

**Einsatz von mechanistischen Biomarkern
zur Charakterisierung
und Bewertung von *in vitro* Genotoxinen**

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg



vorgelegt von

Sabrina Wilde

geboren in Berlin

Würzburg, 2019

Eingereicht am: 12.04.2019

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Markus Sauer

1. Gutachter: Prof. Dr. Helga Stopper

2. Gutachter: PD Dr. Robert Hock

Tag des Promotionskolloquiums: 26.06.2019

Doktorurkunde ausgehändigt am:.....

„Ein Molekül sagte JA zu einem anderen Molekül, und das Leben begann.“

Clarice Lispector

Danksagung

Zunächst gilt mein Dank denjenigen, die mich während der gesamten Promotionszeit unterstützt und zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich bedanke mich bei Frau Prof. Dr. Helga Stopper und Herrn Prof. Dr. Robert Hock von der Universität Würzburg für die wohlwollende Begleitung meines Promotionsprojektes, deren engagierte wissenschaftliche Betreuung, welche meine Dissertation – kritisch wie inspirierend – bis zur Fertigstellung unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. Nina Queisser, die mich fortwährend mit ihrem Wissen als auch Berufserfahrung stets offen, bereichernd und motivierend unterstützt hat.

Ich möchte dem Leiter der Abteilung der Genetischen Toxikologie der Bayer AG in Berlin, Herrn Dr. Andreas Sutter für die Möglichkeit, das entgegengebrachte Vertrauen und der interessanten Themenstellung meiner Arbeit danken. Dem Leiter der Investigativen Toxikologie Herrn Dr. Thomas Steger-Hartmann danke ich für die Ressourcenbereitstellung und Weiterentwicklung im Hinblick auf persönlicher und beruflicher Ebene.

Insbesondere danke ich meinen Kollegen aus der Genetischen Toxikologie für die herzliche Aufnahme, der ausgesprochen angenehmen Arbeitsatmosphäre sowie fachlichen Tipps und nicht zuletzt freundschaftlichen Momenten.

Für die gleichermaßen moralische und seelische Unterstützung in allen Lebenssituationen gilt mein inniger Dank meinen liebevollen Eltern Marion und Gerd, meiner Seelenverwandten und Großmutter Ursula sowie meinen engsten Freunden – für deren Motivation und abwechslungsreichen Zeiten.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	V
Summary	VII
1 Einleitung.....	9
1.1.1 Von der DNA zum Chromosom.....	11
1.1.2 Der Zellzyklus und seine Regulation.....	13
1.2 Genotoxische Wirkmechanismen, Folgen und ihre DNA- Schadensantwort.....	17
1.2.1 Chromosomenmutation: DNA-Strangbrüche.....	17
1.2.2 Genommutation: Chromosomenfehlverteilungen.....	21
1.3 Pharmazeutische Aspekte: Einteilung und Risikobewertung von Wirkstoffkandidaten.....	24
1.3.1 Einteilung von Wirkstoffkandidaten.....	24
1.3.2 Threshold-Konzepte	25
1.3.3 <i>In vitro</i> Genotoxizitätstests und deren Limitierungen.....	26
1.4 Mechanistische Biomarker: Moderne und vielversprechende Tools in der Arzneimittelentwicklung.....	30
1.4.1 Protein p53.....	33
1.4.2 Phosphorylierte Histone: γ H2AX und pH3 (S10).....	33
1.4.3 Cleaved PARP1 (gespaltenes PARP1).....	36
1.5 Zielstellungen	37

