauptkern wegbewegt hat, offensichtlich keine Verbindung mehr zu diesem hat und auch durch eine Mitose des Hauptkerns nicht mehr beeinflusst wird, wurde dies als Extrusion gezählt
- Degradation des Hauptkerns. Wenn der Mikrokern über die Zeit nicht mehr erkennbar war, wurde von Degradation ausgegangen. Unterschieden werden musste das durch ein Verschwinden durch die Bewegung des Mikrokerns entlang der Fokusebene oder durch einen Verlust des Fokus

Zelle:

- Anzahl Zellen und hiervon der Anteil der mikrokernhaltigen Zellen abhängig von der Zellgeneration
- Auftreten und Zeitpunkt des Zelltodes abhängig von der Zellgeneration, erkennbar u. a. an einem intensivierten Chromatinsignal des Hauptkerns, welches aber zusammenschrumpft und häufig mehrere möglicherweise apoptotische Körperchen bildet. Weiterhin konnte aber auch ein Ausdehnen

des Chromatins mit anschließendem langsamem Verblässen beobachtet werden

- Auftreten und Zeitpunkt der Mitose erkennbar an Kondensation der Chromosomen und Bildung zweier Tochterzellen abhängig von der Zellgeneration. In manchen Fällen wurden abnormale Mitosen beobachtet und ebenso notiert:
 - Mitosen nach Fusion von zwei Hauptkernen
 - Zelltod im Laufe der Mitose
 - Mitose, nach der mehr als zwei Kernfragmente (keine Mikrokerne) entstehen
- Äußerlich inaktiver Kern bis zum Ende der Aufnahme ohne eines der anderen Ereignisse abhängig von der Zellgeneration
- Länge von Interphase und Mitose abhängig von der Zellgeneration

Weiterhin wurden von Kontrollzellen sowie nach der jeweils mittleren Dosis von Etoposid, Doxorubicin, tBHP, Strahlung, MMS und Vinblastin von jeweils drei Versuchen die Größen der Mikrokerne ausgemessen. Aus allen Daten wurde dann der Median bestimmt und Größen unter dem Mikrokern wurden als klein, Größen darüber als groß bewertet. Auf diese Weise wurde jeder Mikrokern eingeschätzt und die Verteilung von kleinen und großen Mikrokernen miteinander verglichen.

Bei Versuchen mit HeLa-H2B-GFP-dsRed-LC3B und HeLa-H2B-GFP-dsRed-LMNB1 wurde ausgewertet, ob Mikrokerne der (Tochter-)Zellen mit einem Signal von dsRed assoziiert waren. Hierbei wurden nur Zellen ausgewertet, wo ein dsRed-Signal in der Zelle gefunden wurde, das aber auch nicht so stark war, dass die ganze Zelle überstrahlt wurde. Es wurden jeweils vier Wiederholungen durchgeführt, wobei jeweils 25 mikrokernhaltige Zellen (und folgende Tochterzellen) gewählt wurden. Bei der Untersuchung, ob ein Mikrokern LC3B+ war, wurde als Kriterium ein über mehrere Aufnahmen konstantes Signal am Mikrokern gewählt, um zufällige, kurzzeitige Ko-Lokalisationen auszuschließen.

3.7 Immunfärbung von γ H2AX

Für die Immunfärbung wurden 15.000 Hela-H2B-GFP-Zellen/Well in eine 12-Well-Zellkulturplatte ausgesät. Am nächsten Tag fand die Behandlung beziehungsweise Bestrahlung statt, wobei die höchste Dosis der zuvor verwendeten genotoxischen Agenzien angewandt wurde. Direkt nach der Behandlung wurden Zellen trypsinisiert, zentrifugiert und mit PBS resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen gezählt und mit PBS verdünnt, sodass eine Konzentration von 300.000 Zellen/ml vorlag. Danach wurden mit 100 μ l, entsprechend 30.000 Zellen, der Zellsuspension unter Verwendung des Cytospin 3 bei 1.000 rpm auf einen Objektträger gebracht und die Zellfläche mit einem ImmEdge Pen (Vector Laboratories, Burlingame, USA) umrandet. Die Zellen wurden für 10 min in 4 % PFA fixiert und anschließend zweimal in eiskaltem PBS gewaschen. Als nächstes fand eine Permeabilisierung bei Raumtemperatur für 15 min mit 1 % Triton X-100-Lösung, gefolgt von zwei Waschschritten mit PBST (0.05 % Tween 20 in PBS) für jeweils 5 min unter vorsichtigem Schütteln statt. Blockiert wurde für 30 min in einer feuchten Kammer mit einer Blockierlösung (5 % fötales Kälberserum, 2 % BSA, 0,1 % Triton X-100 und 22,52 mg/ml Glycin in PBS). Anschließend wird die Blockierlösung vorsichtig abgeklopft. Der erste Antikörper war ein monoklonaler Antikörper gegen das menschliche am Serin 139 phosphorylierte Histon H2AX aus der Maus (Abcam 26350, Cambridge, Großbritannien). Dieser wurde 1:500 in Blockierlösung verdünnt und bei 4 °C über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert, worauf drei Waschschrritte für jeweils 5 min ohne Schütteln in PBST folgten. Der zweite Antikörper war ein gegen IgG aus der Maus gerichtete Antikörper aus der Ziege (Abcam 6786, Cambridge, Großbritannien), der mit einem TRITC-Farbstoff gekoppelt wurde. Dieser Antikörper wurde 1:1.000 in Blockierlösung verdünnt und für 2 h bei Raumtemperatur in einer feuchten, dunklen Kammer inkubiert. Anschließend folgten zwei Waschschrritte in PBST und ein letzter PBS für jeweils 5 min ohne Schütteln in einer möglichst lichtarmen Umgebung. Die Zellen wurde mit 25 μ l Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, USA) eingedeckt und mit handelsüblichem Nagellack versiegelt.

Die Auswertung erfolgte bei 400-facher Vergrößerung am Nikon TE2000-E mittels Aufnahme von zwei Bilder mit einer Nikon Digital Sight U2-5MC unter Verwendung

von FITC- oder TRITC-Filterblöcken für die DNA- bzw. γ H2AX-Färbung (Abb. 7a/b). Die Belichtungszeit lag bei 0,5 s im FITC- und 8 s im TRITC-Filter. Anschließend wurde die Software Fiji Version 1.52 genutzt und das γ H2AX-Signal ausschließlich aus dem roten Anteil des Gesamtsignals gemessen. Es wurden 100 mikrokernfreie sowie 30 mikrokernhaltige mit den in diesen Zellen aufgetretenen Mikrokernen gemessen. Anschließend wurde die Intensität im Hintergrund gemessen und von den anderen Messwerten abgezogen.

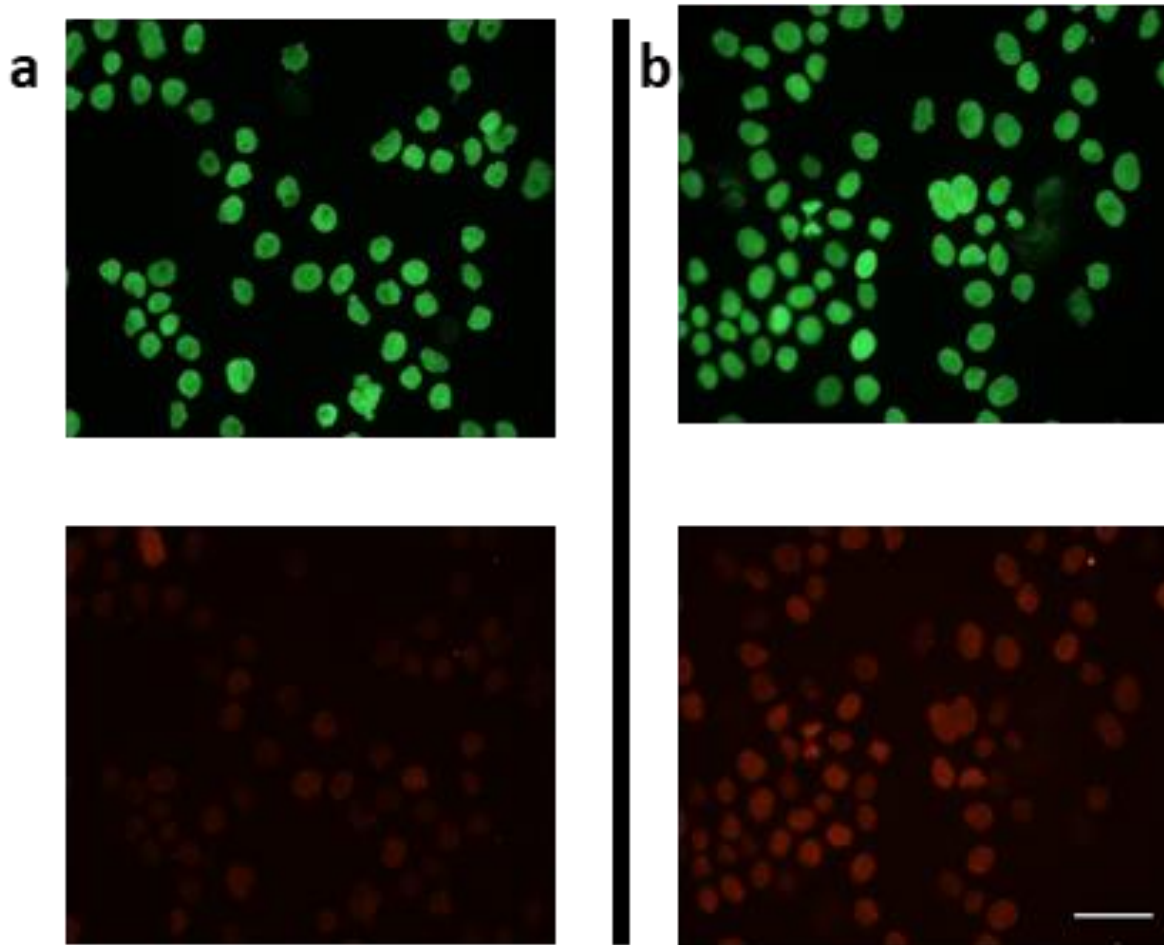


Abb. 7. H2B-GFP (oben) und Immunfärbung von γ H2AX (unten) in HeLa-H2B-GFP-Zellen. (a) Kontrollbehandlung mit DMSO. (b) Behandlung mit 2 μ g/ml Etoposid. Maßstab: 50 μ m.

3.8 Mikrokerntest in Mundschleimhautzellen

Der Probandenstudie wurde von der Ethik-Kommission der medizinischen Fakultät der Universität Würzburg zugestimmt, bevor Proben entnommen worden sind

3 Material und Methoden

(Antragsnummer 162/12). Alle Teilnehmer haben freiwillig teilgenommen und wurde vorab über die Studie informiert und haben eine Zustimmungserklärung unterschrieben. Es gab zwei verschiedene Gruppen: Die erste bestand aus 329 Teilnehmern, die während des zweiten Treffens einer Langzeitkohortenstudie rekrutiert und Proben entnommen wurden [115]. Keine der Teilnehmer litt an einer schweren neurologischen Störung innerhalb des letzten Jahres vor der Probenentnahme und wird im Folgenden als Referenzgruppe bezeichnet. Die zweite Gruppe bestand aus 96 Probanden, die die neurologische Ambulanz der Universitätsklinik Würzburg aufgesucht haben, in der auch die Proben genommen wurden und im Folgenden als Patientengruppe bezeichnet wird.

Die Probenvorbereitung bis zur Lagerung in eiskaltem Methanol wurden von Silvana Wunram und Christin Misigaiski (Universität Würzburg) durchgeführt: Mit einem sterilen Wattestäbchen wurden für die Probenentnahme an beiden Wangeninnenseiten nacheinander jeweils zehn- bis fünfzehnmal mit leichtem Druck unter Drehen des Stäbchens Auf- und Abbewegungen durchgeführt. Anschließend wurde das Stäbchen in 4 ml 0,9 % NaCl-Lösung getaucht und kräftig bewegt, sodass sich möglichst alle Mundschleimhautzellen gelöst haben. Dieser Vorgang wurde mit einem weiteren Wattestäbchen, der anschließend in dieselbe Lösung getaucht wurde, wiederholt. Die Wattestäbchen wurden nun entnommen und zu der NaCl-Lösung 10 ml eines Puffers (0,01 M Tris HCl; 0,1 M EDTA; 0,02 M NaCl sowie 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin, pH 7) dazugegeben. Bei 1.000 rpm wurde zentrifugiert, der Überstand bis auf einen Rest von 0,5–1 ml abpipettiert und wieder 5 ml vom gleichen Puffer hinzugegeben. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde wieder bis auf 0,5-1 ml abpipettiert und der ganze Vorgang noch einmal wiederholt, wobei dieses Mal 1 ml Restvolumen übrigbleiben sollte. Nach Resuspension und Zählung der Zellen wurden mittels Cytospin 3 bei 1.000 rpm 8.000 Zellen auf einen Objektträger gebracht und für mindestens 2 h bei -20 °C in Methanol fixiert. Nach Entnahme der Objektträger wurden abgewartet, bis sich jegliche Methanolreste verflüchtigt haben, wobei anschließend mit 5 µl GelGreen 1:100 in Wasser verdünnt für 30 s gefärbt wurde. Dabei war darauf zu achten, dass möglichst genau die Zellen getroffen wurden, bevor der Farbstoff mit einem Deckglas verteilt wurde. Danach wurden Deckglas und Farbstoff mit PBS abgewaschen und, nachdem die Objektträger getrocknet waren, mit Dabcolösung eingedeckt.

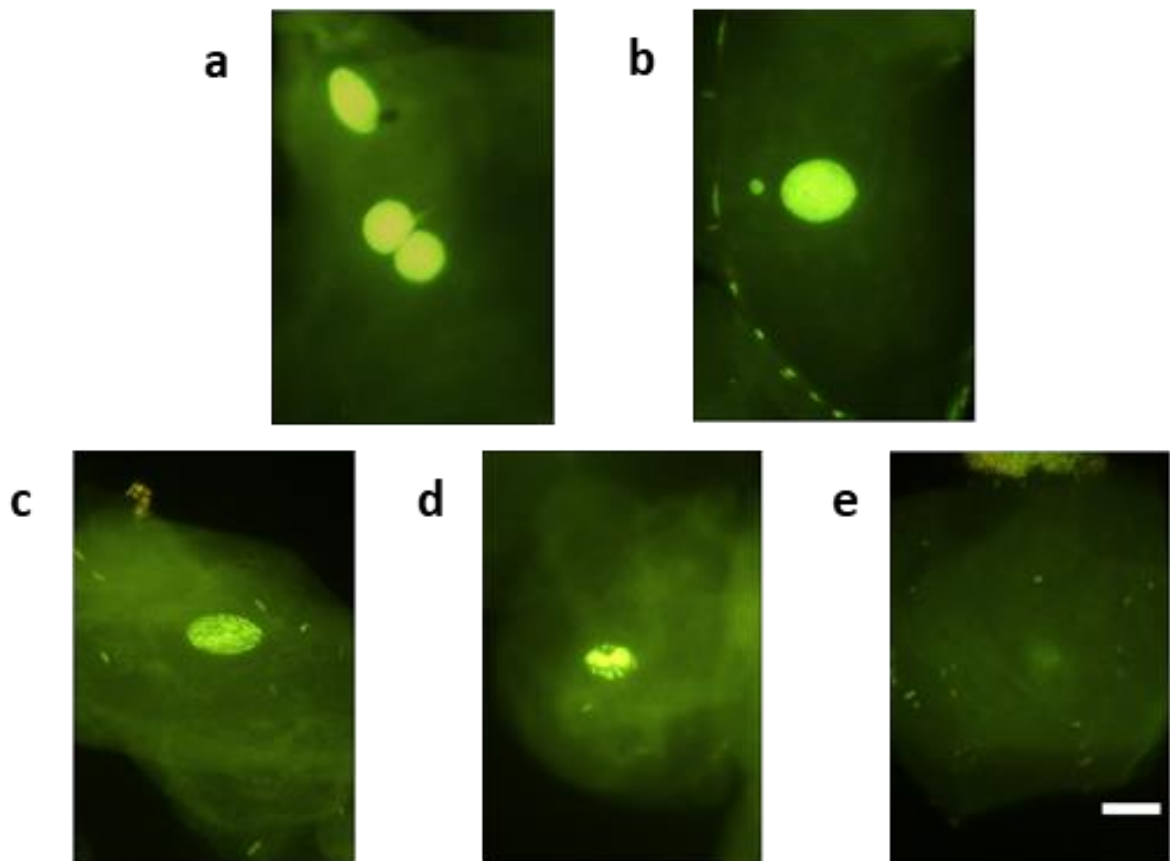


Abb. 8. Zellpopulationen im Mikrokerntest in Mundschleimhautzellen nach Färbung mit GelGreen. (a) Ein- und zweikernige Zellen, (b) einkernige Zelle mit Mikrokern, (c) Zelle mit kondensiertem Chromatin, (d) karyorrhektische Zelle und (e) karyolytische Zelle. Maßstab: 10 μm .

Die Auswertung erfolgte an einem Nikon Eclipse 55i Fluoreszenzmikroskop bei 400-facher Vergrößerung mit FITC-Filterset. Hierbei wurden die Zellen nach den Kriterien bewertet, wie sie vorher schon an anderer Stelle beschrieben worden sind [108]. Da alle einkernigen Zellen differenziert erschienen, wurde hier nicht zwischen basal und differenziert unterschieden. Weiterhin wurden zweikernige, Zellen mit kondensiertem Chromatin oder karyorrhektische sowie karyolytische Zellen gezählt (Abb. 8a, c-e). Die Auswertung erfolgte von jeweils 1.000 Zellen von zwei verschiedenen Objektträgern. Zusätzlich wurden die Häufigkeit von Mikrokernen in ein- und zweikernigen Zellen wie auch in Zellen mit kondensiertem Chromatin gezählt (Abb. 8b). Als Mikrokerne wurden, analog zum Zytokinese-Block Mikrokerntest, nur runde nukleäre Körperchen innerhalb des Zytoplasmas mit ähnlicher Färbintensität wie der Hauptkern gezählt, die einen Durchmesser von 1/16 bis 1/3 des Hauptkerns hatten. Weiterhin wurde noch die Lokalisierung der Mikrokerne im Zytoplasma mit einer Skala von 1-5 bewertet, die folgende Bedeutung hatten:

1. Sehr nahe am Hauptkern
2. Nähe zum Hauptkern, aber Abstand noch vorhanden
3. Keine Orientierung in Richtung Hauptkern oder Plasmamembran
4. Nähe zur Plasmamembran, aber Abstand noch vorhanden
5. Sehr nahe an Plasmamembran

3.9 Statistik

Für die statistische Auswertung wurde die Software IBM SPSS Statistics 25 benutzt. Hierbei wurden die Daten auf Normalität unter anderem mit dem Shapiro-Wilk-Test überprüft. Anschließend wurde entweder mit dem Mann-Whitney-U-Test ein nichtparametrisches Testverfahren durchgeführt oder bei Vorliegen einer Normalverteilung mit dem Student-t-Test fortgefahren. Vor Durchführung des letzteren wurde noch die Gleichheit der Varianzen mit dem Levene-Test überprüft und im Falle einer Ungleichheit ein Welch-t-Test angewandt. Eine Signifikanz wurde bei $p \leq 0,05$ angenommen.

4 Ergebnis

4.1 Schicksal von Mikrokernen und mikrokernhaltigen Zellen in der Lebendzellmikroskopie

Die in den Vorversuchen mittels Zytokinese-Block Mikrokerntest bestimmten Dosen der gentoxischen Behandlungen wurden in der Lebendzellmikroskopie verwendet, um mehr über das Schicksal von Mikrokernen und mikrokernhaltigen Zellen zu erfahren.

4.1.1 Vorversuche

Vor dem Beginn der eigentlichen Versuche mussten passende Dosen für jede gentoxische Behandlung bestimmt werden. Daher wurde der Zytokinese-Block Mikrokerntest in HeLa-H2B-GFP-Zellen durchgeführt. Auf diese Weise wurde jeweils eine niedrige, mittlere und hohe Dosis für die weiteren Versuche bestimmt: 0,5, 1 und 2 µg/ml Etoposid (Abb. 9a); 20, 30 und 40 nM Doxorubicin (Abb. 9b); 50, 100 und 150 µM tBHP (Abb. 9c); 0,5, 1 und 2 Gy Strahlung (Abb. 9d) sowie 1, 2 und 3 nM Vinblastin (Abb. 9f). Alle diese Dosen induzierten Mikrokerne ohne die Proliferation der Zellen, welche in Form des CBPI eingeschätzt wurde, zu stark zu beeinträchtigen. Bei MMS gelang dies nur nach Behandlung mit 20 und 30 µg/ml der Substanz, weswegen hier als zusätzliche mittlere Dosis 25 µg/ml gewählt wurde (Abb. 9e).

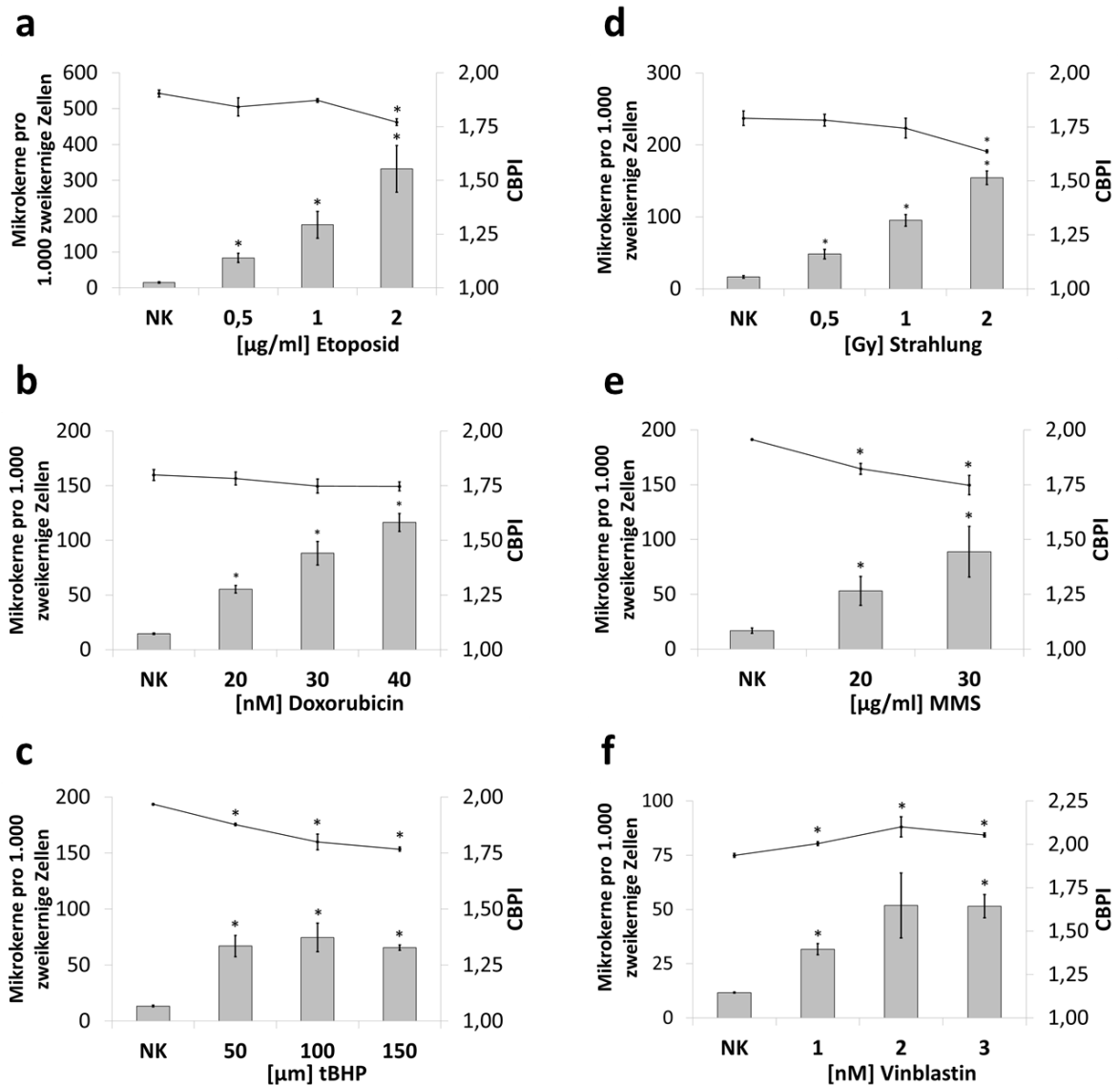


Abb. 9. Zytokineseblock-Mikrokerntest in Hela-H2B-GFP nach Behandlung mit (A) Etoposid, (B) Doxorubicin, (C) tBHP, (D) Strahlung, (E) MMS und (F) Vinblastin. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei (vier bei Etoposid) Versuchen \pm Standardfehler der Mikrokernelhäufigkeit von 1.000 zweikernigen Zellen (grauer Balken) und CBPI (schwarze Linie). Sternchen markiert $p \leq 0,05$ im Vergleich zur NK (Mann-Whitney-U-Test).

4.1.2 Schicksal von Mikrokerneln

In den folgenden Unterkapiteln werden die Ergebnisse dargestellt, die sich auf das Schicksal von Mikrokerneln beziehen.

4.1.2.1 Anzahl der Mikrokerne im Verlauf der Generationen

Die Anzahl der Mikrokerne während der Lebendzellmikroskopie normiert auf die Gesamtzellzahl in den Generationen F0-F5, wurde nach jeder Behandlung untersucht. Hier ist nach allen Behandlungen der gleiche Trend zu beobachten: In F0 ist der Wert immer ≥ 1 , da die zu Beginn gewählten Zellen in jedem Fall Mikrokerne enthielten. Spätestens ab der Generation F2 ist jedoch ein signifikanter Rückgang auf 0,2-0,6 Mikrokerne/Zelle zu beobachten, der sich weiter fortsetzt bis in F5 nur noch wenig bis keine Mikrokerne mehr gefunden wurden (Abb. 10). In F1 wurde nach mittlerer und hoher Etoposid- und Doxorubicinbehandlung (Abb. 10a/b) sowie nach hochdosierter Bestrahlung und MMS-Behandlung (Abb. 10d/e) ein teilweise zu F0 signifikanter Anstieg der Mikrokernzahl beobachtet, der nach hochdosierter Etoposid- und Doxorubicinbehandlung zu bis zu 3 Mikrokernen/Zelle führen kann, während bei F1 selbst nach hohen Dosen tBHP keine Veränderung im Vergleich zu F0 bzw. nach Vinblastinbehandlung schon ein Rückgang zu beobachten war (Abb. 10c/f).

Signifikante Anstiege im Vergleich zu mikrokernhaltigen Zellen in der Kontrollbehandlung (KonMK+) wurden nur in F0/F1 nach Behandlung mit mittleren und hohen Dosen Etoposid bzw. Doxorubicin beobachtet. Ähnliche Effekte wurden nach hoher Dosierung MMS und tBHP festgestellt, bei letzterer Behandlung jedoch nur in F0, während hochdosierte Bestrahlung in F1 zu einer signifikanten Erhöhung der Mikrokernzahl geführt hat.

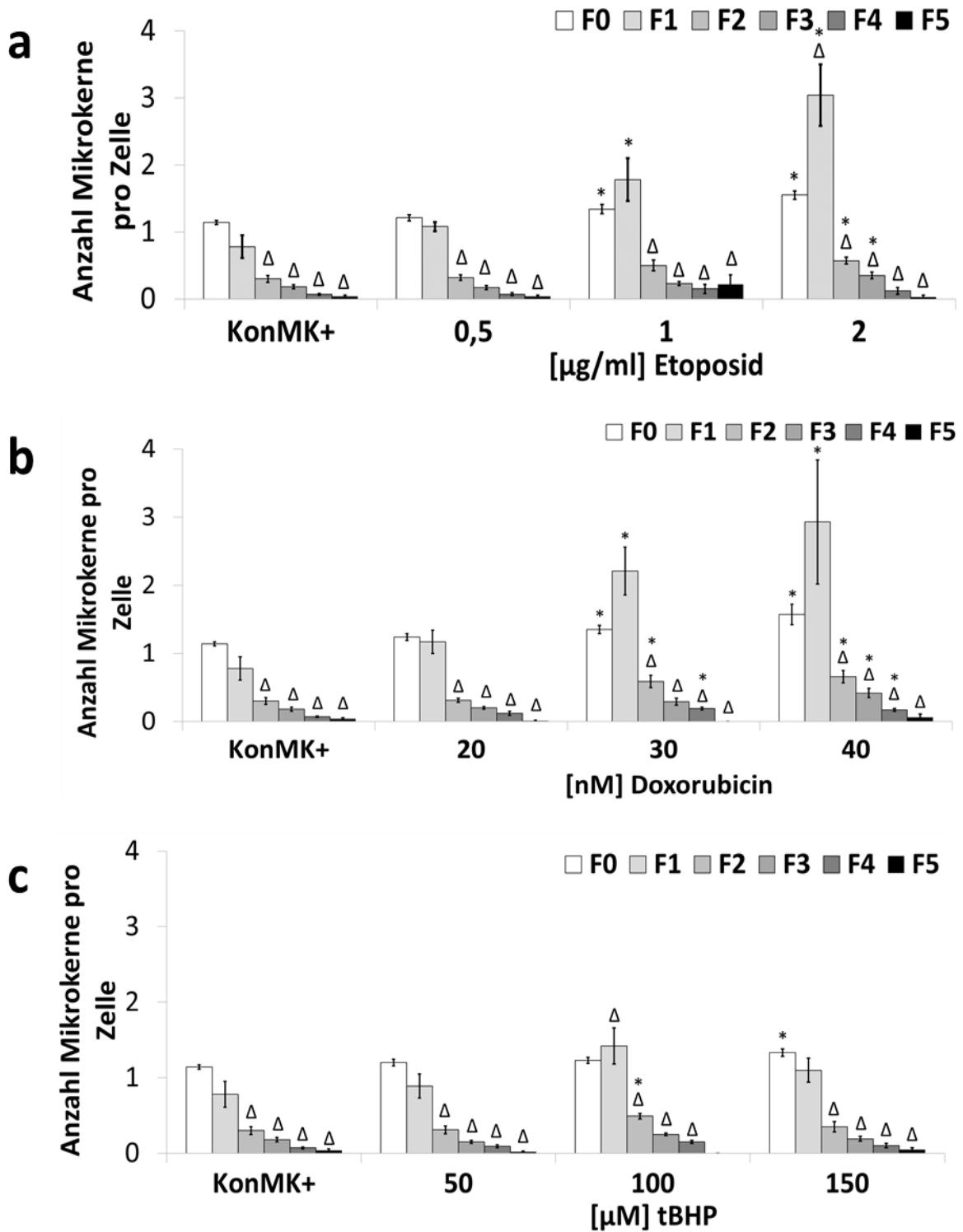


Abb. 10. Fortsetzung auf der nächsten Seite

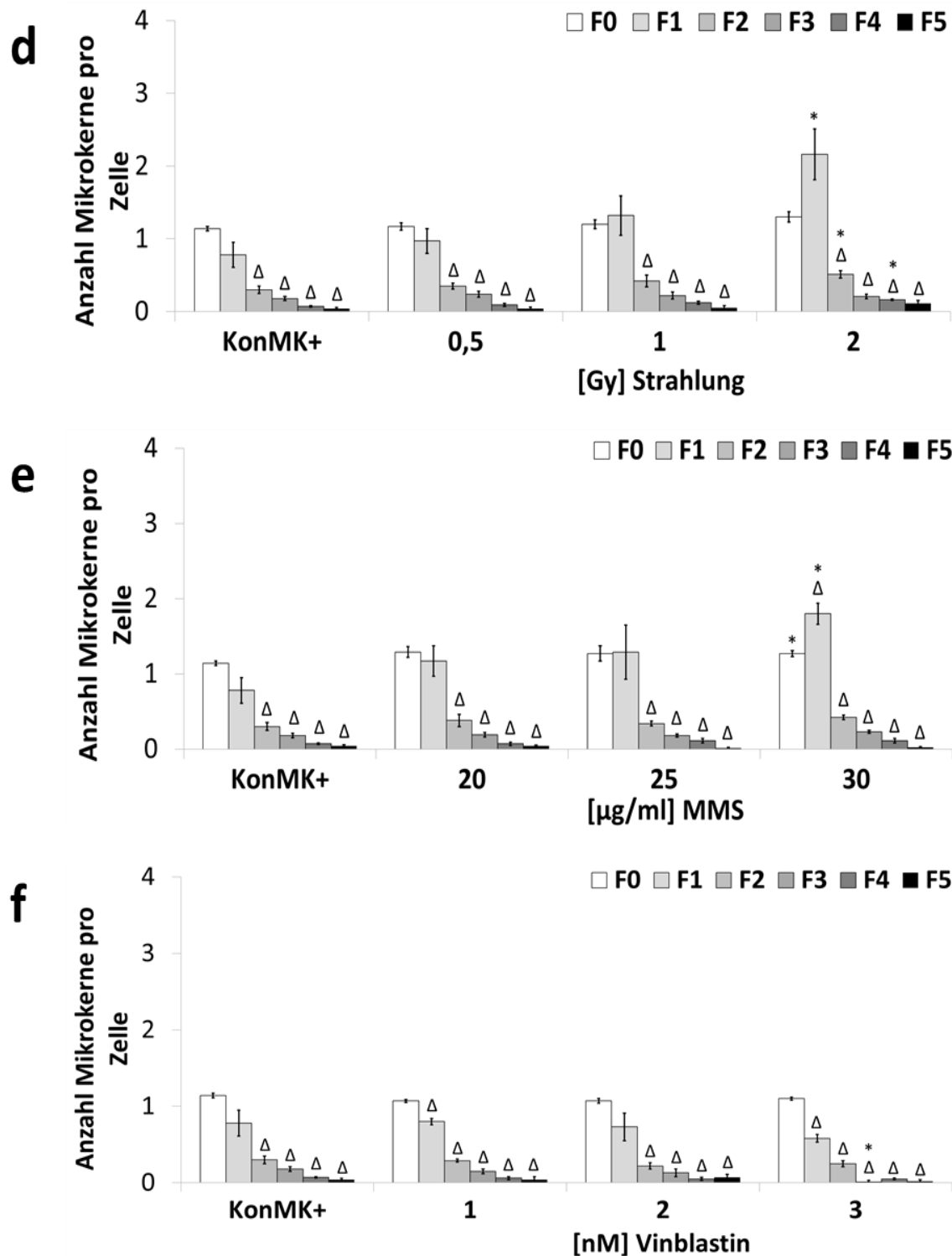


Abb. 10. Anzahl der Mikrokerne normiert auf die Gesamtzellzahl in F0-F5 in HeLa-H2B-GFP nach Behandlung mit (a) Etoposid, (b) Doxorubicin, (c) tBHP, (d) Strahlung, (e) MMS und (f) Vinblastin. Dargestellt sind die Mittelwerte aus fünf Versuchen \pm Standardfehler. Sternchen markiert $p \leq 0,05$ im Vergleich zu KonMK+ der gleichen Generation (t-Test). Delta markiert $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Generation F0 der gleichen Behandlung (t-Test).

4.1.2.2 Persistenz, Reinkorporation, Degradation und Extrusion

Über alle Behandlungen hinweg waren die zwei mit Abstand häufigsten beobachteten Schicksale eines Mikrokerns während eines Zellzyklus Persistenz (Abb. 11a) mit einer Häufigkeit von 74,7 % bis 88,9 % (Abb. 12) und Reinkorporation (Abb. 11b) mit einer Spanne von 10,8 bis 24,3 % (Abb. 12).

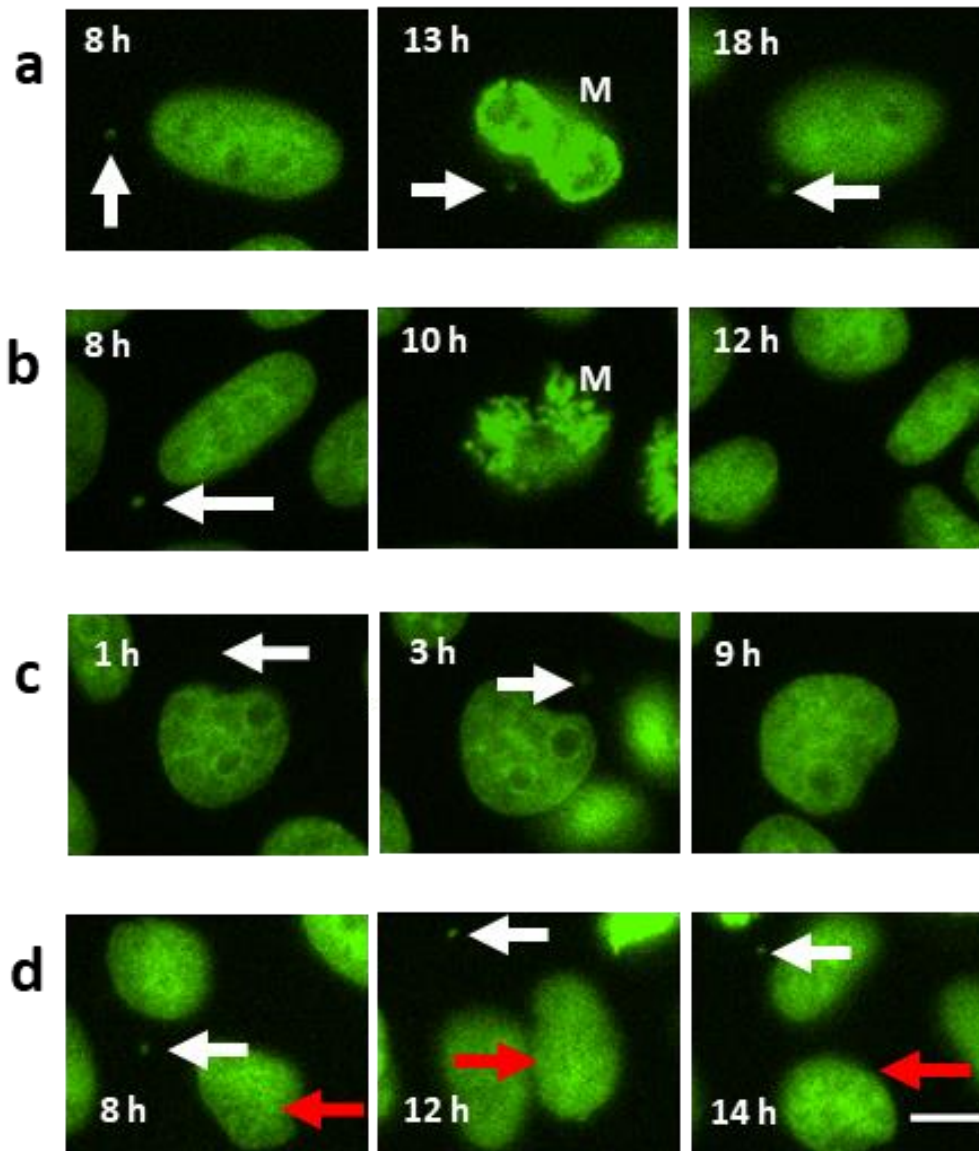


Abb. 11. Schicksal von Mikrokernen in HeLa-H2B-GFP-Zellen. (a) Persistenz, (b) Reinkorporation, (c) Degradation und (d) Extrusion. Weiße Pfeile zeigen Mikrokerne an, während rote Pfeile die immer gleiche mikrokernhaltige Zelle kennzeichnen. M kennzeichnet mitotische Zellen. Maßstab: 10 µm.

Degradation (Abb. 11c) wurde vergleichsweise selten gefunden (0,1 bis 4 %, Abb. 12). Extrusion (Abb. 11d) wurde nur in wenigen Fällen in KonMK+ sowie nach 1 und 2 µg/ml Etoposidbehandlung, 50 µM tBHP-Behandlung, 20 µg/ml MMS-Behandlung

KonMK+

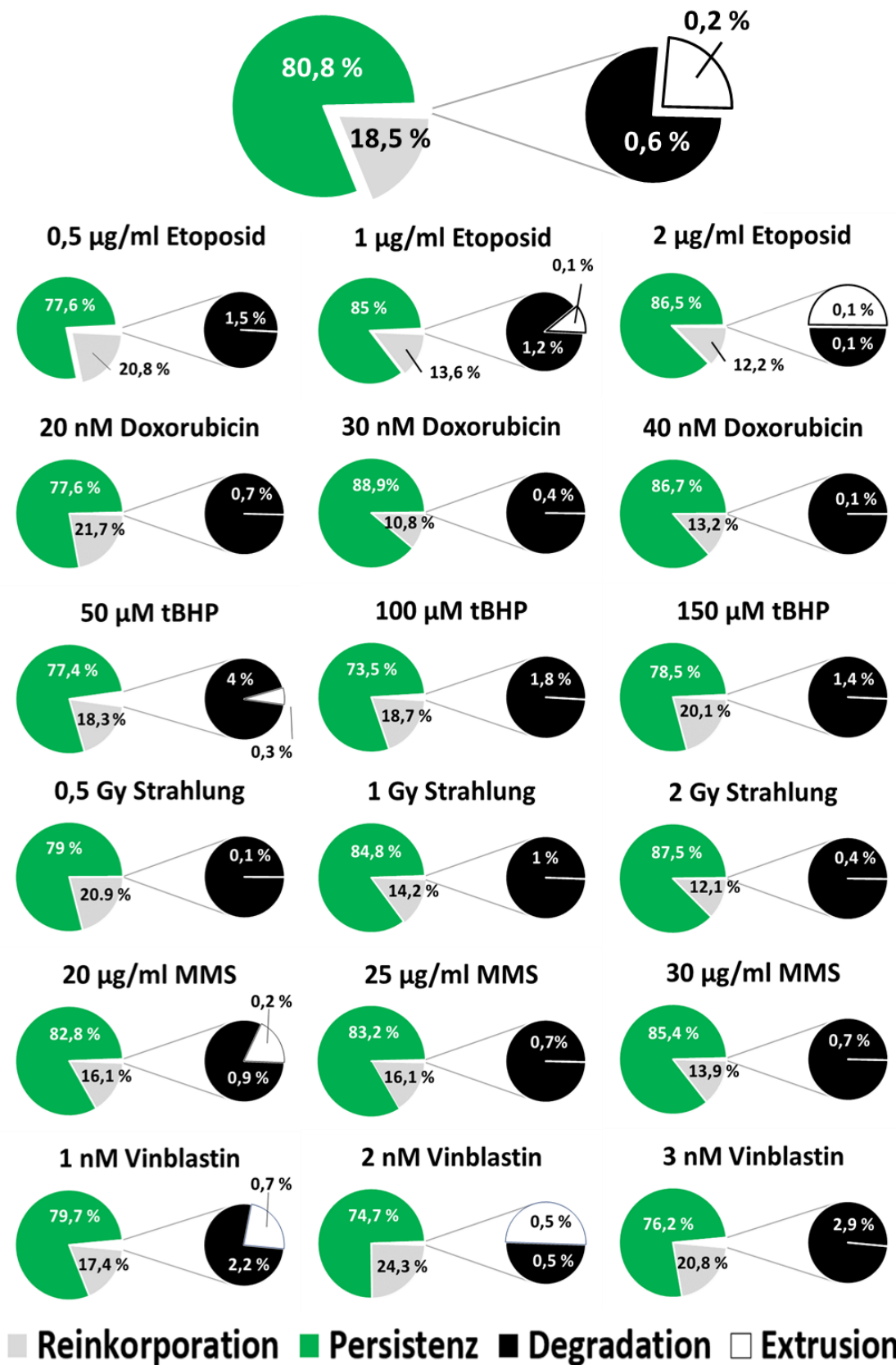


Abb. 12. Beobachtete Schicksale von Mikrokernen in HeLa-H2B-GFP nach Behandlung mit Etoposid, Doxorubicin, tbhP, Strahlung, MMS und Vinblastin.

sowie nach 1 und 2 nM Vinblastinbehandlung beobachtet (Abb. 12).

Eine klare Dosisabhängigkeit im Zusammenhang mit einem der beobachteten Schicksale konnte nicht eindeutig festgestellt werden. So wurde zwar ein Rückgang der Häufigkeit der Reinkorporation verbunden mit einem Anstieg der Persistenzhäufigkeit mit zunehmender Dosierung von Etoposid, Doxorubicin und Strahlung beobachtet. Ein derartiger Effekt war aber nach MMS-Behandlung nur schwach ausgeprägt und konnte nach tBHP und Vinblastinbehandlung überhaupt nicht festgestellt werden. Weiterhin wurde ein Rückgang der Degradationsrate mit zunehmender Dosierung von Etoposid, Doxorubicin und tBHP gefunden, ließ sich aber für die anderen Agenzien nicht nachweisen (Abb. 12).

4.1.2.3 Neubildung von Mikrokernen

Die Neuformierung von Mikrokernen (Abb. 13) wurde, normiert auf die Gesamtzellzahl und über den gesamten Beobachtungszeitraum gemittelt, untersucht.

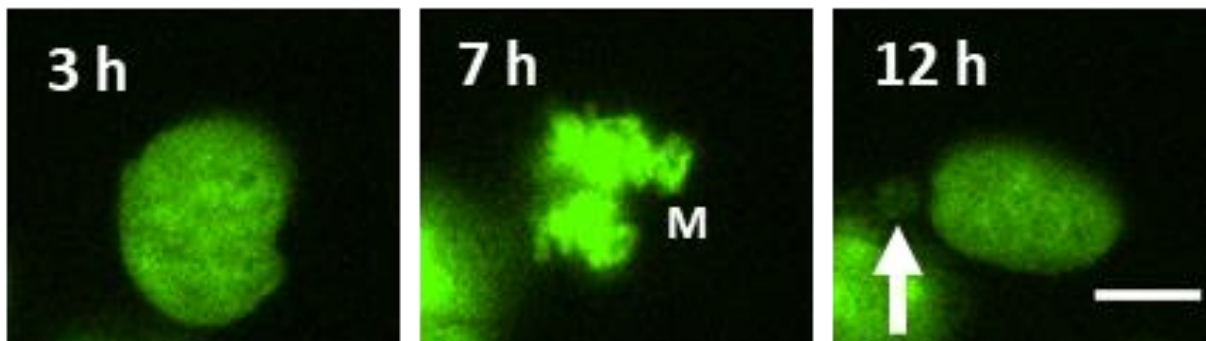


Abb. 13. Neuformierung von Mikrokernen in HeLa-H2B-GFP. Der weiße Pfeil markiert den Mikrokern, das M die mitotische Zelle.

Hierbei wurden neben KonMK+ in einer weiteren Kontrollgruppe mikrokernfreie Zellen und Tochterzellen untersucht (KonMK-). In KonMK- war die Häufigkeit der Neubildung von Mikrokernen äußerst gering und kaum größer als 0 Mikrokern/Zelle. Nach allen Behandlungen sowie in KonMK+ war die Häufigkeit signifikant erhöht, wobei der Anstieg mit Ausnahme nach Vinblastinbehandlung dosisabhängig größer geworden ist, welche mit nur wenig mehr als 0,1 Mikrokern/Zelle die geringste Mikrokernbildungsrate zeigte (Abb. 14).

Die höchste Mikrokernbildungsrate wurde nach Behandlung mit Etoposid und Doxorubicin erreicht, wo pro Zelle nach mittlerer und hoher Dosierung 0,4-0,5 Mikrokern pro Zelle gebildet wurden. Schwächer, mit Maxima nach mittlerer bzw. hoher Dosierung war die Neubildungsrate nach tBHP-Behandlung und Bestrahlung, wobei immer noch 0,3-0,4 Mikrokern pro Zelle gebildet wurden, während nach MMS-Behandlung nur schwach dosisabhängig jeweils ca. 0,2 Mikrokern/Zelle gebildet worden waren. Die Häufigkeit der Mikrokernbildung in KonMK+ befindet sich auf einem ähnlichen Level wie nach Behandlung mit den jeweils niedrigen Dosen der einzelnen Agenzien (Abb. 14).

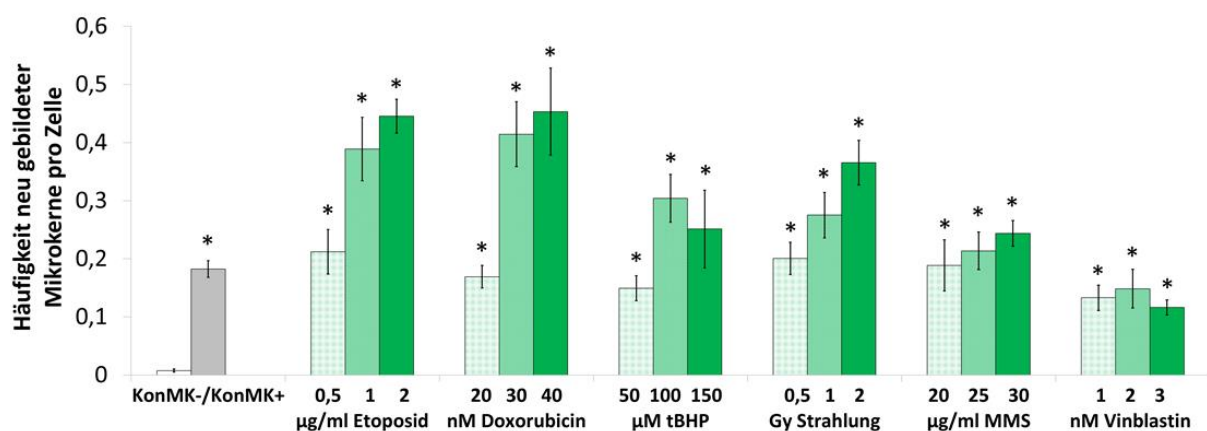


Abb. 14. Neuformierung von Mikrokernen normiert auf die Gesamtzellzahl in HeLa-H2B-GFP nach Behandlung mit Etoposid, Doxorubicin, tbhP, Strahlung, MMS und Vinblastin. Dargestellt sind die Mittelwerte aus fünf Versuchen \pm Standardfehler. Sternchen markiert $p \leq 0,05$ im Vergleich zu KonMK- (t-Test).

4.1.2.4 Mikrokerngröße

Mögliche Unterschiede in der Mikrokerngrößenverteilung nach verschiedenen Behandlungen wurden untersucht. Die Verteilung zwischen kleinen und großen Mikrokernen war in KonMK+ mit jeweils ca. 50 % fast gleich, was ähnlich zu Behandlungen mit 100 µM tbHP bzw. 25 µg/ml MMS war (Abb. 15). Nach 1 Gy Strahlung hingegen wurden 53,8 % der Mikrokern als klein ausgewertet, was über alle Behandlungen hinweg der höchste Wert war. Interessanterweise verursache Doxorubicinbehandlung den höchsten Anteil großer Mikrokern mit 58,8 %, gefolgt von 55,3 % nach Behandlung mit Vinblastin.

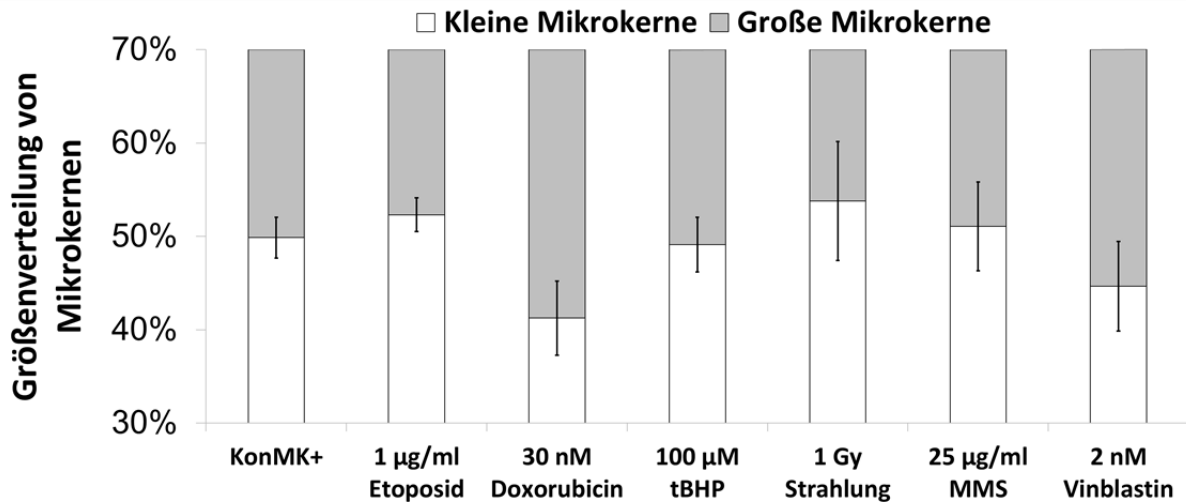


Abb. 15. Größenverteilung von Mikrokerneln in HeLa-H2B-GFP nach Behandlung mit Etoposid, Doxorubicin, tbhP, Strahlung, MMS und Vinblastin. Dargestellt sind die Mediane aus drei Versuchen \pm Standardfehler.

4.1.3 Schicksal von mikrokernhaltigen Zellen

In den folgenden Unterkapiteln werden die Ergebnisse dargestellt, die sich auf das Schicksal von mikrokernhaltigen Zellen beziehen.