2	Material und Methoden	39
2.1	Material	39
2.1.1	Zelllinie	39
2.1.2	Substanzen und Lösungen.....	39
2.1.3	Antikörper	45
2.1.4	Primer.....	45
2.1.5	Kits.....	46
2.1.6	Verbrauchsmaterialien	47
2.1.7	Geräte	48
2.1.8	Software	49
2.2	Methoden	50
2.2.1	Kultivierung, Zellzahlbestimmung und Behandlung der TK6-Zellen zur Aktivierung der DNA-Schadensantwort.....	50
2.2.2	Durchflusszytometrische Methoden zur Genotoxizitätstestung	51
2.2.2.1	Etablierung der MultiFlow® Methode.....	51
2.2.2.2	MNT MicroFlow® Methode.....	58
2.2.2.3	APO-BrdUTP TUNEL Methode.....	60
2.2.3	Immunfluoreszenzfärbung	61
2.2.3.1	High-Content-Imaging mechanistischer Proteine.....	61
2.2.3.2	Proteinquantifizierung von p21 mittels ELISA	69
2.2.4	Genexpressionsanalyse.....	70
2.2.4.1	QuantiGene® Plex Methode (QGP)	70
2.2.4.2	Quantitative qPCR	76
3	Ergebnisse	80
3.1	Teil 1: Etablierung der MultiFlow® Methode als <i>in vitro</i> Genotoxizitätstest	80
3.1.1	Proteinaktivität und Performance von pH3 (S10)	80
3.1.2	Proteinaktivität und Performance von γ H2AX	82
3.1.3	Proteinaktivität und Performance von nukleären p53	83

3.1.4	Proteinaktivität und Performance von cleaved PARP1.....	85
3.1.5	Genotoxischer Endpunkt und Performance von Polyploidie	86
3.1.6	Statistische Bewertung der MultiFlow® Endpunkte	88
3.1.7	Validierung der MultiFlow® Methode.....	90
3.1.7.1	Multiplex- versus Single-Analysen	90
3.1.7.2	Identifizierung genotoxischer Substanzen im MNT MicroFlow® Assay	92
3.2	Teil 2: Identifizierung mechanistischer Biomarkern zur Charakterisierung von Genotoxinen	96
3.2.1	Genexpressionsuntersuchungen mittels qPCR.....	96
3.2.2	Genexpressionsuntersuchungen mittels QGP Methode	100
3.2.2.1	Statistische Bewertung der Gene und Etablierung eines Vorhersagemodells	103
3.2.3	Proteinveränderungen zur Charakterisierung von Genotoxizität...	109
3.2.3.1	Untersuchung von p21 mittels ELISA.....	109
3.2.3.2	Untersuchung von PTMs mittels HCL.....	110
4	Diskussion	121
4.1	Teil 1: Bewertung der MultiFlow® Methode Genotoxine zu klassifizieren	121
4.1.1	Validierung des Multiplex-Ansatzes.....	121
4.1.2	Identifizierung von Genotoxinen mit etablierten und neuen Methoden.....	123
4.1.3	Challenges der MultiFlow® Methode und weitere moderne <i>in vitro</i> Tools	129
4.2	Teil 2: Bewertung von potentiellen Biomarkern zur Klassifizierung von Genotoxinen.....	132
4.2.1	Genomische Marker	132
4.2.1.1	Identifizierung klastogener Substanzen	132
4.2.1.2	Identifizierung aneugener Substanzen	134

4.2.1.3	Identifizierung ROS-induzierender Substanzen	135
4.2.2	Etablierung eines Vorhersagemodells zur Identifizierung (geno)toxischer Substanzen	136
4.2.3	Proteomische Marker	138
4.2.3.1	Identifizierung klastogener Substanzen	138
4.2.3.2	Identifizierung aneugener Substanzen	139
4.2.3.3	Identifizierung ROS-induzierender und genotoxischer Substanzen	140
5	Schlussfolgerung und Ausblick	141
	Literaturverzeichnis	145
	Abkürzungsverzeichnis	175
	Abbildungsverzeichnis	179
	Tabellenverzeichnis	181
	Anhang	182
	Publikationen	191
	Eidstattliche Erklärung	193

Zusammenfassung

Die verfügbaren *in vitro* Genotoxizitätstests weisen hinsichtlich ihrer Spezifität und ihres Informationsgehalts zum vorliegenden Wirkmechanismus (*Mode of Action*, MoA) Einschränkungen auf. Um diese Mängel zu überwinden, wurden in dieser Arbeit zwei Ziele verfolgt, die zu der Entwicklung und Etablierung neuer *in vitro* Methoden zur Prüfung auf Genotoxizität in der Arzneimittelentwicklung beitragen.

1. Etablierung und Bewertung einer neuen *in vitro* Genotoxizitätsmethode (MultiFlow[®] Methode)

Die MultiFlow[®] Methode basiert auf DNA-schadensassoziierten Proteinantworten von γ H2AX (DNA-Doppelstrangbrüche), phosphorylierten H3 (S10) (mitotische Zellen), nukleären Protein p53 (Genotoxizität) und cleaved PARP1 (Apoptose) in TK6-Zellen. Insgesamt wurden 31 Modellsubstanzen mit dem MultiFlow[®] Assay und ergänzend mit dem etablierten Mikrokerntest (MicroFlow[®] MNT), auf ihre Fähigkeit verschiedene MoA-Gruppen (Aneugene/Klastogene/Nicht-Genotoxine) zu differenzieren, untersucht. Die Performance der „neuen“ gegenüber der „alten“ Methode führte zu einer verbesserten Sensitivität von 95% gegenüber 90%, Spezifität von 90% gegenüber 72% und einer MoA-Klassifizierungsrate von 85% gegenüber 45% (Aneugen vs. Klastogen).

2. Identifizierung mechanistischer Biomarker zur Klassifizierung genotoxischer Substanzen

Die Analyse 67 ausgewählter DNA-schadensassoziiierter Gene in der QuantiGene[®] Plex Methode zeigte, dass mehrere Gene gleichzeitig zur MoA-Klassifizierung beitragen können. Die Kombination der hochstrangierten Marker *BIK*, *KIF20A*, *TP53I3*, *DDB2* und *OGG1* ermöglichte die beste Identifizierungsrate der Modellsubstanzen. Das synergetische Modell kategorisierte 16 von 16 Substanzen korrekt in Aneugene, Klastogene und Nicht-Genotoxine. Unter Verwendung der Leave-One-Out-Kreuzvalidierung wurde das Modell evaluiert und erreichte eine Sensitivität, Spezifität und Prädiktivität von 86%, 83% und 85%. Ergebnisse der traditionellen qPCR Methode zeigten, dass Genotoxizität mit *TP53I3*, Klastogenität mit *ATR* und *RAD17* und oxidativer Stress mit *NFE2L2* detektiert werden kann.

Durch die Untersuchungen von posttranslationalen Modifikationen unter Verwendung der High-Content-Imaging-Technologie wurden mechanistische Assoziationen für BubR1 (S670) und pH3 (S28) mit Aneugenität, 53BP1 (S1778) und FANCD2 (S1404) mit Klastogenität, p53 (K373) mit Genotoxizität und Nrf2 (S40) mit oxidativem Stress identifiziert.

Diese Arbeit zeigt, dass (Geno)toxine unterschiedliche Gen- und Proteinveränderungen in TK6-Zellen induzieren, die zur Erfassung mechanistischer Aktivitäten und Einteilung (geno)toxischer MoA-Gruppen (Aneugen/Klastogen/Reaktive Sauerstoffspezies) eingesetzt werden können und daher eine bessere Risikobewertung von Wirkstoffkandidaten ermöglichen.

Summary

Available *in vitro* genotoxicity tests have limitations regarding their specificity and mode of action (MoA) information. To overcome these shortages, two objectives were pursued in this work to develop and establish new *in vitro* tools for genotoxicity testing.