4.1.3.1 Anzahl Zellen im Verlauf der Generationen

Die Verteilung der Zellen über die einzelnen beobachtbaren Generationen wurde für alle Behandlungen analysiert. Da in jedem Versuch 30 Sequenzen von mikrokernhaltigen Zellen und Tochterzellen ausgewertet wurden, ist die Zellzahl in F0 immer 30 (mit Ausnahme von KonMK-, wo pro Versuch nur 10 Sequenzen ausgewertet wurden). Bei allen Behandlungen und Kontrollen wurden (nahezu) doppelt so viele Zellen in F1 wie in F0 gezählt, wodurch es dementsprechend zu einer signifikanten Erhöhung kam (Abb. 16). Offensichtlich fand bei fast allen Zellen in F0 eine Teilung und damit eine Verdopplung der Zellzahl statt.

Während es in den darauffolgenden Generationen bei KonMK- nun weiterhin zu Verdopplungen der Zellzahl kam, erreichten in den anderen Gruppen einschließlich KonMK+ weniger Zellen die folgenden Generationen, wobei bei KonMK+ das Maximum in F3/F4 mit jeweils knapp 100 Zellen erreicht war. So war nach jeder Behandlung mit der jeweils niedrigsten Dosis zwar noch bis F4 immer ein Anstieg zu

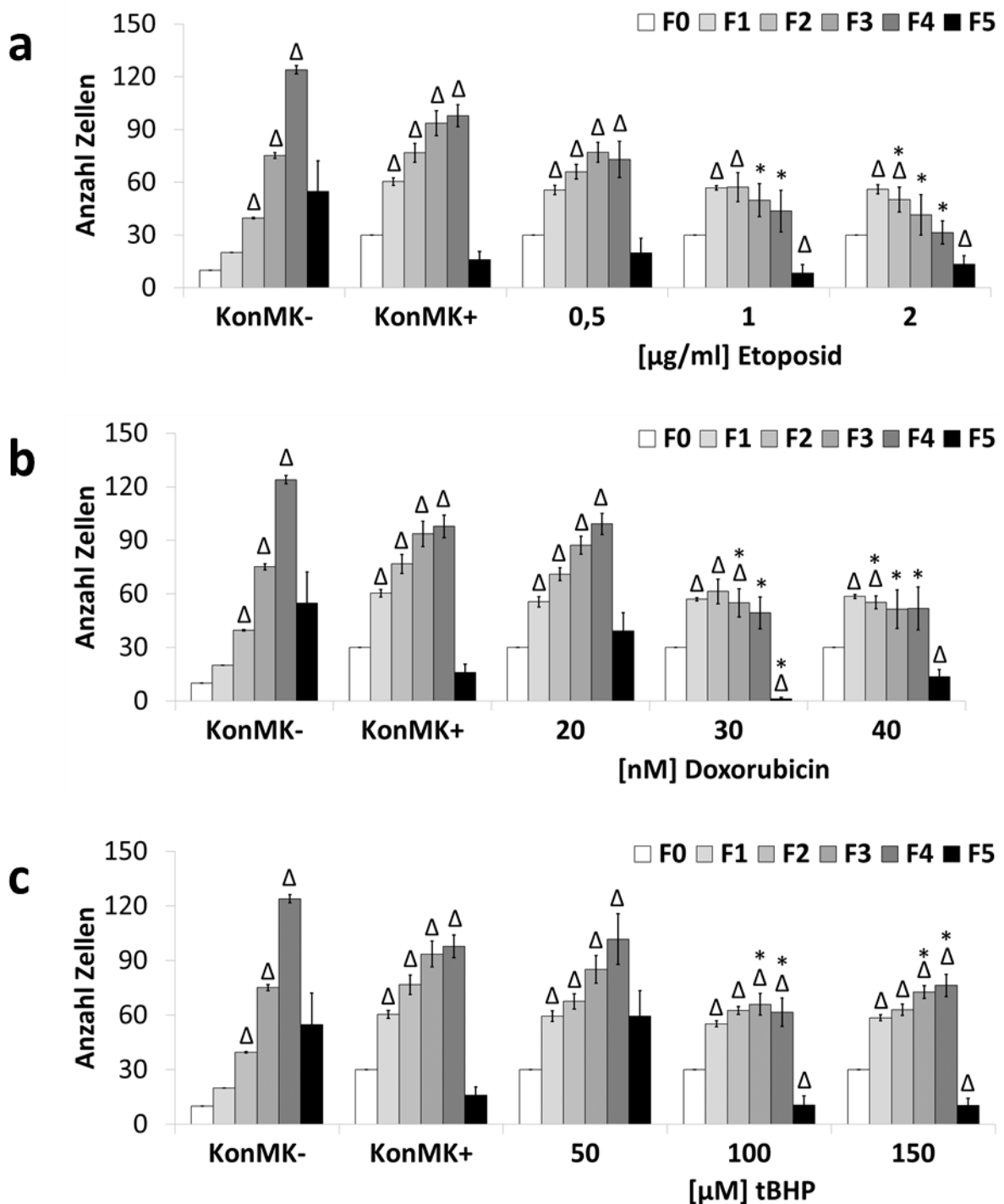


Abb. 16. Fortsetzung auf der nächsten Seite.

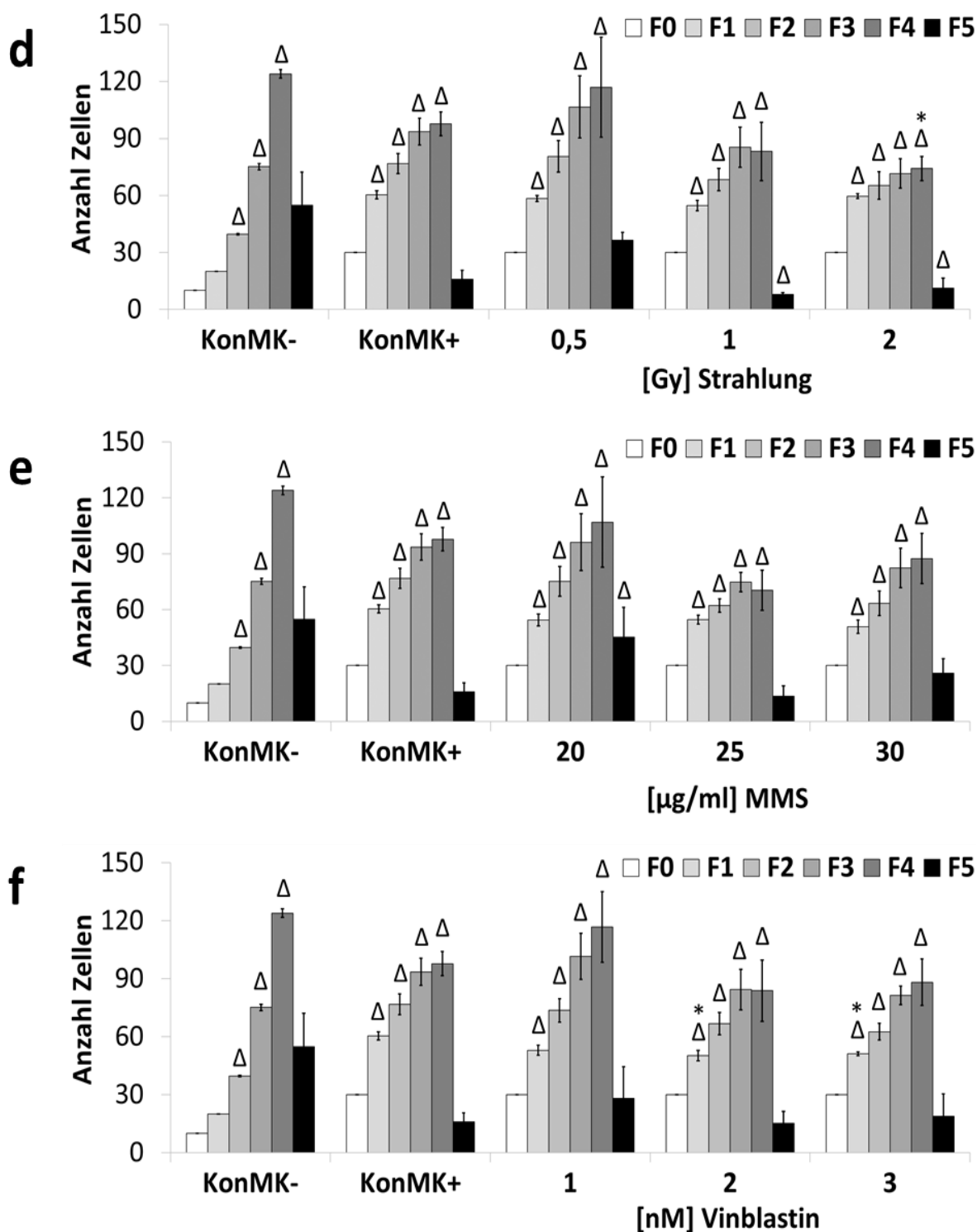


Abb. 16. Anzahl der beobachteten Zellen in F0-F5 in HeLa-H2B-GFP nach Behandlung mit (a) Etoposid, (b) Doxorubicin, (c) tBHP, (d) Strahlung, (e) MMS und (f) Vinblastin. Dargestellt sind die Mittelwerte aus fünf Versuchen \pm Standardfehler. Sternchen markiert $p \leq 0,05$ im Vergleich zu KonMK+ der gleichen Generation (t-Test). Delta markiert $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Generation F0 der gleichen Behandlung (t-Test).

erkennen, der ähnlich war zu dem von KonMK+ war, jedoch kam es beispielsweise nach Behandlung mit mittleren und hohen Dosen von Doxorubicin zu einer Stagnation

bei 50 Zellen, die in F3/F4 (Abb. 16b) beobachtet wurden, während nach Behandlung mit mittleren und hohen Dosen Etoposid die Zellzahl, die F3 und nachfolgende Generationen erreichte, mit weniger als 50 Zellen unter der beobachteten Zellzahl in F2 fiel (Abb. 16a). Nach Behandlung selbst hoher Dosen tBHP, Strahlung, MMS und Vinblastin gab es bis F4 einen zumindest schwachen Anstieg auf bis zu 80 Zellen, wobei auch hier teilweise nach Behandlung mit mittleren Dosen eine Stagnation zu beobachten war (Abb. 16c/d/e/f). Da die Beobachtungszeit mit 96 h nicht immer lang genug war, um F5 zu erreichen, sind hier die Anzahl Zellen in jeder Behandlungsgruppe niedrig und wenig aussagekräftig (Abb. 16).

4.1.3.2 Anteil der mikrokernhaltigen Zellen

Der Anteil der mikrokernhaltigen Zellen zeigt konsistent mit zuvor beschriebenen Ergebnissen einen klaren Abfall des Anteils mikrokernhaltiger Zellen von F0-F5 (Abb. 17). Zur besseren Einordnung der Daten wurde zusätzlich noch die erwartete Mikrokernhäufigkeit berechnet, unter der Annahme, dass aus jeder mikrokernhaltigen Zelle nach der Teilung eine mikrokernhaltige und eine mikrokernfreie Zelle entsteht (F0: 100 %, F1: 50 %, F2: 25 % ...). Da in F0 nur mikrokernhaltige Zellen ausgewählt worden sind, war die Rate hier immer 100 %. Die Rate mikrokernhaltigen Zellen für KonMK+ bewegte sich in F1 leicht unterhalb des erwarteten Wertes, befand sich aber sonst in der Nähe. Nach Behandlung mit niedrigen Dosen Etoposid bewegte sich die Kurve sehr nahe am erwarteten Wert, während sich die Werte nach mittlerer und hoher Dosierung darüber befanden (Abb. 17a). Einen ähnlichen Verlauf ließ sich nach Doxorubicinbehandlung beobachten (Abb. 17b). Nach Behandlung mit der mittleren Dosis tBHP fanden sich vor allem in F2 mehr mikrokernhaltige Zellen als erwartet, während nach niedriger und hoher Dosierung bis auf F1, wo sie leicht unter dem erwarteten Wert lagen, keine großen Abweichungen erkennbar waren (Abb. 17c). Nach Bestrahlung wie MMS-Behandlung fanden sich ab F2 spätestens nach allen Dosen mehr mikrokernhaltige Zellen als erwartet, wobei die Werte nur leicht über der Erwartungskurve lagen (Abb. 17d/e). Lediglich bei F1 nach allen Vinblastindosen waren die beobachteten Häufigkeiten mikrokernhaltiger Zellen immer unter den

erwarteten Werten, wobei sich auch Beobachtung und Erwartung in den folgenden Generationen angenähert haben (Abb. 17f).

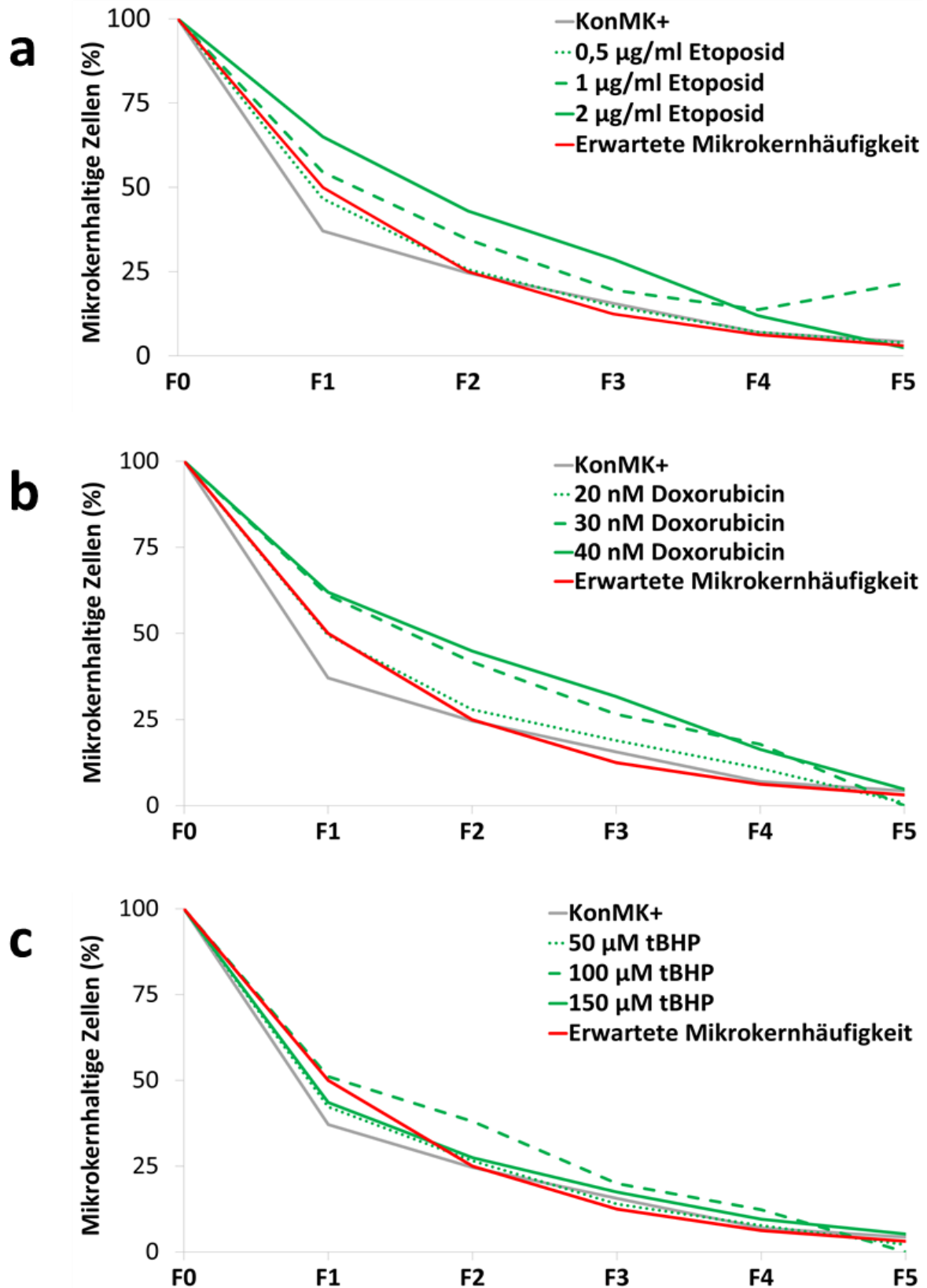


Abb. 17. Fortsetzung auf der nächsten Seite.

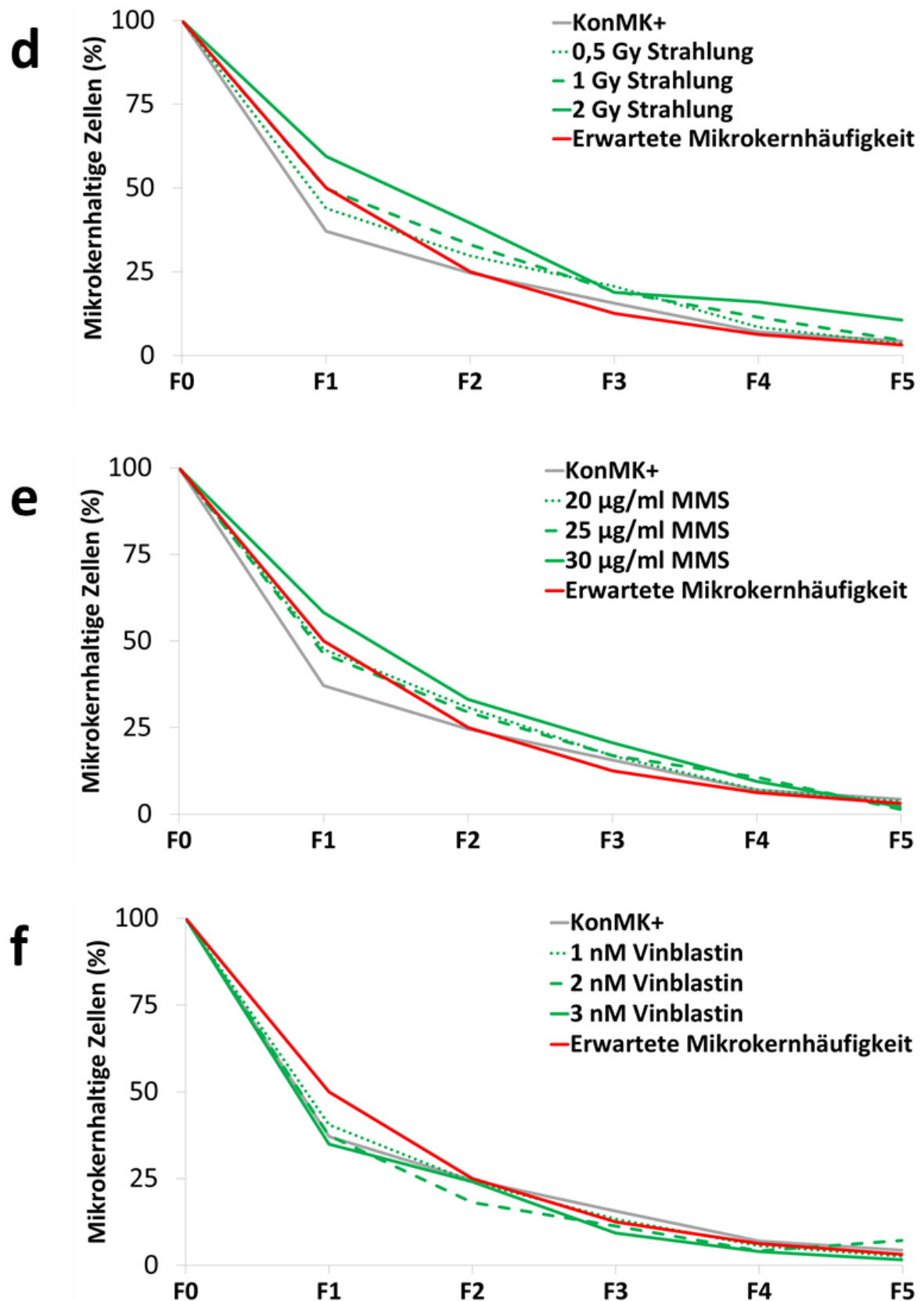


Abb. 17. Anteil mikrokernhaltiger Zellen in F0-F5 in HeLa-H2B-GFP nach Behandlung mit (a) Etoposid, (b) Doxorubicin, (c) tBHP, (d) Strahlung, (e) MMS und (f) Vinblastin. Dargestellt sind die Mittelwerte aus fünf Versuchen.

4.1.3.3 Häufigkeit der Mitose

Die Häufigkeit von Mitosen (Abb. 18) normiert zur Gesamtzellzahl in KonMK- von F0-F3 ist immer nahezu 100 %, wenn auch mit geringem aber erkennbarem Rückgang im Laufe der Generationen (Abb. 19).

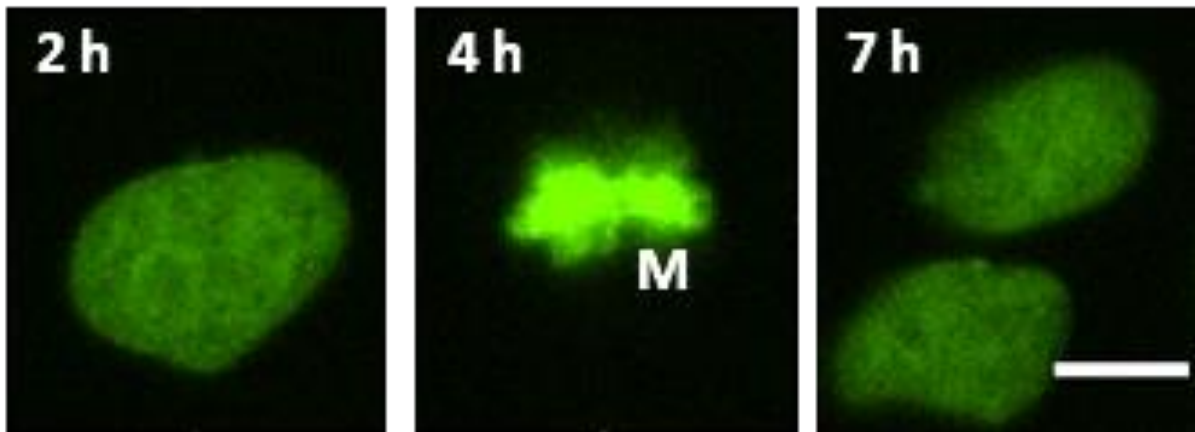


Abb. 18. Mitose in HeLa-H2B-GFP-Zellen. Das M markiert eine mitotische Zelle. Maßstab: 10 μ m.

Die Generationen F4 und F5 wurden nicht berücksichtigt, da hier auf Grund der Nähe zum Ende der Beobachtungsperiode kein ganzer Zyklus mit Mitose erfasst wurde. Bei den meisten anderen Gruppen findet sich in F0 und F1 ein ähnlicher Trend, bei dem in F0 ca. 80 % der Zellen sich teilen, woraufhin die Mitoserate danach noch weiter auf 50-70 % abfällt. Substanz- und dosisabhängige Unterschiede sind hier zusätzlich erkennbar. Während sich nach Behandlung mit niedrigen Dosen Etoposid und Doxorubicin mit ca. 70 % mitotischer Zellen von F1-F3 ein ähnliches Bild zeigt wie bei KonMK+, fällt diese Rate nach mittlerer und hoher Dosierung auf 50 % und erreicht hier immer Signifikanz im Vergleich zu F0, wobei ein weiterer Abfall nicht beobachtet wurde (Abb. 19a/b). Auffällig nach niedriger und hoher Dosis tBHP ist in F2 und F3 wieder eine Erhöhung der Rate mitotischer Zellen mit Werten von ca. 65 % nach einem zuvor im Vergleich zu F0 signifikanten Rückgang in F1 (Abb. 19c). Auch nach 2 Gy Strahlung findet sich nach einem Abfall der Mitoserate auf bis zu 50 % wieder eine Erhöhung auf ca. 60 % in F2-F3, wobei diese immer signifikant zu F0 bleiben (Abb. 19d). Nach 0,5 und 1 Gy Bestrahlung hingegen zeigt sich ein ähnliches Bild wie in KonMK+. Nach MMS-Behandlung fällt die Mitoserate von F0 zu F1 kaum weiter ab und erreicht teilweise wieder das Niveau von F0 nach 1-2 weiteren Generationen (Abb. 19e), während nach Vinblastinbehandlung kein eindeutiger Unterschied von F0

zu den folgenden Generationen zeigt, sondern die Rate über alle Generationen hinweg konstant bleibt (Abb. 19f).

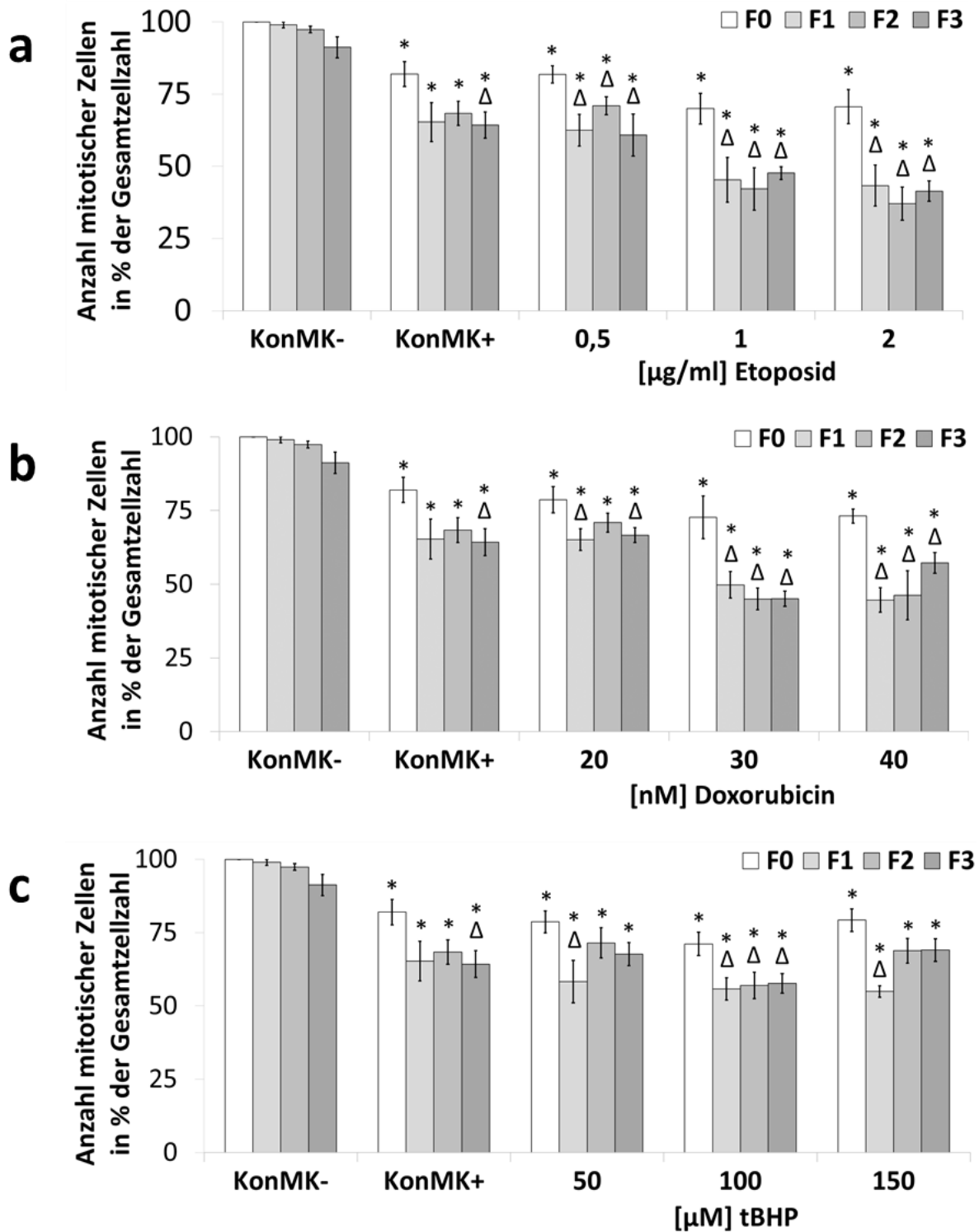


Abb. 19. Fortsetzung auf der nächsten Seite.

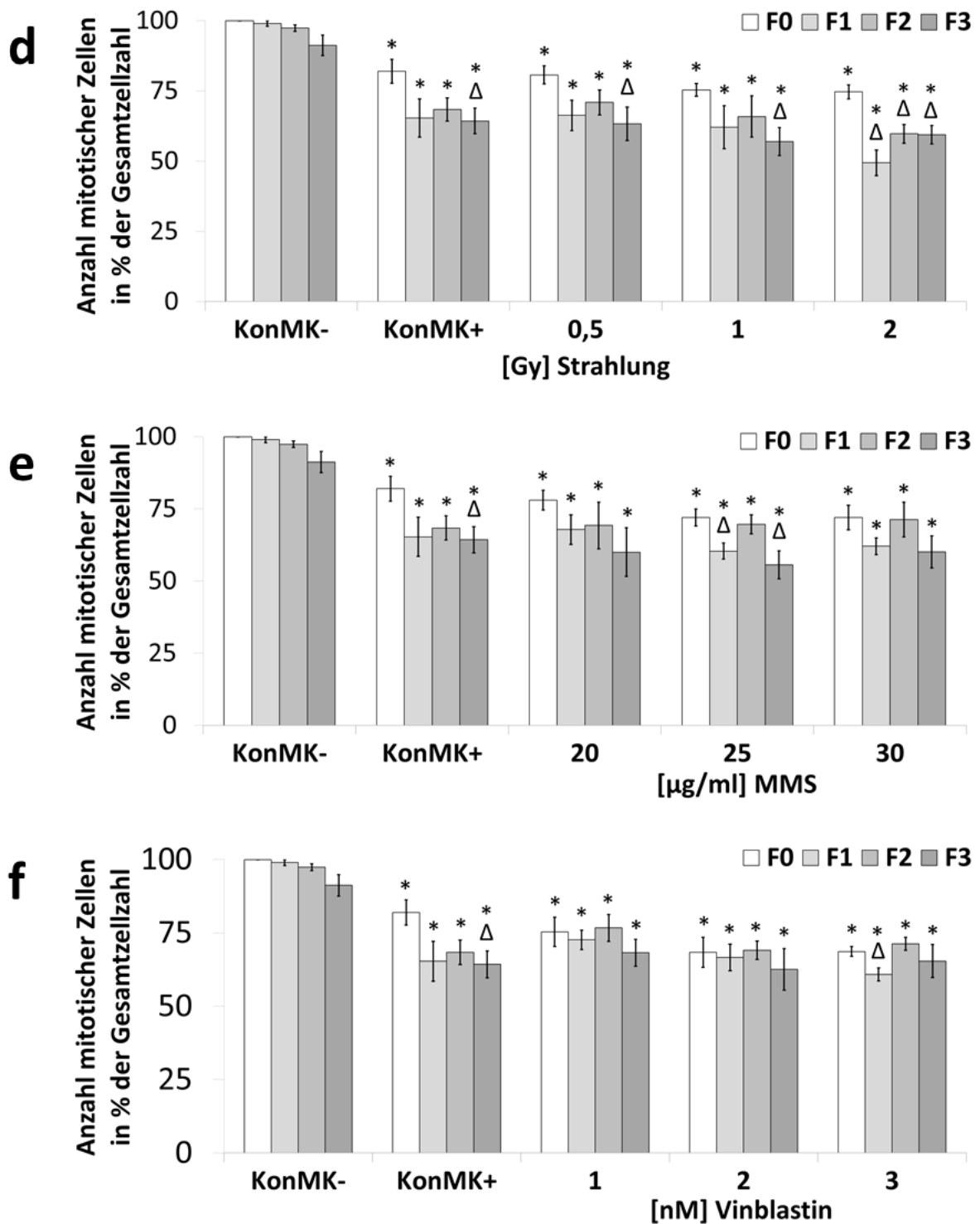


Abb. 19. Anzahl mitotischer Zellen normiert auf die Gesamtzellzahl in F0-F3 in HeLa-H2B-GFP nach Behandlung mit (a) Etoposid, (b) Doxorubicin, (c) tBHP, (d) Strahlung, (e) MMS und (f) Vinblastin. Dargestellt sind die Mittelwerte aus fünf Versuchen \pm Standardfehler. Sternchen markiert $p \leq 0,05$ im Vergleich zu KonMK- der gleichen Generation (t-Test). Delta markiert $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Generation F0 der gleichen Behandlung (t-Test).

4.1.3.4 Häufigkeit von Zelltod

Während die Häufigkeit des Zelltods (Abb. 20), normiert auf die Gesamtzellzahl, bei KonMK- von 0 % nur langsam bis F3 (F4 und F5 wurden wieder auf Grund des Endes der Beobachtungsperiode ausgeschlossen) auf unter 5 % anstieg, zeigten sich in den anderen Gruppen ein überwiegend signifikant anderes Bild (Abb. 21).

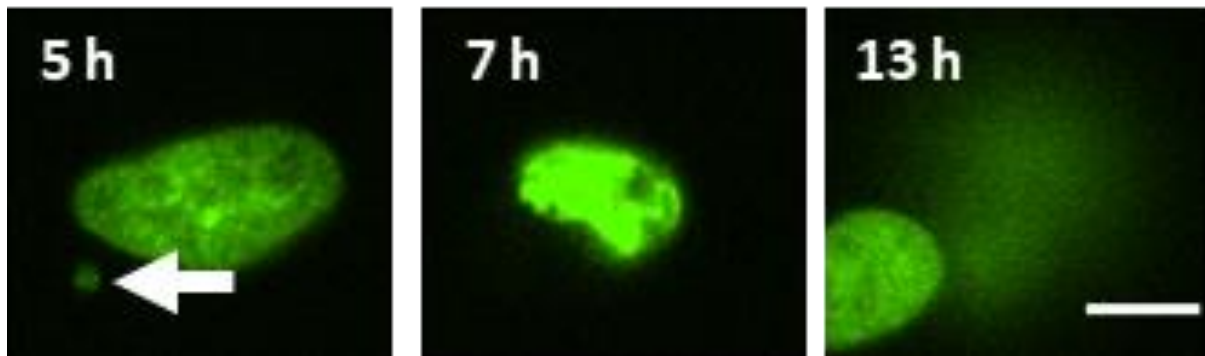


Abb. 20. Zelltod in HeLa-H2B-GFP-Zellen. Der weiße Pfeil markiert einen Mikrokern. Maßstab: 10 μm .

Hierbei stieg beispielsweise in KonMK+ die Zelltodhäufigkeit von 5 % in F0 signifikant auf bis auf 25 % in F1 und fiel dann bis F3 wieder auf 5 %. Dieser Verlauf ist tendenziell repräsentativ für alle anderen Behandlungen, auch wenn die Zelltodraten sich teilweise unterschieden. Der Höhepunkt nach mittleren und hohen Dosen Etoposid und Doxorubicin lag bei 35 % und sank auf 30 % in F2 und 20 bis 25 % in F3 (Abb. 21a/b). Auch nach tBHP-Behandlung stieg die Zelltodrate in F1 dosisabhängig weiter an und erreichte nach der höchsten Dosis bis zu 30 %, wobei bei dieser Dosis auch der schnellste Rückgang bis auf 5 % sterbender Zellen beobachtet wurde (Abb. 21c). Hochdosierte Strahlung verursachte einen starken Anstieg der Zelltodhäufigkeit auf bis zu 35 % bis F1 gefolgt von einem ebenso raschen Abfall, wobei nach niedrigdosierter Bestrahlung kein Unterschied zwischen F1 und F2 beobachtet wurde (Abb. 21d). Nach MMS- und Vinblastinbehandlung zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei KonMK+, wobei hier vor allem nach mittleren und höheren Dosen bereits in F0 eine vergleichsweise hohe Zelltodrate erkennbar war (Abb. 21e/f).

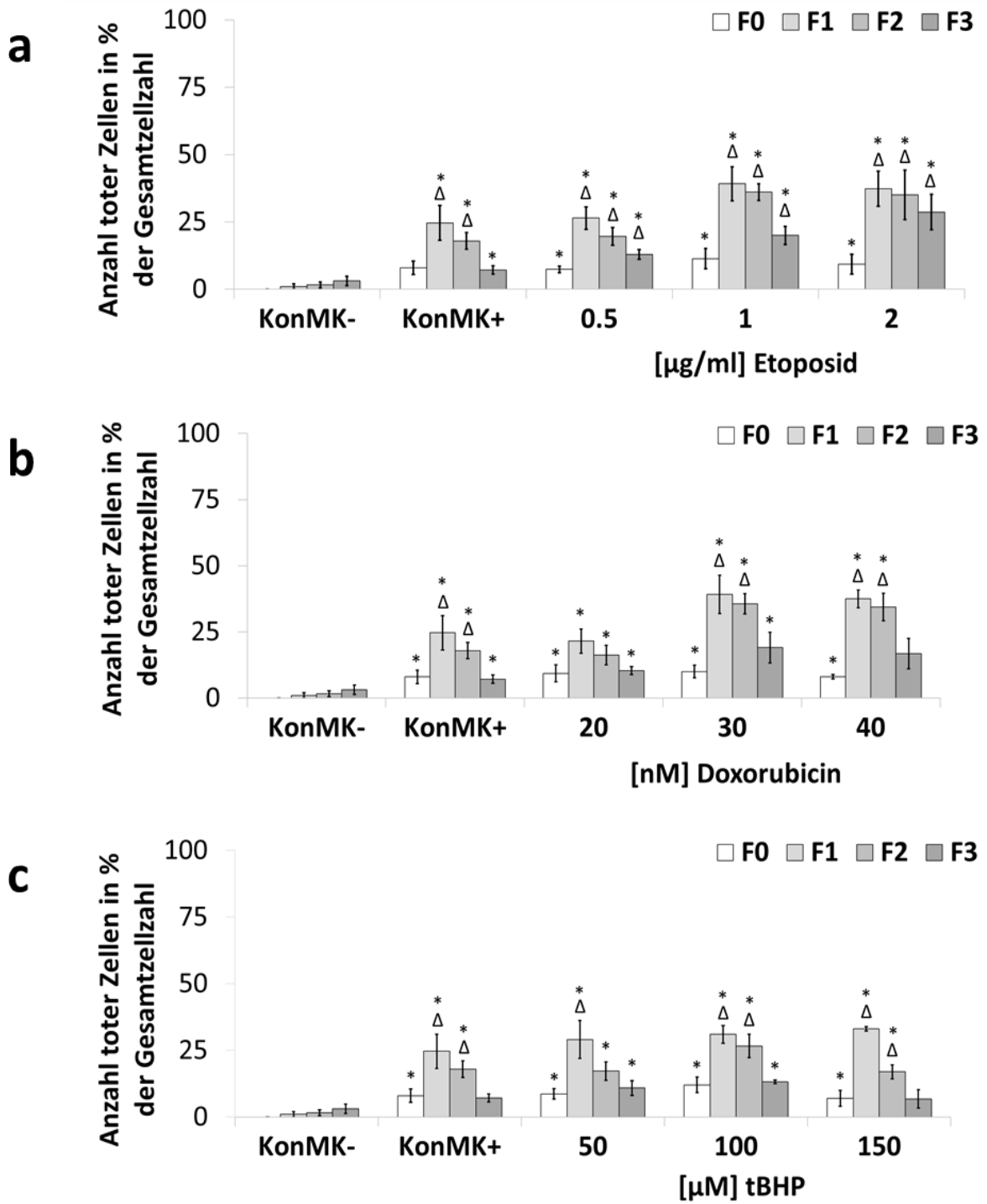


Abb. 21. Fortsetzung auf der nächsten Seite.

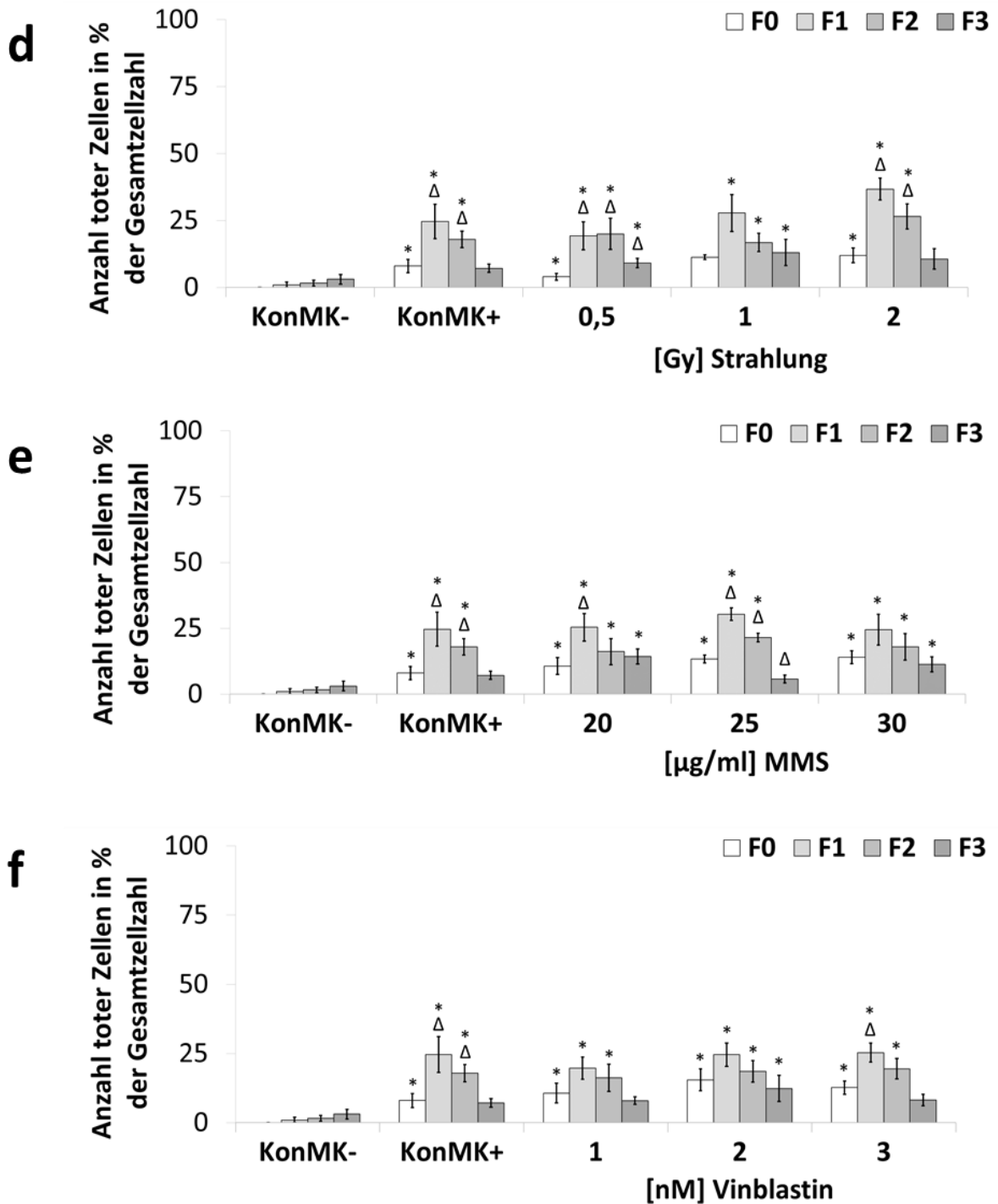


Abb. 21. Anzahl toter Zellen normiert auf die Gesamtzellzahl in F0-F3 in HeLa-H2B-GFP nach Behandlung mit (a) Etoposid, (b) Doxorubicin, (c) tBHP, (d) Strahlung, (e) MMS und (f) Vinblastin. Dargestellt sind die Mittelwerte aus fünf Versuchen \pm Standardfehler. Sternchen markiert $p \leq 0,05$ im Vergleich zu KonMK- der gleichen Generation (t-Test). Delta markiert $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Generation F0 der gleichen Behandlung (t-Test).

4.1.3.5 Häufigkeit inaktiver Zellen

Die Häufigkeit inaktiver Zellen (Abb. 22) normiert auf die Gesamtzellzahl, die einen Hinweis auf Zellarrest geben könnte, stieg in der Regel nach allen Behandlungen von F0 bis F3 von 0 über 2,5 und 9 auf ca. 25 % und erreichte so fast immer Signifikanz (Abb. 23).

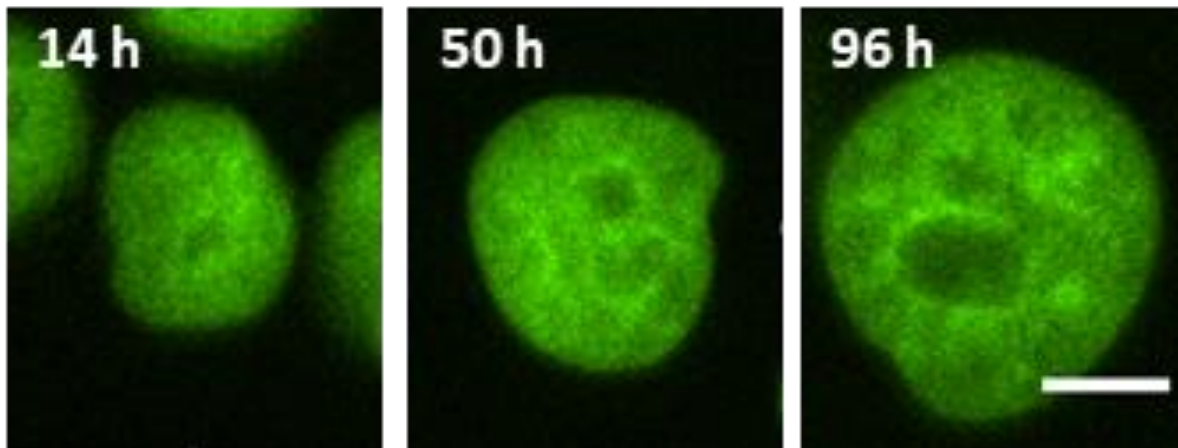


Abb. 22. Inaktive HeLa-H2B-GFP-Zelle. Maßstab: 10 μm .

Dies passt zu der Tatsache, dass mit fortschreitender Generationsdauer auch das Ende der Beobachtungsperiode immer näher rückt, bis schließlich in F4 und F5 fast alle Zellen so beurteilt wurden, die aus diesen Gründen wieder nicht berücksichtigt wurden. Interessant ist ein Vergleich zu KonMK-, wo von F0 bis F2 gar keine und in F3 weniger als 5 % inaktiver Zellen beobachtet wurden, was zu fast allen anderen Behandlungen einen signifikanten und klaren Unterschied darstellt. Zwischen den einzelnen Behandlungen gab es nur geringe Unterschiede und wenn dann am eindeutigsten in F3. So war erkennbar, dass die Häufigkeit inaktiver Zellen nach Behandlung aller Dosen Etoposid, Doxorubicin (Ausnahme: mittlere Dosis) und tBHP um bis zu 5 % geringer war, ebenso nach 20 $\mu\text{g/ml}$ MMS- wie 1 nM Vinblastinbehandlung (Abb. 23a/b/c/e/f). Im Vergleich zu KonMK+ leicht erhöht wiederum war die Rate nach Behandlung mit 25 $\mu\text{g/ml}$ MMS in F3, während es nach Bestrahlung keine weiteren Auffälligkeiten gab (Abb. 23d).

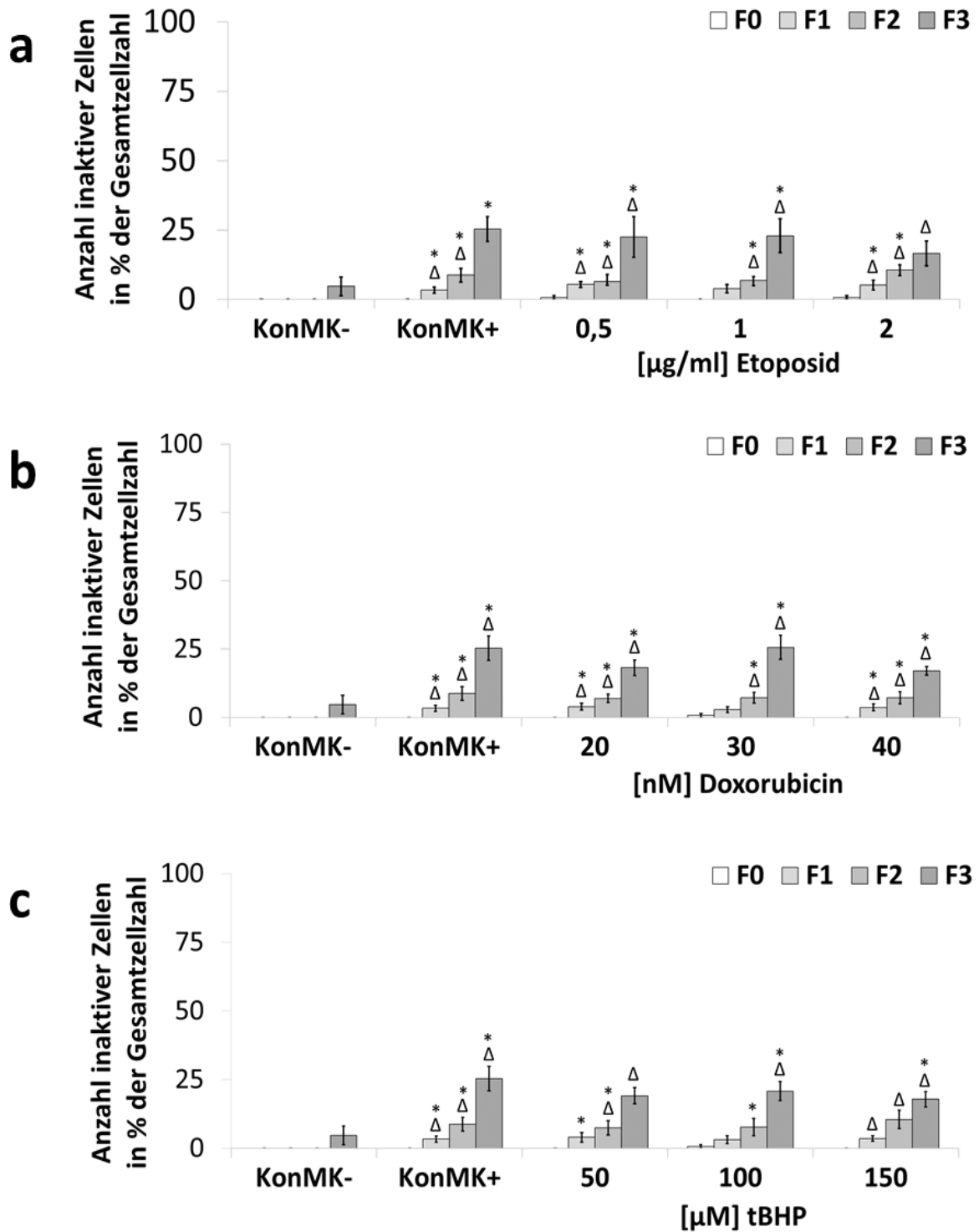


Abb. 23. Fortsetzung auf der nächsten Seite.

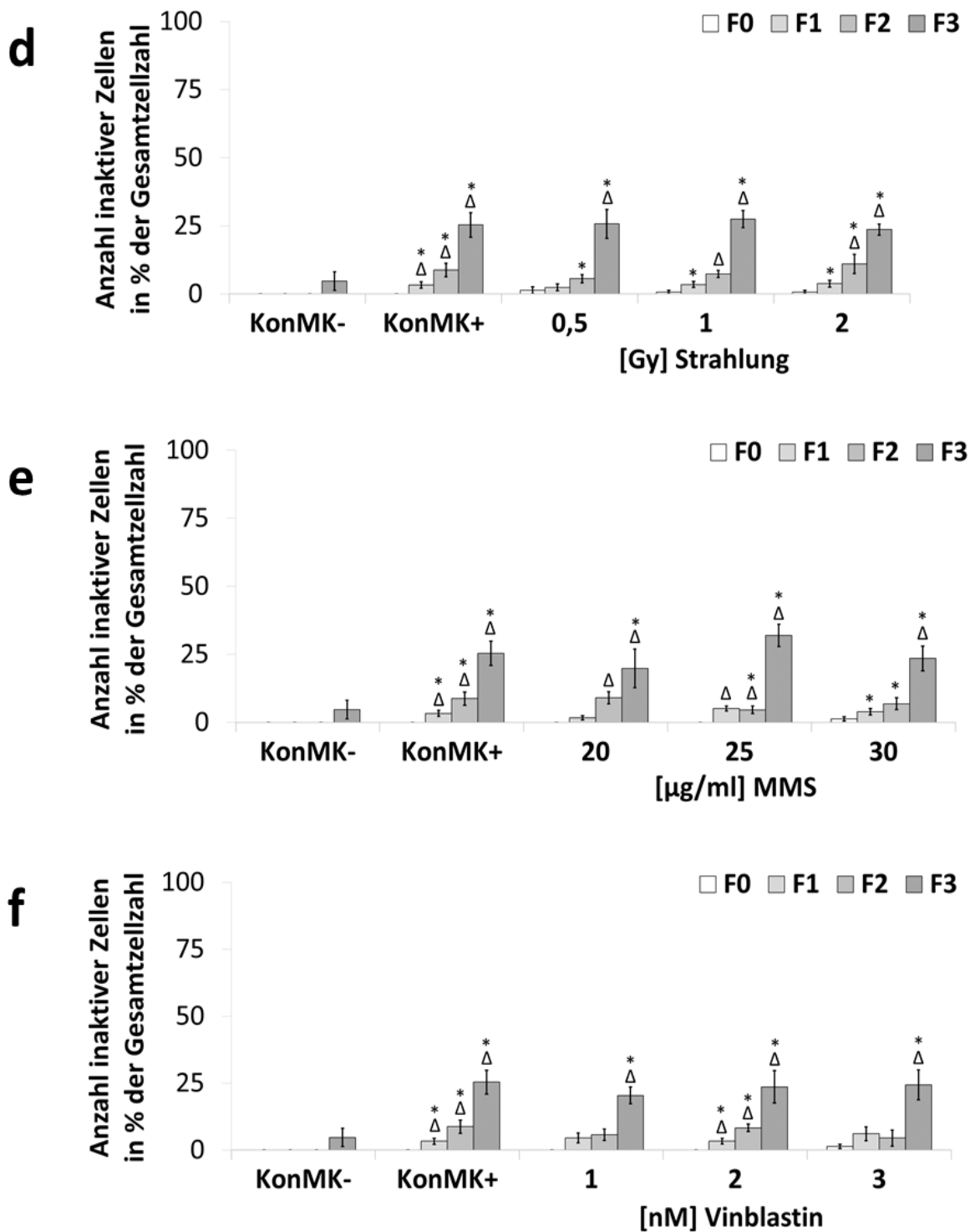


Abb. 23. Anzahl inaktiver Zellen normiert auf die Gesamtzellzahl in F0-F3 in HeLa-H2B-GFP nach Behandlung mit (a) Etoposid, (b) Doxorubicin, (c) tBHP, (d) Strahlung, (e) MMS und (f) Vinblastin. Dargestellt sind die Mittelwerte aus fünf Versuchen \pm Standardfehler. Sternchen markiert $p \leq 0,05$ im Vergleich zu KonMK- der gleichen Generation (t-Test). Delta markiert $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Generation F0 der gleichen Behandlung (t-Test).