1. Establishment and evaluation of a novel *in vitro* genotoxicity method (MultiFlow[®] method)

The MultiFlow[®] method is based on DNA damage-related protein responses of γ H2AX (DNA double-strand breaks), phosphorylated H3 (S10) (mitotic cells), nuclear protein p53 (genotoxicity) and cleaved PARP1 (apoptosis) in TK6 cells. In total, 31 model substances were studied flow cytometrically in the MultiFlow[®] assay - and also with the well-established micronucleus test (MicroFlow[®] MNT) - for their ability to classify across MoA groups: aneugens, clastogens and non-genotoxicants. The performance of the new method resulted in an improved sensitivity of 95% to 90%, specificity of 90% to 72% and a MoA classification rate of 85% to 45% (aneugen vs. clastogen).

2. Identification of mechanistic biomarkers for the characterization of genotoxicants

The analysis of 67 selected DNA-damage associated genes using the QuantiGene[®] Plex method showed that a combination of genes can contribute to MoA classification. The combination of the highest-ranked markers (*BIK*, *KIF20A*, *TP53I3*, *DDB2* and *OGG1*) highlighted the best identification rate of model substances. The synergistic statistic tool correctly categorized 16 of 16 substances into aneugens, clastogens and non-genotoxicants. By using leave-one out cross validation, the model was evaluated and achieved a sensitivity, specificity and predictivity of 86%, 83%, 85% respectively.

Follow-up with qPCR was conducted and revealed associations with *TP53I3* for genotoxicity, *ATR* and *RAD17* for clastogenicity and *NFE2L2* for oxidative stress.

By investigating posttranslational modifications using high-content imaging, associations for BubR1 (S670) and pH3 (S28) with aneugenicity, 53BP1 (S1778) and

FANCD2 (S1404) with clastogenicity, p53 (K373) with genotoxicity and Nrf2 (S40) with oxidative stress were found to be further useful for MoA identification.

This work demonstrates that genotoxicants and non-genotoxicants induce different gene- and protein expression changes in the TK6 cells that can be used to classify the MoA groups (aneugen/clastogen/non-genotoxicant/reactive oxygen species), thus enabling better risk assessment of potential drug candidates.

1 Einleitung

Chemische Substanzen können die Eigenschaft haben, die genetische Information (DNA) in einer Zelle zu schädigen und auf diese Weise Mutationen zu verursachen, die zur Krebsentstehung beitragen können. Diese Eigenschaft wird als „Genotoxizität“ bezeichnet.

Genotoxische Substanzen sind in der Lage, die DNA reversibel oder irreversibel zu schädigen und lösen im Zuge des Schadens einen komplexen, DNA-schadensabhängigen Reparaturmechanismus in der Zelle aus (DNA-Schadensantwort). Im Falle einer fehlenden oder nicht korrekten Reparatur kann die DNA als Folge verändert vorliegen (Mutation). Darüber hinaus kann sich die Mutation fixieren, sich auf die Folgegeneration übertragen und/oder schlimmstenfalls zu Krebs führen. In der Gesamtheit sind Mutagene zwar genotoxisch, jedoch sind nicht alle genotoxischen Substanzen gleichbedeutend mutagen (Phillips DH und Arlt VM. 2009; Lodish et al. 2000).

Den Genotoxinen liegen unterschiedliche Wirkmechanismen zugrunde und abhängig vom induzierten DNA-Schaden, bilden Gene und Proteine die komplexe DNA-Schadensantwort, die im Kontext der vorliegenden Arbeit als mechanistische Biomarker definiert werden. Durch die fortschrittlichen molekularbiologischen Methoden können Biomarker identifiziert werden, die wichtige Rückschlüsse auf die Substanz geben. Im Umkehrschluss können Genotoxine durch die Vielzahl von Mechanismen mechanistische Biomarker für ihre eigene Erkennung liefern.

Im Rahmen der nicht-klinischen Wirkstoffprüfung werden Substanzen umfassend auf ein mögliches genotoxisches Potential untersucht. Die regulatorisch akzeptierten *in vitro* Genotoxizitätstests werden durchgeführt, um die Genotoxizität vorherzusagen, die *in vivo* Relevanz zu bewerten und zum Tierschutz beizutragen (Prieto et al. 2014; Zaldívar et al. 2011; Liebsch et al. 2011). Positive Ergebnisse weisen auf eine genotoxische Gefahr hin, die das Ende eines Wirkstoffkandidaten bedeuten könnte, bevor die Substanz die klinische Phase erreicht. An dieser Stelle sind „Nachfolgetests“ (*Follow-up Tests*) erforderlich, um den Wirkmechanismus (*Mode of Action, MoA*) zu untersuchen und festzustellen, ob die Genotoxizität auch bei klinisch relevanten

Konzentrationen auftritt. Mögliche genotoxische Risiken können jedoch auch bereits in einem früheren Stadium, d.h. bevor die regulatorischen Genotoxizitätstests durchgeführt werden, über sogenannte „*Screening*“-Methoden, identifiziert werden. Häufig wird in der sogenannten Leitstrukturoptimierungs-Phase (*lead optimization phase*) geprüft und es besteht an dieser Stelle die Möglichkeit, die Substanz in der frühen Entwicklungsphase strukturell zu modifizieren und zu optimieren. Diese Aspekte verdeutlichen den Stellenwert sensitiver und präziser *in vitro* Genotoxizitätstests.

Allerdings wurden in den letzten Jahren wesentliche Einschränkungen wie eine

1) relativ niedrige Spezifität (*in vivo* Relevanz) und 2) unzureichenden MoA-Information der *in vitro* Methoden nachgewiesen, um eine moderne Risikobewertung – im Sinne des 3R-Prinzips (*replace* (ersetzen), *reduce* (verringern) und *refine* (verbessern)) und des Hochdurchsatzcharakters sowie der Kosten – von Wirkstoffkandidaten zu ermöglichen (Cheung et al. 2015; Simon et al. 2014; Ellinger-Ziegelbauer et al. 2009; Kirkland et al. 2005).

1) Die regulatorischen *in vitro* Tests werden in Säugerzellen oder Bakterien durchgeführt und sind an dieser Stelle relativ unspezifisch, d.h. falsch positive Ergebnisse werden erzeugt, die zusätzliche und kostspielige Tests zur Folge haben. Die verwendeten Zellsysteme sind hinsichtlich der DNA-Reparatur defizient und genetische Drifts, die während wiederholter Subkultivierung auftreten, können die Zellen für genetische Schäden anfälliger machen. Diesbezüglich gab es in den letzten Jahren viele Aktivitäten und Workshops wie bspw. von der Organisation EURL-ECVAM (*The European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing*) oder der IWGT (*International Workshop on Genotoxicity Testing*), um diesen Mangel zu überwinden. Dabei wurde aufgezeigt, dass durch den Einsatz humaner Zelllinien die hohe Rate an falsch-positiven Ergebnissen reduziert werden konnte, die in nicht-humanen Säugerzellen und Bakterien generiert wurden.

2) Die Identifizierung des MoAs ist ein grundlegender Bestandteil der Risikobewertung und ermöglicht die Einschätzung, ob ein Schwellenwert, d.h. ein sicherer Dosisbereich, für die betreffenden Substanzen diskutiert werden kann (nicht-lineare Dosis-Wirkungsbeziehung). Das Bereitstellen von MoA-Informationen hat an

Bedeutung zugenommen, seit auch für genotoxische Substanzen in bestimmten Fällen Schwellenwerte nachgewiesen wurden (Lutz 1998; Bolt et al. 2004; Doak et al. 2007; Gocke und Müller 2009; Bailey et al. 2009; Crump 2011; ICH 2012; Bevan und Harrison 2017) (s. Kapitel 1.3.2). Somit zeigt sich, dass die Ermittlung des MoAs und Schwellenwertes maßgeblich über die weitere Entwicklung des Arzneimittelkandidaten entscheidet (ICH M7 (R1) 2017; *Guidance for Industry* FDA 2006; *European Food Safety Authority and World Health Organization* 2016).