4.1.3.6 Dauer von Interphase und Mitose

Ein weiterer Hinweis auf möglichen Zellarrest oder Mitosestörungen könnte die Auswertung der Dauer bis zur nächsten Mitose (Interphase) und die Dauer der Mitose selbst sein. Die Dauer bis zur nächsten Mitose in KonMK- lag in F1 bei 19 h, stieg dann bis F3 an auf 22 h und stagnierte dann auf diesem Level (Abb. 24). Da der Beginn eines Zellzyklus in F0 nicht bekannt war, konnte diese Generation nicht berücksichtigt werden. Im Gegensatz dazu brauchten mikrokernhaltige Zellen bedeutend länger. So war die Dauer in F1 nach Etoposidbehandlung bei niedrigen Dosen 24 h und stieg dosisabhängig auf bis zu 27 h an (Abb. 24a). Interessanterweise war danach ein Abfall zu beobachten und bis F4 sank die Dauer unabhängig von der Dosierung auf einen ähnlichen Bereich wie KonMK-. Auch KonMK+, ebenso wie die meisten anderen Behandlungen, zeigten einen ähnlichen Verlauf. Auffällig ist jedoch, dass nach hoher Doxorubicinbehandlung mit 25 h eine im Vergleich kurze Dauer bis zur nächsten Mitose beobachtet wurde, die unter dem Wert nach mittlerer Dosierung lag (Abb. 24b). Auch nach hochdosierter Bestrahlung wurde in F1 mit 25 h eine im Vergleich zu den restlichen Strahlendosen überraschend niedrige Dauer beobachtet (Abb. 24d), während nach niedrigen Dosen tBHP die Kurve über alle Generationen hinweg klar niedriger als bei KonMK+ oder der mittleren/hohen Dosis war und sank ab F3 sogar unter dem Level von KonMK- (Abb. 24c). Nach MMS-Behandlung lagen die Kurven aller drei untersuchten Dosen zwischen KonMK- und KonMK+, wobei ein dosisabhängiger Trend nicht zu beobachten war (Abb. 24e). Nach Vinblastinbehandlung hingegen lagen alle drei Dosierungen sehr nahe der Kurve von KonMK+, sodass substanzspezifische Abweichungen kaum zu erkennen waren (Abb. 24f).

In mikrokernfreien Zellen betrug die Dauer der Mitose in F0 1,6 h, stieg ab F2 an und erreichte bis F4 eine Dauer von 2 h (Abb. 25). Bei KonMK+ hingegen betrug die Dauer bei F0 2,1 h, stieg zu einem Maximum bei 2,6 h und fiel in F3 und F4 auf das gleiche Niveau wie KonMK-. Nach Etoposidbehandlung zeigte sich ein teilweise anderes Bild: Nach niedrigdosierter Behandlung blieb die Kurve bei einem Level von 2,1-2,2 h recht konstant um bei F4 auf 1,7 h abzufallen (Abb. 25a). Nach mittleren Dosen Etoposid betrug die Dauer bei F0 2,4 h um ab F2 einen ähnlichen Verlauf zu nehmen wie nach

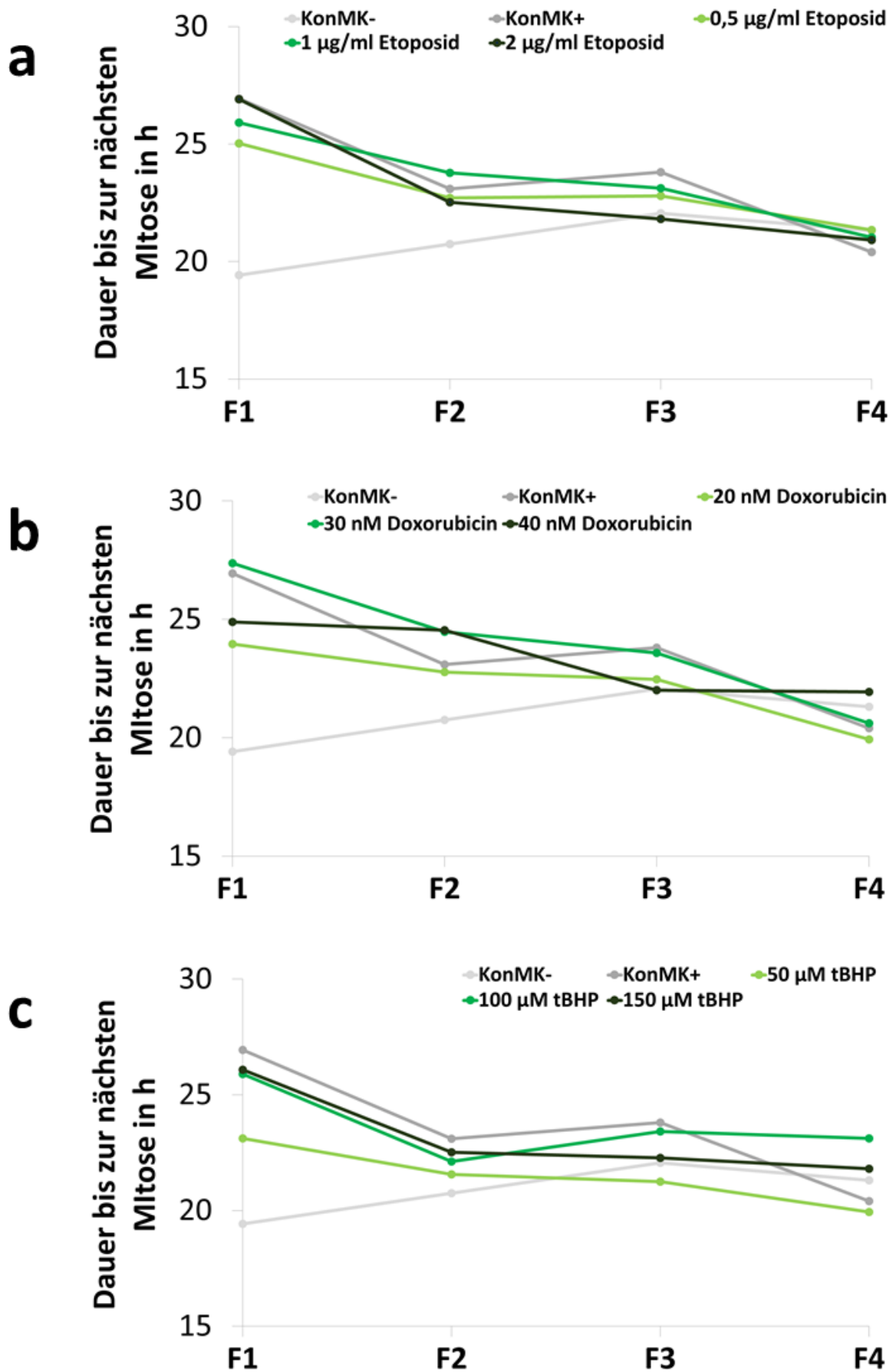


Abb. 24. Fortsetzung auf der nächsten Seite.

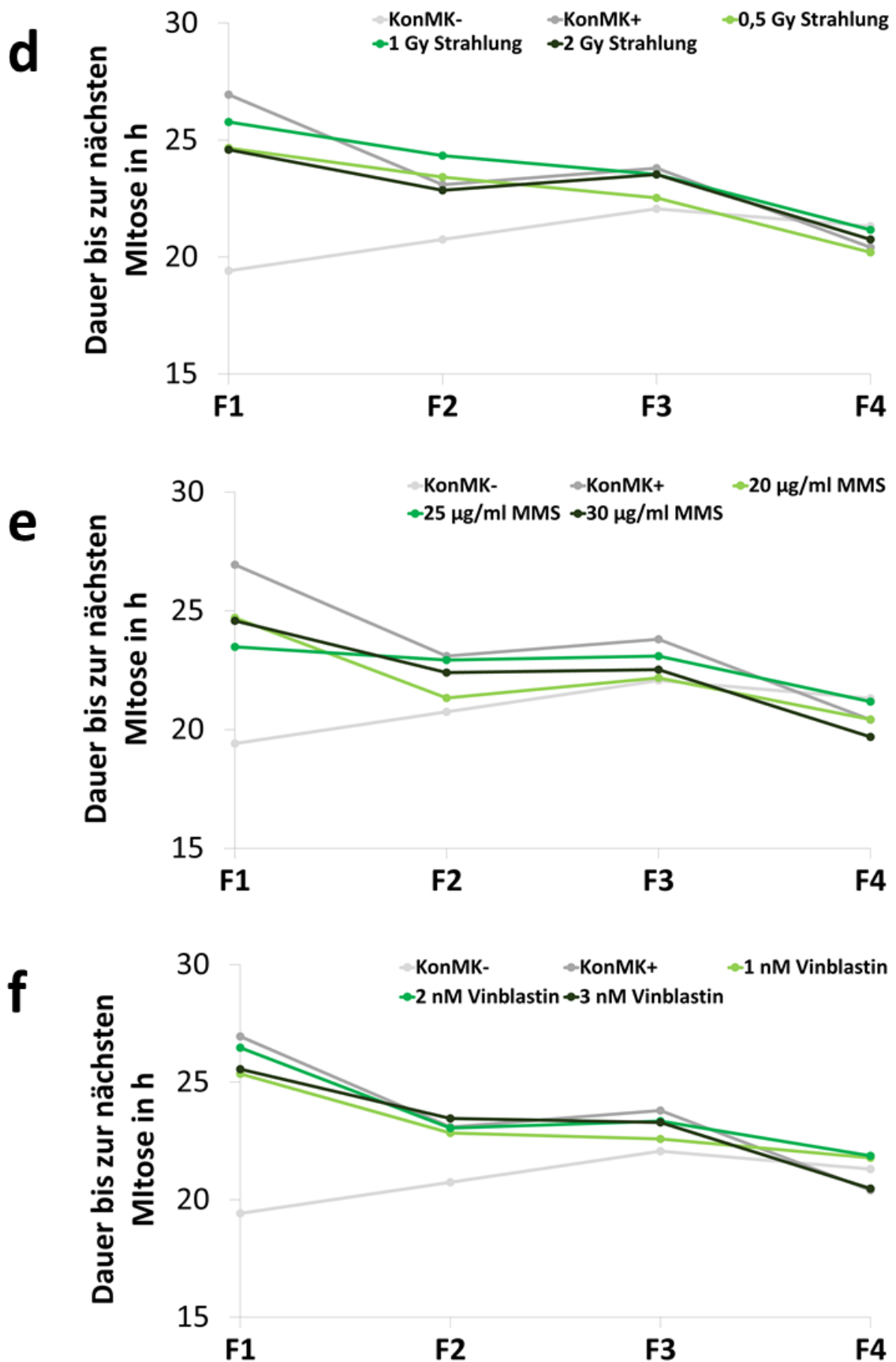


Abb. 24. Dauer bis zur nächsten Mitose (Interphase) in h in F1-F4 in HeLa-H2B-GFP nach Behandlung mit (a) Etoposid, (b) Doxorubicin, (c) tBHP, (d) Strahlung, (e) MMS und (f) Vinblastin. Dargestellt sind die Mittelwerte aus fünf Versuchen.

niedrigen Dosen Etoposid, während nach hohen Dosen ausgehend von 2,4 h ein Maximum bei F2 von über 3 h erreicht wurde, um dann bis F3 wieder abzufallen in den Bereich der anderen Dosen. Die Mitosedauer nach Behandlung mit niedrigen Dosen Doxorubicin blieb von F0-F4 konstant bei ca. 2h, nach mittleren und hohen Dosen hingegen kam es ausgehend von 2,2 bis 2,3 h in F0 zu einem leichten Anstieg in F1 und F2 um sich dann auch 2 h anzunähern (Abb. 25b). Noch weniger Ausschläge gab es nach Behandlung mit tBHP, wo sich die Mitosedauer zwischen 2 h (nach niedrigen Dosen) und 2,3 h (nach mittleren und hohen Dosen) schnell eingependelt hat (Abb. 25c). Im Gegensatz hierzu stieg die benötigte Zeit nach Bestrahlung von F0-F4 an und erreichte den höchsten Wert mit fast 3 h nach mittleren Dosen Bestrahlung (Abb. 25d). Nach MMS-Behandlung ist nach allen Dosen ein recht ähnlicher Verlauf zu beobachten, der, trotz eines leichten Ausschlags in F1, sich zwischen 2,1 h nach niedrigen Dosen MMS bis 2,5 h nach hohen Dosen bewegt, um jedoch in F4 nach allen Dosen moderat abzufallen (Abb. 25e) und sich um 2 h einzupendeln. Nach Vinblastinbehandlung sind nur schwache dosisabhängige Unterschiede zu beobachten, wobei es bei 3 nM eine leichte Erhöhung nach hohen Dosen Vinblasin gab, wo die Mitosedauer 2,5 h betrug. Von F4 bis F5 ist wiederum ein leichter Anstieg nach niedrigen Dosen Vinblastin zu beobachten, sodass sich am Ende die Mitosedauern zwischen 2 h (nach mittleren Dosen) über 2,2 h (nach hohen Dosen) und 2,3 h (nach niedrigen Dosen) befunden haben (Abb. 25f).

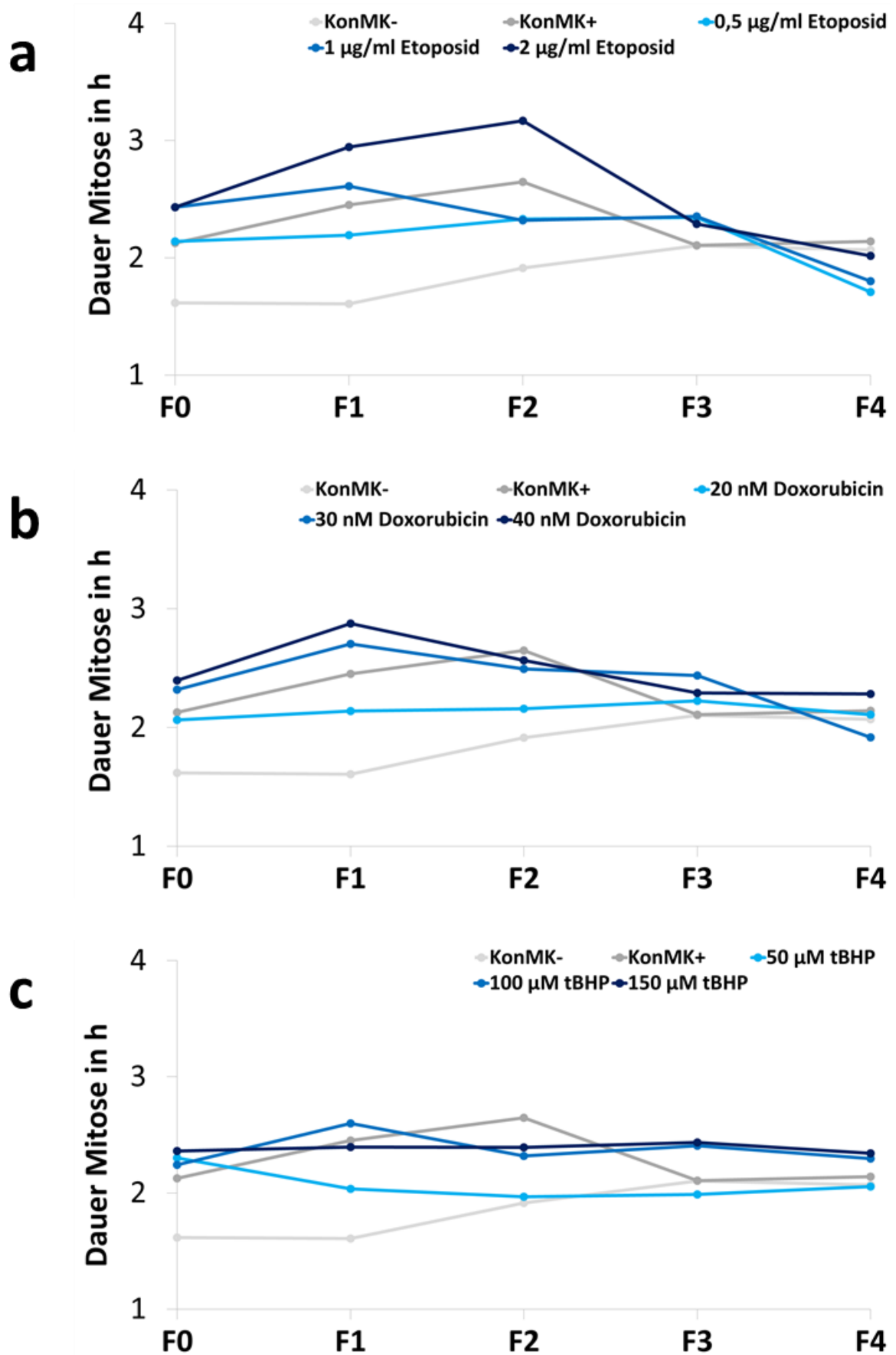


Abb. 25. Fortsetzung auf der nächsten Seite.

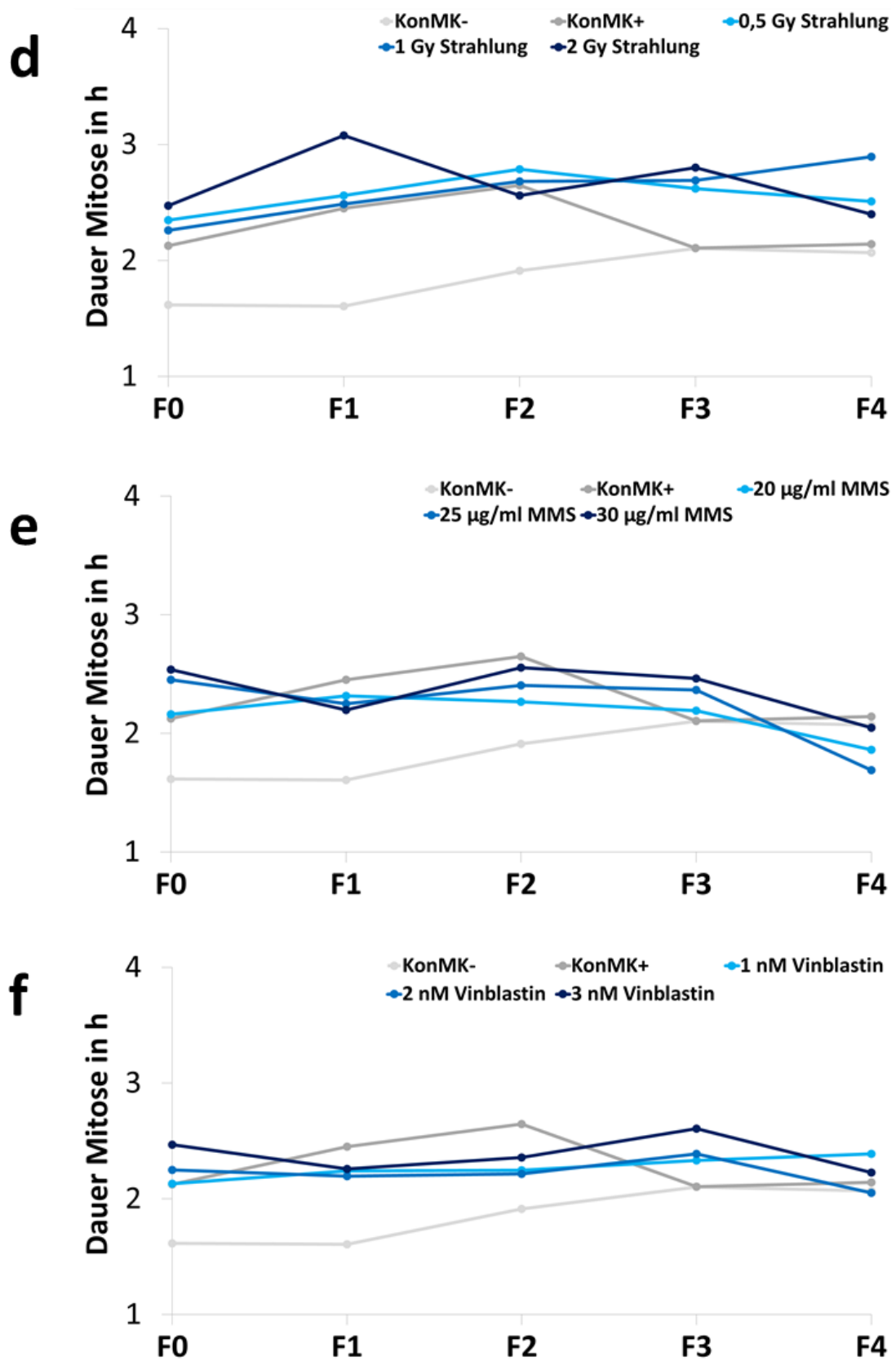


Abb. 25. Dauer der nächsten Mitose in h in F0-F4 in HeLa-H2B-GFP nach Behandlung mit (a) Etoposid, (b) Doxorubicin, (c) tBHP, (d) Strahlung, (e) MMS und (f) Vinblastin. Dargestellt sind die Mittelwerte aus fünf Versuchen.

4.1.3.7 Häufigkeit von abnormalen Ereignissen

Neben den zuvor beschriebenen Endpunkten gibt es weiterhin eine Reihe von abnormalen Ereignissen, die weitere Informationen über mikrokernhaltige Zellen geben können. Dies waren Zelltod während Mitose (Abb. 26a), Mitose nach Fusion mehrerer Kerne und Mitose zu mehr als 2 Kernen (Abb. 26b).

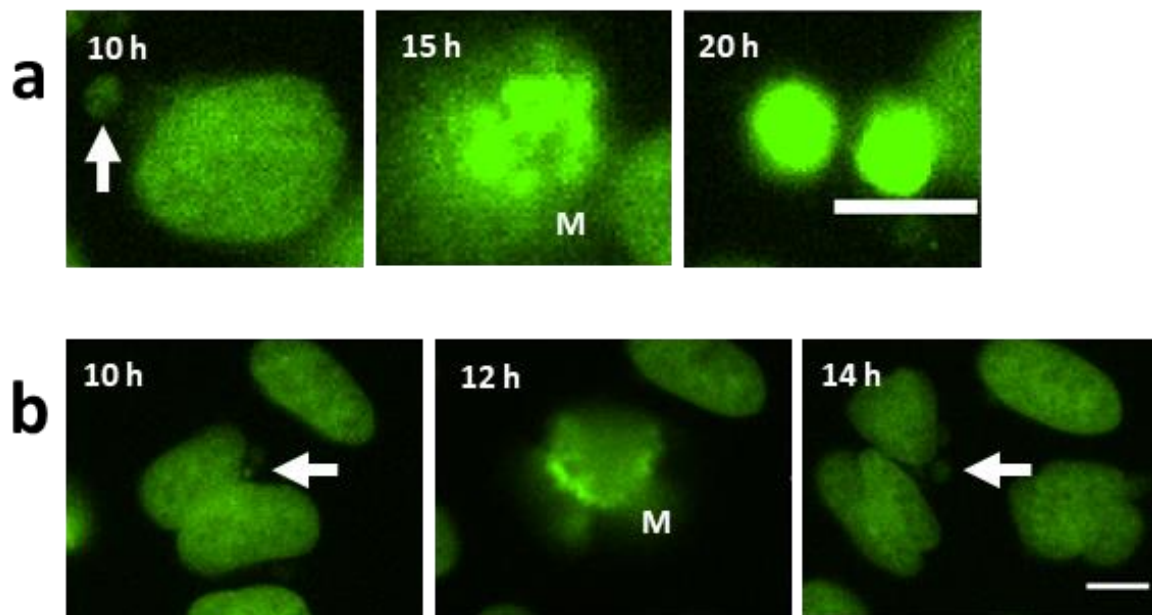


Abb. 26. Abnormale Ereignisse in HeLa-H2B-GFP-Zellen. (a) Zelltod während Mitose, (b) Mitose nach Fusion von zwei Kernen, anschließend Bildung von mehr als 2 Kernen. Weiße Pfeile markieren Mikrokerne, während M mitotische Zellen kennzeichnen. Maßstab: 10 µm.

Bei all diesen Ereignissen war erkennbar, dass sie in mikrokernfreien Zellen nur sehr selten vorkommen (Abb. 27). In mikrokernhaltigen Zellen sind diese jedoch fast immer signifikant erhöht und kamen beispielsweise für Zelltod während Mitose bei KonMK+ in 2,4 % der Zellen normiert auf die Gesamtzellzahl vor. Für das Ereignis Zelltod während Mitose zeigt sich nach Etoposid und Doxorubinbehandlung ein dosisabhängiger Anstieg auf bis zu 3,6 bzw. 4,7 % aller Zellen, während nach MMS- und Vinblastinbehandlung ein Plateau nach mittleren und hohen Dosen bei ca. 3,2 bzw. 2 % der Zellen erreicht wurde (Abb. 27a). Nach tbHP-Behandlung und Bestrahlung lag das Maximum nach Behandlung mit der mittleren Dosis bei 3,4 bzw. 2,8 %. Mitosen nach Fusion mehrerer Zellen kam wieder am häufigsten nach Etoposid- und Doxorubicinbehandlung vor, und zwar in bis zu ca. 5 und 4-4,5 % aller Zellen normiert auf die Gesamtzellzahl, wobei kein eindeutiger Unterschied nach Behandlung mit mittleren und hohen Dosen erkennbar war (Abb. 27b), während

4 Ergebnis

dieses Ereignis in KonMK+ in 1,4 % aller Zellen aufgetreten ist. Während nach MMS- und Vinblastinbehandlung kein großer Unterschied mehr zu KonMK+ zu beobachten war, war dies nur nach hochdosierter Bestrahlung der Fall, wo Mitosen nach Fusion in 2,6 % der Zellen vorkam. tBHP-Behandlung hat nach mittlerer Dosis zu einem Maximum von 3,7 % aller Zellen mit Mitose nach Fusion geführt, während die Häufigkeit nach hohen Dosen mit 1,6 % am niedrigsten aller tBHP-Behandlungen lag.

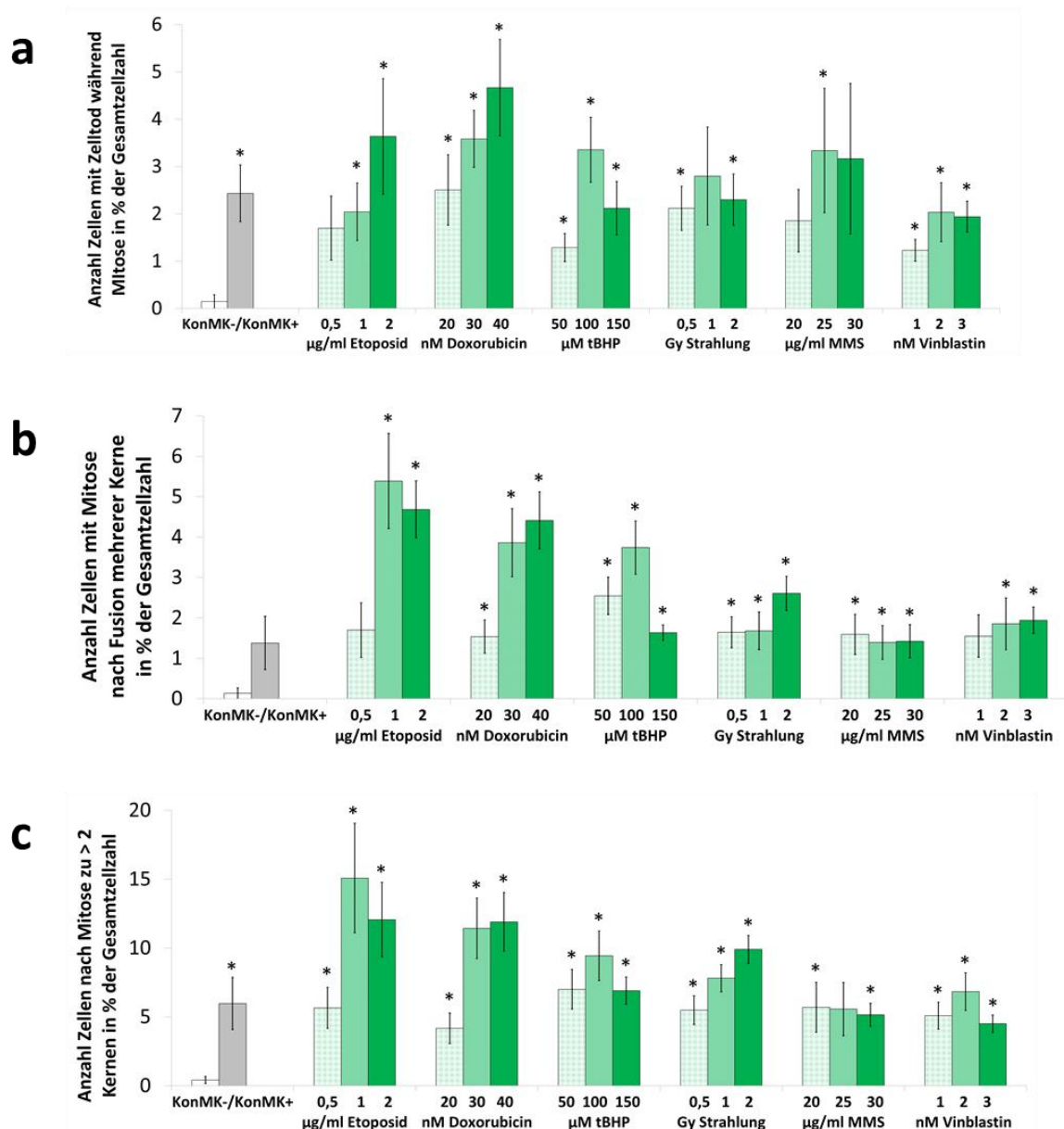


Abb. 27. Häufigkeit von (a) Zellen mit Zelltod während Mitose, (b) Zellen mit Mitose nach Fusion und (c) Zellen nach Mitose zu >2 Kernen normiert auf die Gesamtzellzahl in HeLa-H2B-GFP nach Behandlung mit Etoposid, Doxorubicin, tBHP, Strahlung, MMS und Vinblastin. Dargestellt sind die Mittelwerte aus fünf Versuchen \pm Standardfehler. Sternchen markiert $p \leq 0,05$ im Vergleich zu KonMK- (t-Test).

In fast 6 % aller Zellen normiert auf die Gesamtzellzahl kam eine Mitose zu mehr als 2 Fragmenten in KonMK+ vor (Abb. 27c). Interessanterweise wurde für dieses Ereignis nach Etoposid-, tBHP und Vinblastinbehandlung das Maximum nach mittleren Dosen und hier Werte von 15, 9,4 bzw. 6,8 % erreicht. Hingegen gab es nach MMS-Behandlung fast keine dosisabhängigen Unterschiede, sondern es wurden immer Werte im Bereich von 5,5 % erreicht, während nach Doxorubicinbehandlung nach mittleren und hohen Dosen jeweils die größten Häufigkeiten mit ca. 11,5 % beobachtet wurden. Nur nach Bestrahlung gibt es einen klaren dosisabhängigen Anstieg mit einem Maximum nach hochdosierter Bestrahlung bei 9,9 %.

4.1.4 Weitere Untersuchung der Extrusion

Um die zuvor nur selten oder gar nicht beobachtete Extrusion von Mikrokernen weiter zu untersuchen, wurden basierend vorherigen Studien aus der Literatur neue Behandlungsoptionen getestet:

1. Behandlung mit 8 µg/ml Cytochalasin B gefolgt von gentoxischer Substanz (1 und 2 µg/ml Etoposid wie zuvor) [31]
2. 100 µM Hydroxyurea in zwei Ansätzen: Behandlung für 72 h vor Beginn der Aufnahme oder parallel zur Aufnahme [35]

Hierbei hat gezeigt, dass konsistent mit den vorherigen Versuchen Extrusion nicht oder nur sehr selten beobachtet werden konnte (Abb. 28). Vergleichsweise hoch aber mit 1,1 % der Mikrokerne immer noch selten wurde Extrusion nach Behandlung mit Hydroxyurea für 72 h gefunden. Hier war allerdings die Häufigkeit von Reinkorporation mit 27,7 % im Vergleich zu den anderen Behandlungen hoch und die Persistenzhäufigkeit mit 70,6 % vergleichsweise niedrig. Im Gegensatz dazu wurde Persistenz während des Zellzyklus nach Behandlung mit 2 µg/ml Etoposid und 8 µg/ml Cytochalasin B als auch während parallel zur Aufnahme stattfindender Hydroxyureabehandlung mit 89,2 bzw. 92,6 % der Mikrokerne sehr häufig beobachtet, was verbunden mit einer niedrigen Reinkorporationsrate war. Aber auch Behandlung mit 1 µg/ml Etoposid und 8 µg/ml Cytochalasin B als auch 8 µg/ml Cytochalasin B allein führten zu einer im Vergleich zu KonMK+ erhöhten Häufigkeit von Persistenz

von knapp 86 % zusammen mit einer niedrigeren Frequenz Reinkorporation (12 bis 13 %). Degradation wurden in zwischen 0,2 bis 1,6 % der Mikrokern gefunden und bewegt sich damit in einem ähnlichen Bereich wie in den Versuchen zuvor (Abb. 12/28).

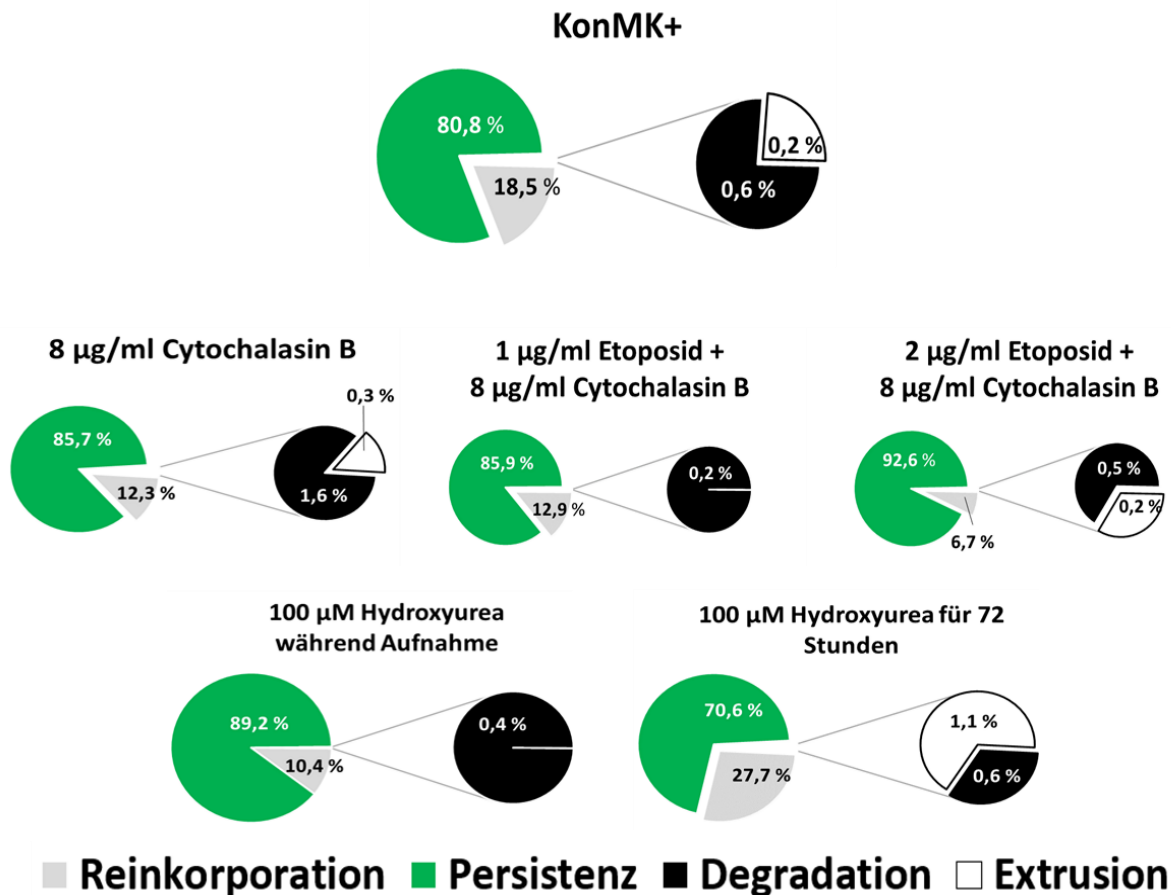


Abb. 28. Beobachtete Schicksale von Mikrokernen in HeLa-H2B-GFP nach Behandlung mit Cytochalasin und Etoposid sowie Hydroxyurea.

4.2 Untersuchung von Mikrokerndegradation und Mikrokernmembranintegrität

Im nächsten Schritt wurde untersucht, warum die in anderen Studien gefundene Mikrokerndegradation in den Experimenten in dieser Arbeit nicht gefunden werden konnte. Hierbei wurden neben gentechnisch modifizierten HeLa-H2B-GFP-Zellen auch γ H2AX-Antikörperfärbung verwendet.

4.2.1 Gentechnische Modifikation von HeLa-H2B-GFP

Die RNA-Isolierung aus HeLa-H2B-GFP-Zellen und folgende cDNA-Synthese waren erfolgreich und ausreichende Mengen RNA/cDNA konnten erzeugt werden (Abb. 29, Tabelle 2). Aus der cDNA konnten für beide Proteine entsprechende Sequenzen mittels PCR amplifiziert und aus dem Elektrophoresegel aufgereinigt werden (Tabelle 2). Die Assemblierung der aufgereinigten PCR-Produkte mit dem linearisierten Gerüstvektor (Konzentration nach PCR und Gelaufreinigung: 13,8 ng/μl; A260/280: 1,8; A260/A230: 0,54) und die anschließende Transformation in Bakterien wurde anhand des Koloniewachstums festgestellt. Zahlreiche Kolonien wurden kultiviert und in kleinem Maßstab Vektoren isoliert (Tabelle 2).

Tabelle 2. Gemessene Konzentrationen sowie Quotienten A260/280 und A260/230 von isolierten RNAs/DNAs bis zur Fertigstellung der Plasmide pHAGE-CMV-dsRed-LC3B und pHAGE-CMV-dsRed-LMNB1.

	pHAGE-CMV-dsRed-LC3B			pHAGE-CMV-dsRed-LMNB1		
	Konzentration in ng/μl	A260/ A280	A260/ A230	Konzentration in ng/μl	A260/ A280	A260/ A230
RNA	781	2,07	1,76	Gleiche RNA und cDNA wie für LC3B verwendet		
cDNA	1320	1,67	1,95			
PCR-Produkt	27	1,87	0,29	23	1,58	0,35
Mini-Plasmid- aufreinigung	373	1,86	2,21	430,4	1,87	2,28
Maxi-Plasmid- aufreinigung	3415	1,91	2,24	4286	1,89	2,24

Über eine anschließende Sequenzierung wurden Bakterienklone mit korrekt transformiertem Vektor identifiziert (Anhang 4-9). Daraufhin folgte die Produktion und Isolierung des so ausgesuchten Vektors in größerem Maßstab (Tabelle 2). Nach Virusproduktion in HEK293-Zellen und Transduktion in HeLa-H2B-GFP-Zellen konnte die erfolgreiche Modifikation durch das Fluoreszenzsignal des Reportergens festgestellt werden (Abb. 30 und 32).

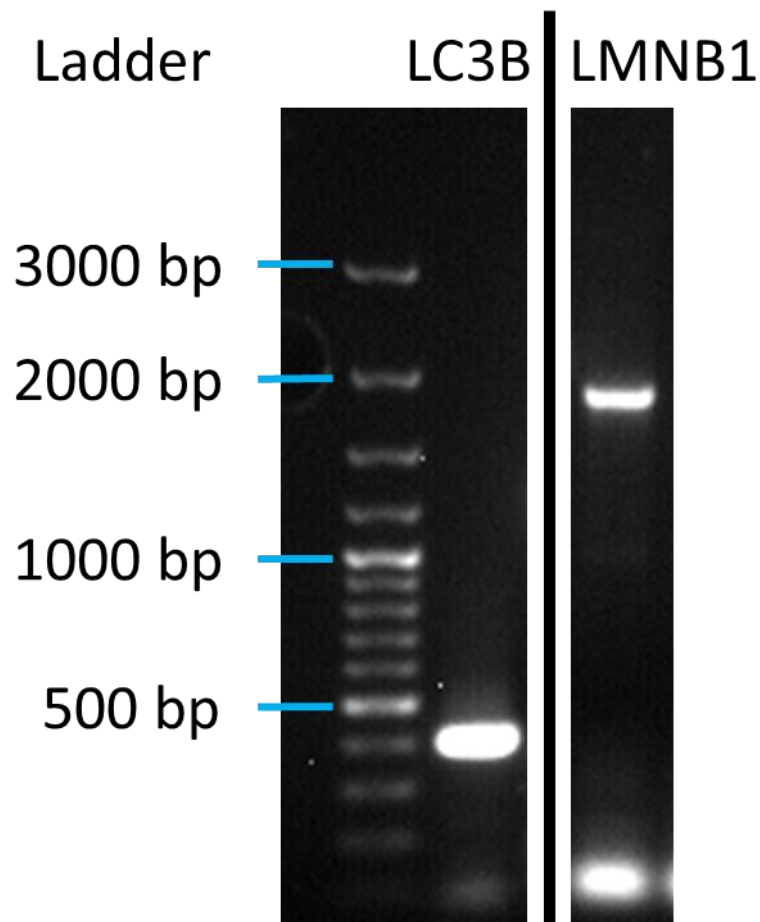


Abb. 29. Elektrophoresegel nach PCR-Amplifikation der Sequenzen von LC3B und LMNB1. GeneRuler 100 bp Plus wurde als Ladder verwendet. Mehrere Bahnen wurden zwischen beiden Proben aus der Abbildung entfernt, wobei an der Position der Bahnen nichts verändert wurde.

4.2.2 Untersuchung von Lamin B1 und LC3B in der Langzeitlebendzellmikroskopie

Mittels der erstellten HeLa-H2B-GFP-dsRed-LC3B-Zellen wurde eine mögliche Ko-Lokalisierung von Mikrokernen mit dem Protein LC3B über einen langen Zeitraum von 96 h in mikrokernhaltigen Zellen und ihren Tochterzellen nach Behandlung mit 2 µg/ml Etoposid sowie 150 µM tBHP untersucht (Abb. 30). Hierbei wurde einerseits die Zahl der LC3B+-positiven Mikrokernkerne über den gesamten Beobachtungszeitraum sowie aufgeteilt nach Generationen ausgewertet, um mögliche Unterschiede nach Zellteilungen herauszufinden (Abb. 31).

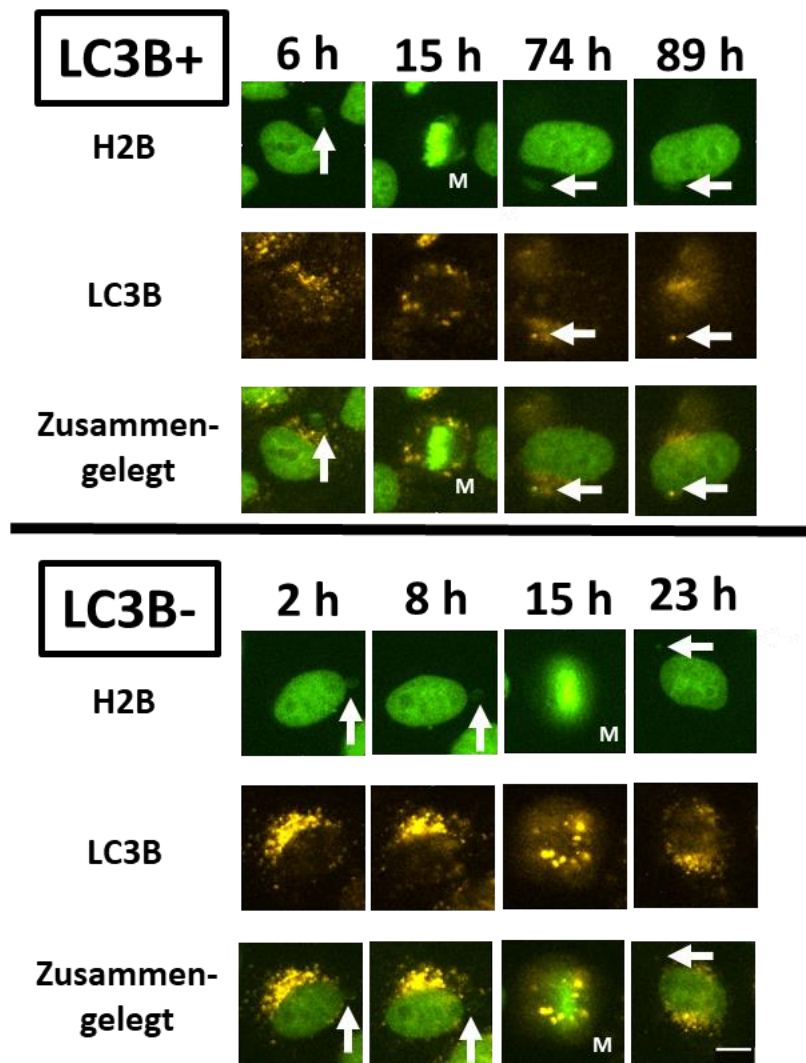


Abb. 30. HeLa-H2B-GFP-dsRed-LC3B-Zellen mit Mikrokerne, die mit LC3B ko-lokalisiert sind (oben nach der Mitose (M)) und welchen, wo keine Ko-Lokalisierung beobachtet wurde (unten). Die weißen Pfeile markieren Mikrokerne. Maßstab: 10 µm.

Allgemein waren nur sehr wenige Mikrokerne mit LC3B ko-lokalisiert, so lag über alle Generationen hinweg der Mittelwert der LC3B+-Mikrokerne abhängig von der Behandlung bei 4,3-5,1 % (Abb. 31).

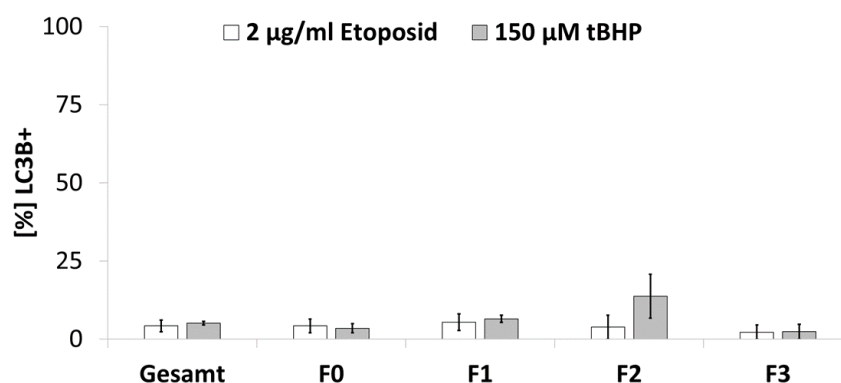


Abb. 31. Anteil Mikrokerne mit LC3B-Signal in HeLa-H2B-GFP-dsRed-LC3B-Zellen. Dargestellt sind LC3B+ Mikrokerne über alle Generationen sowie aufgeteilt in Generation F0-F3 als Mittelwert von 4 Versuchen ± Standardfehler.

4 Ergebnis

Nur geringe Unterschiede zeigten sich innerhalb der einzelnen Generationen, vor allem nach Etoposidbehandlung. Hier war einzig ein kleiner Abfall von F1-F3 von 5,4 auf 2,3 % zu beobachten. Nach tBHP-Behandlung kam es hingegen zu einem Anstieg von F0-F2 von 3,5 auf 13,8 %, wobei in F3 eine ähnliche Häufigkeit von LC3B+-Mikrokernen wie nach Etoposidbehandlung beobachtet wurde. Weiterhin wurde auch bei keinem der LC3B+-Mikrokern Anzeichen einer Degradation beobachtet (Abb. 31).

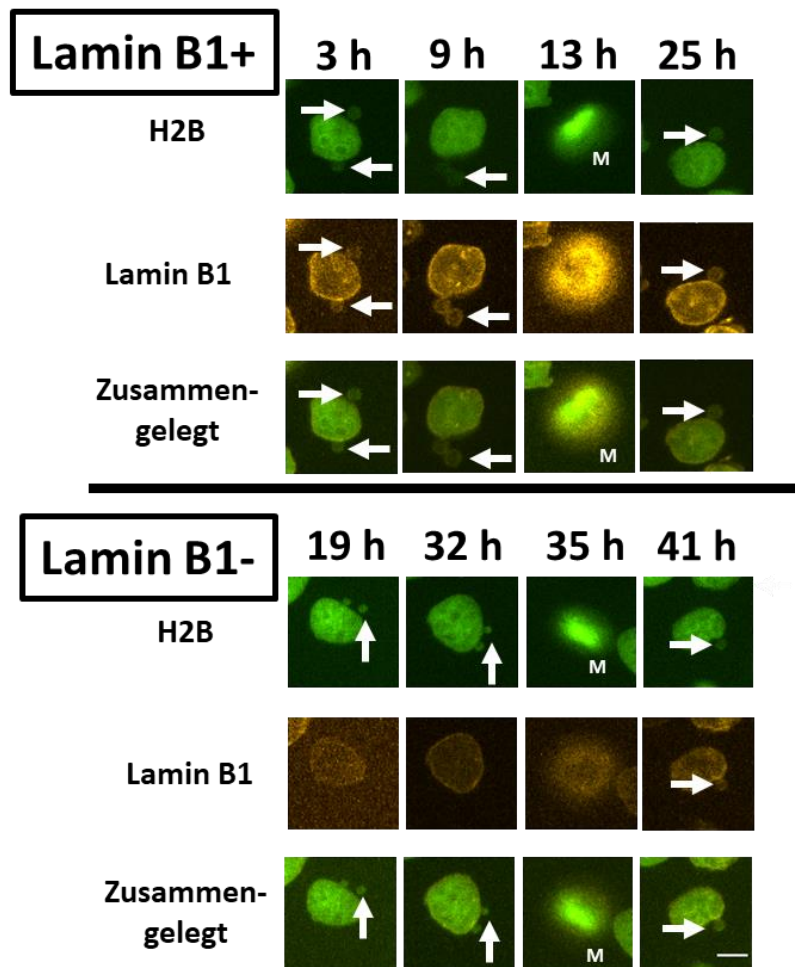


Abb. 32. HeLa-H2B-GFP-dsRed-Lamin B1-Zellen mit Mikrokernen, die mit Lamin B1 ko-lokalisiert sind (oben) und welchen, wo keine Ko-Lokalisierung beobachtet wurde (unten vor der Mitose (M)). Die weißen Pfeile markieren Mikrokern. Maßstab: 10 μ m.

Bei den HeLa-H2B-GFP-dsRed-Lamin B1-Zellen wurde ähnlich wie zuvor vorgegangen. So konnten Mikrokern mit und ohne Lamin B1-Signal in der Mikrokernmembran unterschieden werden (Abb. 32). Weiterhin wurde neben einer Gesamtauswertung auch Mikrokern nach Generationen aufgeschlüsselt (Abb. 33). Im Gegensatz zu den Hauptkernen, die immer über eine Lamin B1-Färbung verfügten, konnte abhängig von Etoposid- oder tBHP-Behandlung nur in 54,3 bzw. 47,6 % aller

Mikrokerne ein Lamin B1-Signal gefunden werden. In F0 und F3 wurden signifikant weniger Lamin B1-positive Mikrokerne nach tBHP-Behandlung gefunden. Während nur nach Etoposidbehandlung ein Rückgang an Lamin B1+-Mikrokernen von F0-F3 (von 59,3 in F0 auf signifikant erniedrigte 40,3 % in F3) gesehen wurde, gab es nach tBHP-Behandlung ein Maximum in F1 bei 63,1 %, welches bis F3 mit 25 % fiel und damit signifikant niedriger war als in F0 (Abb. 33).