Um die voran genannten Limitierungen zu überwinden, wurden in den letzten Jahren erfolgsversprechende Ansätze und Projekte aufgenommen, damit die regulatorischen *in vitro* Genotoxizitätstests (gemäß der ICH S2 (R1) Richtlinie) optimiert oder mit zusätzlichen adequaten *in vitro* Tools erweitert werden können, die sowohl die mechanistischen Erkenntnisse, als auch die *in vitro*- zu *in vivo*-Extrapolation verbessern und folglich den gesamten Prozess der Risikobewertung von Substanzen optimieren sollen (Bryce et al. 2017; Doktorova et al. 2014; Williams et al. 2015; Hendriks et al. 2016; Birrell et al. 2010; Ellinger-Ziegelbauer et al. 2009).

1.1.1 Von der DNA zum Chromosom

Die DNA trägt die Bauanleitung der inneren (Genotyp) und äußeren (Phänotyp) Eigenschaften eines Individuums (s. Abbildung 1). Die DNA liegt mit rund 2 Metern, in Form von Chromosomen im Verbund mit Proteinen in jeder Zelle kondensiert vor (Chromatin). Die kleinste und zugleich elementarste Einheit des Chromatins ist das Nukleosom, welches sich aus der DNA und Histonproteinen zusammensetzt. Die DNA liegt hierbei spiralförmig um ein zentrales Histon-Oktamer gewunden vor. Jedes Nukleosom besteht aus zwei Kopien der Histone (H2A, H2B, H3 und H4) und einem fünften Histon H1, das die weitere Komprimierung der DNA ermöglicht.

Mit Ausnahme des Histonproteins H1, sind die N-terminalen Enden der Histone Zielstrukturen posttranslationaler Histonmodifikationen wie Acetyl-, Phosphoryl- oder Methylierungen. Die Modifikationen der Histone erfolgen enzymatisch und sind entscheidend für Zellteilungsprozesse. Einzelne Histonmodifikationen nehmen eine zentrale Rolle während der Zellteilung und speziell in der DNA-Schadensantwort ein und repräsentieren im Gegensatz zu Genen einen sehr dynamischen Bereich. Dadurch stellen sie einen interessanten Forschungsschwerpunkt dar, der im Kapitel 1.4 näher

beschrieben wird. Im weiteren Komprimierungsschritt der DNA werden die einzelnen Nukleosomen mittels Linker-Regionen miteinander verknüpft, wodurch eine perlenschnurartige Struktur entsteht. Die Nukleosomenkette wird dichter gefaltet, indem sie sich zu unregelmäßigen Schleifen organisiert. Dies führt letztlich zur maximalen Verdichtungsstufe, der Chromatinfaser, in Form von Chromosomen. Die Chromosomen sind die Träger eines DNA-Doppelstranges (Annunziato 2008).