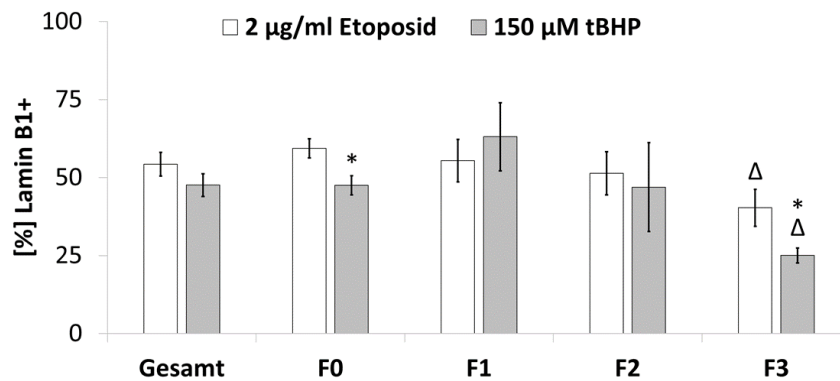


Abb. 33. Anteil Mikrokerne mit Lamin B1-Signal in HeLa-H2B-GFP-dsREd-Lamin B1-Zellen. Dargestellt sind Lamin B1+-Mikrokerne über alle Generationen sowie aufgeteilt in Generation F0-F3 als Mittelwert von 4 Versuchen \pm Standardfehler. Sternchen markiert $p \leq 0,05$ im Vergleich zwischen beiden Behandlungen der gleichen Generation (Mann-Whitney-U-Test). Delta markiert $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Generation F0 der gleichen Behandlung (Mann-Whitney-U-Test).

4.2.3 γ H2AX-Antikörperfärbung in Mikrokernen und mikrokernhaltigen Zellen

Um Degradation vom Mikrokernen weiter zu untersuchen, wurde eine γ H2AX-Färbung sowohl von Mikrokernen als auch von mikrokernfreien wie mikrokernhaltigen Zellen in HeLa-H2B-GFP-Zellen über einen Zeitraum von fünf Tagen (entsprechend Beobachtungszeitraum in Lebendzellmikroskopie + die Zeit davor seit der Mikrokerninduktion) durchgeführt und die gemessenen Intensitäten auf die Werte der mikrokernfreien Zellen der jeweiligen Kontrolle normiert. Hier zeigte sich nach Etoposidbehandlung, dass die γ H2AX-Intensität mikrokernfreier Zellen von einem signifikanten 1,75-fachen Anstieg zur Kontrolle an Tag 0 bis Tag 5 abflachte und dort fast das Niveau der Kontrolle erreichte (Abb. 34a). Auch bei mikrokernhaltigen Zellen war ausgehend von der signifikant erhöhten, doppelten Intensität an Tag 0 ein Abfall bis Tag 5 erkennbar, auch wenn an Tag 3 noch ein weiterer signifikanter Anstieg

4 Ergebnis

beobachtet wurde (Abb. 34b). Bei Mikrokernen hingegen war die γ H2AX-Intensität an Tag 0 nur das 1,3-fache der Kontrolle, stieg aber über ein Maximum an Tag 3 bis zu Tag 5 zu einer signifikant erhöhten doppelten Intensität im Vergleich zum Kontrollwert an (Abb. 34c). In der Kontrolle war auch bei Mikrokernen kein klarer Anstieg der γ H2AX-Intensität zu beobachten.

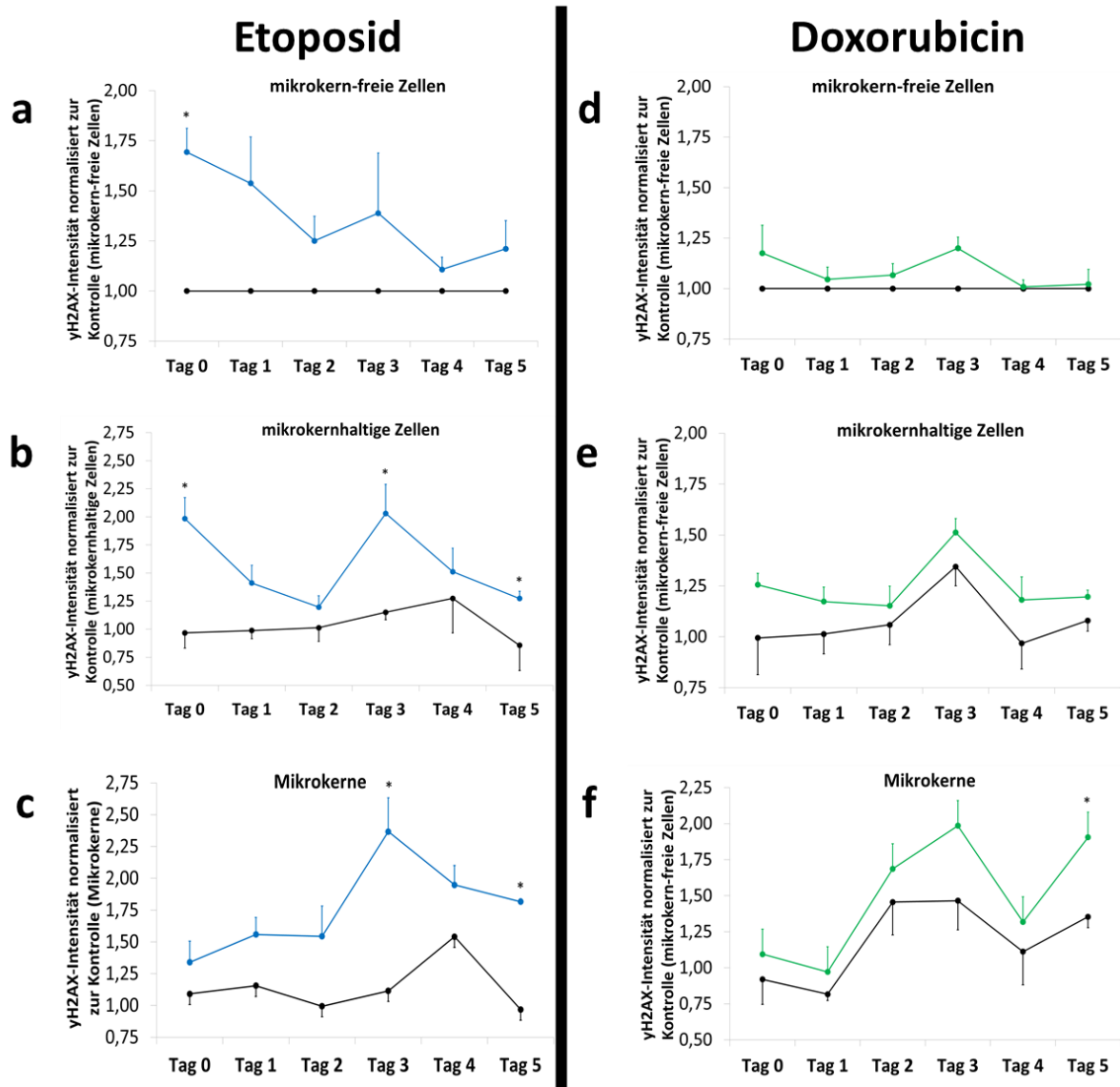


Abb. 34. γ H2AX-Intensität in HeLa-H2B-GFP-Zellen von (a/d) mikrokernfreien Zellen, (b/e) mikrokernhaltigen Zellen und (c/f) Mikrokernen normalisiert zur γ H2AX-Intensität von mikrokernfreien Kontrollzellen nach Behandlung mit 2 μ g/ml Etoposid (blaue Linien) und 40 nM Doxorubicin (grüne Linien). Mit schwarzer Linie gekennzeichnet sind die γ H2AX-Intensitäten der NK (DMSO bei Etoposid, H₂O bei Doxorubicin). Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Versuchen \pm Standardfehler. Sternchen markiert $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle (t-Test).

Nach Behandlung mit Doxorubicin war in mikrokernfreien Zellen an Tag 0 nur ein schwacher 1,25-facher Anstieg der γ H2AX-Intensität festzustellen, der mit Ausnahme eines kleineren Ausschlags an Tag 3 sich bis Tag 5 der Intensität der Kontrolle

annäherte (Abb. 34d). Bei mikrokernhaltigen Zellen blieb das Niveau mit Ausnahme eines Anstiegs an Tag 3 über den gesamten Beobachtungszeitraum konstant beim 1,25-fachen der mikrokernfreien Kontrollzellen, wobei auch die mikrokernhaltigen Kontrollzellen bis auf Tag 3 eine ähnliche γ H2AX-Intensität wie die mikrokernfreien Zellen zeigten (Abb. 34e). Wie nach Etoposidbehandlung stieg die γ H2AX-Intensität in Mikrokernen signifikant bis Tag 5 das das Doppelte an, wobei es in Mikrokernen der Kontrollbehandlung hier zu einem Anstieg auf das 1,25-fache im Vergleich zu mikrokernfreien Zellen kam (Abb. 34f).

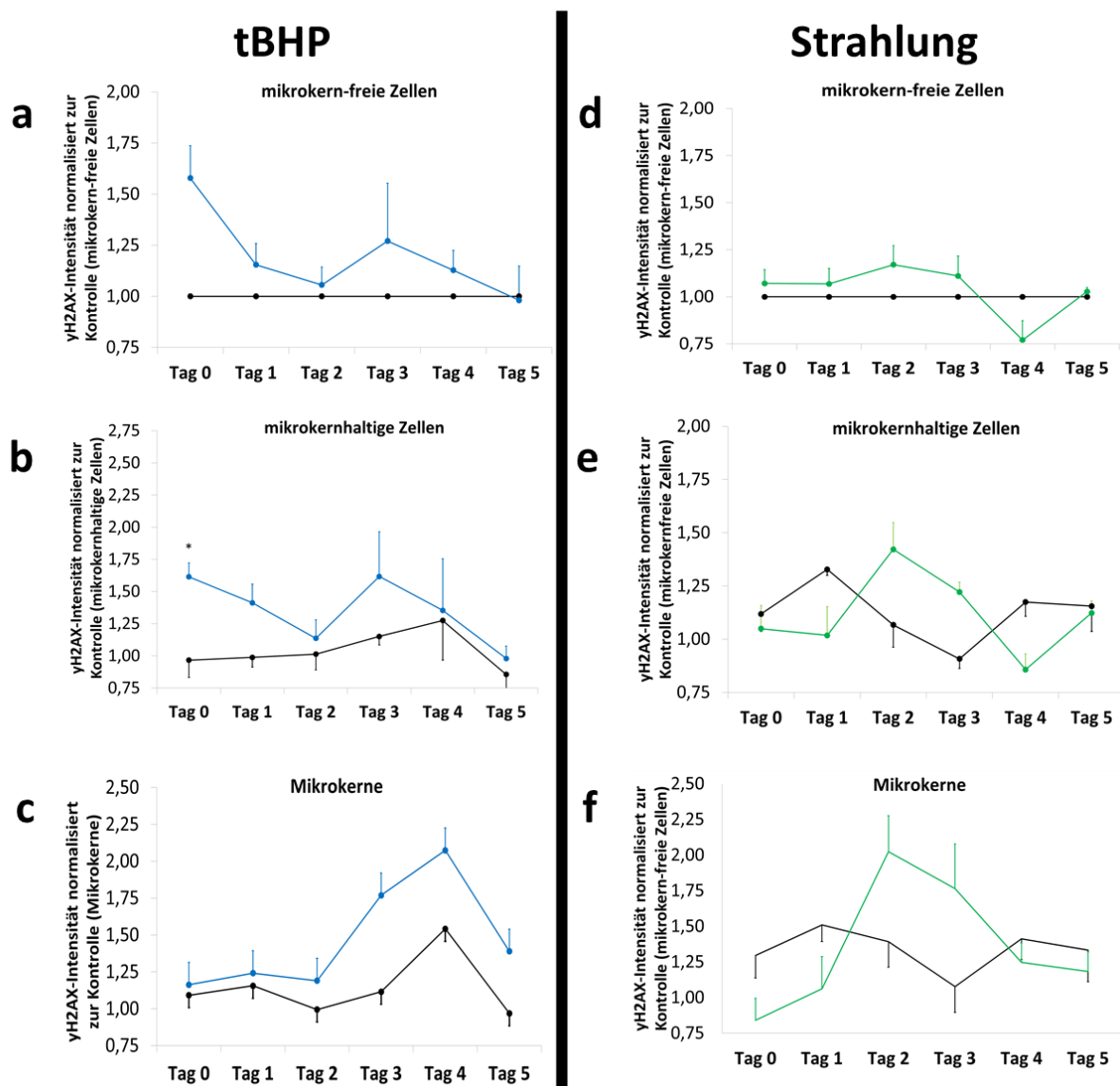


Abb. 35. γ H2AX-Intensität in HeLa-H2B-GFP-Zellen von (a/d) mikrokernfreien Zellen, (b/e) mikrokernhaltigen Zellen und (c/f) Mikrokernen normalisiert zur γ H2AX-Intensität von mikrokernfreien Kontrollzellen nach Behandlung mit 150 μ M tBHP (blaue Linien) und 2 Gy Strahlung (grüne Linien). Mit schwarzer Linie gekennzeichnet sind die γ H2AX-Intensitäten der NK (H_2O). Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Versuchen \pm Standardfehler. Sternchen markiert $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle (t-Test).

Nach tBHP-Behandlung fiel die γ H2AX-Intensität von Tag 0 sowohl in mikrokernfreien wie mikrokernhaltigen Zellen rasch vom jeweils 1,65-fachen der Kontrolle (signifikant nur für mikrokernhaltige Zellen) in Richtung des Niveaus der Kontrolle, wobei wieder an Tag 3 bei beiden Gruppen ein Anstieg zu beobachten war (Abb. 35a/b). Bei Mikrokernen war nach tBHP-Behandlung bis Tag 4 ein Anstieg auf das doppelte der mikrokernfreien Kontrollzellen festzustellen, der jedoch an Tag 5 auf die 1,5-fache γ H2AX-Intensität abfiel (Abb. 35c). Einen ähnlichen Verlauf, jedoch auf niedrigerem Niveau, konnte man bei Mikrokernen der Kontrollbehandlung erkennen.

Nach Bestrahlung zeigte sich nur ein schwacher 1,1-facher Anstieg der γ H2AX-Intensität mikrokernfreier Zellen im Vergleich zur Kontrolle, der sich im Wesentlichen nicht veränderte und bei Tag 4 sogar unter das Niveau der Kontrolle fiel (Abb. 35d). Bei mikrokernhaltigen Zellen war nur an Tag 2 und 3 ein klarer Anstieg auf bis zu das 1,4-fache der Kontrolle zu erkennen (Abb. 35e). Bei den Mikrokernen zeigte sich wieder ein Anstieg der γ H2AX-Intensität bis zum 2-fachen der mikrokernfreien Kontrolle, jedoch folgte bis Tag 5 ein Abfall bis auf die nur noch 1,25-fache γ H2AX-Intensität (Abb. 35f). Die Mikrokernintensität der Kontrollbehandlung verblieb, bis auf einen leichten Rückgang an Tag 3, zwischen der 1,25 bis 1,5-fachen γ H2AX-Intensität der mikrokernfreien Zellen.

MMS-Behandlung führte ebenso in mikrokernfreien Zellen nur zu einem schwachen 1,15-fachen Anstieg zu Kontrolle, der mit kleineren Anstiegen an Tag 2 und 3 bzw. Abfällen an Tag 4 sich bis Tag 5 dem Niveau der Kontrolle stark annäherte (Abb. 36a). Die untersuchten mikrokernhaltigen Zellen nach Behandlung blieben über den gesamten Zeitraum recht konstant auf dem Niveau des 1,25-fachen der mikrokernfreien Kontrollzellen, auf dem sich auch die mikrokernhaltigen Kontrollzellen ab Tag 4 einpendelten (Abb. 36b). Bei den Mikrokernen zeigte sich ausgehend von der 1,5-fachen γ H2AX-Intensität zur mikrokernfreien Kontrollgruppe ein Anstieg auf die 2,25-fache γ H2AX-Intensität an Tag 1, die dann wieder leicht bis Tag 4 auf das 1,5-fache abfiel und nur an Tag 3 signifikant zur Kontrolle war, um am Tag 5 wieder stark auf die Höhe des Maximums von Tag 1 zurückzukehren (Abb. 36c). Im

Gegensatz hierzu zeigten Mikrokerne der Kontrollgruppe eine recht konstante γ H2AX-Intensität vom ca. 1,25-fachen im Vergleich zur mikrokernfreien Kontrolle.

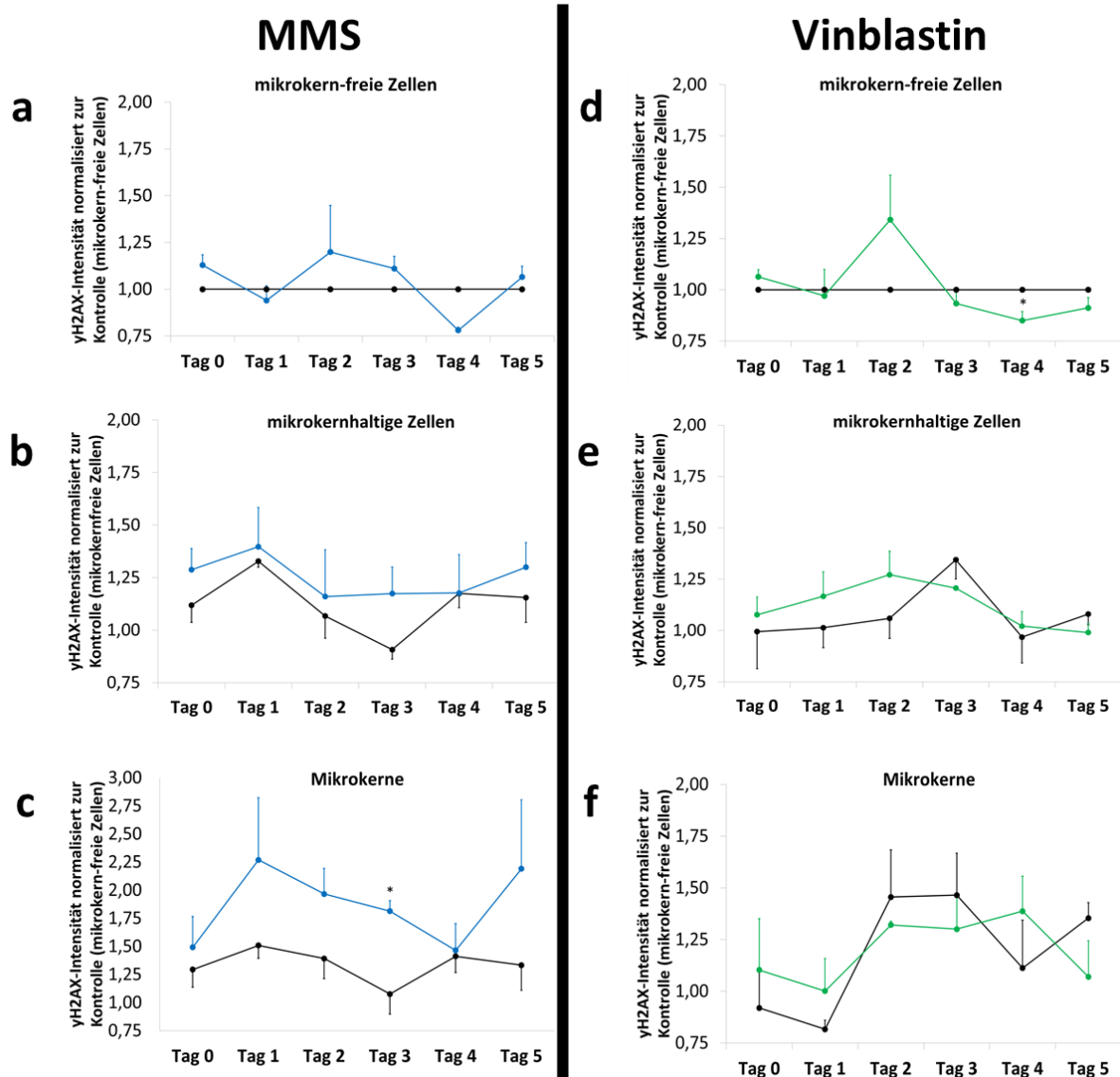


Abb. 36. γ H2AX-Intensität in HeLa-H2B-GFP-Zellen von (a/d) mikrokernfreien Zellen, (b/e) mikrokernhaltigen Zellen und (c/f) Mikrokerne normalisiert zur γ H2AX-Intensität von mikrokernfreien Kontrollzellen nach Behandlung mit 30 μ g/ml MMS (blaue Linien) und 3 nM Vinblastin (grüne Linien). Mit schwarzer Linie gekennzeichnet sind die γ H2AX-Intensitäten der NK (DMSO bei MMS, H₂O bei Vinblastin). Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Versuchen \pm Standardfehler. Sternchen markiert $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle (t-Test).

Mikrokernfreie Zellen nach Vinblastinbehandlung zeigten nur an Tag 2 einen klaren 1,3-fachen Anstieg der γ H2AX-Intensität im Vergleich zur Kontrolle, während ab Tag 3 bis Tag 5 sogar nur ein leicht schwächeres Signal als in Kontrollzellen beobachtet wurde, die für Tag 4 sogar Signifikanz erreichten (Abb. 36d). Nach Vinblastinbehandlung kam es in mikrokernhaltigen Zellen von der 1,1-fachen γ H2AX-Intensität im Vergleich zu mikrokernfreien Zellen an Tag 0 zu einem Maximum

bei der 1,25-fachen γ H2AX-Intensität an Tag 2 wieder zu einem Rückgang bis Tag 4 auf das Niveau von Tag 0, während mikrokernhaltige Zellen der Kontrollbehandlung bis auf einen Anstieg auf das 1,25-fache keine klaren Unterschiede zu mikrokernfreien Kontrollzellen zeigten (Abb. 36e). Wiederum kam es bei Mikrokernen nach Anwendung von Vinblastin zu einem verglichen mit den anderen Agenzien schwachen Anstieg bis auf das 1,4-fache der mikrokernfreien Kontrolle, die an Tag 5 wieder auf die 1,1-fache γ H2AX-Intensität zurückfiel (Abb. 36f). Mikrokerne der Kontrollgruppe stiegen an Tag 2 und 3 auf das 1,5-fache der γ H2AX-Intensität der mikrokernfreien Kontrollzellen an, wobei an Tag 4 und 5 ein unregelmäßiger Rückgang auf die 1,25- bis 1,4-fache γ H2AX-Intensität zu beobachten war.

4.3 Gentoxizität von Thebain

Im folgenden Kapitel wird der Frage der Gentoxizität und Vitalität nach Thebainbehandlung mit und ohne metabolische Aktivierung nachgegangen.

4.3.1 Mikrokernhäufigkeit und Vitalität nach Thebainbehandlung

Die Mikrokernhäufigkeit nach 24 und 4 h Thebainexposition wurde in TK6-Zellen untersucht. Nach Behandlung mit 150 und 500 μ M Thebain für 24 h wurde ein signifikanter Anstieg in der Anzahl der Mikrokerne zusammen mit einem signifikanten Rückgang des CBPI beobachtet (Abb. 37a). Auf Grund der Beschränkung durch die Löslichkeit des Thebains waren höhere Dosen im weiteren Studienverlauf nicht möglich. Im FDA- wie im Trypanblautest war nur nach Behandlung mit 500 μ M Thebain eine signifikant reduzierte Vitalität zu beobachten (Abb. 38a).

Nach 150 und 500 μ M Thebainbehandlung für 4 h wurde nur ein geringer Anstieg der Mikrokernzahl gesehen, während es nach Anwendung von 500 μ M Thebain zu einem kleinen aber signifikanten Rückgang des CBPIs gekommen ist (Abb. 37b).

Übereinstimmend mit diesem Trend wurde bei dieser Dosis im FDA- wie Trypanblautest eine verringerte Vitalität festgestellt, die aber nur im Trypanblautest Signifikanz erreichte (Abb. 38b).

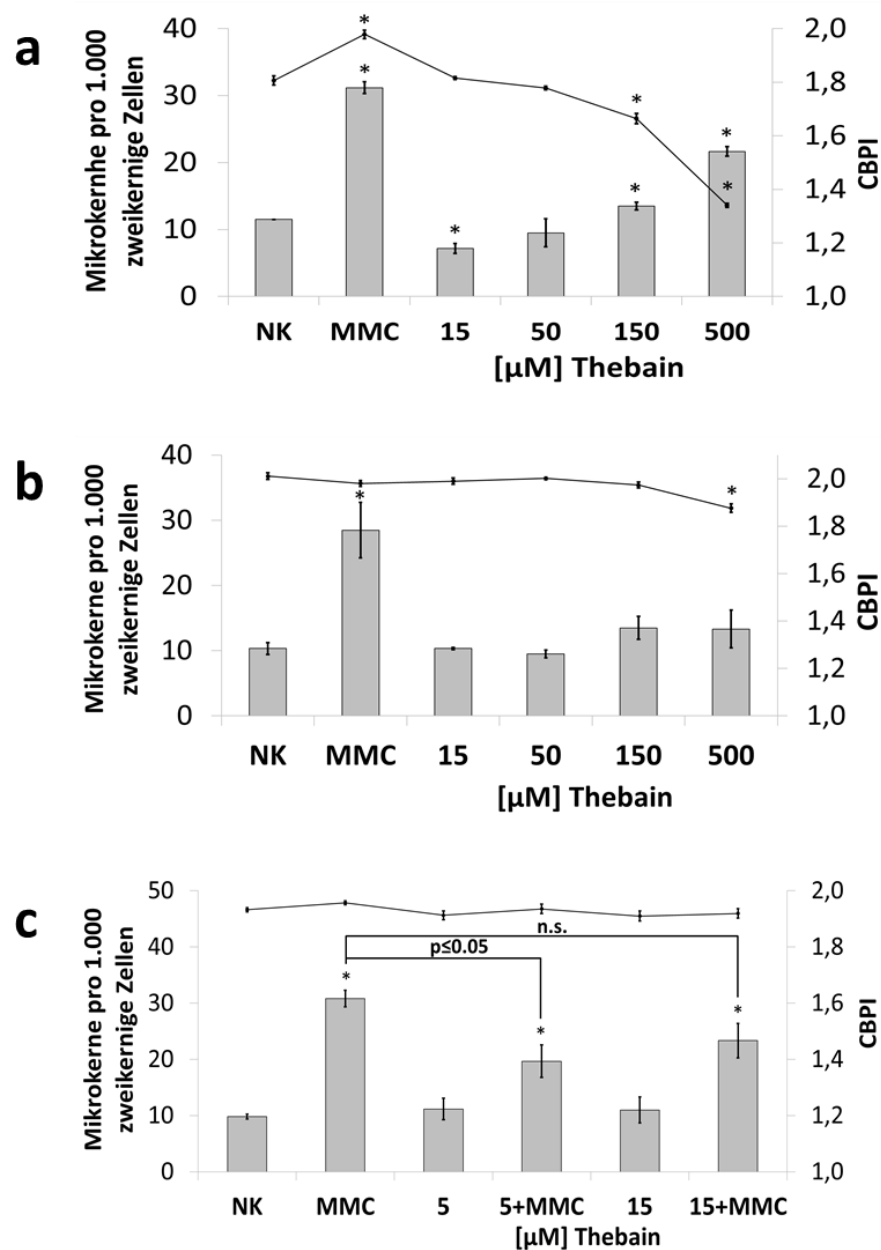


Abb. 37. Zytokinesblock-Mikrokerntest in TK6-Zellen nach Behandlung mit Thebain für (a) 24 h und (b) 4 h sowie nach (c) Ko-Behandlung mit MMC für 24 h. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Versuchen \pm Standardfehler der Mikrokernelhäufigkeit von 1.000 zweikernigen Zellen (grauer Balken) und CBPI (schwarze Linie). Sternchen markiert $p \leq 0,05$ im Vergleich zu NK (Mann-Whitney-U-Test). Als Positivkontrolle oder zur Ko-Behandlung wurden 100 nM MMC verwendet.

Nach 24 h Behandlung wurde nach Behandlung mit 15 μM Thebain ein signifikanter Rückgang der Mikrokernelzahl im Vergleich zur Kontrolle festgestellt. Um einen

möglichen protektiven Effekt weiter zu untersuchen, wurden geringe Dosen Thebain zusammen mit MMC in Kombination für 24 h behandelt.

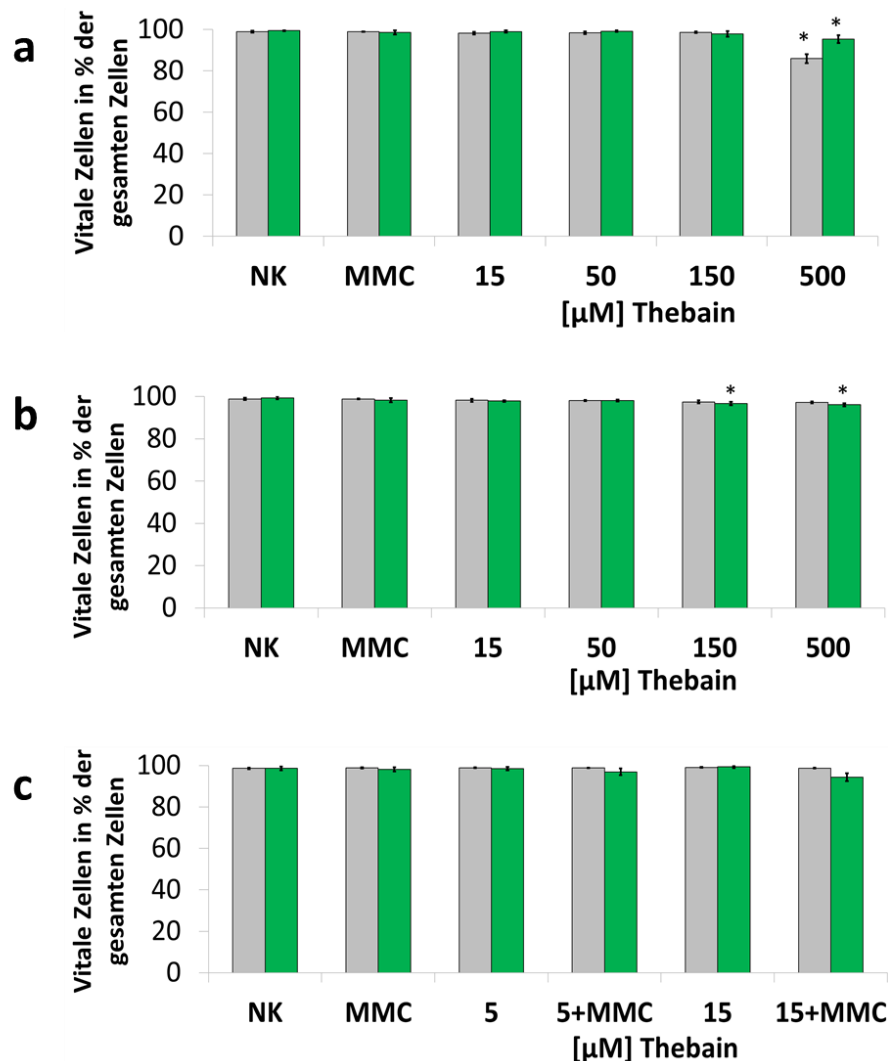


Abb. 38. Viable Zellen in % der gesamten Zellen in TK6-Zellen nach Behandlung mit Thebain für (a) 24 h und (b) 4 h sowie nach (c) Ko-Behandlung mit MMC für 24 h. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Versuchen \pm Standardfehler nach Anwendung im FDA- (grauer Balken) und Trypanblautest (roter Balken). Sternchen markiert $p \leq 0,05$ im Vergleich zu NK (Mann-Whitney-U-Test). Als Positivkontrolle oder zur Ko-Behandlung wurden 100 nM MMC verwendet.

Obwohl der zuvor beschriebene Rückgang der Mikrokernfrequenz nicht reproduziert werden konnte, hat Ko-Behandlung von 5 und 15 μ M Thebain mit 100 nM MMC zu einer klar verringerten Mikrokernzahl im Vergleich zu 100 nM MMC allein geführt (Abb. 37c), der interessanterweise stärker und signifikant wurde nach Behandlung mit der geringeren Dosis Thebain. Nur geringe oder keine Effekte durch dieses Behandlungsschema wurden in beiden Vitalitätstests gefunden (Abb. 38c).

4.3.2 Einfluss durch metabolische Aktivierung

Zur Untersuchung von möglichen DNA-Schäden nach metabolischer Aktivierung von Thebain wurde ähnliche Experimente wie zuvor in metabolisch aktiven HepG2 sowie TK6-Zellen mit Anwendung eines 0,25 % S9-Mix durchgeführt.

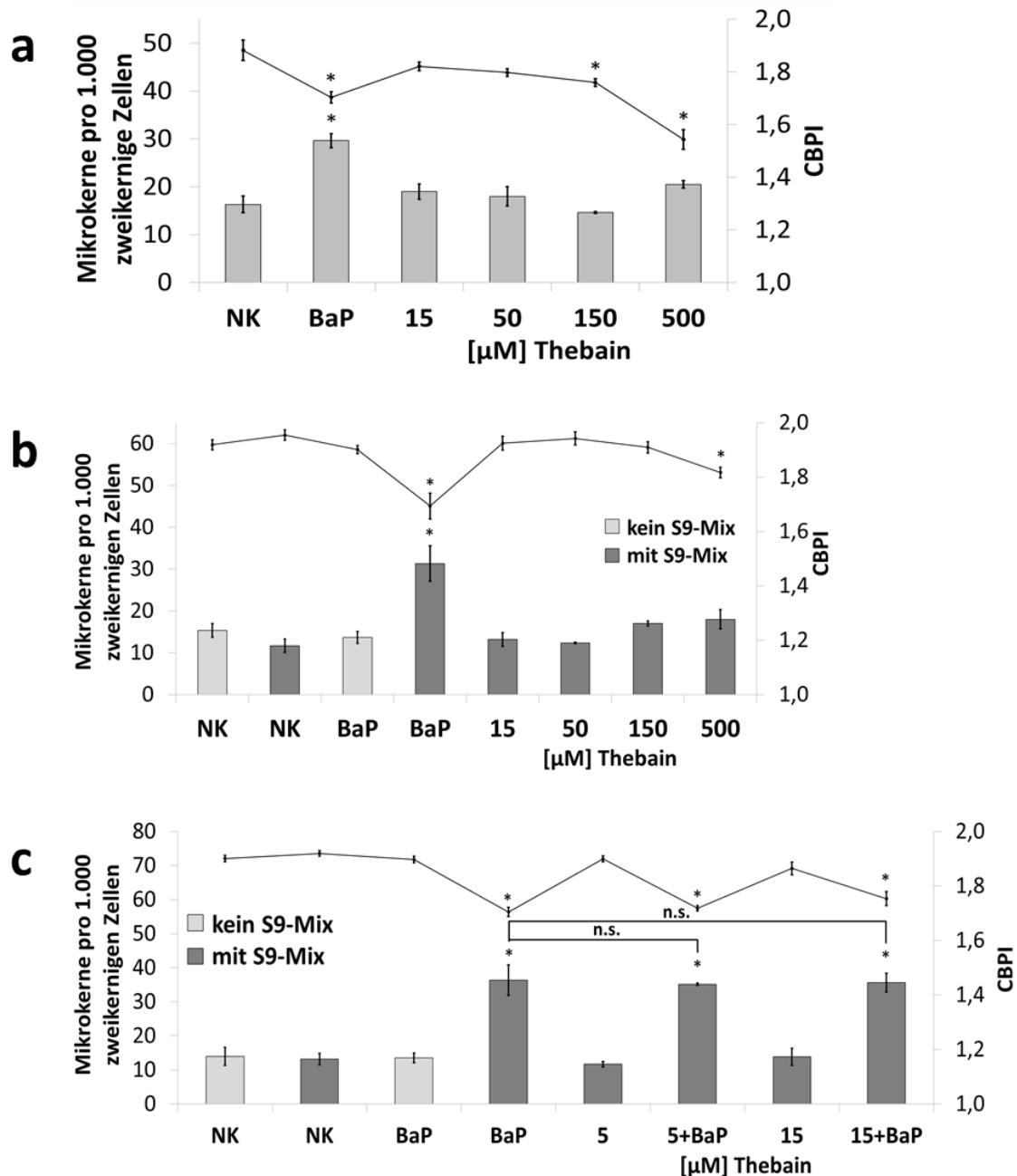


Abb. 39. Zytokinesblock-Mikrokernertest nach Behandlung mit Thebain für (a) 28 h in HepG2-Zellen und (b) 4 h in TK6-Zellen mit S9-Mix sowie nach (c) Ko-Behandlung mit MMC für 4 h in TK6-Zellen mit S9-Mix. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Versuchen \pm Standardfehler der Mikrokernhäufigkeit von 1.000 zweikernigen Zellen (grauer Balken) und CBPI (schwarze Linie). Sternchen markiert $p \leq 0,05$ im Vergleich zu NK (Mann-Whitney-U-Test). Als Positivkontrolle oder zur Ko-Behandlung wurde 1 (a) oder 10 μ M BaP verwendet.

4 Ergebnis

In HepG2-Zellen wurde kein eindeutiger Trend für einen Anstieg der Mikrokernhäufigkeit nach Behandlung mit Thebain beobachtet, allerdings kam es zu einem signifikanten Rückgang des CBPI nach Behandlung mit 150 und 500 μM Thebain für 28 h (Abb. 39a).

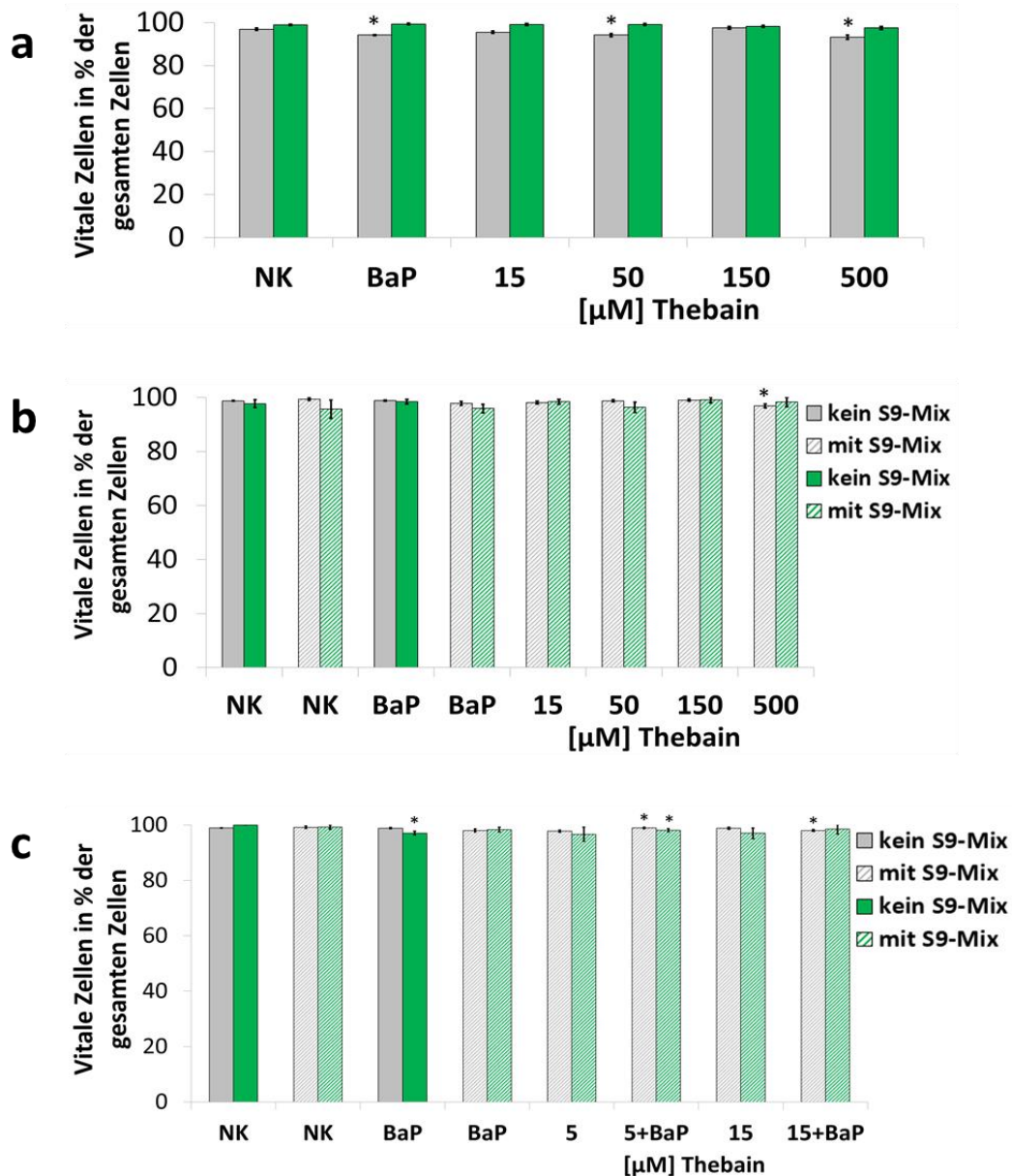


Abb. 40. Viable Zellen in % der gesamten Zellen nach Behandlung mit Thebain für (a) 28 h in HepG2-Zellen und (b) 4 h in TK6-Zellen mit S9-Mix sowie nach (c) Ko-Behandlung mit MMC für 4 h in TK6-Zellen mit S9-Mix. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Versuchen \pm Standardfehler nach Anwendung im FDA- (grauer Balken) und Trypanblautest (roter Balken). Sternchen markiert $p \leq 0,05$ im Vergleich zu NK (Mann-Whitney-U-Test Als Positivkontrolle oder zur Ko-Behandlung wurde 1 (a) oder 10 μM BaP verwendet).

Nach 50 und 500 μM Thebainbehandlung hat sich im FDA-Test eine leicht verringerte Vitalität gezeigt (Abb. 40a). Die gleichen Dosen in TK6-Zellen nach Anwendung des

S9-Mix für 4 h konnten auch keinen Effekt auf die Mikrokernhäufigkeit zeigen (Abb. 39b), während nach Behandlung mit 500 μM Thebain ein signifikanter Rückgang des CBPI und der Vitalität im FDA-Test zu beobachten war (Abb. 40b). Ko-Behandlung von niedrigen Dosen Thebain und 10 μM BaP in TK6-Zellen mit S9-Mix für 4 h konnte keinen protektiven Effekt des Thebains gegen den Einfluss des BaP aufzeigen (Abb. 39c). In beiden Vitalitätstests hingegen wurden kleine, aber signifikante Rückgänge nach 5 μM Thebainbehandlung sowie nach Ko-Behandlung mit 15 μM Thebain und 10 μM BaP festgestellt (Abb. 40c).

4.3.3 Mitose und Apoptose nach Thebainbehandlung

Neben Mikrokernen und Vitalität wurden auch die Häufigkeit von Mitosen und Apoptosen ausgewertet. Nach Thebainbehandlung für 24 h in TK6-Zellen zeigte sich ein eindeutiger, dosis-abhängiger Rückgang der Mitose- sowie ein Anstieg der Apoptosehäufigkeit, der nach Anwendung von 500 μM Thebain Signifikanz erreichte (Abb. 41a). Ähnliche, aber weniger stark ausgeprägten Effekte waren nach vierstündiger Behandlung zu beobachten, wobei nur die Apoptosefrequenz nach 500 μM Thebain signifikant größer geworden war (Abb. 41b). Nach Ko-Behandlung mit Thebain und 100 nM MMC wurden mehr Mitosen gefunden, was möglicherweise die durch Thebain nicht veränderte hohe Mitoserate nach MMC-Behandlung allein widerspiegelt (Abb. 41c). Veränderungen in der Häufigkeit von Apoptosen wurden nicht festgestellt.

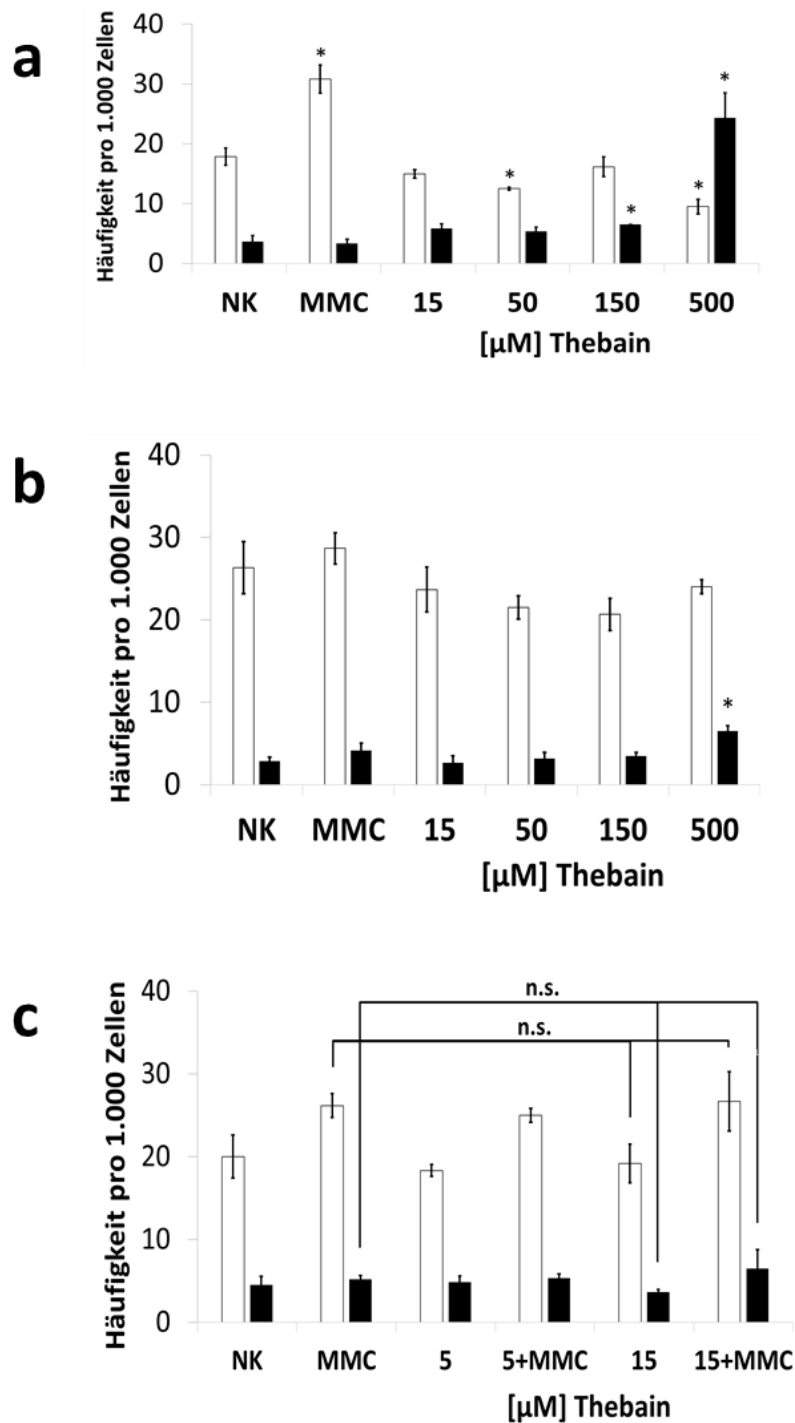


Abb. 41. Häufigkeit von Mitose und Apoptose pro 1.000 Zellen in TK6-Zellen nach Behandlung mit Thebain für (a) 24 h und (b) 4 h sowie nach (c) Ko-Behandlung mit MMC für 24 h. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Versuchen \pm Standardfehler. Sternchen markiert $p \leq 0,05$ im Vergleich zu NK (Mann-Whitney-U-Test). Als Positivkontrolle oder zur Ko-Behandlung wurden 100 nM MMC verwendet.

In HepG2-Zellen wurden zwar in geringem Ausmaß mehr Mitosen gesehen aber die Häufigkeit von Apoptosen blieb unabhängig von der Thebaindosis weitgehend konstant (Abb. 42a). Nach Behandlung mit S9-Mix in TK6-Zellen konnte keine thebainabhängigen Veränderungen bei der Mitose- oder Apoptosehäufigkeit

festgestellt werden, auch unabhängig von einer Ko-Behandlung mit 10 μM BaP (Abb. 42b/c). Nichtsdestoweniger wurde die leicht erhöhte Mitoserate in Zellen, die mit 10 μM BaP und S9-Mix behandelt worden sind, durch Thebainzugabe abgemildert, während 10 μM BaP ohne weitere Zusätze einen starken Anstieg in der Häufigkeit von Apoptosen ausgelöst hat (Abb. 42c).

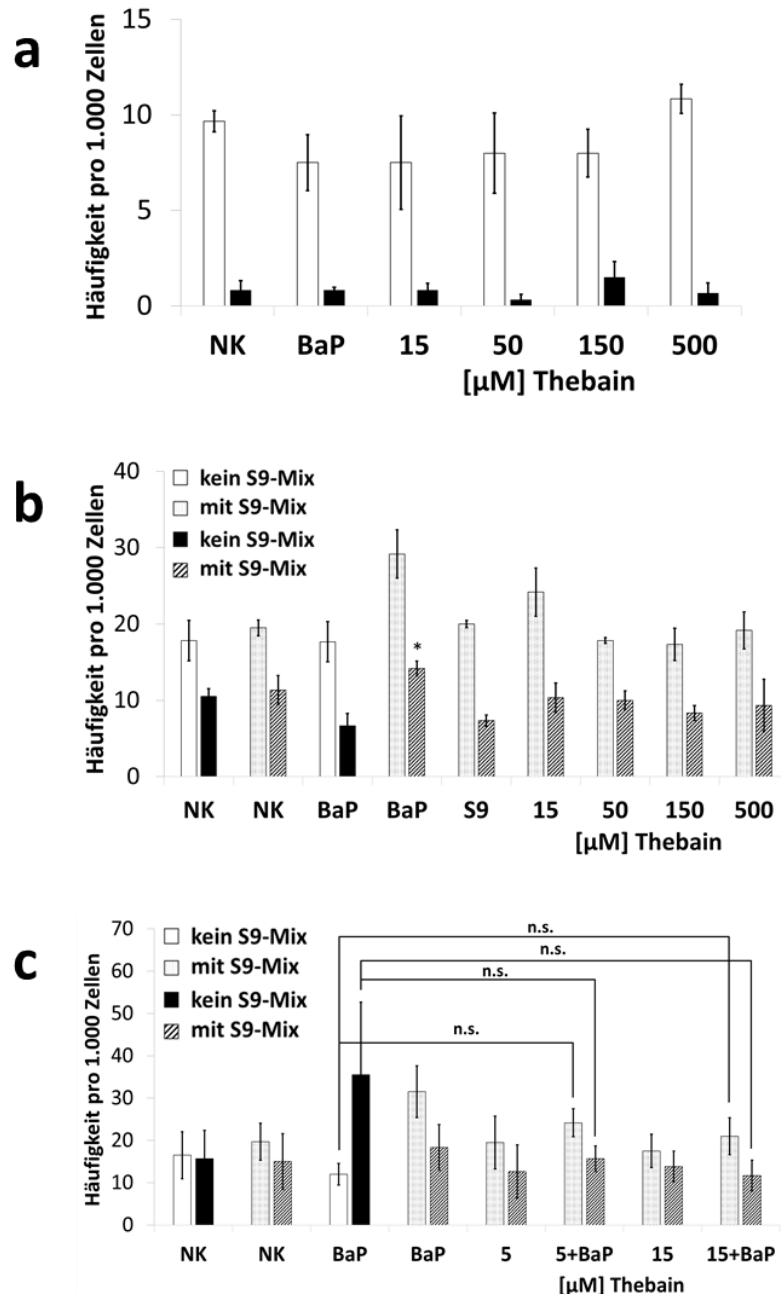


Abb. 42. Häufigkeit von Mitose und Apoptose pro 1.000 Zellen nach Behandlung mit Thebain für (a) 28 h in HepG2-Zellen und (b) 4 h in TK6-Zellen mit S9-Mix sowie nach (c) Ko-Behandlung mit MMC für 4 h in TK6-Zellen mit S9-Mix. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Versuchen \pm Standardfehler. Sternchen markiert $p \leq 0,05$ im Vergleich zu NK (Mann-Whitney-U-Test). Als Positivkontrolle oder zur Ko-Behandlung wurde 1 (a) oder 10 μM BaP verwendet.

4.4 Gentoxizität von Celecoxib und Celecoxibderivaten

Celecoxib hat eine diaryl-substituierte Pyrazolgrundstruktur (Abb. 43a), während es sich bei Derivat 1 um ein 3,4,5-Trimethoxyphenylanalog von Celecoxib handelt (Abb. 43b). Derivate 2-4 basieren alle auf derselben 1,4,5-Triaryl-1*H*-Pyrazol-3-Carboxylatstruktur (Abb. 43c) mit verschiedenen Substituenten an den Positionen R, R' und R'' (Abb. 43d).

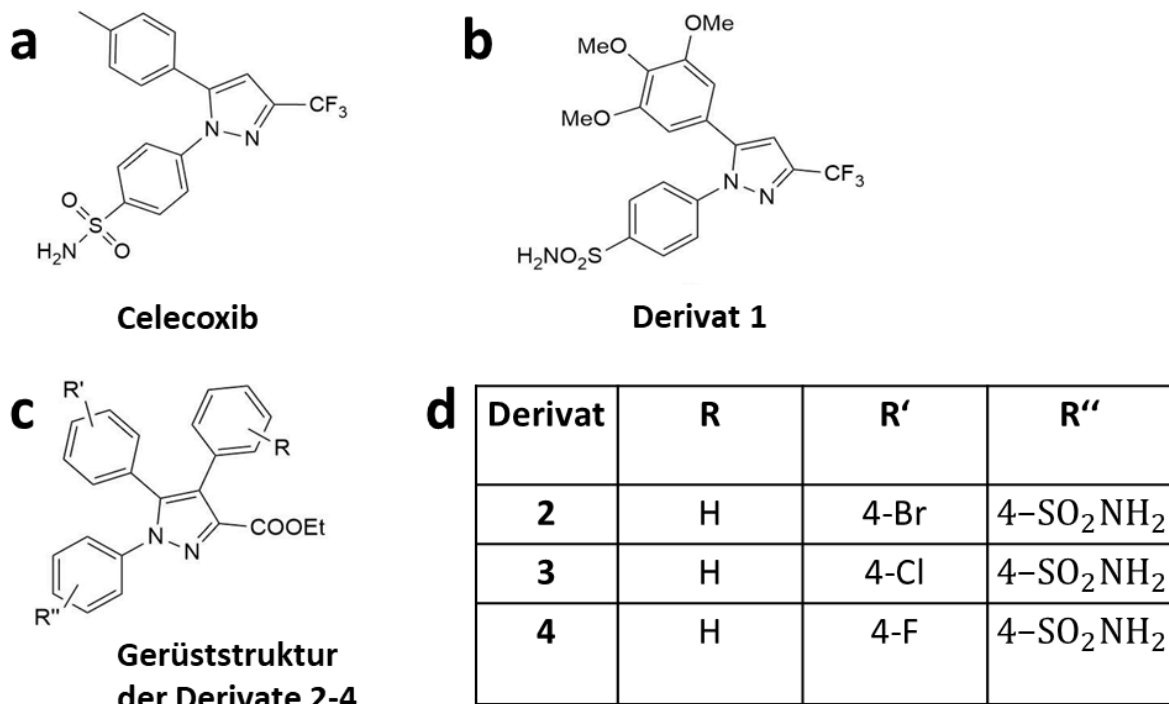


Abb. 43. Chemische Struktur von (A) Celecoxib und (B/C) Derivat 1-4. Derivat 2-4 teilen sich dieselbe Gerüststruktur, die sich nur an den Positionen R' und R'' unterscheiden (D).

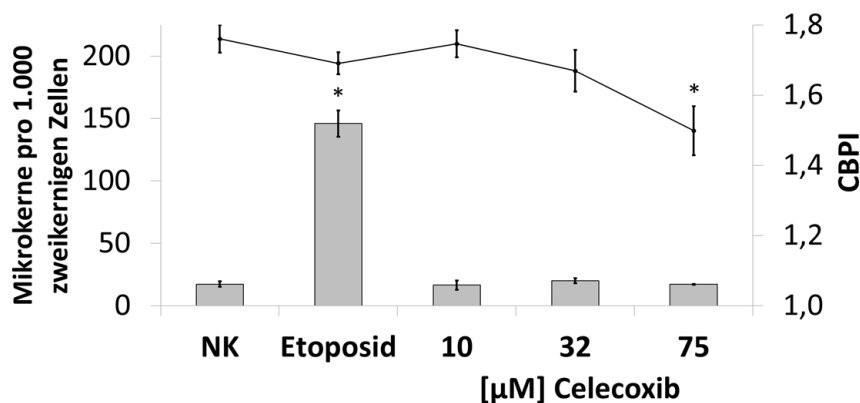


Abb. 44. Zytokineblock-Mikrokernstest in HeLa-H2B-GFP-Zellen nach Behandlung mit Celecoxib. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Versuchen ± Standardfehler der Mikrokernhäufigkeit von 1.000 zweikernigen Zellen (grauer Balken) und CBPI (schwarze Linie). Sternchen markiert p ≤ 0,05 im Vergleich zu NK (Mann-Whitney-U-Test). Als Positivkontrolle wurde 1 μg/ml Etoposid verwendet.

Zur Bewertung der Gentoxizität wurden Zytokinese-Block Mikrokerntests von Celecoxib und allen Derivaten durchgeführt.

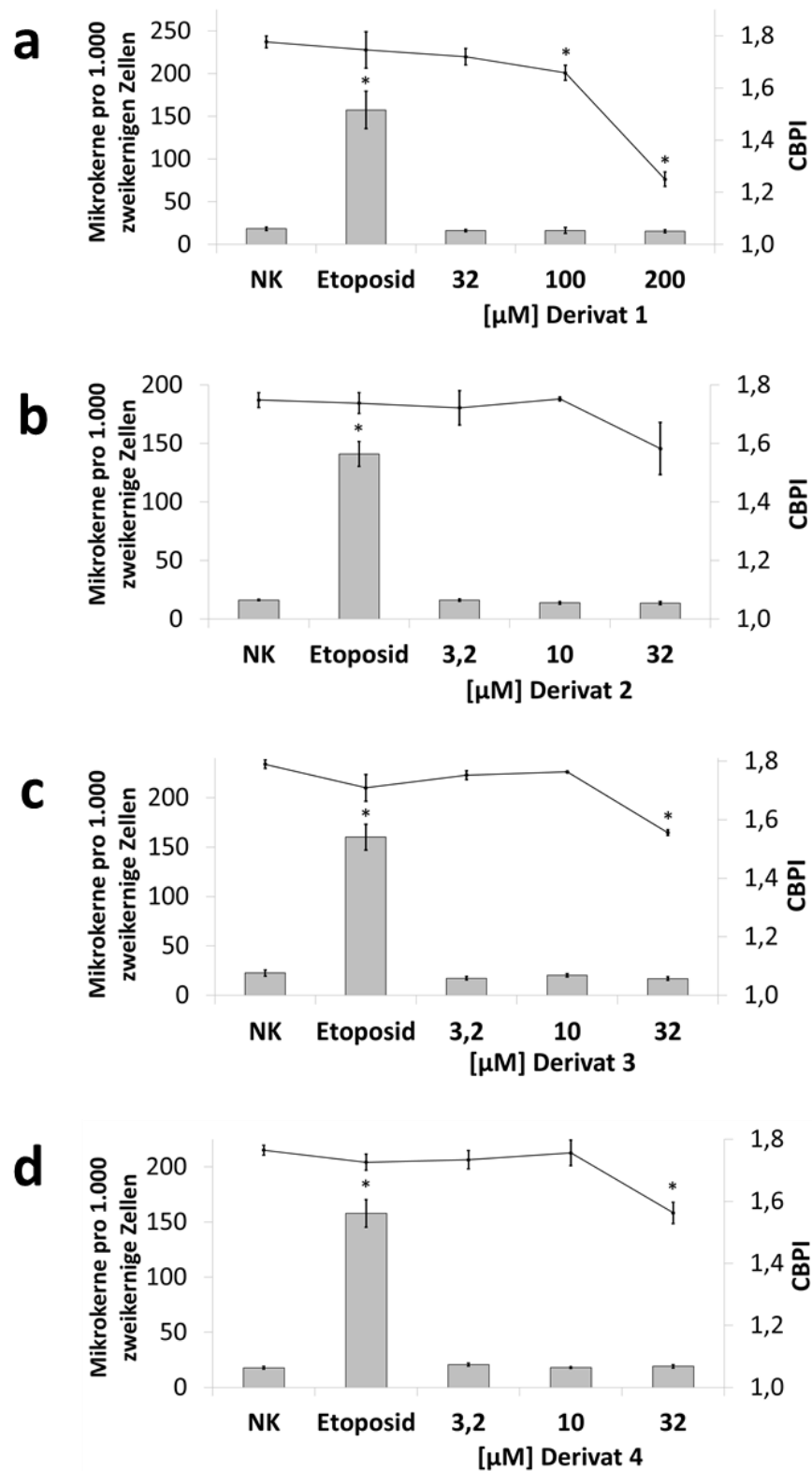


Abb. 45. Zytokinese-Block Mikrokerntest in HeLa-H2B-GFP-Zellen nach Behandlung mit (A) Derivat 1, (B) Derivat 2, (C) Derivat 3 und (D) Derivat 4. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Versuchen \pm Standardfehler der Mikrokernhäufigkeit von 1.000 zweikernigen Zellen (grauer Balken) und CBPI (schwarze Linie). Sternchen markiert $p \leq 0,05$ im Vergleich zu NK (Mann-Whitney-U-Test). Als Positivkontrolle wurde 1 $\mu\text{g/ml}$ Etoposid verwendet.

Behandlung mit Celecoxib zeigte im Vergleich zur Kontrolle keine Erhöhung der Mikrokernhäufigkeit bis zu einer Dosis von 75 μM (Abb. 44). Weiterhin waren nach Behandlung von 100 μM Celecoxib die meisten Zellen nicht mehr vital, weswegen eine Auswertung unmöglich wurde (Daten nicht gezeigt für alle getesteten nicht-vitalen Bedingungen). Zudem war schon nach Celecoxibbehandlung mit 75 μM ein signifikanter Proliferationsrückgang zu beobachten. Nach Behandlung mit Derivat 1 war kein Anstieg der Mikrokernhäufigkeit bis zur maximal auswertbaren Dosis von 200 μM zu beobachten (Abb. 45a). Die Proliferation war bei dieser Dosis schon stark und signifikant eingeschränkt, wobei bereits nach Behandlung mit 100 μM Derivat 1 ein signifikanter Rückgang sichtbar wurde, während nach 300 μM Behandlung mit Derivat 1 keine lebenden Zellen für die Auswertung verblieben. Auch für Derivat 2-4 war keine Erhöhung der Mikrokernhäufigkeit nach Behandlung mit bis zu 32 μM Substanz festzustellen, während Zellen, die mit 100 μM oder mehr behandelt wurden, nicht auswertbar waren (Abb. 45b-d). Exposition mit 32 μM Derivat 3 und 4 führte zu einem signifikanten Rückgang der Proliferation (Abb. 45c/d).

4.5 Mikrokerntest in Mundschleimhautzellen von zwei großen Kohorten mit und ohne neurodegenerative Erkrankungen

Der Einfluss von neurodegenerativen Erkrankungen und weiteren Faktoren auf das Cytom von Mundschleimhautzellen zweier großer Kohorten wurde in den folgenden Kapiteln untersucht. Von den 329 Teilnehmern der Referenzgruppe ohne schwere neurologische Erkrankungen hatten 43 zum Zeitpunkt der Probenentnahme eine LKB und 32 waren depressiv (Tabelle 3). 14 von 327 Teilnehmern mit bekannter MMSE hatten einen MMSE-Wert <27 . Die Geschlechterverteilung war fast ausgeglichen (168 weibliche und 161 männliche Teilnehmer), was auch für die Patientengruppe galt (51 weibliche und 44 männliche Patienten, Tabelle 4).

Tabelle 3. Beschreibung der Referenzgruppe basierend auf den Angaben bei der Probenentnahme.

	Referenzgruppe		
Anzahl	329		
Mittleres Alter	76,33		
Geschlecht	weiblich 168	männlich 161	
BMI	normal 133	prä-adipös 142	adipös 49
Rauchverhalten	Nichtraucher 251	Raucher 77	
Alkoholkonsum	Kein Alkoholkonsum 214	Alkoholkonsum 113	
Geistiger Zustand	Gesund 249	LKB 43	Depression 32
Krebserkrankung	Kein Krebs 281	Krebs 44	
MMSE	MMSE \geq 27 314	MMSE $<$ 27 14	

In der Patientengruppe war der Anteil mit MMSE, die einen Wert unter 27 hatten, erhöht (43 von 78 Patienten mit bekanntem MMSE-Wert). Weitere Informationen zu allen Probanden, denen Mundschleimhautzellen entnommen wurden, finden sich in Tabelle 1 und 2.

Tabelle 4. Beschreibung der Patientengruppe basierend auf den Angaben bei der Probenentnahme.

Patientengruppe					
Anzahl	Mittleres Alter	Geschlecht		MMSE	
96	73,24	Weiblich	Männlich	MMSE \geq 27	MMSE $<$ 27
		51	44	35	43

4.5.1 Vergleich von Referenz- und Patientengruppe

Beide Kohorten zeigten bei den Parametern Mikrokernen sowie mikrokernhaltige, karyolytische und einkernige Zellen sehr ähnliche Ergebnisse (Abb. 46a/b/d/e). Kleine Unterschiede ließen sich bei der Häufigkeit von zweikernigen Zellen (Abb. 46c, reduziert in Patientengruppe) sowie bei karyorrhektischen und Zellen mit kondensiertem Chromatin beobachten (Abb. 46f, erhöht in Referenzgruppe).

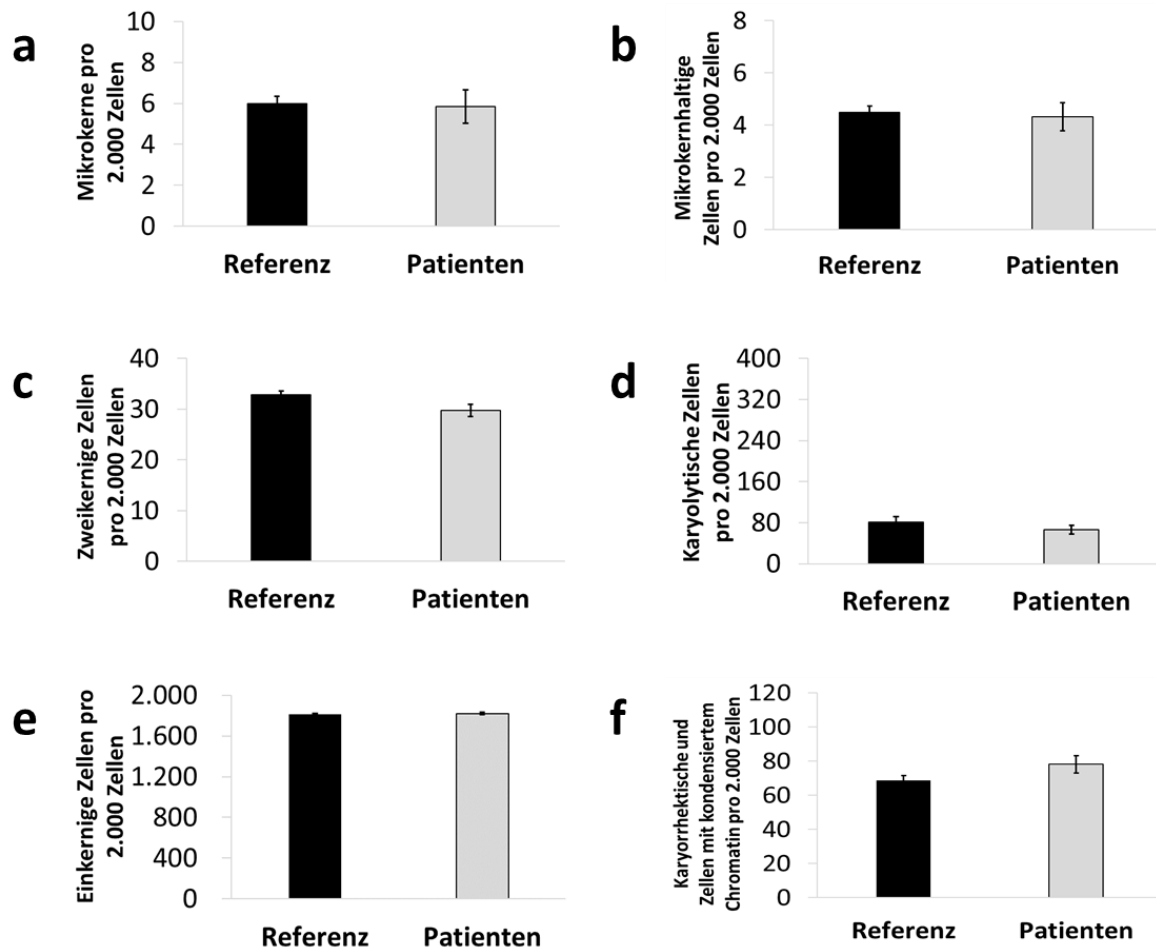


Abb. 46. Vergleich von Referenz- und Patientengruppe. Dargestellt ist die Rate an (a) Mikrokernen, (b) mikrokernhaltigen Zellen, (c) zweikernigen, (d) karyolytischen, (e) einkernigen und (f) karyorrhettischen sowie Zellen mit kondensiertem Chromatin pro 2.000 Mundschleimhautzellen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. n (Referenzgruppe): 329, n (Patientengruppe): 96.

Ähnlich sieht es aus, wenn man beide Kohorten nach Geschlecht unterteilt. Hier konnte man nur einen zwar kleinen aber signifikanten Anstieg in der Anzahl der einkernigen Zellen bei Patientinnen im Vergleich zur Referenzgruppe beobachten (Abb. 47e). Bei allen anderen Parametern ließen sich keine Veränderungen zwischen beiden Kohorten feststellen (Abb. 47a/b/c/d/f). Wenn man mögliche Geschlechtsunterschiede betrachtet, fällt auf, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen Männern und Frauen festgestellt werden konnten, jedoch bei Männern in der Referenzgruppe leicht weniger Mikrokerne und mikrokernhaltige Zellen beobachtet wurden (Abb. 47a/b), während die Häufigkeit von karyolytischen sowie karyorrhettischen und Zellen mit kondensiertem Chromatin erhöht war (Abb. 47d/f).

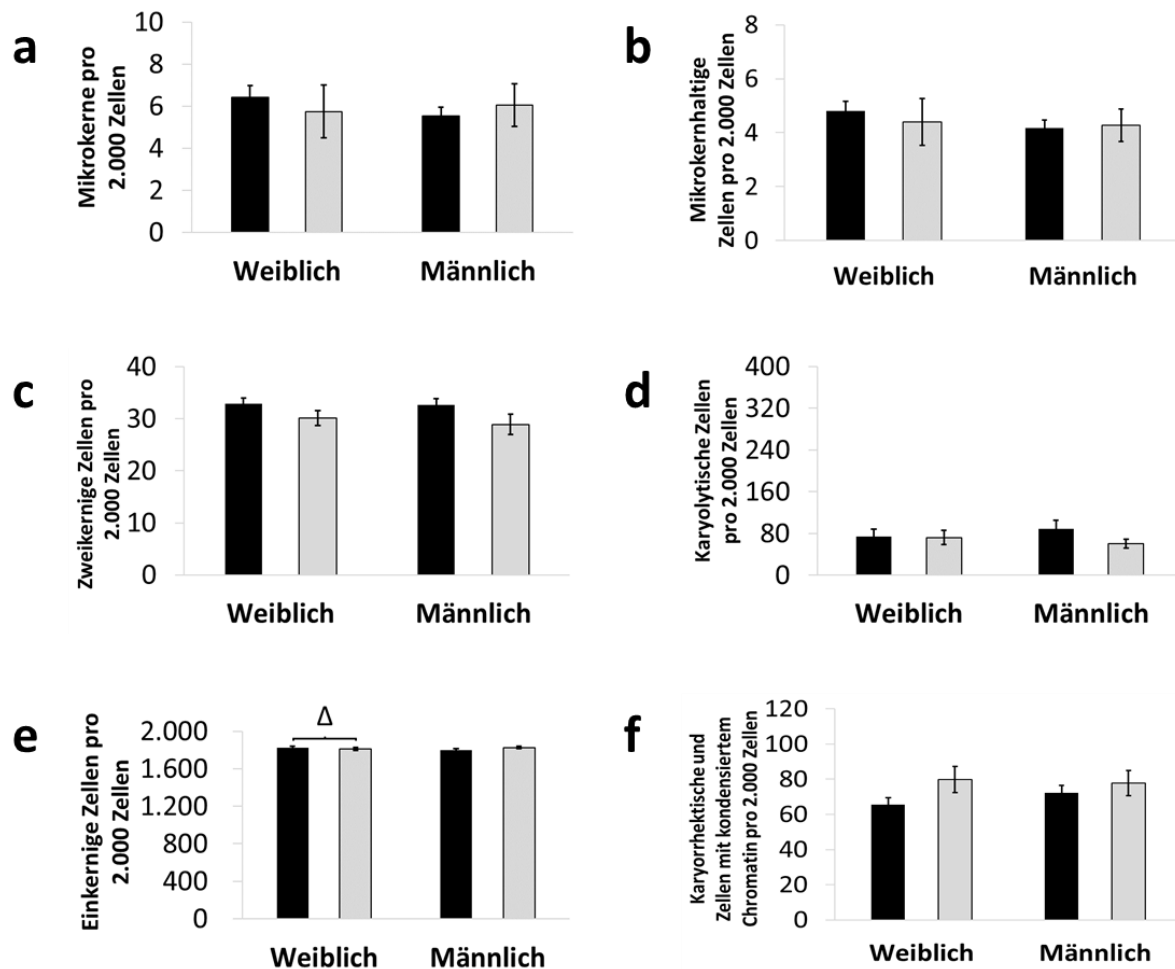


Abb. 47. Geschlecht von Referenz- und Patientengruppe. Dargestellt ist die Rate an (a) Mikrokerneln, (b) mikrokernhaltigen Zellen, (c) zweikernigen, (d) karyolytischen, (e) einkernigen und (f) karyorrhettischen sowie Zellen mit kondensiertem Chromatin pro 2.000 Mundschleimhautzellen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler von Referenz- (schwarzer Balken) und Patientengruppe (grauer Balken). n (Referenzgruppe, weiblich): 168, n (Referenzgruppe, männlich): 161. n (Patientengruppe, weiblich): 51, n (Patientengruppe, männlich): 44. Delta markiert $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Referenzgruppe (Mann-Whitney-U-Test).

Mehr Veränderungen wurden sichtbar, wenn die Kohorten bezüglich ihres Ergebnisses in der MMSE unterschieden wurden, wobei hier ein Testwert von 27 als Schwellenwert gewählt wurde. Sowohl die Häufigkeit von Mikrokerneln wie von mikrokernhaltigen Zellen in Proben aus Referenz- wie Patientengruppe mit einem MMSE-Wert <27 war erhöht (Abb. 48a/b). Innerhalb der Referenzgruppe zeigte sich eine erhöhte Anzahl zweikerniger Zellen bei Teilnehmern mit MMSE-Wert <27 verglichen mit jenen Teilnehmern, die einen höheren Wert hatten (Abb. 48c). Weiterhin konnte zwischen diesen beiden Subgruppen, aber nicht innerhalb der Patientengruppe, ein signifikanter Anstieg in der Frequenz von karyolytischen Zellen beobachtet werden (Abb. 48d). Ein kleiner, nicht signifikanter Rückgang in der Häufigkeit einkerniger Zellen wurde bei Patienten mit einem MMSE-Wert <27 im

4 Ergebnis

Vergleich zu Patienten mit höherem MMSE-Wert wie auch mit der Referenzgruppe unabhängig vom MMSE-Ergebnis festgestellt (Abb. 48e). Hingegen war die Rate an karyorrhektischen und Zellen mit kondensiertem Chromatin in Patienten mit MMSE-Wert ≥ 27 im Vergleich zu Patienten mit kleinem MMSE-Testergebnis wie zur Referenzgruppe erhöht (Abb. 48f).

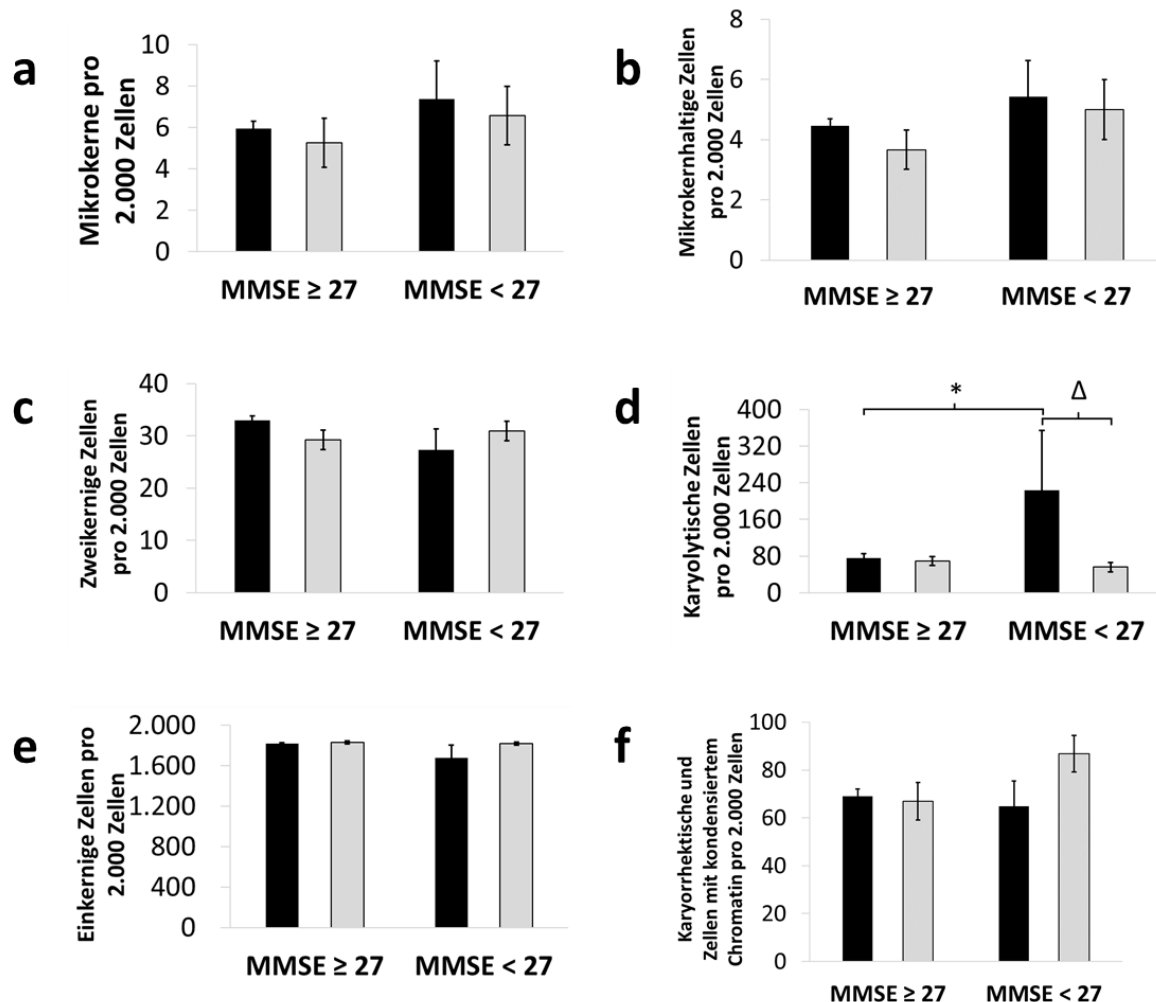


Abb. 48. MMSE-Werte von Referenz- und Patientengruppe. Dargestellt ist die Rate an (a) Mikrokernen, (b) mikrokernhaltigen Zellen, (c) zweikernigen, (d) karyolytischen, (e) einkernigen und (f) karyorrhektischen sowie Zellen mit kondensiertem Chromatin pro 2.000 Mundschleimhautzellen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler von Referenz- (schwarzer Balken) und Patientengruppe (grauer Balken). n (Referenzgruppe, MMSE ≥ 27): 314, n (Referenzgruppe, MMSE<27): 14. n (Patientengruppe, MMSE ≥ 35): 35, n (Patientengruppe, MMSE<27): 43. Sternchen markiert $p \leq 0,05$ im Vergleich zu MMSE ≥ 27 . Delta markiert $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Referenzgruppe (Mann-Whitney-U-Test).

4.5.2 Untersuchung von möglichen Einflussfaktoren der Referenzgruppe

Mögliche Einflussfaktoren der Teilnehmer der Referenzgruppe wurden untersucht und analysiert. Bei adipösen Teilnehmern (BMI >30) wurde ein nicht-signifikanter Anstieg der Anzahl von Mikrokernen und mikrokernhaltigen Zellen im Vergleich zu Individuen mit normalem BMI von 20-25 festgestellt (Abb. 49a/b). Allerdings waren keine Unterschiede erkennbar, wenn zwei-, einkernige oder karyorrhektische und Zellen mit kondensiertem Chromatin betrachtet wurden (Abb. 49c/e/f). Hingegen war ein signifikanter Anstieg bei der Häufigkeit von karyolytischen Zellen von prä-adipösen (BMI: 26-30) und adipösen Teilnehmern zu beobachten (Abb. 49d).

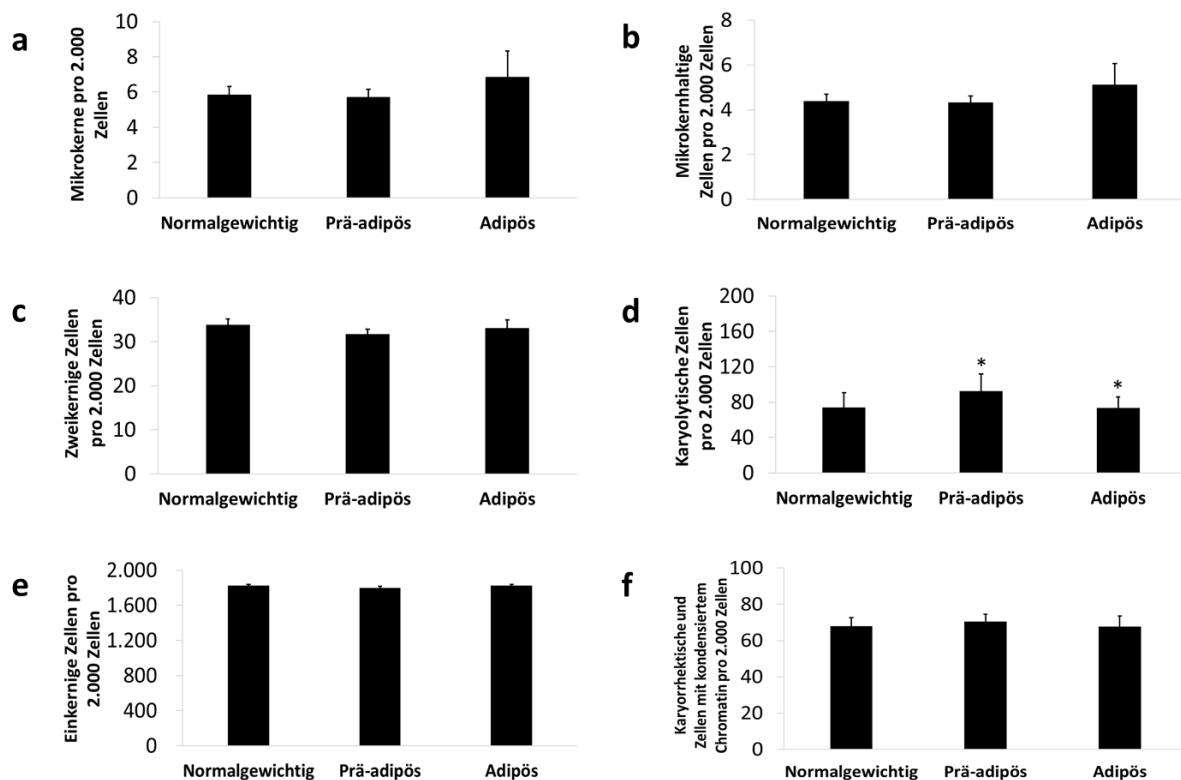


Abb. 49. BMI-Werte in Referenzgruppe. Dargestellt ist die Rate an (a) Mikrokernen, (b) mikrokernhaltigen Zellen, (c) zweikernigen, (d) karyolytischen, (e) einkernigen und (f) karyorrhektischen sowie Zellen mit kondensiertem Chromatin pro 2.000 Mundschleimhautzellen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. n (normalgewicht): 134, n (prä-adipös): 142, n (adipös): 49). Sternchen markiert $p \leq 0,05$ im Vergleich zur normalgewichtigen Gruppe (Mann-Whitney-U-Test).

Interessanterweise wurde bei der Untersuchung des Rauchverhaltens der Teilnehmer kein Anstieg bei Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern bei der Häufigkeit von Mikrokernen und mikrokernhaltigen Zellen festgestellt, sondern im Gegenteil sogar ein Rückgang beobachtet (Abb. 50a/b). Bei karyolytischen sowie karyorrhektischen und

4 Ergebnis

Zellen mit kondensiertem Chromatin wurden ein signifikanter Rückgang in der Rauchergruppe detektiert (Abb. 50d/f). Ein statistisch signifikanter Rückgang in der Anzahl zweikerniger verbunden mit einem Anstieg einkerniger Zellen wurde in Mundschleimhautzellen von Rauchern beobachtet (Abb. 50c/e).

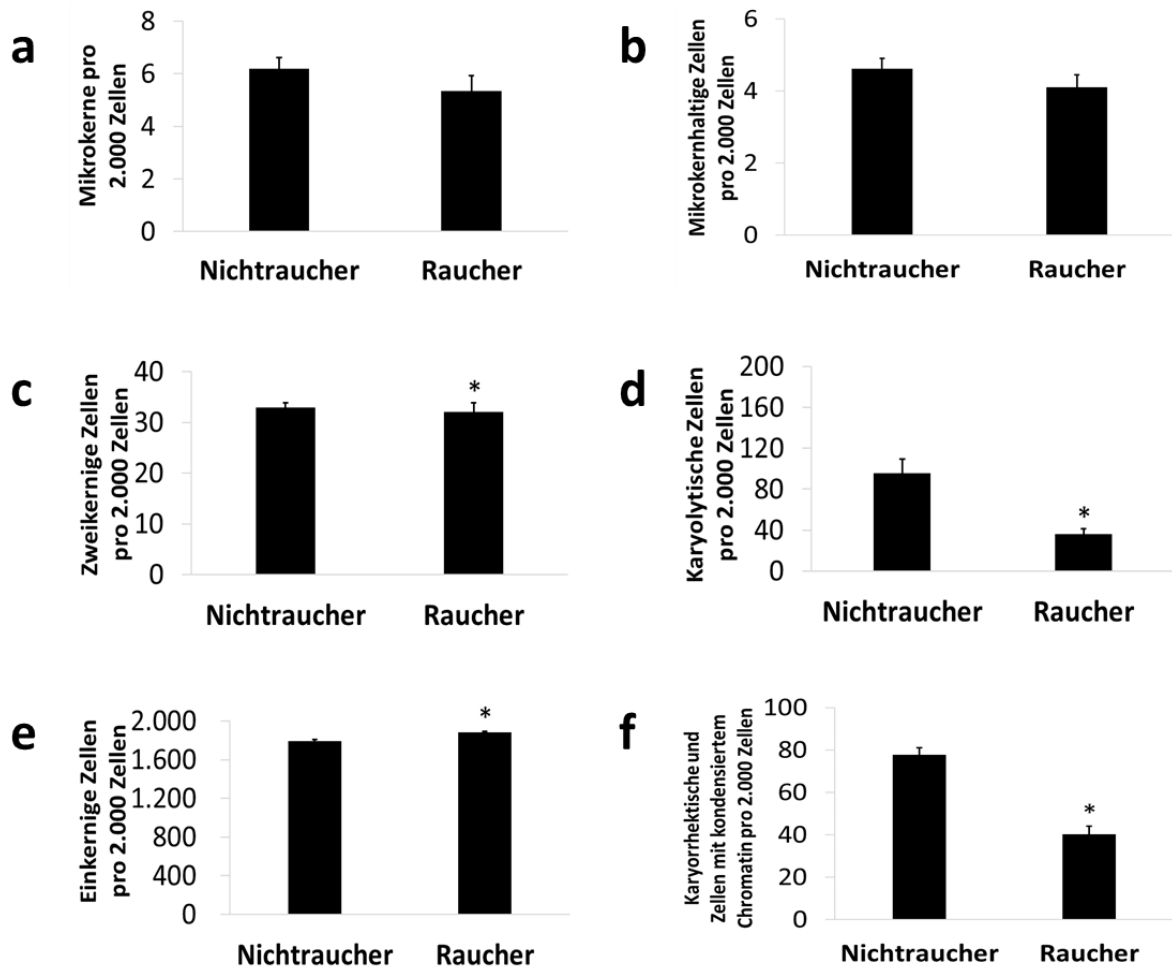


Abb. 50. Rauchverhalten in Referenzgruppe. Dargestellt ist die Rate an (a) Mikrokerneln, (b) mikrokernhaltigen Zellen, (c) zweikernigen, (d) karyolytischen, (e) einkernigen und (f) karyorrhaktischen sowie Zellen mit kondensiertem Chromatin pro 2.000 Mundschleimhautzellen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. n (Nichtraucher): 251, n (Rauchverhalten): 77. Sternchen markiert $p \leq 0,05$ im Vergleich zu Nichtrauchern (Mann-Whitney-U-Test).

Alkoholkonsum hat zu einem signifikanten Rückgang bei der Häufigkeit von Mikrokerneln, mikrokernhaltigen Zellen und allen anderen Parametern geführt (Abb. 51a/b/c/d/f), wobei einkernige Zellen eine Ausnahme bildeten, die in Proben von alkoholkonsumierenden Teilnehmern signifikant erhöht waren (Abb. 51e).

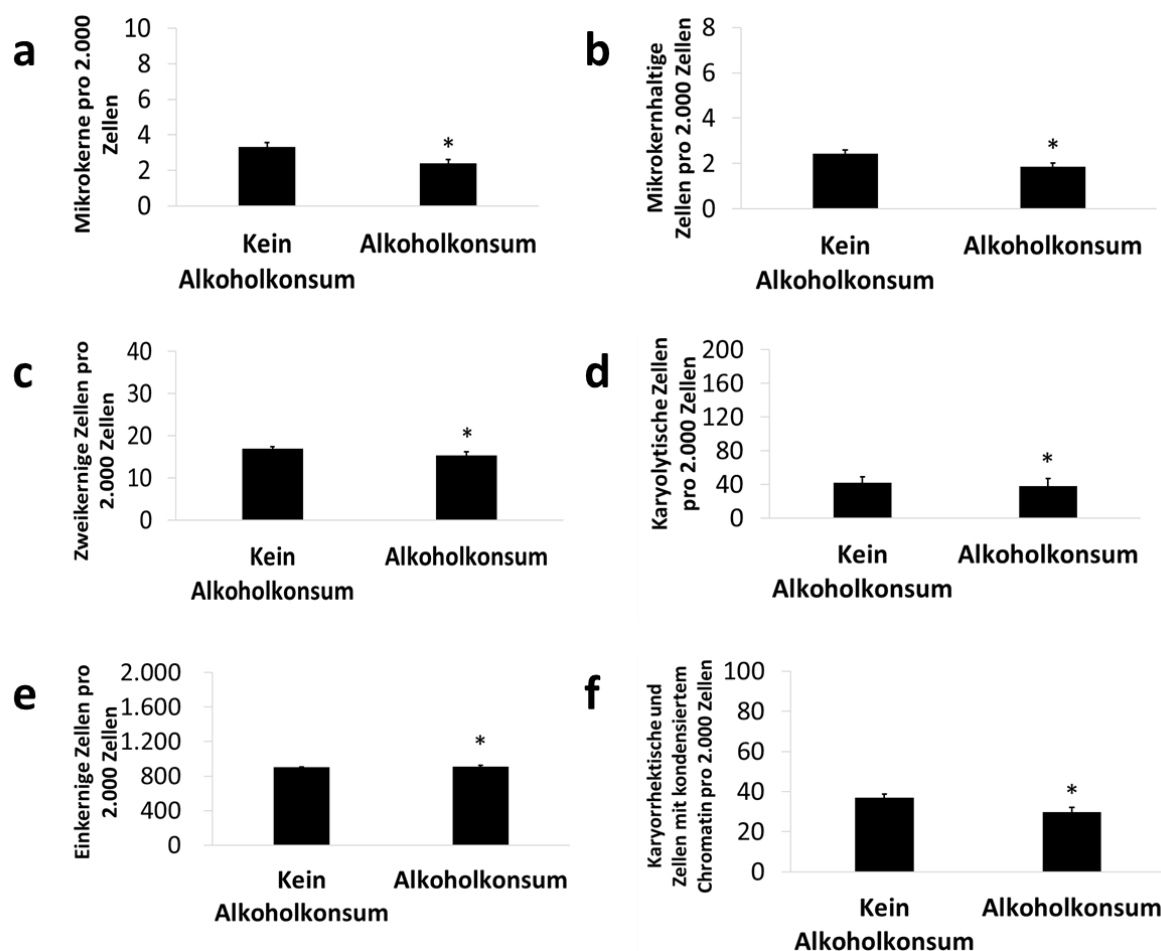


Abb. 51. Alkoholkonsum in Referenzgruppe. Dargestellt ist die Rate an (a) Mikrokernen, (b) mikrokernhaltigen Zellen, (c) zweikernigen, (d) karyolytischen, (e) einkernigen und (f) karyorrhettischen sowie Zellen mit kondensiertem Chromatin pro 2.000 Mundschleimhautzellen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. n (Kein Alkoholkonsum): 214, n (Alkoholkonsum): 113. Sternchen markiert $p < 0,05$ im Vergleich zur Gruppe ohne Alkoholkonsum (Mann-Whitney-U-Test).

In Teilnehmern der Referenzgruppe, die an Depression litten, wurden signifikant weniger Mikrokern und mikrokernhaltige Zellen gezählt, wobei es bei diesen beiden Parametern nur zu geringen Veränderungen in Verbindung mit LKB gekommen ist (Abb. 52a/b). Ein geringer Rückgang im Vergleich zu gesunden Teilnehmern wurde bei der Häufigkeit von zweikernigen Zellen in Teilnehmern mit Depression oder LKB festgestellt (Abb. 52c). Zusätzlich war in diese Gruppen auch die Häufigkeit karyolytischer Zellen erhöht (Abb. 52d), wohingegen für einkernige sowie für karyorrhettische und Zellen mit kondensiertem Chromatin keine Unterschiede festzustellen waren (Abb. 52e/f).

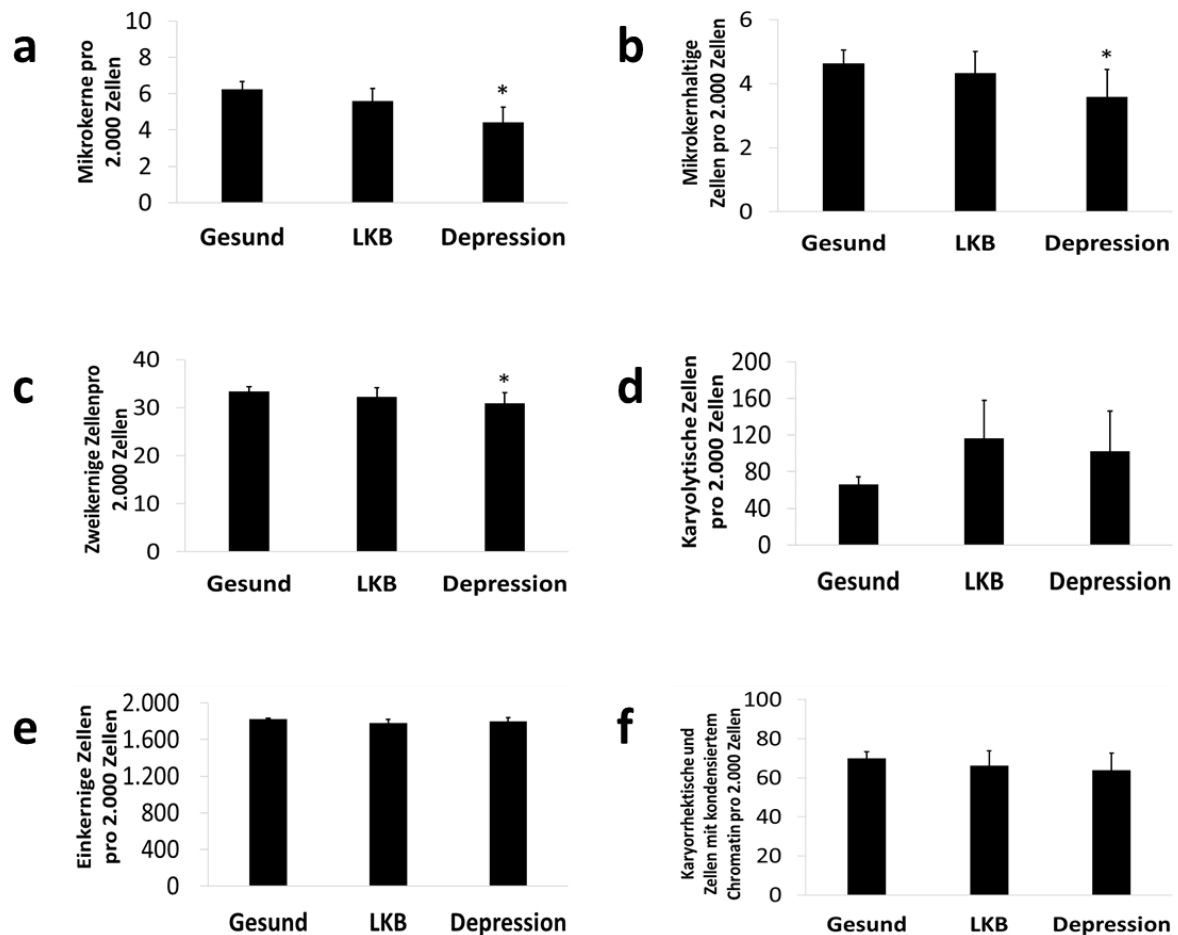


Abb. 52. Geistiger Zustand in Referenzgruppe. Dargestellt ist die Rate an (a) Mikrokernen, (b) mikrokernhaltigen Zellen, (c) zweikernigen, (d) karyolytischen, (e) einkernigen und (f) karyorrhektischen sowie Zellen mit kondensiertem Chromatin pro 2.000 Mundschleimhautzellen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. n (Gesund): 249, n (LKB): 43, n (Depression): 32. Sternchen markiert $p \leq 0,05$ im Vergleich zu Gesunden (Mann-Whitney-U-Test).

Die Anzahl beobachteter Mikrokern und mikrokernhaltiger Zellen in Mundschleimhautzellen von Teilnehmern, die an Krebs erkrankt waren, war im Vergleich zu gesunden Teilnehmern erniedrigt (Abb. 53a/b). Hierbei handelte es sich um ein breites Spektrum an Krebserkrankungen, an denen die Betroffenen litten. Weiterhin wurden weniger karyolytische sowie karyorrhektische und Zellen mit kondensiertem Chromatin in Proben von an Krebs erkrankten Teilnehmern beobachtet (Abb. 53d/f), während die Häufigkeit von zweikernigen Zellen leicht anstieg (Abb. 53c). Nur bei der Häufigkeit von zweikernigen Zellen wurden keine Veränderungen festgestellt (Abb. 53e).

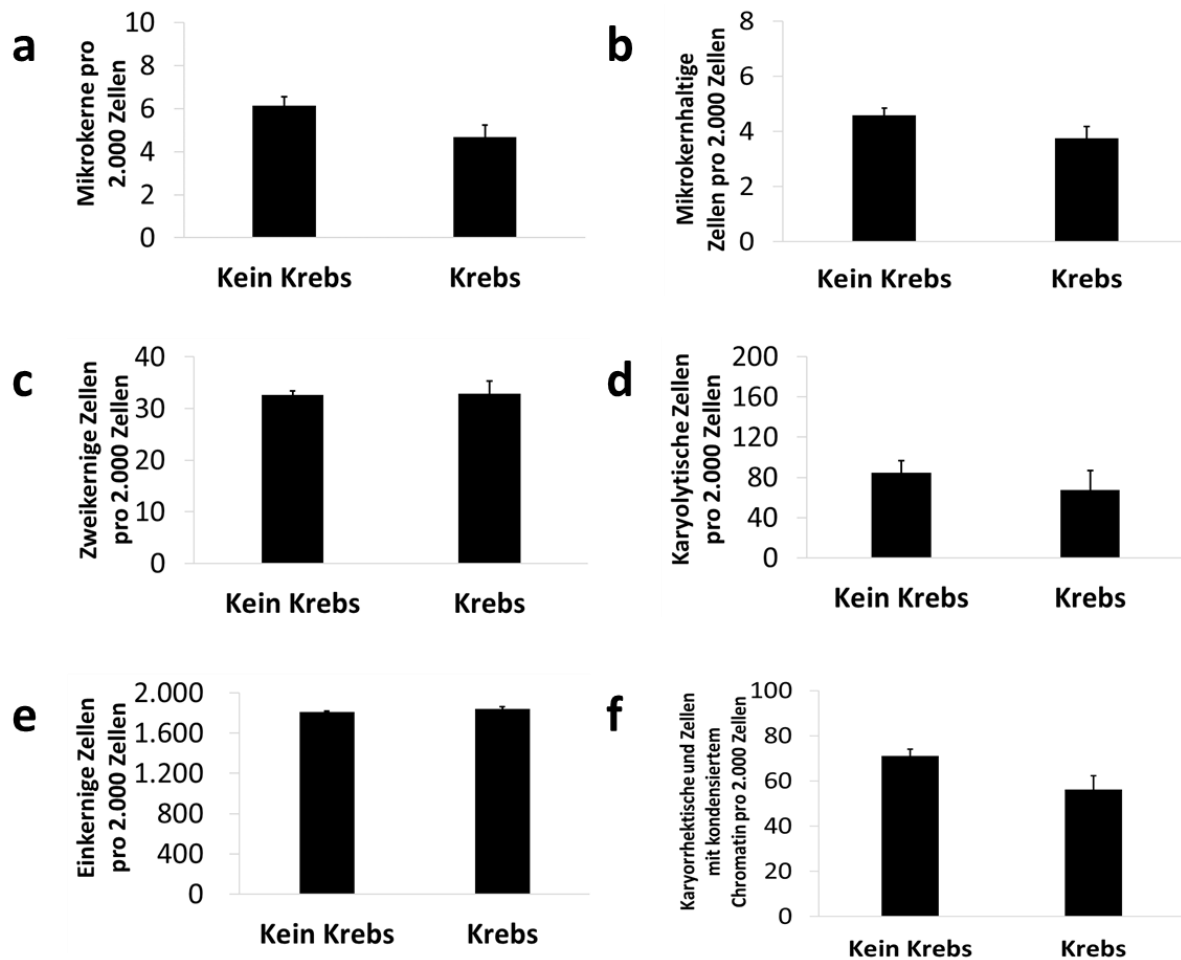


Abb. 53. Krebserkrankungen in Referenzgruppe. Dargestellt ist die Rate an (a) Mikrokerne, (b) mikrokernhaltigen Zellen, (c) zweikernigen, (d) karyolytischen, (e) einkernigen und (f) karyorrhektischen sowie Zellen mit kondensiertem Chromatin pro 2.000 Mundschleimhautzellen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. n (Kein Krebs): 281, n (Krebs): 44. Sternchen markiert $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Gruppe ohne Krebserkrankung (Mann-Whitney-U-Test).

4.5.3 Lokalisierung von Mikrokerne in Mundschleimhautzellen

Zusätzlich zu den vorherigen Untersuchungen wurde die Lokalisation von Mikrokerne in Mundschleimhautzellen bewertet. Hierbei zeigte sich, dass sich durchschnittlich in einer Mundschleimhautzelle 1,5 Mikrokerne sehr nahe am Zellkern befinden, während zusätzlich mit 2,4 Mikrokerne die Mehrheit zumindest mit einem gewissen Abstand in der Nähe des Kerns gefunden wurden, was im Vergleich zu der Gruppe der Mikrokerne, die nicht zuzuordnen waren, eine signifikante Erhöhung darstellte (Abb. 54). Durchschnittlich 1,7 Mikrokerne konnten auf Grund ihrer Position weder Zellkern noch Plasmamembran zugeordnet werden, während mit 0,3 und 0,03

Mikrokernen pro Mundschleimhautzelle statistisch signifikant weniger Mikrokerne in der Nähe bzw. sehr nahe an der Plasmamembran gefunden wurden.

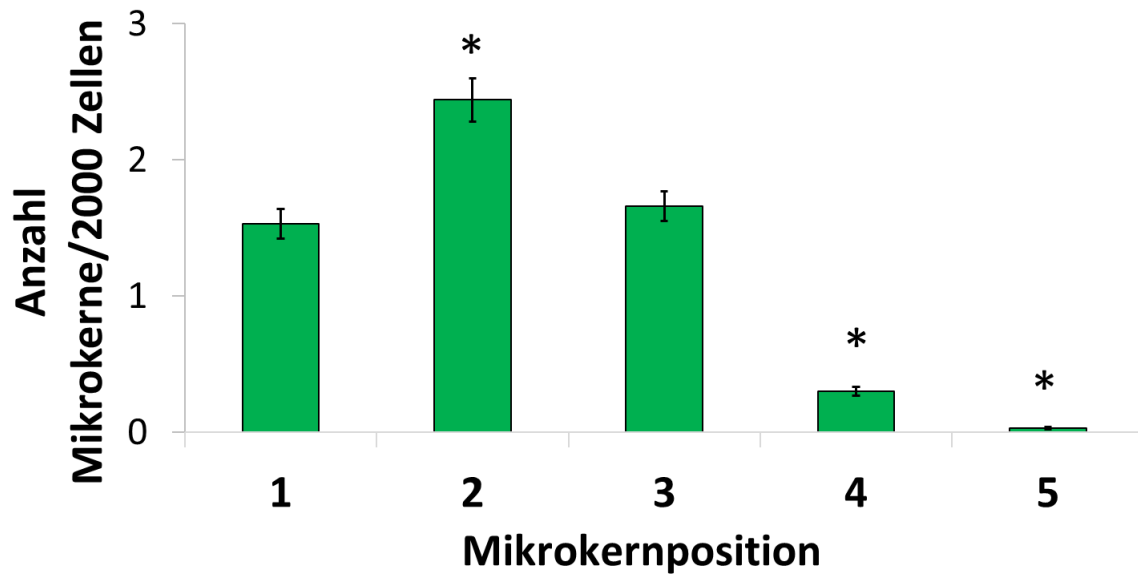


Abb. 54. Lokalisation von Mikrokernen in Mundschleimhautzellen nach Auswertung aller Proben als durchschnittliche Anzahl Mikrokerne pro Zelle. 1=sehr nahe am Zellkern, 2=Nähe zum Kern aber Abstand erkennbar, 3=keine Zuordnung möglich, 4=Nähe zur Plasmamembran aber Abstand erkennbar, 5=sehr nahe an Plasmamembran. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler aus 425 Proben. Sternchen markiert $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Lokalisierung 3 (Mann-Whitney-U-Test).