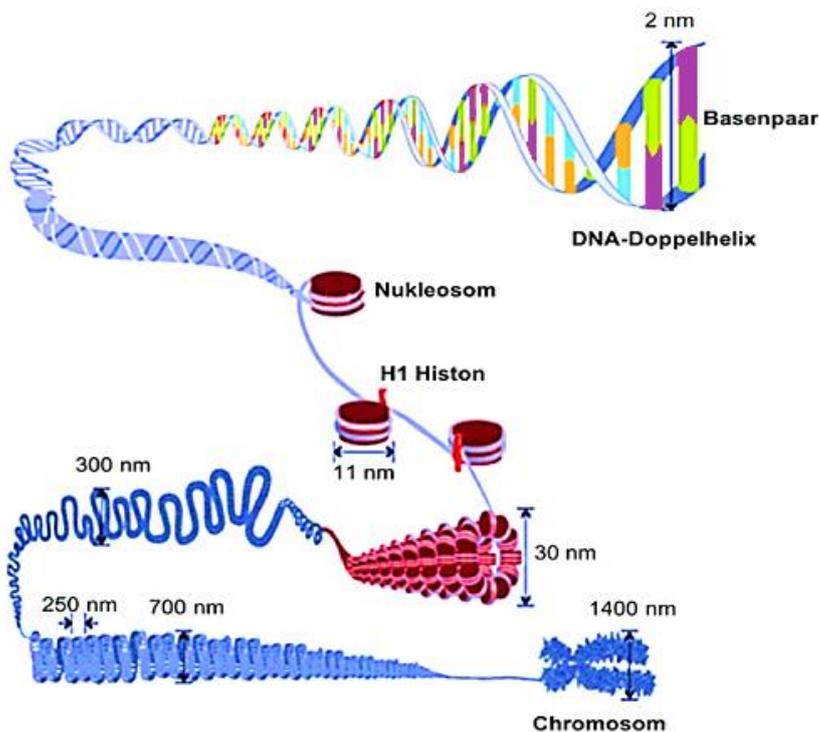


Abbildung 1: Die Organisation der DNA im Kern.

Gezeigt sind die unterschiedlichen Organisationsebenen der DNA. Die DNA-Doppelhelix (2 nm) umwindet einen Histon-Komplex (Kernhistone: H2A, H2B, H3 und H4) und das Histon H1 (Verbindungshiston) zu einem Nukleosom (11 nm). Das Histon H1 verbindet einzelne Nukleosomen untereinander zu einer Chromatinfaser (30 nm). Die Chromatinfaser organisiert sich in Schleifen und kondensiert weiter zum Chromatin (700 nm) bis hin zum hoch konservierten Chromosom (1400 nm), das in der Mitose während der Metaphase vorliegt. Modifiziert nach Annunziato 2008.

Die unterschiedlichen Varianten der DNA-Verpackung haben Einfluss auf die Genexpression und bestimmen, welche Proteine danach vorliegen. Die DNA, in ihrer einfachsten Organisationsstufe, setzt sich aus Nukleotiden zusammen, bestehend aus einer Base (Adenin, Thymin, Cytosin oder Guanin) und einer stabilen Desoxyribose-Phosphorsäure-Kette. Zwei antiparallel verlaufende Einzelnukleotidketten formieren über festgelegte Basenpaarungen ein DNA-Molekül. Bestimmte Sequenzen von Basen

repräsentieren Gene, die in spezifische Aminosäure-Kombinationen übersetzt werden können und auf diese Weise Proteine kodieren. An dieser Stelle zeigt sich, dass die Abfolge und chemische Struktur von Basen elementar ist und eine „ungezielte“ Veränderung (Mutation) bspw. zu funktionsunfähigen Proteinen (Nonsense-Mutation) führen kann (Cordon-Cardo 1995; Annunziato 2008).

1.1.2 Der Zellzyklus und seine Regulation

Der Zellzyklus stellt eine komplexe Reaktionsabfolge dar, die den Zweck hat, die DNA korrekt zu duplizieren (S-Phase, Synthese-Phase) und die Chromosomen in zwei genetisch identische Tochterzellen zu trennen (M-Phase, Mitose-Phase). Die Mitose-Phase lässt sich in die Prophase, Metaphase, Anaphase und Telophase unterteilen.

Zwischen den beiden kritischen Hauptphasen (S/M-Phase) regulieren zwei wichtige Replikationspausen den Zellzyklus (G1/G2-Phase, Gap-Phasen). In den Pausen wird zum einen sichergestellt, dass die nächste Phase beginnen kann und zum anderen wird kontrolliert, ob die DNA-Replikation fehlerfrei und vollständig abgelaufen ist. Auf diese Weise kann eine Weitergabe veränderter oder defekter DNA auf die Tochterzellen verhindert werden. Eine weitere Gap-Phase stellt die G0-Phase (Ruhephase) dar, in die ausschließlich ausdifferenzierte Zellen nach der M-Phase eintreten können. Als Antwort auf extrazellulärer Stimuli wird die G1-Phase eingeleitet, um die DNA-Replikation vorzubereiten (Morgan 2008; Alberts et al. 2002).