5 Diskussion

5.1 Mikrokernschicksal und die Bedeutung für die Kanzerogenese

5.1.1 Relevanz der beobachteten Ergebnisse

Mittels Langzeit-Lebendzellmikroskopie sollte in dieser Arbeit untersucht werden, wie sich Mikrokerne und mikrokernhaltige Zellen über einen längeren Zeitraum entwickeln. Einer der zentralen Parameter für die Beurteilung der langfristigen Entwicklung ist die Mitoserate. So erreichte die Mitoserate in mikrokernhaltigen Zellen zwar nie die Werte von mikrokernfreien Zellen, aber vor allem nach niedrigdosierter Behandlung wurden kaum Effekte durch die Behandlung sichtbar, während auch nach den höchsten Dosen zumindest kein weiterer Rückgang der Mitoserate bei F2 und F3 beobachtet wurde oder sogar wieder eine leichte Erhöhung festzustellen war. Es gibt einige Studien, in denen zumindest die erste bis maximal die zweite Mitose nach Mikrokerninduktion beobachtet wurde, auch wenn keine genauere Charakterisierung der Mitosen durchgeführt wurde [44, 47, 49, 55, 62]. In dieser Arbeit konnte nun erstmal gezeigt werden, zu welchem Anteil Mitosen auch nach mehreren Zellzyklen in Abhängigkeit von der Behandlung noch stattfinden, sodass auf diese Weise auch mikrokernhaltige Zellen und ihre Tochterzellen proliferieren können. Im Gegensatz zu den hier verwendeten Zellmodell, wurden in mikrokernhaltigen Mäuseembryozellen keine Veränderungen der Mitosen oder der Zellzykluskinetik auch nach mehreren Zyklen beobachtet [54].

In HeLa-H2B-GFP-Zellen hingegen wurde eine verlängerte Dauer von Mitose wie Interphase im Vergleich zu mikrokernfreien Zellen festgestellt, der bei der Interphase behandlungsabhängig bis zu mehreren Stunden betragen konnte, sich aber innerhalb einiger Zellzyklen wieder mikrokernfreien Zellen angenähert hat. In einer anderen Studie in HeLa-CENP B-GFP-H2B-mCherry-Zellen wurde auch eine Erhöhung der Mitosedauer gefunden, die in Zellen mit Kinetochor-positiven Mikrokernen zu einer

Erhöhung der Mitosedauer um 28,8 % geführt hat, wobei in Zellen mit Kinetochor-negativen Mikrokernen nur ein schwacher Anstieg zu beobachten war [56]. Eine andere Studie in verschiedenen bestrahlten CNE-Zelllinien fand heraus, dass die Dauer des gesamten Zellzyklus in beiden untersuchten Zelllinien in mikrokernhaltigen Zellen signifikant erhöht war, während in HeLa-H2B-GFP-Zellen analog zu dieser Studie die durchschnittliche Interphasedauer von 20 auf über 30 h und die Mitose von 1 auf 1,75 h erhöht war [51, 52].

Die Häufigkeit äußerlich inaktiver Zellen, die einen Hinweis auf Zellarrest bieten könnten, ist in mikrokernhaltigen Zellen und ihren Tochterzellen erhöht. Auch dies wurde nach Bestrahlung in CNE-Zellen untersucht, und ein Anstieg an arretierenden Zellen von 2,2 bzw. 5,9 % in mikrokernfreien auf 9 bzw. 10,2 % in mikrokernhaltigen Zellen [52]. In Mäuseembryozellen wurde keine Erhöhung der Zellarrestrate festgestellt [54]. Genaue Erklärungen für die Verbindung zwischen Mikrokernen und Zellarrest sind noch nicht gefunden, aber eine Rolle von p53-abhängigen Zellzykluskontrollpunkten ist naheliegend. Zusätzlich wurde spekuliert, ob arretierende mikrokernhaltige Zellen immunmodulierende Zytokine, Chemokine und Proteasen sekretieren, was in anderen arretierenden Zellen beschrieben und als Seneszenz-assoziiierter sekretorischer Phänotyp bekannt geworden ist [120]. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich ein Teil der mikrokernhaltigen Zellen weiter teilen können, auch wenn diese Teilung zu Beginn nur verzögert abläuft. Nach einigen Zellteilungen gibt es Hinweise auf eine Art Adaption, sodass sich die Zellzyklusverzögerungen mit zunehmender Zeit wieder reduzieren. Dies könnte auch mit der beobachteten Abnahme des Anteils der mikrokernhaltigen Zellen mit zunehmenden Generationen zusammenhängen, sodass zu stark geschädigte Zellen aussortiert werden könnten. Hingegen wird durch die vor allem in mikrokernhaltigen Zellen beobachtete Mitose mit zwei Kernen in einer wahrscheinlich binukleären Zelle, weitere chromosomale Instabilität erzeugt und verbreitet. Aber auch die Erzeugung von tri-, tetra oder multinukleären mikrokernhaltigen Zellen nach einer wahrscheinlich multipolaren Mitose kann zu Instabilitäten führen und die Tumorzellentstehung begünstigen [121, 122].

Persistenz von Mikrokernen war eines der am häufigsten beobachteten Schicksale von Mikrokernen, was in Übereinstimmung mit Ergebnissen aus Studien in

CNE-Zellen, HeLa-Zellen oder Mäuseembryozellen ist [51, 52, 54]. HeLa-Zellen mit Kinetochor-negativen Mikrokernen produzierten meistens auch Tochterzellen mit derartigen Mikrokernen, genauso, wenn auch in geringerem Maße, Zellen mit Kinetochor-positiven Mikrokernen, was auf eine Persistenz von Mikrokernen über die Mitose hindeutet [56]. Lebendzellversuche mit photokonvertiblem Chromatin in U2OS-Zellen nach Nocodazolbehandlung kam zu dem Ergebnis, dass 62 % der Mikrokerne persistieren und damit etwas weniger als in dieser Arbeit [62]. Untersuchung der Persistenz in zwei aufeinanderfolgenden Mitosen in RPE1-Zellen kam mit Raten von 73,4 und 74,8 % persistierender Mikrokernen hingegen auf ähnliche Werte [55]. Im Gegensatz dazu hat eine Studie in HCT116-Zellen nur in 3 % der Mikrokerne Persistenz zeigen können [53]. Dennoch scheint Persistenz von Mikrokernen über die Mitose hinaus in den meisten untersuchten Zellen eines der wichtigsten Schicksale von Mikrokernen darzustellen, wobei es noch weiterer Untersuchungen bedarf, was genau mit dem Mikrokern bzw. dessen Inhalt während der Mitose passiert (Abb. 55a). Ein methodisches Problem in dieser Studie bestand in der Nichtunterscheidbarkeit von Mikrokern- und Hauptkern-DNA während der Mitose, da die DNA jeweils gleich gefärbt war und nur auf Grund ihrer Größe und Lokalisation unterschieden werden konnten. Da es keine mikrokernspezifischen Proteine gibt, ist auch eine spezifische Färbung des Mikrokerns über Antikörper oder Reportergene nicht ohne weiteres möglich. Ein möglicher Ansatz bietet das lac-Operon, welches nur in ein Chromosom in Zellen integriert wurde, welche ein GFP-lac-Repressor-Fusionsprotein exprimieren. Wird ein Mikrokern aus diesem Chromosom gebildet, ist eine spezifische Verfolgung möglich [53]. Eine weitere Methode nutzt ein Reportergen, welches als Fluorophor ein photokonvertibles Protein wie z. B. Dendra2 nutzt: Dieses im Grundzustand grün emittierende Protein wird bei Bestrahlung mit UV- oder blauem Licht so verändert, dass es im roten Spektrum emittiert. Dies wurde genutzt, um gebildete Mikrokerne spezifisch zu markieren, sodass nur der Mikrokerninhalt ein rotes Signal abgibt und auch während der Mitose erkennbar bleibt [55]. Ein Nachteil ist der höhere Aufwand, einzelne Mikrokerne zu markieren und die zusätzliche notwendige technische Ausstattung. Auch ist es anspruchsvoll, eine effiziente Konversion durchzuführen, ohne die Zellen durch die Strahlung zu schädigen oder das Fluorophor auszubleichen (eigene Beobachtungen).

Apoptoseinduktion durch Mikrokerne ist experimentell schwierig zu untersuchen. In dieser Arbeit wurde in mikrokernhaltigen Zellen und ihren Tochterzellen abhängig von der Behandlung und Generation in bis zu 33 % aller Zellen einer Generation Zelltod beobachtet, wobei ab Generation F3 ein gewisser Trend zur Stabilisierung oder sogar Reduktion der Zelltodrate erkennbar war. Weiterhin wurden fast ausschließlich in mikrokernhaltigen Zellen der Zelltod während der Mitose beobachtet. Im Vergleich hierzu wurde Zelltod in der Interphase bzw. während der Mitose in verschiedenen CNE-Zelllinien nur in 12-13,8 % bzw. in 3,6-3,7 % aller mikrokernhaltigen Zellen beobachtet, wobei ähnlich zum Zellarrest der Zelltod je häufiger beobachtet wurde, je mehr Mikrokerne in der Zelle waren [52]. In einer anderen Lebendzellstudie wurde abhängig von der Behandlung Zelltod in 0,9 % der Zellen nach MMC-Behandlung, während nach Bestrahlung und Vincristinbehandlung 7,2 bzw. 6,7 % der Zellen gestorben sind, was auf eine starke Substanzabhängigkeit hinweist [57]. In HeLa-H2B-GFP-Zellen sind 16 von 53 untersuchten mikrokernhaltigen Zellen in die Apoptose gegangen, was einer ähnlichen Rate wie in dieser Arbeit entsprechen würde [51]. Die Wahrscheinlichkeit, Apoptose zu durchlaufen, stieg in HeLa-CENP B-GFP-H2B-mCherry-Zellen in mikrokernhaltigen Zellen, wobei Kinetochor-positive Mikrokerne häufiger apoptotisch wurden als negative (10,47 bzw. 7,48 % aller Zellen) [56]. Hingegen wurde in anderen Versuchen mit markieren einzelnen Chromosomen keine Unterschiede in der Zelltodrate gefunden [53]. Auch in mikrokernhaltigen PTK1-Zellen ohne Mikrokernmembranschäden zeigten sich maximal geringe Änderungen der Zelltodrate [123].

Trotz dieses in den meisten Zelllinien recht eindeutigen Zusammenhangs bleibt unklar, ob der Zelltod durch die Mikrokerne induziert wird oder durch die sonstigen Schädigungen der Zelle bedingt und die Mikrokernbildung nur ein Begleitprodukt waren. Auch wenn die Rolle von Caspasen für die Apoptose lang bekannt und gut untersucht sind, scheinen Caspasen für die Mikrokerninduktion verschiedene Rollen zu haben, die sich auch speziesspezifisch unterscheiden können [39, 41]. Um diesen Zusammenhang weiter zu untersuchen, könnten spezielle mikroskopische Versuche mit Lebendzellen durchgeführt werden: So könnten mikrokernhaltige Zellen, die mit einem Marker für DNA-Schäden (z. B. ein Reporterprotein fusioniert mit einer Komponente der *DNA damage repair* (DDR) wie ATM/ATR transfiziert worden sind, auf Grund des Grads ihrer DNA-Schäden in schwach und stark geschädigte Zellen

unterschieden werden. Wenn beide Gruppen keine Unterschiede bei der Zelltodrate zeigen, liegt die Ursache möglicherweise an der Mikrokernbildung selbst, gibt es Unterschiede, könnte das Ausmaß der DNA-Schäden ursächlich für den Zelltod sein.

Der Auswurf von Mikrokernen wurde in HeLa-H2B-GFP-Zellen unabhängig von der Behandlung sehr selten bis nie beobachtet. In Mundschleimhautzellen wurden nur selten Mikrokerne in der Nähe der Plasmamembran gefunden, sondern häufiger in der Nähe des Hauptkerns, was auf eine maximal seltene Extrusion hinweist. Dies ist im Widerspruch zu anderen Studien, die u. a. mit hohen Dosen Cytochalasin B mit einer gentoxischen Substanz oder nach geringen Dosen Hydroxyurea Extrusion beobachtet haben [31, 35]. Daher wurde versucht, die in diesen Studien verwendeten Behandlungen in HeLa-H2B-GFP-Zellen zu untersuchen. Jedoch konnte kein Einfluss auf die Extrusionshäufigkeit beobachtet werden. Auch die Hauptkerne haben keine morphologischen Auffälligkeiten gezeigt, obwohl durch die verwendete hohe Dosis an Cytochalasin B auch ein Auswurf des Hauptkerns hätte beobachtet werden können [31]. Möglicherweise findet ein Auswurf von Mikro- wie Hauptkern nur in speziellen Zellen statt, zum Beispiel in Erythrozyten. Hier gehört der Auswurfvorgang des Hauptkerns zum physiologischen Reifungsprozess und auch ein Mikrokernauswurf wurde hier schon beschrieben [32, 33]. Hydroxyurea wurde entweder für 72 h vor Aufnahmebeginn oder parallel zur Aufnahme behandelt, um mögliche Unterschiede durch den Zeitpunkt der Behandlung herauszufinden. Dass dennoch keine Extrusion gefunden wurde, könnte an einem DM-spezifischen Mechanismus liegen, da der in vorherigen Studien beobachtete Hydroxyurea-abhängige Mikrokernauswurf in DM-haltigen Mikrokernen beschrieben wurde. Neue Untersuchungen haben gezeigt, dass beispielsweise durch Hydroxyurea ausgelöste DNA-Doppelstrangbrüche durch homologe Rekombination Aggregate aus DM gebildet werden. Diese Aggregate können anschließend aus dem Kern und anschließend aus der Zelle geschleust werden [61]. Auch mittels Gensupprimierung bestimmter bevorzugt auf DM lokalisierter Gene können Mikrokerne und damit wahrscheinlich auch Extrusion induziert werden [124]. Da durch die in dieser Arbeit verwendeten Behandlungen wahrscheinlich vorrangig Mikrokerne mit Chromosomen oder Chromosomenfragmenten induziert worden sind, erklärt dies die Abwesenheit DM-spezifischer Extrusion. Auch in zahlreichen Lebendzellstudien wurden keine Hinweise auf Extrusion gefunden, abgesehen von einem neuartigen, vergleichsweise seltenen

Mechanismus der Mikrokernbildung, der den Auswurf eines Chromosoms in eine „Minizelle“ vorzieht, gefolgt von anschließender Wiederaufnahme in die Zelle als Mikrokern [53, 57, 62, 72, 125].

Auch Degradation ist ein in dieser Studie, wie auch in anderen Lebendzellversuchen, selten beobachtetes Schicksal [53, 57, 62, 126]. Dies steht im Widerspruch zu der Ko-Lokalisierung der Autophagie- bzw. Lysosomenmarker LC3B und Lamp2 mit Mikrokernen [27, 29]. Um diesen Zusammenhang weiter zu untersuchen, wurden Langzeitversuche mit HeLa-H2B-GFP-dsRed-LC3B durchgeführt. Allerdings wurden hier über mehrere Generationen hinweg nur selten eine stabile Ko-Lokalisation des LC3B-Signals mit Mikrokernen gefunden, die in keinem Fall mit einem daraufhin folgenden Abbau eines Mikrokerns in Verbindung gebracht werden konnten und daher nicht zwingend auf einen autophagosomalen Abbau hinweisen müssen. Antikörperfärbungen von γ H2AX in fixierten HeLa-H2B-GFP-Zellen als Marker für möglicherweise degradierte DNA in Haupt- wie Mikrokern über einen längeren Zeitraum konnten zeigen, dass Mikrokerne im Vergleich zum Hauptkern auch noch nach mehreren Tagen eine starke und ansteigende DNA-Degradation gezeigt haben. Dies war nicht immer konstant und abhängig von der Behandlung (vor allem nach Etoposid-, Doxorubicin, tBHP und MMS-Behandlung), während die Hauptkerne mikrokernfreier wie mikrokernhaltiger Zellen mit der Zeit einen Rückgang der Degradation im Vergleich zur Kontrolle gezeigt haben (auch wenn es bei letzteren häufig nicht zu einem kompletten Rückgang gekommen ist). Da die Hintergrundschäden der DNA in den hier verwendeten Zellen immer recht hoch waren, wurde sicherlich nie eine vollständige Reparatur aller Schäden erreicht. Dennoch können diese Ergebnisse einen Hinweis darauf geben, dass DNA-Schäden in Mikrokernen akkumulieren können und mit der Zeit zunehmen. Wie lassen sich die Anwesenheit von nicht reparierten DNA-Schäden in Mikrokernen, nicht nur in dieser Studie, und das teilweise Vorhandensein von Autophagiemarkern mit dem Ausbleiben einer Degradation erklären? In vielen Nicht-Säugerzellen wurde Degradation von Mikrokernen oder mikrokernähnlichen Kompartimenten degradative Prozesse beschrieben: So kommt es in *C. elegans* zu einer programmierten Ausschleusung von 18 % des Genoms aus dem Zellkern in Mikrokerne, wo sie mutmaßlich über Autophagie degradiert werden [127]. Weiterhin wurde in Hefezellen während der Nukleophagie die Abschnürung von Teilen des Hauptkerns als Mikrokerne

beobachtet, bevor diese von Vakuolen umschlossen und degradiert werden [26, 128]. Aber auch in Säugerzellen haben Lysosomen eine wichtige Rolle in der Erhaltung der chromosomalen Stabilität, da während der Mitose durch lysosomale Degradation die korrekte Segregation der Chromosomen gewährleistet wird [129]. Zwar lassen sich diese Funde nicht direkt auf durch Chromosenschäden induzierte Mikrokern in HeLa-H2B-GFP-Zellen übertragen, dennoch erscheint es möglich, dass in diesen Zellen zwar eine Ko-Lokalisierung, womöglich als evolutionärer Überrest eines einst möglichen Degradationsmechanismus, vorhanden ist, ein kompletter Abbau aber nicht mehr durchgeführt werden kann.

Nach der Persistenz von Mikrokernen wurde Reinkorporation als häufiges Mikrokernschicksal beobachtet. Die Rate war am ehesten übereinstimmend mit der Häufigkeit die innerhalb der ersten zwei Mitosen nach Mikrokerninduktion in RPE1-Zellen nach Nocodazol gefunden worden sind und bei 25-27% lag, wobei auch in CNE-Zellen nach Bestrahlung ungefähr ähnliche Werte beobachtet wurden [52, 55]. Nichtsdestotrotz wurde in anderen Zelllinien wie Mausembryozellen keine Reinkorporation oder mit ca. 50 % in HeLa-H2B-GFP-Zellen deutlich mehr Reinkorporation gefunden, während HCT116-Zellen ein Extrembeispiel zu sein scheinen, da hier fast alle Mikrokern reinkorporierten [51, 53, 54]. Die Bedeutung von Reinkorporation ist daher stark schwankend und damit auch die Relevanz von Chromothripsis, was für das nächste Kapitel noch von Bedeutung sein wird. In U2OS-Zellen schwankte die Reinkorporationsrate abhängig davon ob die Mikrokern ruptiert waren oder nicht zwischen 50 und 70 % [5]. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Reinkorporation in den meisten Zelllinien zumindest zu einem gewissen Anteil vorkommt, dessen Höhe ist aber variabel und von verschiedenen Einflussfaktoren abhängt (Abb. 55b). Am Beispiel wird der Chromothripsis wird im nächsten Unterkapitel erkennbar, dass aber auch die Reinkorporation nicht die Rückkehr zu einem Normalzustand des wiederaufgenommenen Materials bedeuten muss. Dies wird unterstützt durch die Tatsache, dass Mikrokernneubildung in (Tochter-)Zellen, die schon einen Mikrokern besaßen, deutlich erhöht ist. Selbst wenn keine Schädigung in Form von Mikrokernen mehr erkennbar ist, bleibt die chromosomale Instabilität in Zellen bestehen und kann im weiteren Verlauf für die Zelle negative Konsequenzen wie Mikrokernneubildung haben.

Ein wichtiges Untersuchungsobjekt in diesen Studien war die Abhängigkeit des Mikrokernschicksals von der Höhe und Art der gentoxischen Behandlung. So wurden jeweils drei Dosen von Etoposid (DNA-Topoisomerase II-Inhibitor), Doxorubicin (DNA-Topoisomerase II-Inhibitor und Erzeuger reaktiver Sauerstoffspezies), tBHP (Erzeuger reaktiver Sauerstoffspezies), Bestrahlung (Strangbrüche über direkte und indirekte Effekte), MMS (DNA-Methylierer) und Vinblastin (Stört Bildung von Mikrotubulispindel) [130-134]. Dennoch lassen sich keinem dieser Mechanismen eindeutig bestimmte Konsequenzen auf Mikrokerne zuordnen, auch wenn es Unterschiede in der Mikrokerngröße in Abhängigkeit von der Behandlung gab. So waren die Mikrokerne nach Behandlung mit den Klastogenen Etoposid und Bestrahlung im Schnitt kleiner als nach Behandlung mit dem Aneugen Vinblastin, was bestätigt, dass Klastogene bevorzugt Mikrokerne mit Chromosomenfragmenten und Aneugene verstärkt Mikrokerne mit ganzen Chromosomen induzieren. Während nach tBHP- und MMS-Behandlung (beides Klastogene) kein eindeutiger Trend zu beobachten war, hat die klastogene Substanz Doxorubicin am häufigsten große Mikrokerne verursacht. Eine Erklärung könnte die Induktion von Mikrokernen aus mehreren Chromosomenfragmenten sein, die schlussendlich auch zu großen Mikrokernen führen würden, was sich aber ohne spezielle Färbung z. B. der Kinetochore nicht bestätigen lässt.

Einzig die Potenz der jeweiligen Behandlung, wie man sie in den Zytokinese-Block Mikrokerntests abschätzen konnte, scheint Einfluss auf mikrokernhaltige Zellen zu haben. So verursachte die im Vorversuch potenteste Substanz Etoposid auch bei den in der Lebendzellmikroskopie untersuchten Parametern der mikrokernhaltigen Zellen, ob Mitose, Zelltod oder die Dauer der Zellzyklusphasen, in den meisten Fällen die stärksten Effekte, während bei der am wenigsten potenten Substanz Vinblastin das Gegenteil antritt. Bei den beobachteten Mikrokernschicksalen hingegen sieht man allenfalls einen gewissen dosisabhängigen Rückgang der Reinkorporation verbunden mit Anstieg der Persistenz mit zunehmender Dosierung Etoposid, Doxorubicin und Bestrahlung, wobei zwischen den einzelnen Substanzen kein Trend abzuleiten ist. Daher erscheint es zweifelhaft, einen substanzspezifischen Wirkmechanismen einem möglichen Schicksal für Mikrokern oder mikrokernhaltige Zellen zuzuordnen.

5.1.2 Eigenschaften des Mikrokerns

Neben der Frage, was mit der mikrokernhaltigen Zelle und dem Mikrokern passiert, sind auch die Prozesse im Mikrokern von entscheidender Bedeutung. Es hat sich gezeigt, dass Mikrokerne zerbrechen können, wodurch die Integrität der Mikrokernmembran aufgehoben und der Mikrokerninhalt freigelegt werden können [135]. Ein weiteres Merkmal ist das Eindringen endoplasmatischen Retikulums in den freigelegten Mikrokern und Verdichtung des Chromatins [5, 30]. Die genauen Ursachen für diesen Prozess sind noch nicht genau verstanden, doch spielen nukleäre Lamine, allen voran Lamin B1 und Lamin B2, eine wichtige Rolle: So wurde nachgewiesen, dass Mikrokerne teilweise über keine oder nur reduzierte Mengen an Lamin B verfügen und eine Überexprimierung von Lamin B1/2 ein Zerbrechen des Mikrokerns verhindern kann [5]. Da für die Bildung der Kernmembran vor allem Lamin A und C wichtig sind, scheinen Lamin B1/2 in dieser frühen Phase noch verzichtbar [136] Lamin B1/2 könnte eine wichtige, aber nicht die einzige Komponente sein, die in Mikrokernen nur eingeschränkt zur Verfügung steht. Auch Kernporenproteine wie M414 und NUP153 wurden in Mikrokernen nur wenig gefunden, während bestimmte membran-gebundene Proteine wie Emerin und LBR noch nachweisbar waren [30]. Eine Begründung für die unterschiedliche Häufigkeit verschiedener Proteine konnte in einer umfangreichen Studie gezeigt werden: So existieren *core* (viele Membranproteine) und *non-core* Proteine (Kernporenproteine, Lamin B-Rezeptoren) in der Mikrokernmembran. Während *core* Proteine üblicherweise in die Mikrokernmembran rekrutiert werden, geschieht dies bei *non-core* Proteinen durch die Aktivität von Mikrotubuli nicht. Durch Störung der Mikrotubuli-Mikrokerninteraktion oder durch eine periphere Lokalisation des Mikrokerns weg von den Mikrotubuli konnte der Anteil an *non-core* Proteine im Mikrokern erhöht und die Häufigkeit des Zerbrechens reduziert werden (Abb. 55c Nr. 1/2 [137]). Der Mangel an Lamin B1/2 führt nicht sofort zum Zerbrechen des Mikrokerns, sondern erst nach einigen Stunden [5]. Daher gibt es möglicherweise neben dem Fehlen bestimmter Proteine noch weitere Faktoren, die das Zerbrechen des Mikrokerns bestimmen. Hoher physikalischer Stress durch die in Mikrokernen im Vergleich zum Hauptkern erhöhte Krümmung der Membran wurde als Ursache für ein

Zerbrechen vorgeschlagen und würde auch erklären, warum auch Mikrokern, die durch ein Mikrotubulispindelgift entstanden sind, Lamin B1/2-Mangel zeigen und zerbrechen können (Abb. 55d [138]). Ein weiteres Modell sieht die Ursache in der Bildung des Mikrokerns: Hierbei wird ein Chromosomenfragment nach der Mitose mit der Kernmembran umschloss, bleibt aber über eine Art Leine aus Proteinen und DNA mit dem Hauptkern verbunden. Die Kernmembran enthält kein Lamin B1/2 oder Kernporenproteine. Das mit dem Hauptkern verbundene Fragment kann entweder mit dem Hauptkern fusionieren, was über die Aktivität von Aurora B und ESCRTIII vermittelt wird oder sich lösen und einen Mikrokern mit einem Mangel an bestimmten Komponenten der Kernmembran bilden [139].

ESCRTIII ist eine wichtige Komponente für die Integrität der (Mikro-)kernmembran und zusammen mit Spastin in der Lage, Lücken in der Membran zu versiegeln [140]. Eine Einschränkung dieser Funktion führt in Mikrokernen zu einer fehlerhaften Kernmembranzusammensetzung, mehr DNA-Schäden und einer Reduzierung der Kernporen, wobei es eine dichotome Wirkung zu haben scheint: Während es auf der einen Seite zur Reparatur der Mikrokernmembran notwendig sind, führt auch eine Akkumulation von ESCRTIII auf zerbrochenen Mikrokernen zu einem Anstieg der DNA-Schäden (Abb. 55e, Nr. 1/2 [141]). Die Ursache liegt in der mangelhaften Fähigkeit von Mikrokernen, die ESCRTIII-Untereinheit CHMP7-LEMD2, die normalerweise den Ausgangspunkt zur Rekrutierung weiterer ESCRTIII-Faktoren an die Kernmembran und damit zur Reparatur von großen und kleinen Schäden bildet, zu limitieren, wodurch es im schlimmsten Fall zu Chromosomenfragmentierungen, vermutlich durch die Exonuklease TREX1, kommen kann [142, 143].

Durch die eingeschränkte Funktion der Mikrokernmembran, ist es fraglich und daher Forschungsgegenstand, ob Mikrokern fähig zur Replikation, Transkription oder DDR sind. So hat man in Mikrokernen in RPE1-Zellen mit ausgeschaltetem p53 herausgefunden, dass nur 40 % der Mikrokern mit einer ähnlichen Rate wie im Hauptkern replizierten, während die Mehrheit der Mikrokern keine oder nur eingeschränkte Replikation zeigten [55]. Eine ältere Studie kam zu dem Schluss, dass die Replikationsaktivität nach Bestrahlung in Mikro- und Hauptkern zu 98 % übereinstimmen [144]. Spätere Erkenntnisse zeigten auf, dass die Fähigkeit zur Replikation stark vom einzelnen Mikrokern abhängig ist, da Mikrokern mit und ohne

BrdU-Einbau in derselben Zelle gefunden wurden [10, 43]. Auch eine Abhängigkeit durch die Zelllinie oder die Behandlung der Zelle auf die Replikationsfähigkeit ist zu erwarten und könnte teilweise widersprüchliche Ergebnisse erklären. Da in einer weiteren Studie Replikation nur in Lamin B1-positiven Mikrokernen nachgewiesen wurde, scheint ein direkter Zusammenhang zur Mikrokernmembranintegrität zu existieren [145]. Ein Nachweis für eine Replikation könnte in den gefundenen zahlreichen Centromersignalen des X-Chromosoms (bis zu 10!) erbracht worden sein, die in humanen Lymphozyten gefunden wurden [146]. Auch wenn beispielsweise 10 kein Ergebnis einer erwarteten 2^n -Replikation darstellen, erscheint es fraglich, wie so viele X-Chromosomen über einen anderen Mechanismus gebildet werden könnten. Hingegen wurden in lebenden Zellen nach 24 h keine Replikation in Form einer Verdopplung des Signals von markierten Chromosomen beobachtet, was weiter die Bedeutung der verwendeten Zelllinie unterstreicht [53]. Auch scheint es eine Verzögerung in der DNA-Replikation in Mikrokernen zu geben, möglicherweise verursacht durch das Zerschneiden von Mikrokernen, sodass in G2 noch 30 % der Mikrokerne replizieren [62].

Transkription in Mikrokernen wurde schon in älteren Studien mittels Radioautographie untersucht und RNA-Synthese in nucleolus-artigen Körperchen in Mikrokernen aus ganzen Chromosomen gefunden [147]. In *Xenopus*-Zellen mit Mikrokernen aus ganzen Chromosomen wurden in Folgeversuchen herausgefunden, dass diese nucleolus-artigen Körperchen notwendig für die ribosomale RNA-Synthese sind, aber sonstige RNA auch in Mikrokernen ohne diese Strukturen synthetisiert werden kann [148]. Eine spätere Studie mit der gleichen Technik kam zu einem abweichenden Ergebnis: Auch wenn die Aktivität der RNA-Polymerase nach Inhibierung und in verschiedenen ionischen Umgebungen zwischen Haupt- und Mikrokern ähnlich waren, war der Einbau von radioaktiv markierten Nukleotiden in Mikrokerne um 30-35 % geringer als im Hauptkern [149]. In Mikrokernen aus chromosomalen Fragmenten, die aus dem Zusammenbruch von Chromatinbrücken entstanden sind, wurde weiterhin gar keine transkriptionelle Aktivität beobachtet [50]. Proteine, die in der Transkription involviert sind wie PCNA oder RFP-A wurden in strahlungsinduzierten Mikrokernen nur in geringem Ausmaß nachgewiesen [150]. Versuch in DM-haltigen Mikrokernen haben wiederum die Bedeutung von Lamin B1 unterstrichen: Während in Lamin B1-negativen Mikrokernen in keinem Fall

Transkription nachgewiesen wurde, während alle transkriptionell aktiven Mikrokerne Lamin B1-positiv waren [7, 151]. Hierzu passt, dass in transkriptionell inaktive Mikrokern aus Chromosomenfragmenten Kernporenproteine nur in äußerst geringen Mengen nachgewiesen werden konnte [50].

Da Mikrokerne bereits ein Produkt von DNA-Schäden sind, ist die Reparatur eben jener Schäden von besonderer Bedeutung in Mikrokernen. Die für Chromosomenbrüche entscheidenden Doppelstrangbrüche können vor allem mittels HR und (fehleranfälliger) NHEJ repariert werden. Während bei der HR homologe DNA als Vorlage genutzt wird, werden beim NHEJ Doppelstrangbrüche erkannt und mittels spezieller Polymerasen miteinander verknüpft [152, 153]. Wichtige Proteine für die Doppelstrangbruchreparatur sind unter anderem ATM/ATR, 53BP1, MRE11 und p53. In primären Fibroblasten, die UV- und Röntgenstrahlung exponiert waren, wurde ein Einschluss von p53 in Mikrokernen beobachtet, der auch nach Abklingen von p53 im Hauptkern persistierte [154]. Dieses Ergebnis konnte später in Mauslebertumorzellen reproduziert werden, wo nach Bestrahlung ein persistentes p53-Signal gefunden wurde, was aber nicht zu einem Block der DNA-Synthese geführt hat [155]. Dies konnte auch nach Behandlung mit dem Aneugen Vinblastin bestätigt werden, was gezeigt hat, dass DNA-Schäden auch dann in Mikrokernen akkumulieren, wenn die Mikrokernbildung ohne direkte Schädigung des Chromosoms selber erfolgte [156]. Neben p53 ist γ H2AX ein typischer Marker für DNA-Schäden auch in Mikrokernen. Während die γ H2AX-Intensität in dieser Arbeit nach Bestrahlung in Haupt- wie Mikrokern kurz nach der Exposition anstieg, fiel sie nur im Hauptkern nach einigen Stunden wieder ab. Das konstant hohe Signal in Mikrokernen könnte hierbei auf eine eingeschränkte DDR-Kapazität hinweisen. In einer anderen Studie wurde nur ein schwaches Signal nach Behandlung mit dem Aneugen Colchicin detektiert, während zusätzlich eine Ko-Lokalisierung mit γ H2AX und ATM aber nicht mit 53BP1, MRE11 und Rad50 gefunden wurde, was auf eine eingeschränkte Rekrutierung dieser DDR-Proteine hinweist [157]. Eine andere Studie kam zu anderen Ergebnissen: Haben in HeLa-Zellen nur 63 % aller Mikrokern ein γ H2AX-Signal 72 h nach Bestrahlung gezeigt, waren es in HE49-Zellen hingegen 91 % und damit in beiden Fällen gleich viele wie im Hauptkern zu diesem Zeitpunkt. Foci mit ATM, DNA-PKc und 53BP1 wurden zwar nur in wenigen Mikrokernen beobachtet, aber eindeutig häufiger in HeLa- als in

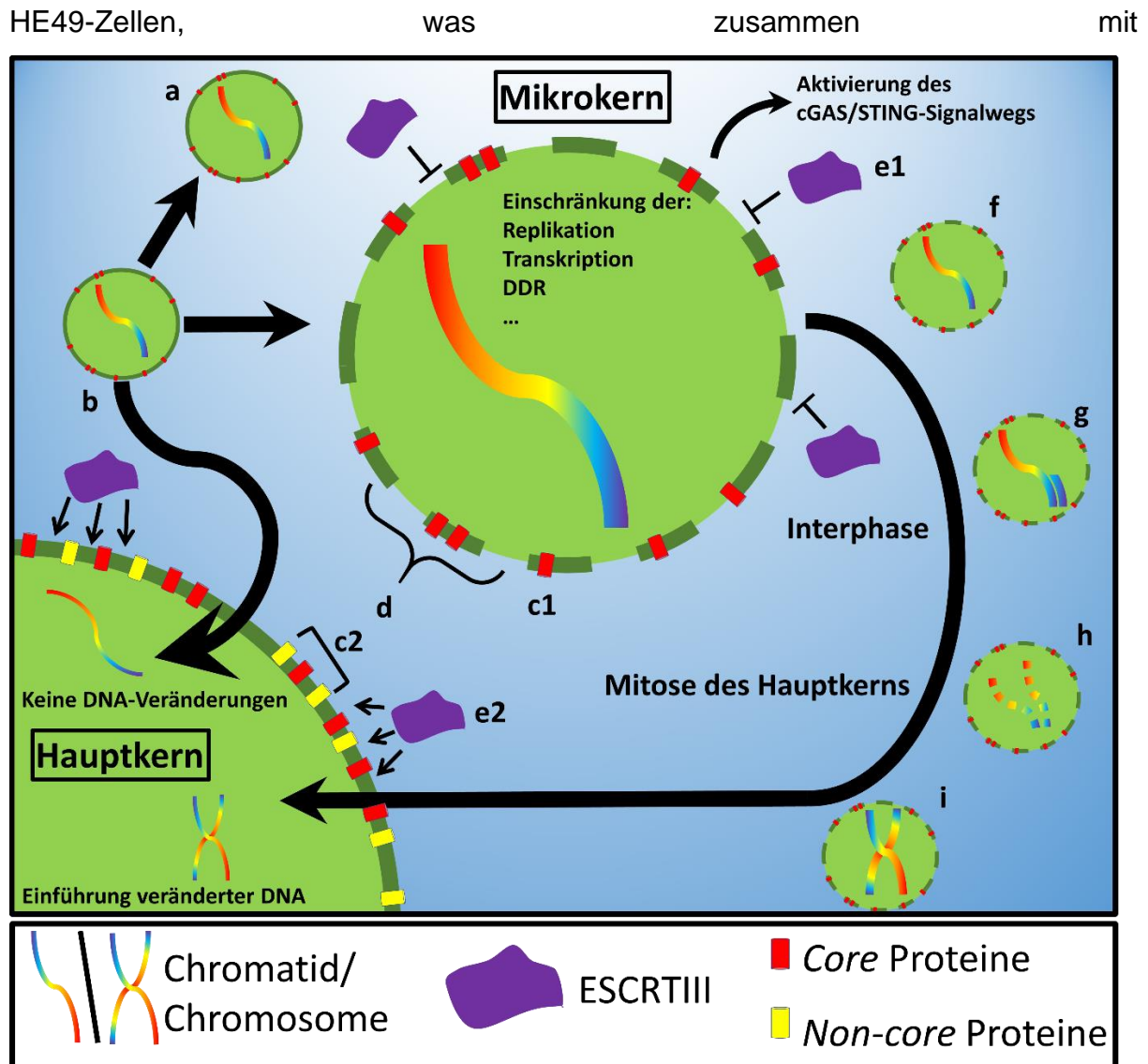


Abb. 55. Mutmaßliche Entwicklung des Mikrokerns nach der Bildung. (a) Mikrokernne können für mehrere Zellteilungen persistieren, (b) oder aber Reinkorporation in den Hauptkern könnte zur Wiederaufnahme unveränderter DNA führen. (c1) Die Mikrokernmembran besteht häufig nur aus core Proteinen, (c2) im Gegensatz dazu lassen sich in der Hauptkernmembran core wie non-core Proteine finden. (d) Zusammen mit der im Vergleich zum Hauptkern erhöhten Krümmung des Mikrokerns kann dies zu einer eingeschränkten Zusammensetzung der Mikrokernmembran führen. (e1) Da der ESCRTIII-Komplex zusätzlich nicht in der Lage, entstehende Membranlücken im Mikrokern, (e2) im Gegensatz zum Hauptkern, zu versiegeln, können Mikrokernne zerbrechen, was zu einer Einschränkung zellulärer Prozesse im Mikrokern führt, zusätzlich kann über den cGAS/Sting-Signalweg eine Immunantwort ausgelöst werden. (f) Trotzdem durchlaufen Mikrokernne weiter den Zellzyklus. (g) Durch die eingeschränkte Replikation kommt es zu Fehlern und Verzögerungen bei dieser. (h) Wenn der Rest der Zelle die Mitose beginnt, erleiden die sich noch replizierenden Mikrokernne eine frühzeitige Chromosomenkondensierung, die zu einer Pulverisierung der DNA führt. (i) Auf Grund der eingeschränkten DDR wird das Chromosom nur fehlerhaft repariert und nach einer Reinkorporation wird nun veränderte DNA in den Hauptkern eingeführt, was zu einer schnellen Tumorevolution führen kann.

unterschiedlichen Häufigkeiten der γ H2AX-Färbung auf eine Abhängigkeit der DDR-Kapazität von der verwendeten Zelllinie hinweist [158]. In Hauptkernnen von humanen primären Fibroblasten nach Bestrahlung stiegen die Foci schnell an und

fielen bis 48 h wieder auf das Niveau nicht-bestrahlter Zellen. Hingegen kam es zeitverzögert in Mikrokernen erst nach 4-7 h zu einem Anstieg, der innerhalb der Beobachtungszeit von 48 h nicht mehr auf ganz zurückging. Weiterhin waren 53BP1 und MRE11 nur in 14,1 bzw. 27,6 % aller Mikrokerne mit γ H2AX-Foci ko-lokalisiert, während diese Proteine in Hauptkernen immer zusammen mit Foci gefunden wurden [10]. In Mikrokernen, die das Y-Chromosom enthielten, wurde zwar der MRN-Komplex (MRE11-Rad50-NBS1) bei γ H2AX-Foci gefunden, im Gegensatz zum Hauptkern jedoch nicht 53BP1 [159]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Zellen, in denen p53 ausgeschaltet wurde, mehr Mikrokerne mit γ H2AX-Färbung hatten als jene mit p53. Auch war die Färbung in mutmaßlich Chromosomenfragmente enthaltenen kleinen Mikrokernen stärker, sodass diese mehr DNA-Doppelstrangbrüche enthielten als Mikrokerne mit ganzen Chromosomen. Lamin B1 war weiterhin in 50 % aller Mikrokerne reduziert, wobei kleine Mikrokerne in p53-negativen Zellen den stärksten Abfall zeigten, was eine wichtige Rolle der Mikrokernmembran auch für die DDR nahelegt [160]. Neben Lamin B1 konnte auch für Kernporenproteine gezeigt werden, dass sie einerseits in der Kernmembran reduziert sind, was andererseits zu einem Mangel zahlreicher Proteine der Nukleotidexzisionsreparatur führte [161]. Das Zerbrechen des Mikrokerns, als Folge der fehlerhaften Mikrokernmembran, reduzierte die DDR-Kapazität noch weiter [5]. Es konnte zusätzlich sogar gezeigt werden, dass Hauptkerne von mikrokernhaltigen Zellen mehr Zeit zur Reparatur benötigten, als ihre Gegenstück in mikrokernfreien Zellen [52].

Zusammenfassend fällt auf, dass Mikrokerne teilweise in der Lage sind zu replizieren oder zu transkribieren und zumindest einige DDR-Proteine zu rekrutieren, auch wenn eine komplette Reparatur so nicht gewährleistet wird. Entscheidender Faktor für alle Vorgänge durch die Sicherstellung des korrekten Im- und Exports von Proteinen ist die Mikrokernmembran, wie in zahlreichen Studien gezeigt wurde. Da Lamin B1 häufig mit mangelnder Kapazität der beschriebenen Prozesse assoziiert ist, wurde in dieser Arbeit die Lokalisierung von Lamin B1 mit Mikrokernen in lebenden Zellen nach Behandlung mit Etoposid und tBHP über einen längeren Zeitraum untersucht. Bei beiden Behandlungen wurden über mehrere Generationen hinweg ein Rückgang an Lamin B1+-Mikrokernen beobachtet, was auf einen Rückgang der Membranintegrität über der Zeit, und damit auch auf eine Zunahme zerbrechender Mikrokerne hinweist. Die Gesamthäufigkeit von Mikrokernen lag mit 54,3 und 47,6 % nach Etoposid- und tBHP-Behandlung nahe beieinander, auch wenn ein gewisser Unterschied zu

erkennen war. Als Folge der eingeschränkten Mikrokernmembran verbunden mit einer nur teilweise möglichen Durchführung von essentiellen zellulären Mechanismen, ist zu erwarten, dass der Inhalt des Mikrokerns vom Hauptkern entkoppelt wird und so auch im Falle einer Reinkorporation nicht der Normalzustand wiederhergestellt werden kann, auch wenn Mikrokerne scheinbar ohne Veränderungen den Zellzyklus durchlaufen (Abb. 55f). Wie durch die Reinkorporation sogar noch größere Schäden in den Hauptkern eingeführt werden können, ist im nächsten Kapitel dargestellt.

5.1.3 Konsequenzen der Mikrokernbildung

Das Schicksal von Mikrokernen und mikrokernhaltigen Zellen könnte bedeutsam für die Kanzerogenese sein. Eine der in den letzten Jahren am meisten untersuchten Konsequenzen der Mikrokernbildung und Ruptur ist die Chromothripsis, die dank moderner Sequenzieretechniken immer besser verstanden wird. Hierbei kommt es, im Gegensatz zum klassischen Tumorentwicklungsmodell, zu einer katastrophalen genomischen Erschütterung, die mehrere Krebs-befördernde Gene beeinflussen und dadurch eine schnelle Tumorentwicklung auslösen kann, wobei allerdings nur ein oder wenige Chromosomenregionen betroffen sind [162]. Auch wenn es mehrere Theorien zur Entstehung von Chromothripsis gibt, so bieten Mikrokerne eine der vielversprechendsten Ansätze [163]. Neuere Studien zu Chromothripsis haben gezeigt, dass auch bereits ein Zellzyklus vor der Mikrokernbildung durch zerbrechende Chromosomenbrücken und anschließender fehlerhafter DNA-Replikation komplexe DNA-Neuanordnungen und so Chromothripsis begünstigt wird [164]. Weitere Untersuchungen in Mikrokernen haben gezeigt, dass DNA-Schäden in Mikrokernen auch nach der Induktion mit dem Aneugen Nocodazol möglicherweise durch Replikationsfehler induziert werden können (Abb. 55g [62]). Zusätzlich spielt die Exonuklease TREX1 eine wichtige Rolle bei der Entstehung von DNA-Schäden in Mikrokernen [165]. Auch die seit Jahrzehnten bekannte vorzeitige Chromosomenkondensation in Mikrokernen könnte die Entstehung von zusätzlichen DNA-Schäden erklären (Abb. 55h): Hierbei kommt es zu einer massiven DNA-Schädigung, wenn in zweikernigen, aber auch mikrokernhaltigen Zellen ein

Zellkern in die Mitose geht, während der andere (Mikro-)kern noch in der Interphase ist [166-170]. Nur wenn der Interphasekern noch in der S-Phase war, also die Replikation verzögert ablief, wie es auch in Mikrokernen beschrieben wurde, kam es anschließend zu einer Chromosomenpulverisierung, sodass einzelne bis wenige Chromosomen stark geschädigt werden (Abb. 55h [170, 171]). Dieser Effekt kann durch Inhibierung des Cyclin B/CDK1-Kontrollpunkts noch weiter verstärkt werden [171]. Ursache für die anschließende Pulverisierung ist vermutlich mechanischer Stress, der auf die sich noch in der Replikation befindlichen frühzeitig kondensierenden Kerne [172].

Die nun zusätzlich geschädigte DNA kann nun durch die mangelnde DDR-Kapazität des Mikrokerns nicht mehr repariert werden und wird im Falle eines Zerbrechens im Gegenteil eher anfällig für weitere Schäden [5]. Ein weiterer Faktor, der bei Abwesenheit sowohl die frühzeitige Chromosomenkondensation als auch die DDR weiter verzögert ist die nicht-kodierende RNA ASAR6 [173]. Wird nun der Mikrokern während der nächsten, oder worauf es in dieser Arbeit Hinweise gibt, während einer der folgenden Mitosen reinkorporiert, kommt es zur Einführung massiv geschädigter DNA in den Hauptkern [62]. Im Hauptkern findet dann eine Wiederausammensetzung des Chromosoms via NHEJ statt, wobei es zu starken Rearrangierungen wie Translokationen, Insertionen, Deletionen, Inversionen und anderen kommen kann (Abb. 55i [159, 174]).

Die Konsequenzen für die Zelle können in vielen Fällen tödlich sein, aber, wenn die Zelle den ersten Schock übersteht, zu einem schnelleren Wachstum und Tumorevolution verbunden mit einer schlechten Prognose für eine Therapie führen (Abb. 55i [138, 175]). Es gibt Hinweise, dass Chromothripsis die Bildung von DM befördert, was die Tumorevolution und so die Bildung von aggressiveren Varianten beschleunigen könnte [176]. Die Relevanz von Chromothripsis in menschlichen Tumoren ist umstritten und wahrscheinlich stark tumorabhängig: So wurden in einer der ersten Untersuchungen Chromothripsis nur in 2-3 % aller Tumore mit Höchstwerten von 25 % in Knochentumoren gefunden [162]. Basierend auf einer Stichprobe von 4945 Krebserkrankungen wurde Chromothripsis in 0-16 % aller Tumore mit einem Mittelwert von 5 % über alle Tumore hinweg gefunden [177]. Die

eigentliche Relevanz von Chromothripsis ist also stark schwankend und muss wahrscheinlich für jeden Tumor spezifisch beantwortet werden.

Eine weitere Konsequenz von zerbrochenen Mikrokernen ist die Auslösung des inflammatorischen cGAS/Sting-Signalwegs, da die zuvor im (Mikro-)kern abgeschottete DNA nun frei liegt und eine Immunantwort auslösen kann [178, 179]. Depletion eines der Faktoren des cGAS/Sting-Signalwegs führt zu mehr Mikrokernen, da der G2/M-Kontrollpunkt auf diese Weise über durch cGAS/Sting regulierte Beeinflussung von p21 überwunden werden kann [180]. Wird der cGAS/Sting-Signalweg hingegen aktiviert, kommt es zur Expression von Interferonen und autophagischem Zelltod, wodurch die chromosomale Instabilität in Form von zerbrochenen Mikrokernen reduziert wird [181]. Da der Signalweg aber einen Zellzyklus benötigt, um aktiviert zu werden, kann im Vergleich zur DDR nur eine verzögerte Antwort der Zelle auf freigewordene DNA erfolgen [182, 183].

Mikrokernen können, wenn die gesamte Zelle nicht durch die starken Veränderungen oder den cGAS/Sting-Signalweg ausgeschaltet wird, zu weiteren Veränderungen und einer beschleunigten Kanzerogenese führen. Womöglich ist auch die in dieser Arbeit beobachtete erhöhte Zelltodrate eine Konsequenz dieser Prozesse. Da Mikrokerne vorrangig persistieren und reinkorporieren, könnte Chromothripsis nicht nur direkt nach der Mikrokernbildung, sondern auch nach mehreren Zellzyklen ausgelöst werden, auch wenn mit den hier verwendeten Methoden eine genaue Analyse von Chromothripsis nicht möglich war. Da aber mikrokernhaltige Zellen und Tochterzellen bevorzugt neue Mikrokerne bilden und sich ein Teil der mikrokernhaltigen Zellen und Tochterzellen immer weiterteilt bleibt eine Gefahr durch Mikrokerne bestehen, auch wenn man sie durch Reinkorporation nach einer Zellteilung morphologisch nicht mehr identifizieren kann.

5.2 Mikrokerne als Marker für Gentoxizität

5.2.1 Gentoxizität nach Thebainbehandlung

Chromosomenschäden und DNA-Strangbrüche wurden nach Behandlung mit Thebain untersucht, um die Gentoxizität zu bestimmen. Eindeutige Anzeichen von gentoxischen Schäden wurden nur in Form von Mikrokerneln nach Behandlung mit der höchsten Dosis Thebain nach 24 h in TK6-Zellen beobachtet, wobei diese mit einer niedrigen bis moderaten Zytotoxizität verbunden war. Aus diesem Grund kann eine Gentoxizität durch Thebain nicht ausgeschlossen werden, obwohl Versuche nach metabolischer Aktivierung auf eine Detoxifizierung und damit auf eine Reduktion des Gefahrenpotentials hinweisen. Es wurden in den Vitalitätstests bei manchen Dosen kleine, aber signifikante Rückgänge der Vitalität beobachtet, wobei es fraglich bleibt, ob diese Rückgänge eine biologische Relevanz besitzen oder eine Folge der statistischen Auswertung sind.

Da keine weiteren Informationen zu DNA-Schäden nach Thebainexposition verfügbar sind, wurden die Daten mit den Metaboliten Codein und Morphin für eine weitere Einschätzung verglichen [89]. Nach Codeinbehandlung wurde sowohl in vivo in Mäuseknochenmarkszellen keine Mikrokernelhöhung als auch keine Mutagenität in Bakterien sowie keine Chromosomenaberrationen in CHO-Zellen gefunden. Ko-Behandlung mit Paracetamol hat zu mehr Mikrokerneln im Vergleich zur Kontrolle aber nicht im Vergleich zur reinen Paracetamolbehandlung geführt, sodass die Erhöhung mutmaßlich durch das Paracetamol verursacht wurde. Ein häufigeres Auftreten des Schwesterchromatidaustausches wurde in CHO-Zellen mit und ohne metabolische Aktivierung nach Codeinbehandlung beobachtet. Trotzdem wurde Codein durch die EFSA als nicht-gentoxisch eingestuft [94]. Morphin war in den meisten untersuchten in vitro-Studien, von Mutagenitätstests in Bakterien oder Hefe über Chromosomenaberrationstests in Lymphozyten bis Mikrokerntests in Mausmilzzellen, negativ [94]. Dennoch wurde in humanen T-Zellen eine erhöhte Mutationsrate am *hprt*-Locus und Strangbrüche beobachtet. In vivo-Versuche in Mausmilzzellen führten zu mehr Mikrokerneln nach Morphinbehandlung sowie mehr

Chromosomenaberration und Mikrokernen in Mäuseknochenmarkszellen. Auch sekundäre DNA-Schäden via Hyperthermie in Keimzellen männlicher Mäuse wurde durch Morphin erhöht, was zu einer Einschätzung als gentoxisch in vivo durch die EFSA geführt hat [94]. Thebain wurde in dieser Studie nur in vitro untersucht, daher kann eine potenzielle Gentoxizität in vivo nicht ausgeschlossen werden. Da Codein als nicht-gentoxisch und Morphin als gentoxisch zumindest in vivo eingeschätzt wurde, kann eine Metabolisierung zu diesen beiden Substanzen die reduzierte Gentoxizität nach metabolischer Aktivierung von Thebain erklären.

In TK6-Zellen wurde teilweise nach Thebainbehandlung eine reduzierte Mitose zusammen mit einer erhöhten Apoptoserate beobachtet. Auch dieser Effekt konnte nicht eindeutig nach metabolischer Aktivierung von Thebain beobachtet werden (ausgenommen einem kleinen Anstieg der Mitoserate nach Behandlung mit 500 µM Thebain in HepG2-Zellen). Gentoxizität wurde nur nach Behandlung mit hohen Dosen Thebain beobachtet, was die These stützt, dass es sich hierbei um einen sekundären Effekt auf Grund der Zytotoxizität handelt (reduzierte Proliferation, Viabilität, und Mitoserate, erhöhte Apoptoserate). Zytotoxizität nach Thebainbehandlung wurde auch in anderen Studien beobachtet, so zum Beispiel in HeLa-Zellen nach Behandlung mit 1 mM Thebain, welche nach 60 min zu einer Wachstumsinhibierung von 60 % geführt hat. Behandlung mit 1 oder 2 mM Thebain für 60 min hat zu einer Protein- bzw. RNA-Syntheseinhibierung von 81 bzw. 58 % geführt, welche damit höher im Vergleich zu beispielsweise Codein ausfiel [184]. In einer weiteren Studie in KB-Zellen verursachte die Behandlung mit bis zu 1 mM Thebain für 20-24 h (ebenso wie Codein) keine Störung der DNA-, RNA- oder Proteinsynthese, was ein Hinweis auf einen adaptiven Mechanismus nach längerer Behandlung darstellen könnte [185]. Mittels MTT-Methode nach 24 h Behandlung wurde eine für 50 % der Zellen toxische Konzentration zwischen 93 µg/ml in HSG-Zellen, über 125 µg/ml in HSC-2-Zellen bis zu 181 µg/ml in HGF-Zellen gemessen, welche in einem ähnlichen Bereich wie die Werte nach Codein- oder Morphinbehandlung lagen [186]. Thebain wurde weiterhin als Inhibitor der Adenosindeaminase beschrieben und könnte auf diese Weise einen Einfluss auf das Immunsystem haben, auch wenn zum Beispiel Morphin in dieser Hinsicht potenter ist [187]. Insgesamt betrachtet scheint die Zytotoxizität von Thebain vielen Fällen höher zu sein als Codein und eventuell Morphin, was gut zu akuten Studien in Tieren passt, wo der LD₅₀ nach oraler Verabreichung in Mäusen um den

Faktor 10 niedriger ist als für Morphin [96]. Dies passt zu der Beobachtung in dieser Arbeit, dass die Zytotoxizität nach metabolischer Aktivierung reduziert wurde, da das Thebain zu Codein und Morphin umgesetzt wurde.

Nach 24 h Behandlung in TK6-Zellen mit geringen Dosen Thebain wie 15 μM wurde eine signifikante Verringerung der Mikrokernhäufigkeit beobachtet. Dieser Effekt konnte nach 4 h Behandlungszeit oder metabolischer Aktivierung nicht beobachtet werden. Um dies genauer zu untersuchen, wurden im Mikrokerntest Ko-Behandlungen mit MMC in TK6-Zellen und BaP in HepG2-Zellen oder mit S9-Mix in TK6-Zellen durchgeführt. Während nach metabolischer Aktivierung kein protektiver Effekt durch eine Ko-Behandlung mit BaP beobachtet wurde, konnte nach Behandlung mit 100 nM MMC und 5 bzw. 15 μM Thebain ein Mikrokernrückgang verzeichnet werden, wobei der Effekt bei 5 μM Thebain größer als bei 15 μM Thebain war. Die vorher beobachtete Reduktion nach Behandlung mit geringen Thebaindosen konnte nicht repliziert werden, was sich dadurch erklären, dass diese Reduktion ungeachtet einer statistischen Signifikanz äußerst gering war und die biologische Relevanz daher unklar bleibt. Im Gegensatz hierzu handelt es sich bei der Mikrokernreduktion nach Ko-Behandlung mit MMC und Thebain um einen größeren Effekt. MMC verursacht DNA-Schäden über Inter- und Intrastrangverknüpfungen der DNA sowie über Basenalkylierungen [188]. Es bleibt jedoch fraglich, inwiefern Thebain mit MMC und/oder der DNA interagieren kann, um entweder DNA-Schäden zu verhindern oder die DNA-Schadensreparatur zu fördern.

Es handelte sich hierbei um die erste bekannte Studie zur Untersuchung von DNA-Schäden nach Thebainexposition. Allerdings sind noch manche Fragen zur Genotoxizität zu klären und weitere Versuche, zum Beispiel Mutagenitätstests, nötig. Die durch Thebain verursachte Zytotoxizität hat sich in vorherigen Studien als höher im Vergleich zu ähnlichen Strukturen wie Codein und Morphin herausgestellt. Da der Thebaingehalt von Mohnsamen sowie die Mohnaufnahme über die Ernährung äußerst variabel sind besteht ein dringender Bedarf, die toxikologischen Eigenschaften von Thebain weiter aufzuklären.

5.2.2 Gentoxizität nach Behandlung mit Celecoxib und Celecoxibderivaten

In dieser Arbeit wurden außerdem Zytokinese-Block Mikrokerntests nach Behandlung mit Celecoxib und vier verschiedenen Celecoxibderivaten in HeLa-H2B-GFP-Zellen durchgeführt. Keine dieser Substanzen hat hierbei zu einer Erhöhung der Mikrokernhäufigkeit geführt. Dieses Ergebnis passt zu einer Kanzerogenitätsstudie in Raten, in der bis zu 200 mg/kg Körpergewicht Celecoxib täglich verabreicht nach zwei Jahre zu keiner Kanzerogenität geführt hat, während auch im Ames-Test, im Chromosomenaberrationstest in CHO-Zellen sowie im in vivo Mikrokerntest keine Gentoxizität gefunden wurde [189]. Behandlung von Blutproben mit Celecoxib hat im Gegenteil sogar zu einer Reduzierung der Mikrokernhäufigkeit durch ionisierende Strahlung geführt [190]. Andere Autoren postulierten einen etwas anderen Zusammenhang: Während nach Celecoxibexposition von rauchfreien Mäusen eine Akkumulation von DNA-Adduktion in Herz und Lunge beobachtet wurde, konnte durchs Rauchen verursachter DNA-Schaden nach Behandlung mit Celecoxib reduziert werden, was mehrere Wirkmechanismen als Ursache für diesen Fund nahelegen [191].

Celecoxib hat Potential für die Anwendung in der Chemoprävention [192]. Neben kardiovaskulären sollten hierfür auch gastrointestinalen Nebenwirkungen nach längerer Aufnahme berücksichtigt und möglichst reduziert werden, auch wenn diese Probleme im Vergleich zu anderen Substanzen wie Ibuprofen bei Celecoxib schwächer ausgeprägt sind [193]. Neben Hormonen oder Vakzinen werden weitere nichtsteroidale Antirheumatika für die Chemoprävention diskutiert [194]. Der Grund liegt in der Inhibierung der Prostaglandinsynthese durch COX-2-Hemmer. Prostaglandin kann COX-2-abhängig von Tumorzellen produziert werden und das Tumorwachstum stimulieren. Wird COX-2 möglichst selektiv gehemmt, könnte dies einen vielversprechenden und sicheren Ansatz bieten, da die meisten Nebenwirkungen durch gleichzeitige COX-1-Inhibierung ausgelöst werden [195]. Allerdings scheinen die antikarzinogenen Effekte von Celecoxib unabhängig von der COX-2-Aktivität zu sein [102].

Celecoxib wurde zur Chemoprävention von Kolorektaladenomen in Langzeitstudien untersucht und es konnte eine klare Verringerung der Wiederkehr von Adenomen festgestellt werden. Allerdings führten höhere Dosen von Celecoxib (400 mg zweimal täglich) zu einem erhöhten Risiko von kardiovaskulären Erkrankungen, wodurch die Dosierung entscheidend für den Therapiererfolg ist [192]. Weiterhin könnte Celecoxib in der Radiotherapie Anwendung finden, wo es gesundes Gewebe vor Schäden schützt und Tumorzellen empfindlicher macht [196]. Auch eine topische Anwendung von Celecoxib scheint möglich und würde für die Chemoprävention von Hauttumoren eine effektive Verabreichungsform mit verringerter systemischer Toxizität darstellen [197].

Neue Derivate könnten dabei helfen, die vorteilhaften Effekte der Celecoxibbehandlung zu erhalten oder zu verstärken und gleichzeitig die Toxizität zu verringern [104]. Auch wenn keine Gentoxizität in HeLa-H2B-GFP-Zellen beobachtet wurde, bleibt es unklar, ob DNA-Schäden in anderen Zelllinien z. B. mit metabolischer Aktivierung oder anderen Testmethoden auftreten können. So besteht die international akzeptierte Standardtestbatterie zur Untersuchung der Gentoxizität für Arzneimittel aus einem Mutagenitätstest in Bakterien sowie einer In-vitro-Studie in Säugerzellen. Letztere kann ein Mikrokerntest wie in dieser Arbeit sein, aber auch ein Chromosomenaberrationstest oder ein Thymidinkinase-Genmutationstest in L5178Y-Zellen sind möglich oder notwendig. Weitere Tests, ggf. auch In-vivo-Versuche, können abhängig von der Substanz und den Ergebnissen aus vorherigen Versuchen notwendig sein [198]. Da die meisten Zulassungsbehörden weltweit diese Strategie implementiert haben, führt an einer derartigen Gentoxizitätsuntersuchung und damit auch am Daten aus Mikrokerntests, kein Weg bei einer Zulassung als Arzneimittel vorbei. Da die Ergebnisse aus dieser Studie keine Anzeichen einer Gentoxizität gezeigt haben, spricht nichts gegen eine weitere Entwicklung von Celecoxibderivaten. Zwar sind weiterhin für eine erfolgreiche Arzneimittelentwicklung noch zusätzliche Informationen zu den pharmakologischen und toxikologischen Aktivitäten der Celecoxibderivate notwendig, dennoch weisen die vorhandenen Daten auf einiges Potenzial für diese Substanzen hin.

5.2.3 Kognitive Beeinträchtigungen und ihre Bedeutung für chromosomale Instabilität in Mundschleimhautzellen

Aus vorherigen Studien ist ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Mikrokernen und neurodegenerativen Erkrankungen bekannt [199]. Um diesen Zusammenhang genauer zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit Mikrokerntests in Mundschleimhautzellen von einer Referenzgruppe ohne schwere neurodegenerative Erkrankungen sowie von einer Patientengruppe einer örtlichen Ambulanz mit einer derartigen Erkrankung durchgeführt. Ein weiteres Ziel war die Untersuchung von verschiedenen Einflussfaktoren bei Proben von Teilnehmern der Referenzgruppe auf das Ergebnis im Mikrokerntest. Insgesamt wurden über 400 Proben ausgewertet, wodurch der Einfluss von Ausreißern und Artefakten reduziert werden sollte. Sowohl Referenz- wie Patientengruppe hatten ein ähnliches Durchschnittsalter (76 bzw. 73). Es wurde zuvor beschrieben, dass mit zunehmendem Alter der Probanden, die Häufigkeit von Mikrokernen in Mundschleimhautzellen zunimmt [110]. Das hohe Durchschnittsalter über alle Teilnehmer hinweg sollte mögliche Verzerrungen reduzieren und könnte weiterhin auch die vergleichsweise hohe Anzahl an gezählten Mikrokernen erklären [108].

Beim Vergleich zwischen Referenz- und Patientengruppe wurden in keinem der untersuchten Parameter signifikante Unterschiede entdeckt. Auch das Geschlecht spielt basierend auf den erhobenen Daten keine entscheidende Rolle für das Testergebnis. Allerdings zeigte sich in der Referenzgruppe bei Teilnehmern mit MMSE-Wert <27 ein Anstieg der karyolytischen Zellen, sodass es einen Zusammenhang zwischen einer reduzierten mentalen Kapazität und Zelltod geben könnte. Weiterhin wurde in beiden Gruppen ein kleiner, aber nicht-signifikanter Anstieg in der Anzahl von Mikrokernen und mikrokernhaltigen Zellen gezählt, wenn der MMSE-Wert <27 war, sodass auch ein gewisser Zusammenhang zwischen eingeschränkter mentaler Kapazität und dem Auftreten von Mikrokernen existieren könnte. Eine andere Studie kam zu dem Ergebnis, dass MMSE-Werte und die Mikrokernhäufigkeit in Lymphozyten bei Alzheimerpatienten, aber nicht bei Individuen mit LKB negativ korreliert sind [114]. Ein teilweise anderes Ergebnis wurde in Mundschleimhautzellen von jungen und älteren Alzheimerpatienten im Vergleich zur

Kontrollgruppe erhalten: Während bei jungen Alzheimerpatienten ein leichter Anstieg von mikrokernhaltigen Zellen beobachtet wurde, wurden in älteren Patienten weniger mikrokernhaltige Zellen gefunden. In beiden Gruppen wurden weiterhin weniger Zellen, die auf Zelltod hinweisen, gezählt (karyorrhektische, karyolytische oder Zellen mit kondensiertem Chromatin) [200]. Eine Erklärung für diese Funde könnten in Veränderungen der Gehalte an Vitamin B₁₂ und Homocystein liegen, die einen Einfluss auf einige der untersuchten Parameter haben [201]. Kein signifikanter Unterschied zwischen Alzheimerpatienten und Kontrolle wurde im Zytokinese-Block Mikrokerntest beobachtet, wobei jedoch ein Anstieg in der Häufigkeit nukleärer „Knospen“ bei Individuen mit LKB gesehen wurde [114]. In einer älteren Studie in Lymphozyten konnte ein klarer Anstieg an Mikrokernen bei Alzheimerpatienten festgestellt werden, was auf Aneuploidie hinweisen könnte [202, 203]. Sowohl die sporadische als auch die familiäre Form von Morbus Alzheimer haben in einer anderen Studie in Lymphozyten zu einem Anstieg der Mikrokernhäufigkeit geführt [204].

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen den Parametern des Mikrokerntests in Mundschleimhautzellen sowie mentalen Einschränkungen genauer zu charakterisieren, wurde das Auftreten von LKB in ansonsten gesunden (d.h. ohne weitere schwere neurodegenerative Erkrankungen) Teilnehmern der Referenzgruppe untersucht. Es wurde kein Anstieg von Mikrokernen oder mikrokernhaltigen Zellen beobachtet bei Teilnehmern mit LKB. Dies könnte durch die Entstehung der Krankheit erklärt werden: Oxidativer Stress entwickelt sich in der Frühphase von Morbus Alzheimer, wird aber mit zunehmenden Krankheitsverlauf wieder reduziert. Aus diesem Grund könnte chromosomale Instabilität in Form von Mikrokernen nur während einer sehr begrenzten Zeit oder auch gar nicht in Mundschleimhautzellen beobachtet werden [116]. Allerdings wurde zumindest in Lymphozyten in vorherigen Studien eine starke positive Korrelation zwischen der Mikrokernhäufigkeit und dem Auftreten von LKB gefunden [205]. Auch für andere neurodegenerative Erkrankungen oder angeborene neurologische Behinderungen wie Morbus Parkinson oder das Down-Syndrom wurde ein Anstieg der Häufigkeit von Mikrokernen aber auch von anderen DNA-Schadensmarkern in verschiedenen Geweben beschrieben [199].

Zusammengenommen scheint es keinen klaren Zusammenhang zwischen Morbus Alzheimer von dem Auftreten von DNA-Schäden in Form von Mikrokernen zu geben. Möglicherweise haben einer oder mehrere Störfaktoren in den verschiedenen veröffentlichten Studien ein Ergebnis überdeckt. Außerdem ist ein direkter Vergleich mit dieser Arbeit schwierig, da ein MMSE-Wert <27 nicht identisch zur Diagnose von Morbus Alzheimer oder LKB ist. Andere Parameter wie das Auftreten von karyolytischen Zellen könnten einen sensitiveren Marker bei der Untersuchung von Veränderungen auf Grund der mentalen Kapazität darstellen.

Die Häufigkeit von Mikrokernen war in untersuchten Proben von Teilnehmern der Referenzgruppe mit Depression reduziert. Dies ist überraschend, da ein erhöhtes Level von oxidativem Stress sowie eine reduzierte DNA-Schadensreparatur in depressiven Menschen beobachtet wurde, was beides DNA-Schäden begünstigen sollte [206]. Durch Antidepressiva könnten Enzyme, die oxidativen Stress reduzieren, induziert werden [207]. Jedoch bleibt es fraglich, ob dieser Effekt so weit geht, dass die antioxidative Kapazität von depressiven Menschen dadurch so weit gestärkt wird, dass DNA-Schäden seltener auftreten. Da auch karyolytische Zellen vermehrt in depressiven Menschen gefunden wurden, könnte Zelltod eine Rolle in der Pathophysiologie der Depression spielen. Auch wenn es schon länger Hinweise gibt, dass Depression Zelltod von neuronalem Gewebe fördert, lässt sich über den Einfluss auf Mundschleimhautzellen nur spekulieren [208].

Auch zahlreiche andere Einflussfaktoren könnten einen oder mehrere Parameter des Mikrokerntests in Mundschleimhautzellen beeinflussen, zum Beispiel der BMI, Rauchverhalten oder Krebserkrankungen. In adipösen Teilnehmern der Studie wurde ein Anstieg an Mikrokernen beobachtet. Die Induktion von DNA-Schäden durch Übergewicht wurde zuvor schon beschrieben und auch Mundschleimhautzellen scheinen ein geeigneter Marker zur Vorhersage potenzieller DNA-Schäden durch Übergewicht zu sein [209, 210].

Kein Mikrokernelanstieg wurde in Rauchern gefunden. Es konnte jedoch in einer Meta-Analyse gezeigt werden, dass nur starkes Rauchen (≥ 40 Zigaretten/Tag) einen signifikanten Mikrokernelanstieg in Mundschleimhautzellen verursachen können [110]. Da die meisten Raucher in dieser Studie nur wenige Zigaretten konsumiert haben, könnte dies die Abwesenheit jeglicher Effekte erklären. Ähnlich zum Rauchen wurde

auch nur nach starkem Alkoholkonsum Unterschiede auf Parameter des Mikrokerntests in Mundschleimhautzellen gefunden. Allerdings wurde dann, ähnlich wie in unserer Studie, bei hohen Dosen ein Rückgang an Mikrokernen beobachtet, was im Widerspruch zur erwarteten Toxizität durch Alkohol vor allem im Mundraum steht [110].

Der Zusammenhang zwischen Krebs und Mikrokernen ist schon länger bekannt und auch der Mikrokerntest in Mundschleimhautzellen wurde schon zur Untersuchung verschiedener Krebserkrankungen genutzt [109]. Überraschenderweise wurden allerdings in Proben von Krebspatienten weniger Mikrokern und weniger karyolytische, karyorrhektische und Zellen mit kondensiertem Chromatin gefunden. Ein aktuelles Review konnte bei Umweltkarzinogenen eine hohe Variabilität im Hinblick auf die chromosomale Instabilität von Mundschleimhautzellen feststellen [211]. Da zahlreiche verschiedene Krebsarten in dieser Studie gruppiert wurden und Störfaktoren nicht ausgeschlossen werden können, kann es sein, dass sich diese Unterschiede zu den unerwarteten beobachteten Ergebnissen aufsummiert haben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass kein Anstieg der DNA-Schäden zwischen Referenz- und Patientengruppe beobachtet wurde. Der Mikrokerntest in Mundschleimhautzellen kann zur Untersuchung verschiedener Einflussfaktoren genutzt werden. Ein Zusammenhang zwischen Veränderungen einzelner Parameter und reduzierter mentaler Kapazität wurde gefunden. Auch Depression wurde als Einflussfaktor bestimmt. Jedoch sind zur genaueren Charakterisierung des Effekts von neurodegenerativen Erkrankungen auf Mundschleimhautzellen weitere Informationen notwendig, wobei auf den Einfluss durch Störfaktoren bei der Interpretation der Ergebnisse geachtet werden muss.

6 Schlussfolgerung

Mikrokerne sind zwar lange bekannt, doch umfangreiche Studien über die Konsequenzen und Relevanz der Mikrokernbildung sind erst seit einigen Jahren verfügbar. Durch diese Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, wie sich Mikrokerne und mikrokernhaltige Zellen innerhalb eines längeren Zeitraums von 96 h, entsprechend 4-5 Mitosen, verhalten. Persistenz und Reinkorporation konnten als die mit Abstand relevantesten Schicksale von Mikrokernen identifiziert werden. Mikrokernhaltige Zellen teilen sich zumindest teilweise weiterhin, wodurch der Inhalt des Mikrokerns in den meisten Fällen nicht verloren geht. Dennoch zeigt sich an Prozessen wie der Ruptur von Mikrokernen und der Chromosomen, dass der Mikrokerninhalt nicht unverändert bleibt, sondern weitere DNA-Schäden auftreten können, was im Zusammenhang mit der Kanzerogenese wahrscheinlich mit einer schlechten Prognose für Krebspatienten verbunden ist. Auch ohne Chromothripsis ist durch eine eingeschränkte Mikrokernmembranintegrität Replikation, Transkription und DDR nur zum Teil möglich, wodurch in über mehrere Zellteilungen persistierenden Mikrokernen damit zu rechnen ist, dass im Mikrokern enthaltenen Geninformationen für die Zelle immer schlechter verfügbar werden. Weitere Untersuchungen in diesem Bereich machen jedoch eine direkte Verfolgung des Mikrokerninhalts, auch über eine Mitose hinaus, notwendig, wie es zum Beispiel mit einem photokonvertiblen Fluorophor möglich wäre. Bisher wurde nicht weiter untersucht, wie sich die Wahrscheinlichkeit des Eintretens von Chromothripsis über mehrere Zellteilungen hinweg, auch in Abhängigkeit von verschiedenen genotoxischen Agenzien, verändern könnte.

Mikrokerne sind weiterhin als Biomarker für durch Chemikalien oder Krankheiten verursachte chromosomale Instabilität. Durch die Untersuchung von Mikrokernhäufigkeiten konnten für Thebain und Celecoxib mit seinen Derivaten Informationen über mögliche von diesen Substanzen ausgehende DNA-Schäden gefunden werden, während die Eignung von Mikrokernen in Mundschleimhautzellen zur Untersuchung von Effekten von neurodegenerativen Erkrankungen zweifelhaft bleibt. Ein besseres Verständnis des Schicksals von Mikrokernen und mikrokernhaltigen Zellen kann aber auch helfen, die Ergebnisse aus den

6 Schlussfolgerung

verschiedenen Varianten des Mikrokerntests besser einzuordnen und zu verstehen. So konnte gezeigt werden, dass Mikrokerne keine vorübergehende Manifestation chromosomaler Instabilität ohne langfristige Folgen für die Zellen oder das Gewebe sind, sondern zu weiteren, stabilen DNA-Veränderungen führen können, die die Kanzerogenese befördern können. Daher sollte bei der Interpretation des Mikrokerntests, gerade auch im Vergleich mit anderen Gentoxizitätstests und im Falle widersprüchlicher Testergebnisse, berücksichtigt werden, dass Mikrokerne nicht nur Biomarker für DNA-Schäden oder chromosomaler Instabilität sind, sondern wahrscheinlich auch eine eigenständige biologische Funktion in der Kanzerogenese haben.

7 Literatur

1. Reimann, H., H. Stopper, and H. Hintzsche, *Long-term fate of etoposide-induced micronuclei and micronucleated cells in Hela-H2B-GFP cells*. Arch Toxicol, 2020.
2. Reimann, H., et al., *Cytokinesis-block micronucleus assay of celecoxib and celecoxib derivatives*. Toxicol Rep, 2020. **7**: S. 1588-1591.
3. Reimann, H., et al., *Micronucleus frequency in buccal mucosa cells of patients with neurodegenerative diseases*. Sci Rep, 2020. **10**(1): S. 22196.
4. Norppa, H. and G.C.M. Falck, *What do human micronuclei contain?* Mutagenesis, 2003. **18**(3): S. 221-233.
5. Hatch, Emily M., et al., *Catastrophic Nuclear Envelope Collapse in Cancer Cell Micronuclei*. Cell, 2013. **154**(1): S. 47-60.
6. Hanahan, D. and Robert A. Weinberg, *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*. Cell, 2011. **144**(5): S. 646-674.
7. Shimizu, N., *Molecular mechanisms of the origin of micronuclei from extrachromosomal elements*. Mutagenesis, 2011. **26**(1): S. 119-123.
8. Jeremic, B., Y. Shibamoto, and M. Abe, *Assessment of micronucleus induction in murine SCCVII cells treated with various anticancer agents*. Chemotherapy, 1996. **42**(4): S. 266-72.
9. Fowler, P., et al., *Etoposide; colchicine; mitomycin C and cyclophosphamide tested in the in vitro mammalian cell micronucleus test (MNvit) in Chinese hamster lung (CHL) cells at Covance laboratories; Harrogate UK in support of OECD draft Test Guideline 487*. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2010. **702**(2): S. 175-180.
10. Terradas, M., et al., *DNA lesions sequestered in micronuclei induce a local defective-damage response*. DNA Repair, 2009. **8**(10): S. 1225-1234.
11. Lutz, W.K., et al., *Different Types of Combination Effects for the Induction of Micronuclei in Mouse Lymphoma Cells by Binary Mixtures of the Genotoxic Agents MMS, MNU, and Genistein*. Toxicological Sciences, 2005. **86**(2): S. 318-323.
12. Massey, E.D. and S. Hinchliffe, *2-Aminoanthracene, diethylstilboesterol and vinblastine tested in the in vitro mammalian cell micronucleus test at British American Tobacco UK in support of the OECD draft Test Guideline 487*. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2010. **702**(2): S. 208-211.
13. Andreassi, M.G., et al., *The association of micronucleus frequency with obesity, diabetes and cardiovascular disease*. Mutagenesis, 2011. **26**(1): S. 77-83.
14. Coppedè, F., et al., *Association of micronucleus frequency with neurodegenerative diseases*. Mutagenesis, 2011. **26**(1): S. 85-92.
15. Bonassi, S., et al., *An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans*. Carcinogenesis, 2007. **28**(3): S. 625-31.
16. Hintzsche, H., H. Reimann, and H. Stopper, *Schicksal von Mikrokernen und mikrokernhaltigen Zellen*. BIOSpektrum, 2018. **24**(4): S. 379-381.
17. Kirsch-Volders, M., et al., *The in vitro MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance*. Archives of Toxicology, 2011. **85**(8): S. 873-899.
18. Kisurina-Evgenieva, O.P., O.I. Sutiagina, and G.E. Onishchenko, *Biogenesis of micronuclei*. Biochemistry (Moscow), 2016. **81**(5): S. 453-464.
19. Shimizu, N., N. Misaka, and K.-i. Utani, *Nonselective DNA damage induced by a replication inhibitor results in the selective elimination of extrachromosomal double*

- minutes from human cancer cells*. Genes, Chromosomes and Cancer, 2007. **46**(10): S. 865-874.
20. Utani, K., A. Okamoto, and N. Shimizu, *Generation of micronuclei during interphase by coupling between cytoplasmic membrane blebbing and nuclear budding*. PLoS One, 2011. **6**(11): S. e27233.
 21. Wilhelm, T., M. Said, and V. Naim, *DNA Replication Stress and Chromosomal Instability: Dangerous Liaisons*. Genes (Basel), 2020. **11**(6).
 22. Hintzsche, H., et al., *Fate of micronuclei and micronucleated cells*. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 2017. **771**: S. 85-98.
 23. Stopper, H. and H. Hintzsche, *CHAPTER 3 The Fate of Micronuclei and Micronucleated Cells*, in *The Micronucleus Assay in Toxicology*. 2019, The Royal Society of Chemistry. S. 24-37.
 24. Rogakou, E.P., et al., *DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139*. J Biol Chem, 1998. **273**(10): S. 5858-68.
 25. Riballo, E., et al., *A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma-H2AX foci*. Mol Cell, 2004. **16**(5): S. 715-24.
 26. Otto, F.B. and M. Thumm, *Mechanistic dissection of macro- and micronucleophagy*. Autophagy, 2020: S. 1-14.
 27. Rello-Varona, S., et al., *Autophagic removal of micronuclei*. Cell Cycle, 2012. **11**(1): S. 170-176.
 28. Yu, L., Y. Chen, and S.A. Tooze, *Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms*. Autophagy, 2018. **14**(2): S. 207-215.
 29. Sagona, A.P., I.P. Nezis, and H. Stenmark, *Association of CHMP4B and autophagy with micronuclei: implications for cataract formation*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: S. 974393.
 30. Maass, K.K., et al., *Altered nuclear envelope structure and proteasome function of micronuclei*. Experimental Cell Research, 2018. **371**(2): S. 353-363.
 31. Nito, S., F. Ariyuki, and A. Okaniwa, *Spontaneous expulsion of micronuclei by enucleation in the micronucleus assay*. Mutation Research Letters, 1988. **207**(3): S. 185-192.
 32. Schriever-Schwemmer, G., U. Kliesch, and I.-D. Adler, *Extruded micronuclei induced by colchicine or acrylamide contain mostly lagging chromosomes identified in paintbrush smears by minor and major mouse DNA probes*. Mutagenesis, 1997. **12**(4): S. 201-207.
 33. Parton, J.W., et al., *Expulsion of demecolcine-induced micronuclei from mouse bone marrow polychromatic erythrocytes*. Environmental and Molecular Mutagenesis, 1991. **17**(2): S. 79-83.
 34. Von Hoff, D.D., et al., *Elimination of extrachromosomally amplified MYC genes from human tumor cells reduces their tumorigenicity*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1992. **89**(17): S. 8165-8169.
 35. Shimizu, N., T. Shimura, and T. Tanaka, *Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2000. **448**(1): S. 81-90.
 36. Valent, A., et al., *In Vivo Elimination of Acentric Double Minutes Containing Amplified MYCN from Neuroblastoma Tumor Cells Through the Formation of Micronuclei*. The American Journal of Pathology, 2001. **158**(5): S. 1579-1584.
 37. Decordier, I., et al., *Elimination of micronucleated cells by apoptosis after treatment with inhibitors of microtubules*. Mutagenesis, 2002. **17**(4): S. 337-344.
 38. Vukicevic, V., K. Kampfinger, and H. Stopper, *Influence of altered apoptosis in human lymphoblastoid cell lines on micronucleus frequency*. Toxicology Letters, 2004. **147**(2): S. 187-195.
 39. Decordier, I., E. Cundari, and M. Kirsch-Volders, *Influence of caspase activity on micronuclei detection: a possible role for caspase-3 in micronucleation*. Mutagenesis, 2005. **20**(3): S. 173-179.

40. Decordier, I., E. Cundari, and M. Kirsch-Volders, *Survival of aneuploid, micronucleated and/or polyploid cells: Crosstalk between ploidy control and apoptosis*. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2008. **651**(1): S. 30-39.
41. Whitwell, J., et al., *Relationships between p53 status, apoptosis and induction of micronuclei in different human and mouse cell lines in vitro: Implications for improving existing assays*. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2015. **789-790**(Supplement C): S. 7-27.
42. Yamamoto, M., et al., *Chromosome loss caused by DNA fragmentation induced in main nuclei and micronuclei of human lymphoblastoid cells treated with colcemid*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2014. **762**(Supplement C): S. 10-16.
43. Terradas, M., et al., *Genetic activities in micronuclei: Is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell?* Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 2010. **705**(1): S. 60-67.
44. Rizzoni, M., et al., *Indirect mitotic nondisjunction in Vicia faba and Chinese hamster cells*. Chromosoma, 1989. **97**(4): S. 339-346.
45. Gustavino, B., et al., *Mitotic indirect non-disjunction in phytohemagglutinin stimulated human lymphocytes*. Mutagenesis, 1994. **9**(1): S. 17-21.
46. Minissi, S., et al., *Direct and indirect non-disjunction in the origin of trisomy in cultured human lymphocytes*. Mutagenesis, 1999. **14**(6): S. 557-562.
47. Thompson, S.L. and D.A. Compton, *Chromosome missegregation in human cells arises through specific types of kinetochore-microtubule attachment errors*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011. **108**(44): S. 17974-17978.
48. Schultz, N. and A. Önfelt, *Video time-lapse study of mitosis in binucleate V79 cells: chromosome segregation and cleavage*. Mutagenesis, 1994. **9**(2): S. 117-123.
49. Yang, A.H., et al., *Chromosome segregation defects contribute to aneuploidy in normal neural progenitor cells*. J Neurosci, 2003. **23**(32): S. 10454-62.
50. Hoffelder, D.R., et al., *Resolution of anaphase bridges in cancer cells*. Chromosoma, 2004. **112**(8): S. 389-397.
51. Utani, K.-i., et al., *Emergence of Micronuclei and Their Effects on the Fate of Cells under Replication Stress*. PLoS ONE, 2010. **5**(4): S. e10089.
52. Huang, Y., et al., *The fate of micronucleated cells post X-irradiation detected by live cell imaging*. DNA Repair, 2011. **10**(6): S. 629-638.
53. Huang, Y., et al., *Lagging chromosomes entrapped in micronuclei are not 'lost' by cells*. Cell Res, 2012. **22**(5): S. 932-935.
54. Vázquez-Diez, C., et al., *Micronucleus formation causes perpetual unilateral chromosome inheritance in mouse embryos*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2016. **113**(3): S. 626-631.
55. Soto, M., et al., *Chromosomes trapped in micronuclei are liable to segregation errors*. J Cell Sci, 2018. **131**(13).
56. Jiang, E., et al., *The roles of kinetochore of micronucleus in mitosis of HeLa cells: a live cell imaging study*. Cancer Cell International, 2019. **19**(1): S. 206.
57. Yasui, M., et al., *Live cell imaging of micronucleus formation and development*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2010. **692**(1-2): S. 12-18.
58. Eckert, I., et al., *Micronuclei containing whole chromosomes harbouring the selectable gene do not lead to mutagenesis*. Mutagenesis, 1997. **12**(5): S. 379-382.
59. Schlegel, R. and J.T. MacGregor, *The persistence of micronucleated erythrocytes in the peripheral circulation of normal and splenectomized Fischer 344 rats: Implications for cytogenetic screening*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 1984. **127**(2): S. 169-174.
60. Narumi, K., et al., *Persistence and accumulation of micronucleated hepatocytes in liver of rats after repeated administration of diethylnitrosamine*. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2013. **755**(2): S. 100-107.

61. Oobatake, Y. and N. Shimizu, *Double-strand breakage in the extrachromosomal double minutes triggers their aggregation in the nucleus, micronucleation, and morphological transformation*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2019.
62. Crasta, K., et al., *DNA breaks and chromosome pulverization from errors in mitosis*. *Nature*, 2012. **482**: S. 53.
63. Ettinger, A. and T. Wittmann, *Fluorescence live cell imaging*. *Methods Cell Biol*, 2014. **123**: S. 77-94.
64. Tsien, R.Y., *THE GREEN FLUORESCENT PROTEIN*. *Annual Review of Biochemistry*, 1998. **67**(1): S. 509-544.
65. Bevis, B.J. and B.S. Glick, *Rapidly maturing variants of the Discosoma red fluorescent protein (DsRed)*. *Nat Biotechnol*, 2002. **20**(1): S. 83-7.
66. Nagai, T., et al., *A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications*. *Nature Biotechnology*, 2002. **20**(1): S. 87-90.
67. Kanda, T., K.F. Sullivan, and G.M. Wahl, *Histone-GFP fusion protein enables sensitive analysis of chromosome dynamics in living mammalian cells*. *Curr Biol*, 1998. **8**(7): S. 377-85.
68. Wolffe, A., *Chromatin: Structure and Function*. 1995: Academic Press.
69. Laissue, P.P., et al., *Assessing phototoxicity in live fluorescence imaging*. *Nature Methods*, 2017. **14**: S. 657.
70. Icha, J., et al., *Phototoxicity in live fluorescence microscopy, and how to avoid it*. *Bioessays*, 2017. **39**(8).
71. Magidson, V. and A. Khodjakov, *Circumventing photodamage in live-cell microscopy*. *Methods Cell Biol*, 2013. **114**: S. 545-60.
72. Huang, Y., M. Fenech, and Q. Shi, *Micronucleus formation detected by live-cell imaging*. *Mutagenesis*, 2011. **26**(1): S. 133-138.
73. Heddle, J.A., et al., *Reflections on the development of micronucleus assays*. *Mutagenesis*, 2011. **26**(1): S. 3-10.
74. Sommer, S., I. Buraczewska, and M. Kruszewski, *Micronucleus Assay: The State of Art, and Future Directions*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(4).
75. Fenech, M., et al., *HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2003. **534**(1): S. 65-75.
76. Bolognesi, C., et al., *Buccal micronucleus cytome assay: results of an intra- and inter-laboratory scoring comparison*. *Mutagenesis*, 2015. **30**(4): S. 545-555.
77. OECD, *Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test*. 2016: OECD Publishing.
78. Murgia, E., et al., *Validation of micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes as early cancer risk biomarker in a nested case-control study*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2008. **639**(1): S. 27-34.
79. Fenech, M., *Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2006. **600**(1): S. 58-66.
80. Francies, F.Z., et al., *Diagnosis of Fanconi Anaemia by ionising radiation- or mitomycin C-induced micronuclei*. *DNA Repair (Amst)*, 2018. **61**: S. 17-24.
81. Torres-Bugarín, O., et al., *Genotoxic Effect in Autoimmune Diseases Evaluated by the Micronucleus Test Assay: Our Experience and Literature Review*. *BioMed Research International*, 2015. **2015**: S. 194031.
82. Kirsch-Volders, M., et al., *Micronuclei, inflammation and auto-immune disease*. *Mutat Res*, 2020. **786**: S. 108335.
83. Fenech, M. and A. Morley, *Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay*. *Cytobios*, 1985. **43**(172-173): S. 233-46.

84. Fenech, M., *Cytokinesis-block micronucleus cytome assay*. Nat. Protocols, 2007. **2**(5): S. 1084-1104.
85. OECD, *Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test*. 2016: OECD Publishing.
86. Fenech, M., *Cytokinesis-Block Micronucleus Cytome Assay Evolution into a More Comprehensive Method to Measure Chromosomal Instability*. Genes (Basel), 2020. **11**(10).
87. Presley, C.C. and C.W. Lindsley, *DARK Classics in Chemical Neuroscience: Opium, a Historical Perspective*. ACS Chemical Neuroscience, 2018. **9**(10): S. 2503-2518.
88. Kramlinger, V.M., et al., *Cytochrome P450 3A Enzymes Catalyze the O6-Demethylation of Thebaine, a Key Step in Endogenous Mammalian Morphine Biosynthesis*. J Biol Chem, 2015. **290**(33): S. 20200-10.
89. Misra, A.L., R.B. Pontani, and S.J. Mulé, *Pharmacokinetics and Metabolism of [3H] Thebaine*. Xenobiotica, 1974. **4**(1): S. 17-32.
90. Zhang, Y., et al., *Study on the Activation of the Opioid Receptors by a Set of Morphine Derivatives in a Well-Defined Assay System*. Neurochemical Research, 2012. **37**(2): S. 410-416.
91. Nikolaev, V.O., et al., *Live cell monitoring of mu-opioid receptor-mediated G-protein activation reveals strong biological activity of close morphine biosynthetic precursors*. J Biol Chem, 2007. **282**(37): S. 27126-32.
92. Goldinger, A., W.E. Müller, and U. Wollert, *Inhibition of glycine and GABA receptor binding by several opiate agonists and antagonists*. General Pharmacology: The Vascular System, 1981. **12**(6): S. 477-479.
93. Navarro, G. and H.W. Elliott, *The effects of morphine, morphinone and thebaine on the EEG and behavior of rabbits and cats*. Neuropharmacology, 1971. **10**(4): S. 367-377.
94. EFSA, *Update of the Scientific Opinion on opium alkaloids in poppy seeds*. EFSA Journal, 2018. **16**(5): S. e05243.
95. BfR, *Mohn in Lebensmitteln: Gehalt des Opiumalkaloids Thebain sollte so weit wie möglich gesenkt werden*. 2018(Stellungnahme Nr. 039/2018 des BfR vom 7. Dezember 2018).
96. Eisenreich, A., et al., *What do we know about health risks related to thebaine in food?* Food Chemistry, 2020. **309**: S. 125564.
97. Cohen, B. and C.V. Preuss, *Celecoxib*, in *StatPearls*. 2020, StatPearls Publishing: Treasure Island (FL).
98. Puljak, L., et al., *Celecoxib for osteoarthritis*. Cochrane Database Syst Rev, 2017. **5**: S. Cd009865.
99. Fidahic, M., et al., *Celecoxib for rheumatoid arthritis*. Cochrane Database Syst Rev, 2017. **6**: S. Cd012095.
100. McAdam, B.F., et al., *Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(1): S. 272-7.
101. Saxena, P., P.K. Sharma, and P. Purohit, *A journey of celecoxib from pain to cancer*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2019. **147**: S. 106379.
102. Schonthal, A.H., et al., *Celecoxib analogs that lack COX-2 inhibitory function: preclinical development of novel anticancer drugs*. Expert Opin Investig Drugs, 2008. **17**(2): S. 197-208.
103. Bennett, J.S., et al., *The use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): a science advisory from the American Heart Association*. Circulation, 2005. **111**(13): S. 1713-6.
104. Ngo, Q.A., et al., *Design, Synthesis and Biological Activities of New Pyrazole Derivatives Possessing Both Coxib and Combretastatins Pharmacophores*. Chem Biodivers, 2019.
105. Zhou, S., S. Yang, and G. Huang, *Design, synthesis and bioactivities of Celecoxib analogues or derivatives*. Bioorg Med Chem, 2017. **25**(17): S. 4887-4893.

106. Tolbert, P.E., C.M. Shy, and J.W. Allen, *Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development*. Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, 1992. **271**(1): S. 69-77.
107. Bolognesi, C., et al., *The HUMNxl scoring criteria for different cell types and nuclear anomalies in the buccal micronucleus cytome assay - an update and expanded photogallery*. Mutat Res, 2013. **753**(2): S. 100-13.
108. Thomas, P., et al., *Buccal micronucleus cytome assay*. Nat. Protocols, 2009. **4**(6): S. 825-837.
109. Bolognesi, C., et al., *Clinical application of micronucleus test in exfoliated buccal cells: A systematic review and metanalysis*. Mutat Res Rev Mutat Res, 2015. **766**: S. 20-31.
110. Bonassi, S., et al., *The HUMan MicroNucleus project on eXfoLiated buccal cells (HUMN(XL)): the role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol*. Mutat Res, 2011. **728**(3): S. 88-97.
111. Prince, M., M. Guerchet, and M. Prina, *The Epidemiology and Impact of Dementia - Current State and Future Trends*. WHO Thematic Briefing. 2015.
112. Wimo, A., et al., *The worldwide costs of dementia 2015 and comparisons with 2010*. Alzheimer's & Dementia, 2017. **13**(1): S. 1-7.
113. Selkoe, D.J., *SnapShot: Pathobiology of Alzheimer's Disease*. Cell, 2013. **154**(2): S. 468-468.e1.
114. Lee, S.L., et al., *Chromosomal DNA damage measured using the cytokinesis-block micronucleus cytome assay is significantly associated with cognitive impairment in South Australians*. Environ Mol Mutagen, 2015. **56**(1): S. 32-40.
115. Polak, T., et al., *Near-infrared spectroscopy (NIRS) and vagus somatosensory evoked potentials (VSEP) in the early diagnosis of Alzheimer's disease: rationale, design, methods, and first baseline data of the Vogel study*. Journal of Neural Transmission, 2017. **124**(11): S. 1473-1488.
116. Nunomura, A., et al., *Oxidative Damage Is the Earliest Event in Alzheimer Disease*. Journal of Neuropathology & Experimental Neurology, 2001. **60**(8): S. 759-767.
117. Gauthier, S.G., *Alzheimer's disease: the benefits of early treatment*. Eur J Neurol, 2005. **12 Suppl 3**: S. 11-6.
118. Sabe, L., et al., *Sensitivity and specificity of the Mini-Mental State Exam in the diagnosis of dementia*. Behav Neurol, 1993. **6**(4): S. 207-10.
119. Hou, Y., et al., *Genome instability in Alzheimer disease*. Mech Ageing Dev, 2017. **161**(Pt A): S. 83-94.
120. Guo, X., et al., *The molecular origins and pathophysiological consequences of micronuclei: New insights into an age-old problem*. Mutat Res, 2019. **779**: S. 1-35.
121. Telentschak, S., et al., *Cytokinesis failure and successful multipolar mitoses drive aneuploidy in glioblastoma cells*. Oncol Rep, 2015. **33**(4): S. 2001-8.
122. Vitale, I., et al., *Multipolar mitosis of tetraploid cells: inhibition by p53 and dependency on Mos*. Embo j, 2010. **29**(7): S. 1272-84.
123. He, B., et al., *Chromosomes missegregated into micronuclei contribute to chromosomal instability by missegregating at the next division*. Oncotarget, 2019. **10**(28): S. 2660-2674.
124. Ji, W., et al., *Expulsion of micronuclei containing amplified genes contributes to a decrease in double minute chromosomes from malignant tumor cells*. International Journal of Cancer, 2014. **134**(6): S. 1279-1288.
125. Rao, X., et al., *Multiple origins of spontaneously arising micronuclei in HeLa cells: Direct evidence from long-term live cell imaging*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2008. **646**(1-2): S. 41-49.
126. Shimizu, N., *Extrachromosomal Double Minutes and Chromosomal Homogeneously Staining Regions as Probes for Chromosome Research*. Cytogenetic and Genome Research, 2009. **124**(3-4): S. 312-326.
127. Wang, J., et al., *Comprehensive Chromosome End Remodeling during Programmed DNA Elimination*. Curr Biol, 2020.

128. Bo Otto, F. and M. Thumm, *Nucleophagy-Implications for Microautophagy and Health*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(12).
129. Almacellas, E., et al., *Lysosomal degradation ensures accurate chromosomal segregation to prevent chromosomal instability*. Autophagy, 2020: S. 1-18.
130. Pommier, Y., et al., *DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs*. Chem Biol, 2010. **17**(5): S. 421-33.
131. Jordan, M.A., *Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin*. Curr Med Chem Anticancer Agents, 2002. **2**(1): S. 1-17.
132. Desouky, O., N. Ding, and G. Zhou, *Targeted and non-targeted effects of ionizing radiation*. Journal of Radiation Research and Applied Sciences, 2015. **8**(2): S. 247-254.
133. Wyatt, M.D. and D.L. Pittman, *Methylating agents and DNA repair responses: Methylated bases and sources of strand breaks*. Chem Res Toxicol, 2006. **19**(12): S. 1580-94.
134. Imlay, J.A. and S. Linn, *DNA damage and oxygen radical toxicity*. Science, 1988. **240**(4857): S. 1302-9.
135. Maciejowski, J. and E.M. Hatch, *Nuclear Membrane Rupture and Its Consequences*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2020.
136. de Castro, I.J., et al., *CDK1 and PLK1 coordinate the disassembly and reassembly of the nuclear envelope in vertebrate mitosis*. Oncotarget, 2018. **9**(8): S. 7763-7773.
137. Liu, S., et al., *Nuclear envelope assembly defects link mitotic errors to chromothripsis*. Nature, 2018. **561**(7724): S. 551-555.
138. Kneissig, M., et al., *Micronuclei-based model system reveals functional consequences of chromothripsis in human cells*. Elife, 2019. **8**.
139. Warecki, B., et al., *ESCRT-III-mediated membrane fusion drives chromosome fragments through nuclear envelope channels*. The Journal of cell biology, 2020. **219**(3): S. e201905091.
140. Vietri, M. and H. Stenmark, *Orchestrating Nuclear Envelope Sealing during Mitosis*. Developmental Cell, 2018. **47**(5): S. 541-542.
141. Willan, J., et al., *ESCRT-III is necessary for the integrity of the nuclear envelope in micronuclei but is aberrant at ruptured micronuclear envelopes generating damage*. Oncogenesis, 2019. **8**(5): S. 29.
142. Vietri, M., et al., *Unrestrained ESCRT-III drives micronuclear catastrophe and chromosome fragmentation*. Nat Cell Biol, 2020.
143. Lusk, C.P. and N.R. Ader, *CHMPions of repair: Emerging perspectives on sensing and repairing the nuclear envelope barrier*. Curr Opin Cell Biol, 2020. **64**: S. 25-33.
144. Kramer, J., G. Schaich-Walch, and M. Nusse, *DNA synthesis in radiation-induced micronuclei studied by bromodeoxyuridine (BrdUrd) labelling and anti-BrdUrd antibodies*. Mutagenesis, 1990. **5**(5): S. 491-5.
145. Okamoto, A., K.-i. Utani, and N. Shimizu, *DNA replication occurs in all lamina positive micronuclei, but never in lamina negative micronuclei*. Mutagenesis, 2012. **27**(3): S. 323-327.
146. Leach, N.T. and C. Jackson-Cook, *Micronuclei with multiple copies of the X chromosome: do chromosomes replicate in micronuclei?* Mutation research, 2004. **554**(0): S. 89-94.
147. Phillips, S.G. and D.M. Phillips, *Sites of nucleolus production in cultured Chinese hamster cells*. J Cell Biol, 1969. **40**(1): S. 248-68.
148. Phillips, S.G. and D.M. Phillips, *Nucleolus-like bodies in micronuclei of cultured Xenopus cells*. Experimental Cell Research, 1979. **120**(2): S. 295-306.
149. Labidi, B., et al., *RNA polymerase activity in PtK1 micronuclei containing individual chromosomes. An in vitro and in situ study*. Exp Cell Res, 1987. **169**(1): S. 233-44.
150. Abend, M., S. Frombeck, and D. Van Beuningen, *Indications for an active process underlying spontaneous and radiation-induced micronucleation in L929 cells*. International Journal of Radiation Biology, 1999. **75**(12): S. 1567-1578.

151. Utani, K., J.K. Kawamoto, and N. Shimizu, *Micronuclei bearing acentric extrachromosomal chromatin are transcriptionally competent and may perturb the cancer cell phenotype*. Mol Cancer Res, 2007. **5**(7): S. 695-704.
152. Chang, H.H.Y., et al., *Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair*. Nature reviews. Molecular cell biology, 2017. **18**(8): S. 495-506.
153. Wright, W.D., S.S. Shah, and W.-D. Heyer, *Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks*. The Journal of biological chemistry, 2018. **293**(27): S. 10524-10535.
154. Lu, X. and D.P. Lane, *Differential induction of transcriptionally active p53 following UV or ionizing radiation: Defects in chromosome instability syndromes?* Cell, 1993. **75**(4): S. 765-778.
155. Unger, C., et al., *γ -Irradiation-induced Micronuclei from Mouse Hepatoma Cells Accumulate High Levels of the Tumor Suppressor Protein p53*. Cancer Research, 1994. **54**(14): S. 3651-3655.
156. Granetto, C., et al., *p53 accumulates in micronuclei after treatment with a DNA breaking chemical, methylnitrosourea, and with the spindle poison, vinblastine*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 1996. **352**(1): S. 61-64.
157. Medvedeva, N.G., et al., *Phosphorylation of Histone H2AX in Radiation-Induced Micronuclei*. Radiation Research, 2007. **168**(4): S. 493-498.
158. Yoshikawa, T., et al., *Phosphorylated H2AX Foci in Tumor Cells Have No Correlation with Their Radiation Sensitivities*. Journal of Radiation Research, 2009. **50**(2): S. 151-160.
159. Ly, P., et al., *Chromosome segregation errors generate a diverse spectrum of simple and complex genomic rearrangements*. Nat Genet, 2019. **51**(4): S. 705-715.
160. Sutyagina, O.I. and O.P. Kisurina-Evgenieva, *Morphofunctional Differences of Micronuclei in Cultures of Human p53-Positive and p53-Negative Tumor Cells*. Bull Exp Biol Med, 2019. **167**(6): S. 813-817.
161. Terradas, M., et al., *Nuclear envelope defects impede a proper response to micronuclear DNA lesions*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2012. **729**(1): S. 35-40.
162. Stephens, P.J., et al., *Massive Genomic Rearrangement Acquired in a Single Catastrophic Event during Cancer Development*. Cell, 2011. **144**(1): S. 27-40.
163. Luijten, M.N.H., J.X.T. Lee, and K.C. Crasta, *Mutational game changer: Chromothripsis and its emerging relevance to cancer*. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 2018. **777**: S. 29-51.
164. Umbreit, N.T., et al., *Mechanisms generating cancer genome complexity from a single cell division error*. Science, 2020. **368**(6488).
165. Maciejowski, J., et al., *Chromothripsis and Kataegis Induced by Telomere Crisis*. Cell, 2015. **163**(7): S. 1641-54.
166. Kato, H. and A.A. Sandberg, *Chromosome Pulverization in Human Cells With Micronuclei*. JNCI: Journal of the National Cancer Institute, 1968. **40**(1): S. 165-179.
167. Johnson, R.T. and P.N. Rao, *Mammalian Cell Fusion : Induction of Premature Chromosome Condensation in Interphase Nuclei*. Nature, 1970. **226**(5247): S. 717-722.
168. Ikeuchi, T., *Chromosome pulverization in chinese hamster multinucleate cells induced by bleomycin and cytochalasin B*. The Japanese journal of genetics, 1973. **48**(6): S. 391-405.
169. Obe, G., et al., *Premature chromosome condensation in a case of Fanconi's anemia*. Human Genetics, 1975. **28**(2): S. 159-162.
170. Obe, G., B. Beek, and V. Vidyadhar Gopal, *The human leukocyte test system: III. Premature chromosome condensation from chemically and X-ray induced micronuclei*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 1975. **27**(1): S. 89-101.

171. Stevens, J.B., et al., *Comparison of mitotic cell death by chromosome fragmentation to premature chromosome condensation*. Molecular Cytogenetics, 2010. **3**(1): S. 20.
172. Terzoudi, G.I., et al., *Stress induced by premature chromatin condensation triggers chromosome shattering and chromothripsis at DNA sites still replicating in micronuclei or multinucleate cells when primary nuclei enter mitosis*. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2015. **793**(Supplement C): S. 185-198.
173. Thayer, M.J., *Mammalian chromosomes contain cis-acting elements that control replication timing, mitotic condensation, and stability of entire chromosomes*. BioEssays, 2012. **34**(9): S. 760-770.
174. Ly, P., et al., *Selective Y centromere inactivation triggers chromosome shattering in micronuclei and repair by non-homologous end joining*. Nat Cell Biol, 2017. **19**(1): S. 68-75.
175. Li, W., et al., *Quantitative, noninvasive imaging of radiation-induced DNA double-strand breaks in vivo*. Cancer research, 2011. **71**(12): S. 4130-4137.
176. Shoshani, O., et al., *Chromothripsis drives the evolution of gene amplification in cancer*. Nature, 2020.
177. Zhang, C.-Z., M.L. Leibowitz, and D. Pellman, *Chromothripsis and beyond: rapid genome evolution from complex chromosomal rearrangements*. Genes & Development, 2013. **27**(23): S. 2513-2530.
178. Mackenzie, K.J., et al., *cGAS surveillance of micronuclei links genome instability to innate immunity*. Nature, 2017. **548**(7668): S. 461-465.
179. Bartsch, K., et al., *Absence of RNase H2 triggers generation of immunogenic micronuclei removed by autophagy*. Hum Mol Genet, 2017. **26**(20): S. 3960-3972.
180. Basit, A., et al., *The cGAS/STING/TBK1/IRF3 innate immunity pathway maintains chromosomal stability through regulation of p21 levels*. Exp Mol Med, 2020. **52**(4): S. 643-657.
181. Ku, J.W.K., et al., *Bacterial-induced cell fusion is a danger signal triggering cGAS-STING pathway via micronuclei formation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020.
182. Harding, S.M., et al., *Mitotic progression following DNA damage enables pattern recognition within micronuclei*. Nature, 2017. **548**: S. 466.
183. Gekara, N.O., *DNA damage-induced immune response: Micronuclei provide key platform*. The Journal of cell biology, 2017. **216**(10): S. 2999-3001.
184. Noteboom, W.D. and G.C. Mueller, *Inhibition of Cell Growth and the Synthesis of Ribonucleic Acid and Protein in HeLa Cells by Morphinans and Related Compounds*. Molecular Pharmacology, 1969. **5**(1): S. 38-48.
185. Nassiri, M.R., G.L. Flynn, and C. Shipman, Jr., *Inhibition of cell growth and DNA, RNA, and protein synthesis in vitro by fentanyl, sufentanil, and opiate analgesics*. Pharmacol Toxicol, 1991. **69**(1): S. 17-21.
186. Kawase, M., et al., *Cell death-inducing activity of opiates in human oral tumor cell lines*. Anticancer Res, 2002. **22**(1a): S. 211-4.
187. Amanlou, M., et al., *Adenosine deaminase activity modulation by some street drug: molecular docking simulation and experimental investigation*. Daru, 2014. **22**(1): S. 42.
188. Janusz, B., *DNA-Damaging Anticancer Drugs – A Perspective for DNA Repair-Oriented Therapy*. Current Medicinal Chemistry, 2017. **24**(15): S. 1488-1503.
189. FDA. CELEBREX. DailyMed 2019 [cited 2020 01.04.2020]; Available from: <https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?setid=8d52185d-421f-4e34-8db7-f7676db2a226>.
190. Hosseinimehr, S.J., et al., *Celecoxib mitigates genotoxicity induced by ionizing radiation in human blood lymphocytes*. Res Pharm Sci, 2017. **12**(1): S. 82-87.
191. Izzotti, A., et al., *Modulation of genomic and epigenetic end-points by celecoxib*. Oncotarget, 2018. **9**(72): S. 33656-33681.
192. Veetil, S.K., et al., *Efficacy and safety of celecoxib on the incidence of recurrent colorectal adenomas: a systematic review and meta-analysis*. Cancer Manag Res, 2019. **11**: S. 561-571.

193. Ashcroft, D.M., et al., *Upper gastroduodenal ulceration in arthritis patients treated with celecoxib*. Ann Pharmacother, 2001. **35**(7-8): S. 829-34.
194. Benetou, V., A. Lagiou, and P. Lagiou, *Chemoprevention of cancer: current evidence and future prospects*. F1000Research, 2015. **4**(F1000 Faculty Rev): S. 916-916.
195. Krishnan, K., et al., *Cancer chemoprevention drug targets*. Curr Drug Targets, 2003. **4**(1): S. 45-54.
196. Cheki, M., et al., *COX-2 in Radiotherapy: A Potential Target for Radioprotection and Radiosensitization*. Curr Mol Pharmacol, 2018. **11**(3): S. 173-183.
197. Quiñones, O.G. and M.B.R. Pierre, *Cutaneous Application of Celecoxib for Inflammatory and Cancer Diseases*. Curr Cancer Drug Targets, 2019. **19**(1): S. 5-16.
198. ICH, *Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use S2(R1)*. 2011.
199. Migliore, L., et al., *Association of micronucleus frequency with neurodegenerative diseases*. Mutagenesis, 2011. **26**(1): S. 85-92.
200. Thomas, P., et al., *Buccal micronucleus cytochrome biomarkers may be associated with Alzheimer's disease*. Mutagenesis, 2007. **22**(6): S. 371-9.
201. Thomas, P. and M. Fenech, *Buccal Cytome Biomarkers and Their Association with Plasma Folate, Vitamin B12 and Homocysteine in Alzheimer's Disease*. Lifestyle Genomics, 2015. **8**(2): S. 57-69.
202. Migliore, L., et al., *Spontaneous and induced aneuploidy in peripheral blood lymphocytes of patients with Alzheimer's disease*. Hum Genet, 1997. **101**(3): S. 299-305.
203. Migliore, L., et al., *Preferential occurrence of chromosome 21 malsegregation in peripheral blood lymphocytes of Alzheimer disease patients*. Cytogenet Cell Genet, 1999. **87**(1-2): S. 41-6.
204. Trippi, F., et al., *Spontaneous and induced chromosome damage in somatic cells of sporadic and familial Alzheimer's disease patients*. Mutagenesis, 2001. **16**(4): S. 323-7.
205. François, M., et al., *Guanine-quadruplexes are increased in mild cognitive impairment and correlate with cognitive function and chromosomal DNA damage*. DNA Repair, 2016. **46**: S. 29-36.
206. Czarny, P., et al., *The interplay between inflammation, oxidative stress, DNA damage, DNA repair and mitochondrial dysfunction in depression*. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 2018. **80**: S. 309-321.
207. Schmidt, A.J., et al., *Effects of antidepressants on mRNA levels of antioxidant enzymes in human monocytic U-937 cells*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2008. **32**(6): S. 1567-73.
208. Duman, R.S., *Depression: a case of neuronal life and death?* Biol Psychiatry, 2004. **56**(3): S. 140-5.
209. Bankoglu, E.E., et al., *Decreased Chromosomal Damage in Lymphocytes of Obese Patients After Bariatric Surgery*. Sci Rep, 2018. **8**(1): S. 11195.
210. Włodarczyk, M. and G. Nowicka, *Obesity, DNA Damage, and Development of Obesity-Related Diseases*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(5).
211. Hopf, N.B., et al., *Biological monitoring of workers exposed to carcinogens using the buccal micronucleus approach: A systematic review and meta-analysis*. Mutat Res, 2019. **781**: S. 11-29.
212. Fenech, M., et al., *Micronuclei as biomarkers of DNA damage, aneuploidy, inducers of chromosomal hypermutation and as sources of pro-inflammatory DNA in humans*. Mutat Res, 2020. **786**: S. 108342.

8 Danksagung

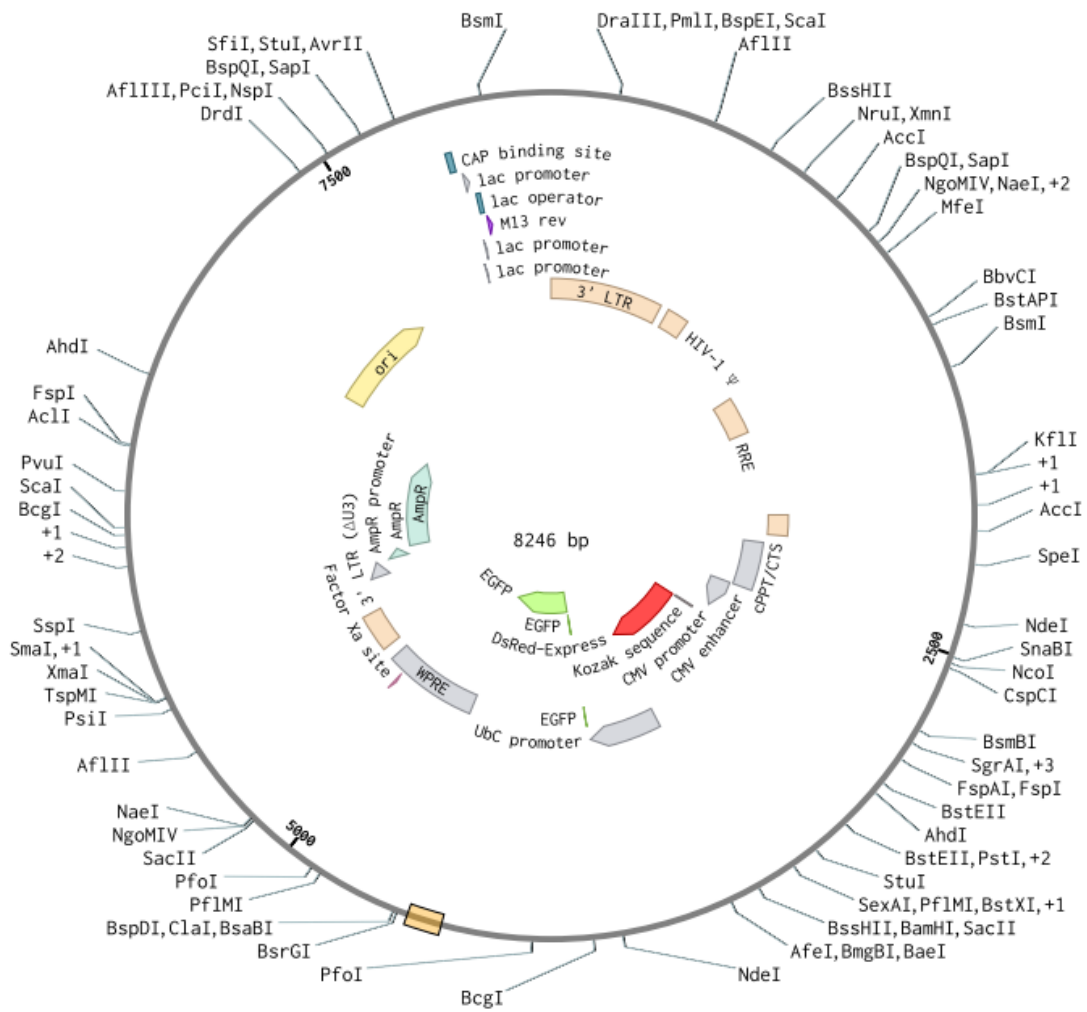
Wie bei jeder größeren Arbeit, wäre auch diese Doktorarbeit niemals ohne die Unterstützung zahlreicher Menschen entstanden. Zuerst möchte ich PD Dr. Henning Hintzsche danken, der mir die Möglichkeit gab, an diesem Thema zu arbeiten und über die ganze Zeit mit Rat und Tat in allen möglichen Fragen beiseite stand. Als nächstes möchte ich mich bei Prof. Dr. Helga Stopper bedanken, die nicht nur mit guten Ratschlägen geholfen hat, sondern mir freundlicherweise auch erlaubte, die Ausstattung ihrer Arbeitsgruppe zu benutzen. Weiterhin möchte ich mich bei den verbliebenden Mitgliedern meines Promotionskomitees, Prof. Dr. Katrin Heinze und Prof. Dr. Markus Christmann für die Teilnahme an den jährlichen Komiteetreffen und Rückmeldungen zur laufenden Arbeit bedanken. Prof. Dr. Kristina Lorenz möchte ich danken, dass sie mir ermöglichte, meine Doktorarbeit um ein paar weitere Monate fortzuführen und abzuschließen.

Für ihre Hilfen und die Tipps in zahlreichen methodischen Fragen möchte ich mich bei Dr. Ezgi Eylül Bankoğlu und Geema Kodandaraman bedanken. Ohne Viktoria Kunz hätte ich sicherlich niemals die Transduktion durchführen können, während mir Dr. Gracia Montag und Elisabeth Stein besonders in den ersten Monaten einen leichten Einstieg in den Laboralltag ermöglichten. Nicht vergessen möchte ich auch die Unterstützung durch Helga Schimmer in vielen Fragen des „Laborhaushalts“. Es gibt noch viele weitere Personen, die ich hier nicht erwähnen kann, aber mich dennoch bedanken möchte für jede kleine und größere Hilfe für mein Projekt.

Zum Schluss möchte ich mich vielmals bei meiner Frau Emily sowie meiner Mutter Sabine bedanken, die mich in der gesamten Promotionszeit und davor auf vielfältigste Weise begleiteten und unterstützten.

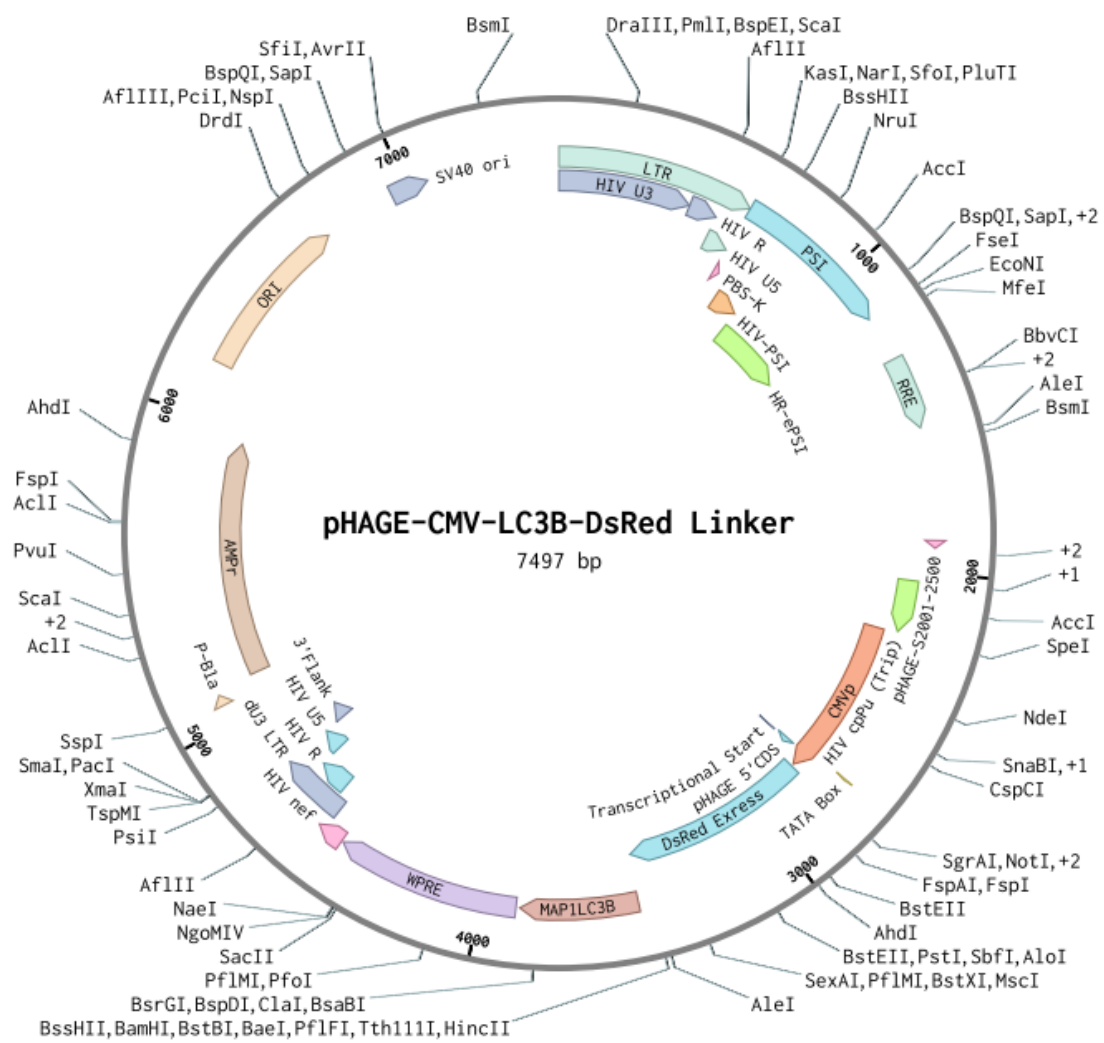
9 Anhang

pHAGE-CMV-dsRed-UBC-GFP-W (8246 bp)



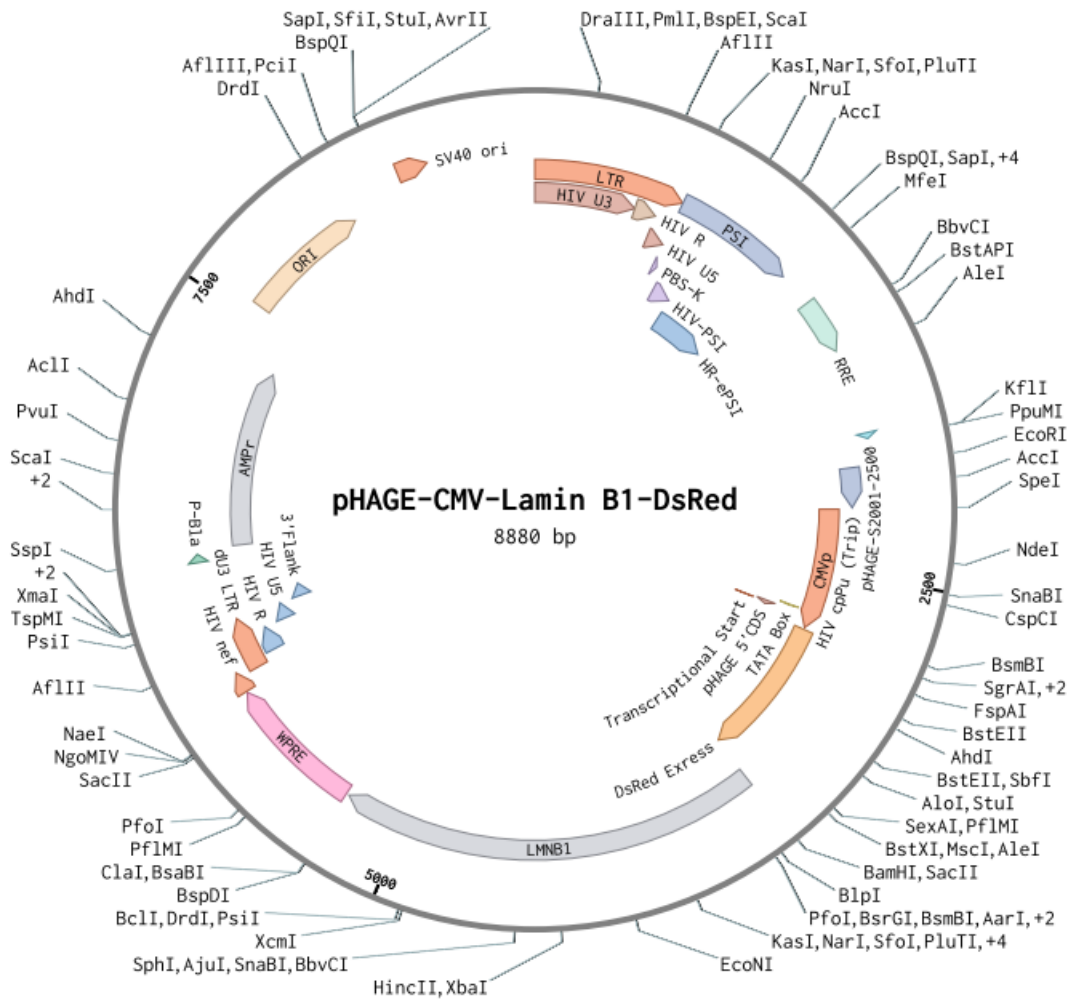
Anhang 1. Vektorkarte von pHAGE-CMV-dsRed-UBC-GFP-W

pHAGE-CMV-LC3B-DsRed Linker (7497 bp)

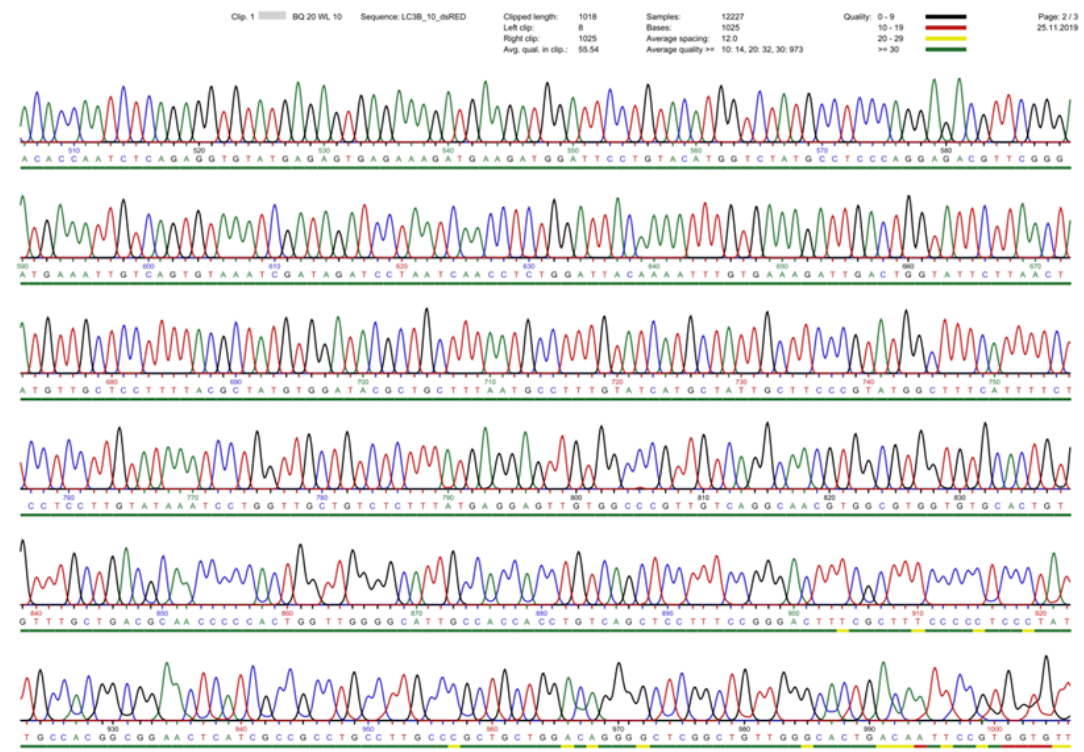
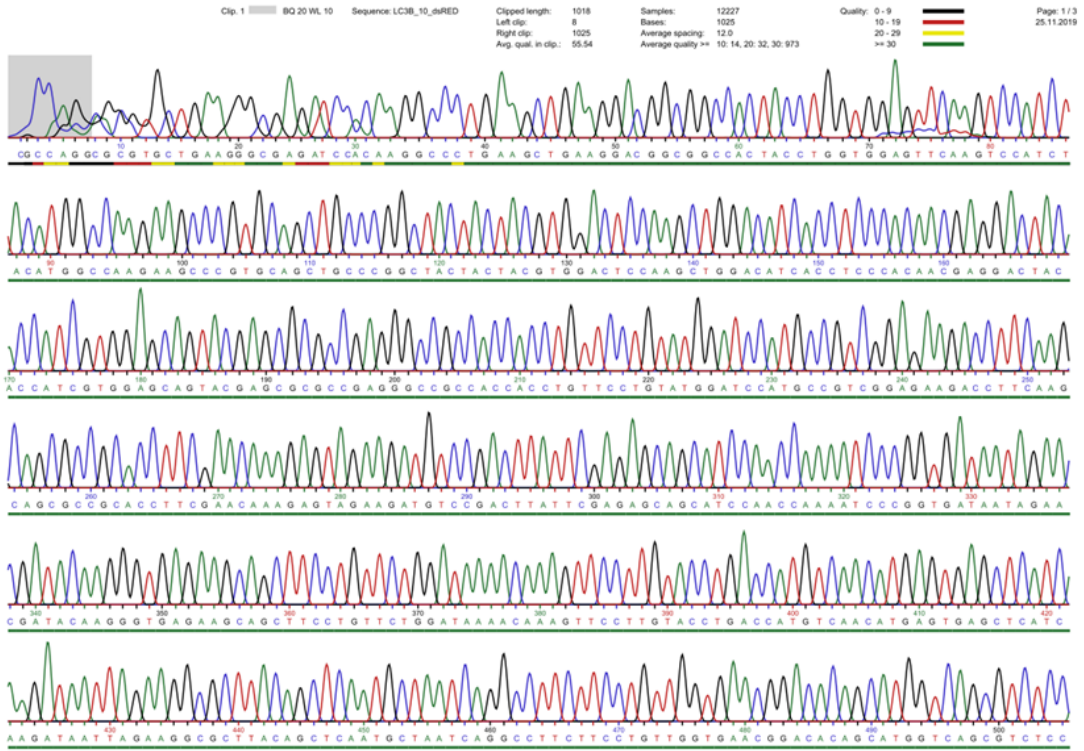


Anhang 2. Vektorkarte von pHAGE-CMV-LC3B-dsRed.

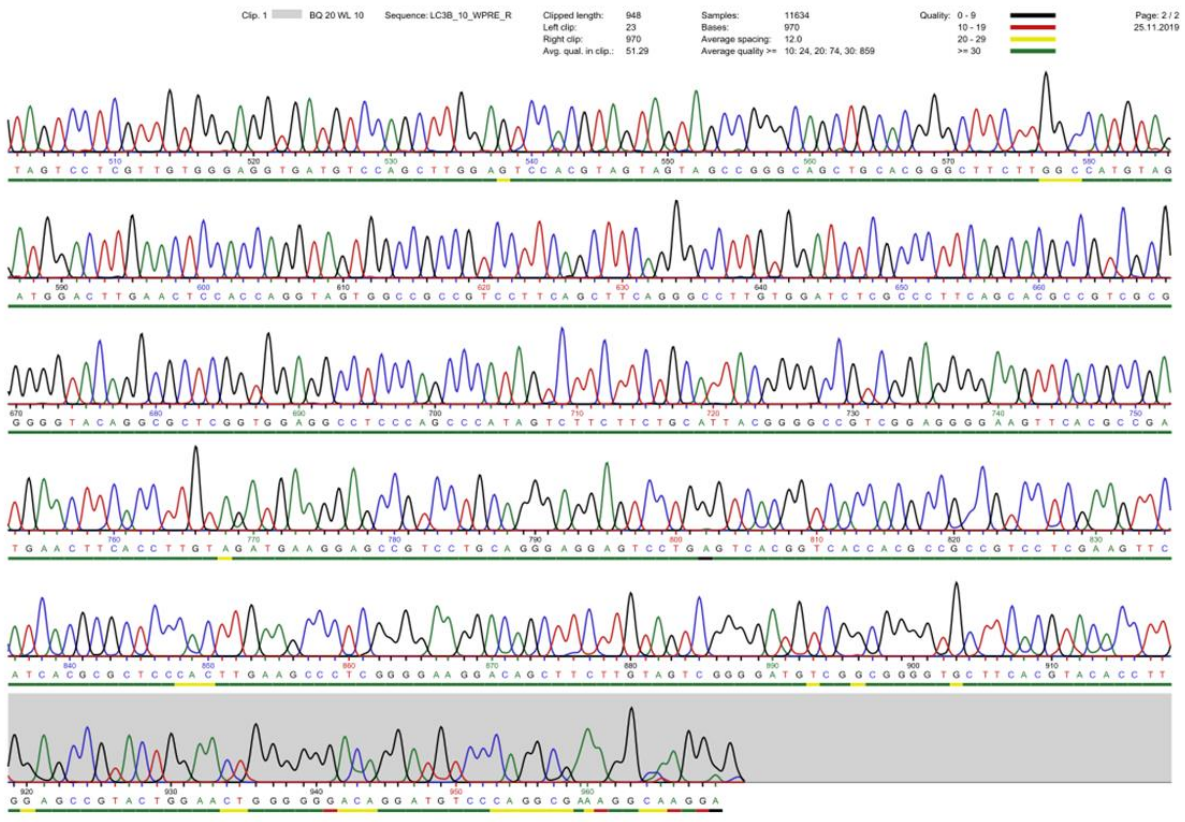
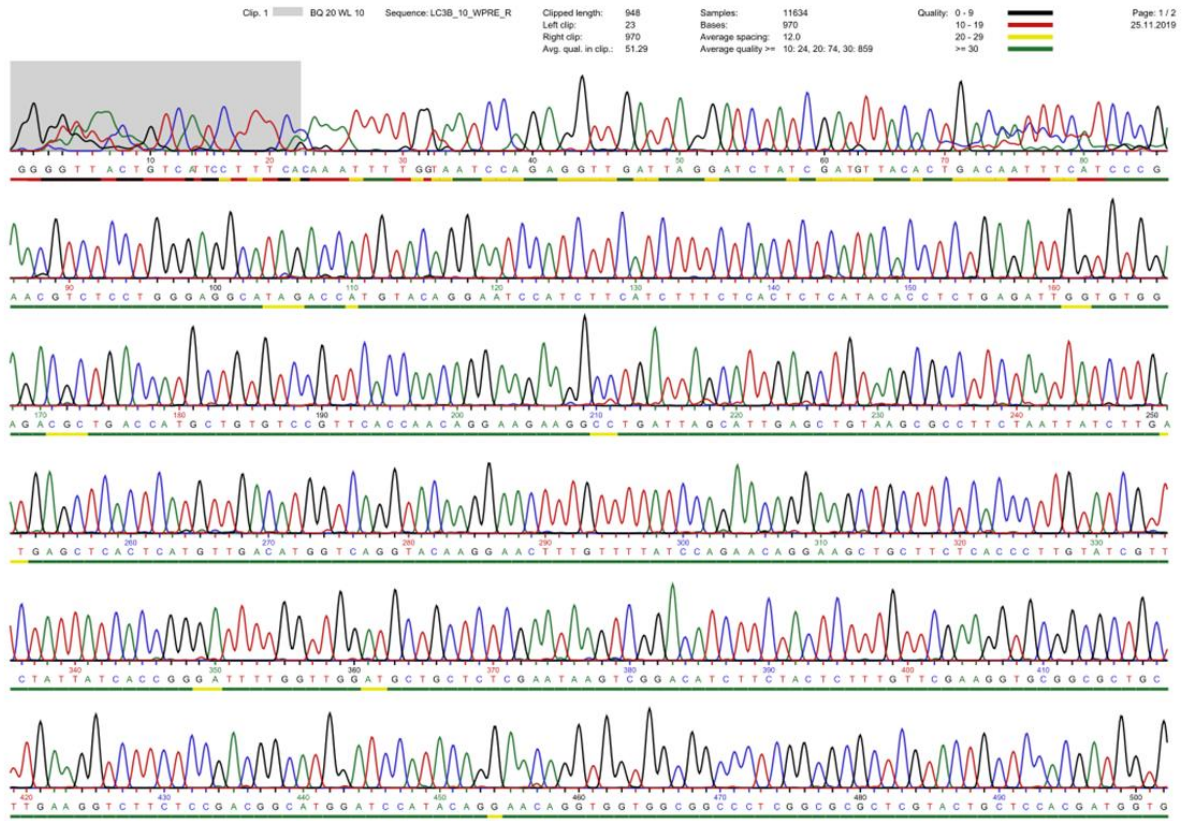
pHAGE-CMV-Lamin B1-DsRed (8880 bp)



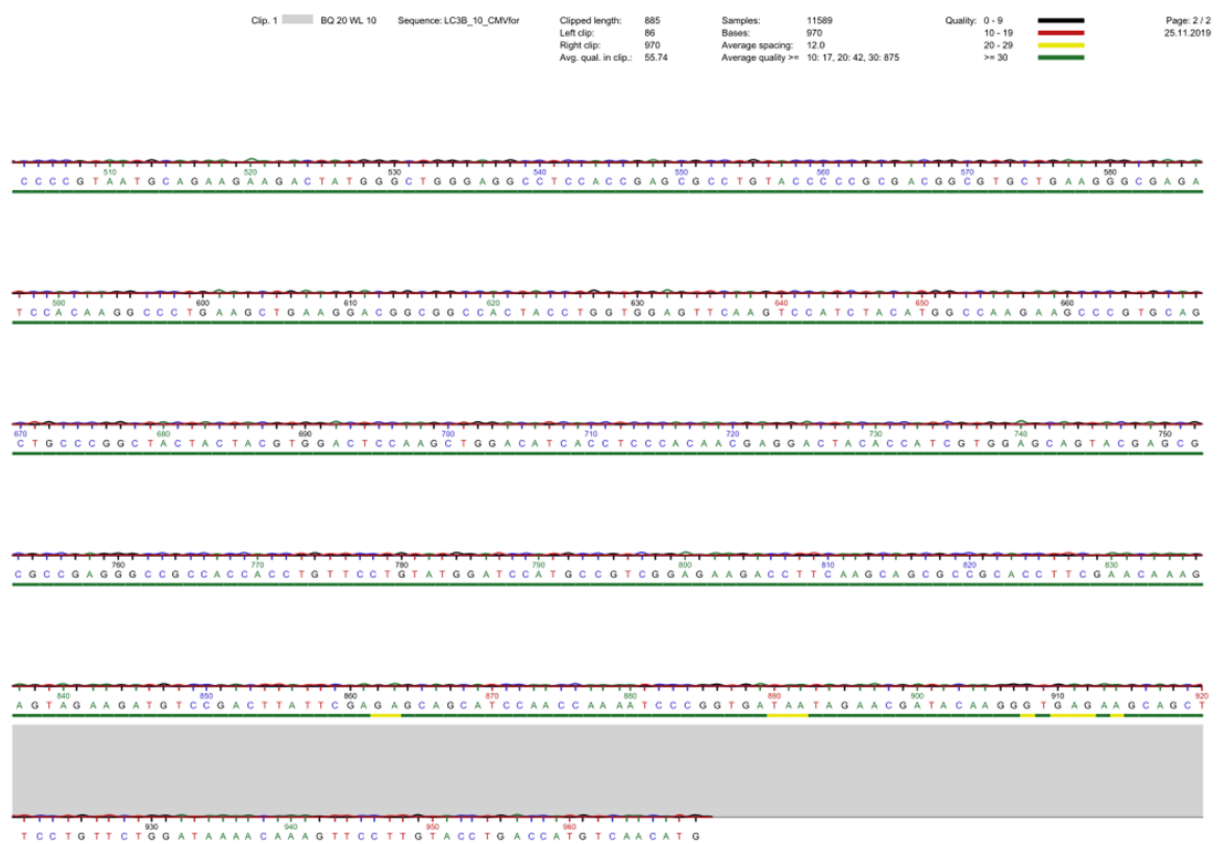
Anhang 3. Vektorkarte von pHAGE-CMV-Lamin B1-dsRed.



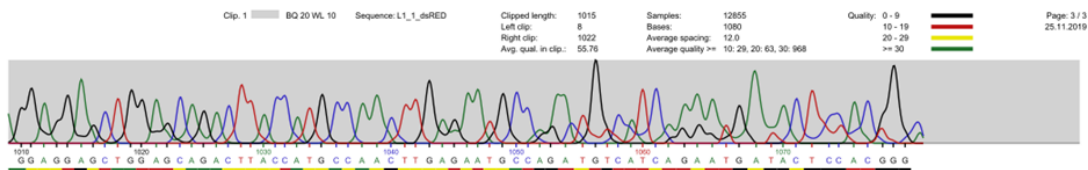
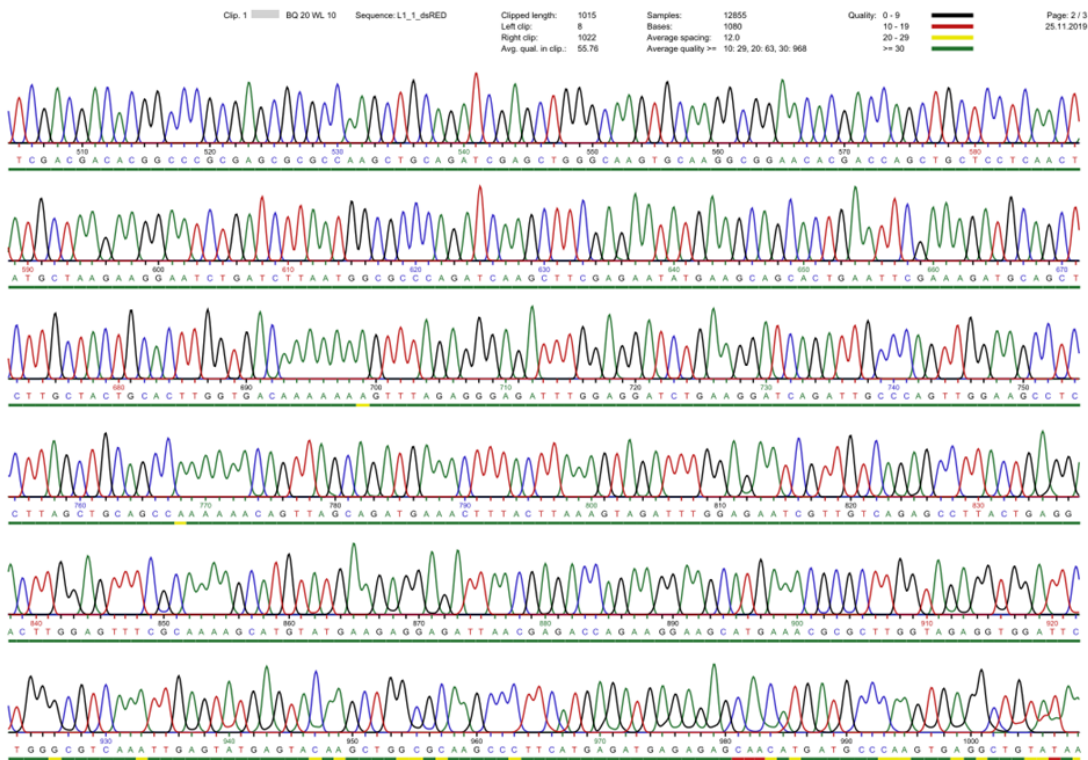
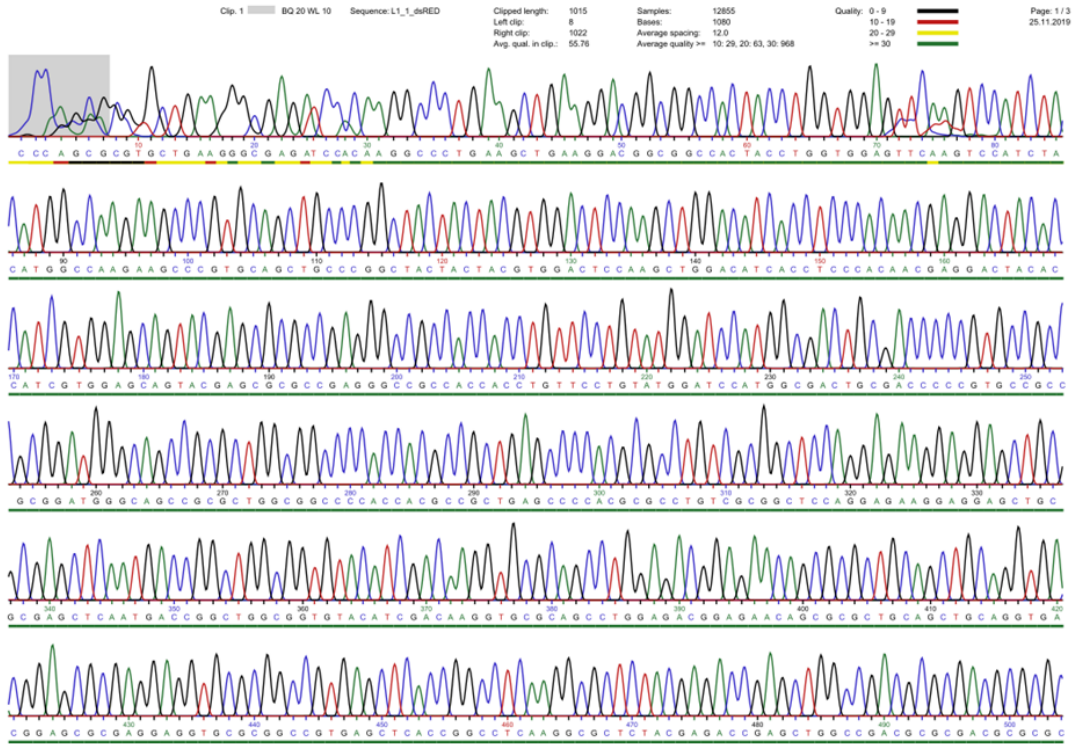
Anhang 4. Sequenzierbericht von pHAGE-CMV-dsRed-LC3B mit Primer dsRed-forward.



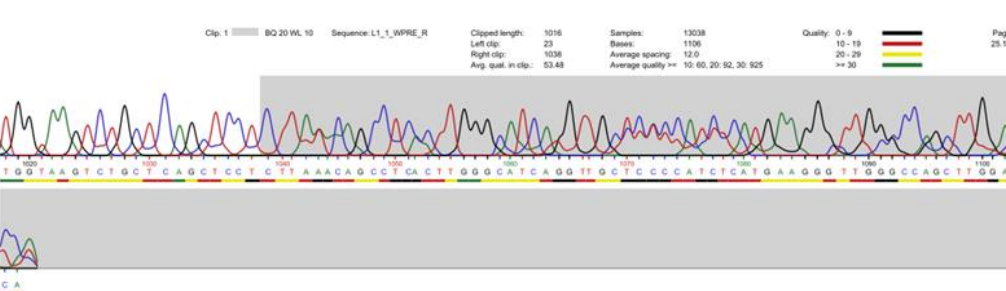
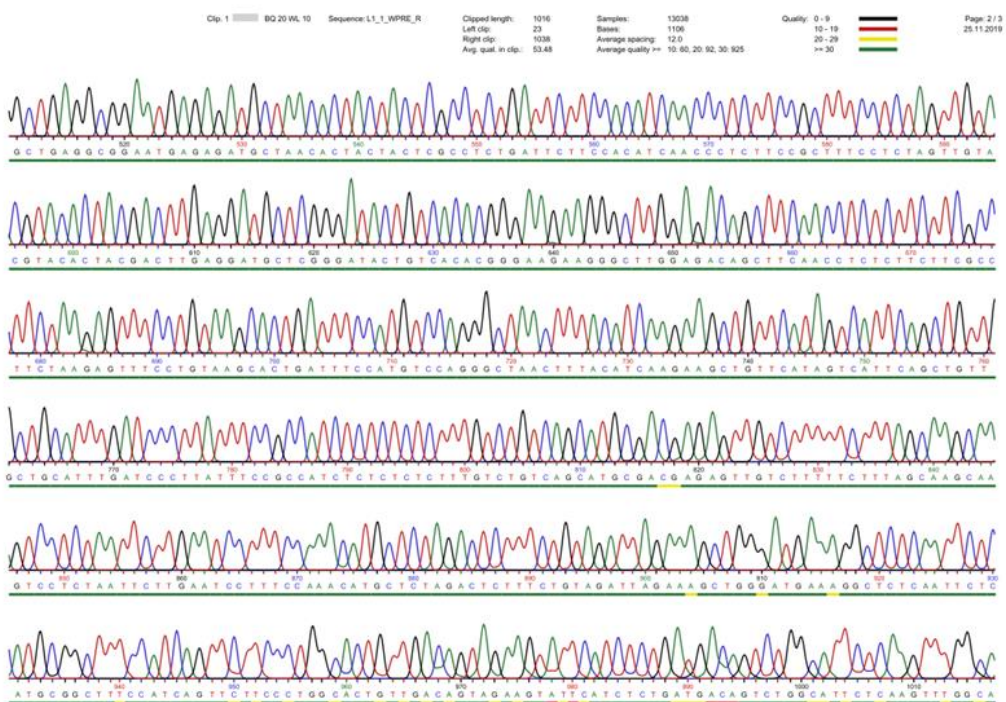
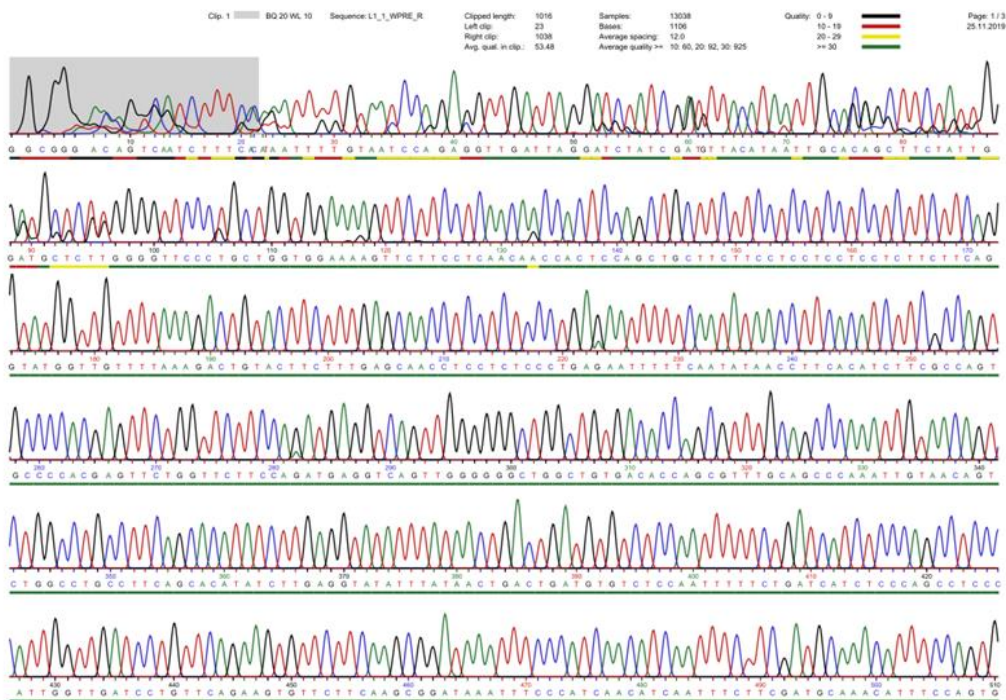
Anhang 5. Sequenzierbericht von pHAGE-CMV-dsRed-LC3B mit Primer WPRER-reverse.



Anhang 6. Sequenzierbericht von pHAGE-CMV-dsRed-LC3B mit Primer CMV-forward.

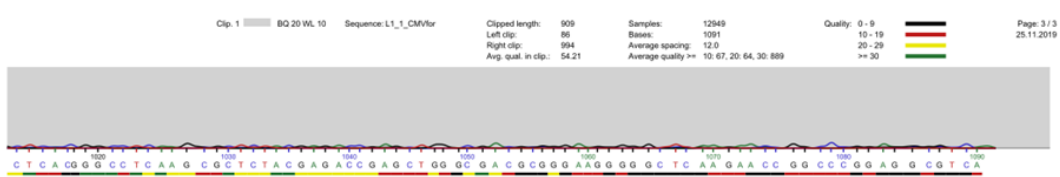
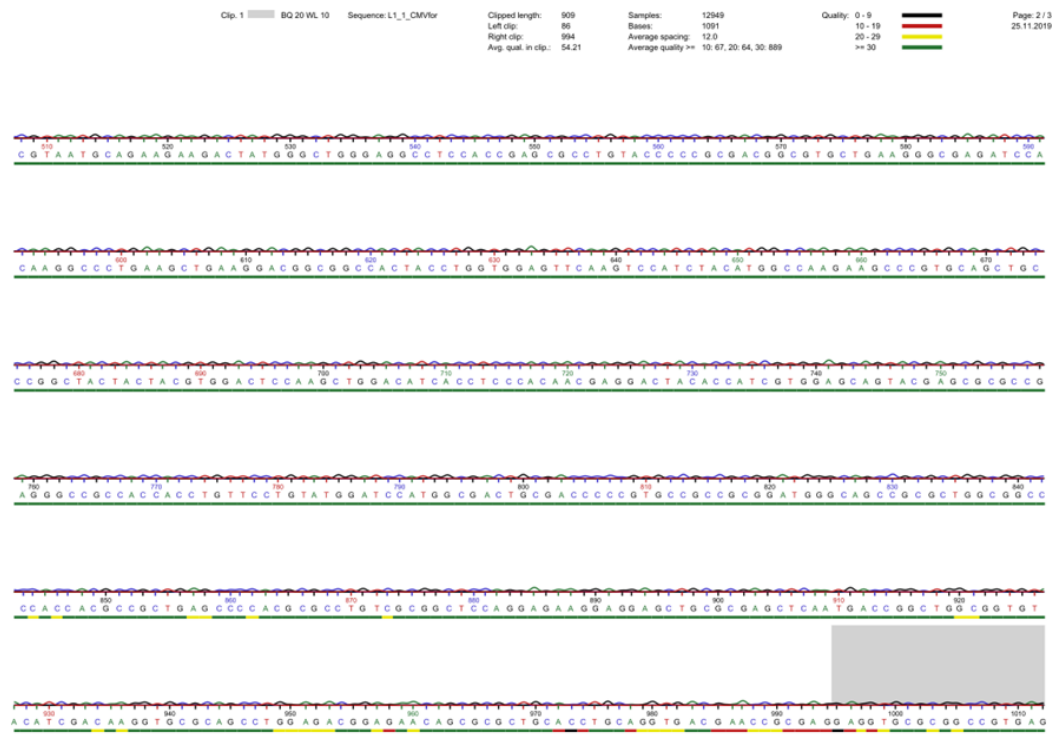
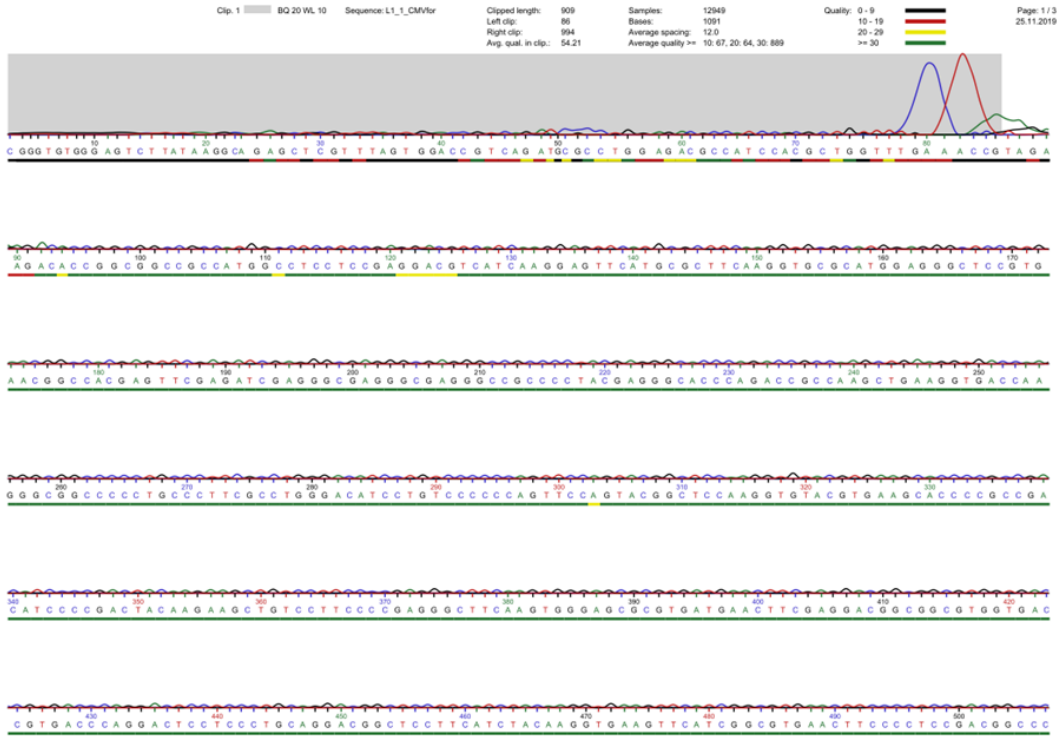


Anhang 7. Sequenzierbericht von pHAGE-CMV-dsRed-LMNB1 mit Primer dsRed-forward.



Anhang 8. Sequenzierbericht von pHAGE-CMV-dsRed-LMNB1 mit Primer WPRER-reverse

9 Anhang



Anhang 9. Sequenzierbericht von pHAGE-CMV-dsRed-LMN1 mit Primer CMV-forward.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Schicksal von Mikrokernen bzw. mikrokernhaltigen Zellen und Bedeutung von Mikrokernen als Biomarker“ 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.

Neunkirchen am Brand, 20.02.2021

Ort, Datum

Unterschrift