Die Abläufe während und zu Beginn der Zellteilung werden sehr genau kontrolliert, da ein Verlust der Zellzykluskontrolle zu einer deregulierten Zellproliferation führen könnte, welche ein Merkmal von Krebs darstellt (Wenzel und Singh 2018). Der Übergang in die nächste Phase ist von bestimmten Signalkombinationen abhängig. Sind die Signale aufgrund von z. B. zellulärem Stress unvollständig, werden andere Signalkaskaden aktiviert, die den Zellzyklus verzögern, anhalten (arretieren) und mit einer DNA-Reparatur oder der Apoptose fortsetzen. Diese phasenspezifischen Kontrollabschnitte werden als Checkpoints bezeichnet (Funk 2006).

Der Zellzyklus wird über drei wichtige Proteinkinasefamilien reguliert: den Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs), den Polo-ähnlichen Kinasen (Plks) und den Aurora-Kinasen, wobei die CDKs die Hauptakteure im Zellzyklus darstellen (Lee et al. 2014).

Die CDKs fördern die Zellzyklusprogression, indem sie intrazelluläre Proteine phosphorylieren und dadurch diverse Zellzyklusvorgänge initiieren und regulieren. Die CDKs selbst werden ebenfalls streng reguliert, moduliert und erst durch die Assoziation ihrer Untereinheit mit einem entsprechenden Cyclin aktiv. Ihre Antagonisten sind Cyclin-abhängige Kinase Inhibitoren (CKI) wie bspw. p21, die die Cyclin-CDK-Komplexe hemmen und jederzeit den Zellzyklus anhalten können. Der Übergang in die jeweils nächste Zellzyklusphase wird kontrolliert durch die Komplexbildung von CDK2/Cyclin E (G1/S-Phase), CDK2/Cyclin A (S-Phase), CDK1/Cyclin A (G2-Phase) und durch CDK1/Cyclin B (M-Phase). Innerhalb dieser regulierenden Signalkaskade ist die Interaktion mit Antagonisten, auch Tumorsuppressoren genannt, sehr essentiell, da sie die Proliferation der Zellen inhibieren und zugleich ein zentrales Ziel für genetische Veränderungen bei diversen Krebsarten darstellen (Malumbres 2014; Sherr und Roberts 1999; Funk 1999).

Die Plks, welche die zweite Familie der Zellzyklusregulatoren bilden, bestehen aus fünf Mitgliedern (Plk1-5) und sind in verschiedenen Zellteilungsphasen und Ereignissen wie in dem DNA-Checkpoint, der CDK/Cyclin-Aktivierung, dem Mitose-Eintritt oder in den Aufbau der Spindel involviert. Plk1 stellt dabei das wichtigste Mitglied dar. Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Plk1 mit einer Genommutation, wie der Aneuploidie, einhergehen kann, welche häufig in Krebszellen vorzufinden ist (Lee et al. 2014).

Die Aurora-Familie setzt sich aus drei Mitgliedern, der Aurora A, B und C, zusammen, die jeweils verschiedene spezifische Funktionen ausüben. Aurora A reguliert die Reifung und Trennung von Zentrosomen sowie die Spindelanordnung, wohingegen Aurora B die Zytokinese und die Anordnung von Chromosomen steuert. Das letzte Mitglied, die Aurora C Kinase, koordiniert primär die Spindeln während der Spermatogenese.

Allen ist gemeinsam, dass sie in Tumoren überexprimiert vorliegen und somit schwere Genommutationen, wie Aneuploidien, induzieren (Goldenson und Crispino 2014).

Im Zellzyklus gibt es drei zentrale Kontrollmechanismen bzw. Checkpoint-Signalwege, die die Progression der Zellteilung überprüfen und eine korrekte Zellteilung sicherstellen. Die folgenden Erläuterungen beziehen sich auf einen

normalen oder stressfreien Zustand einer Zelle. Die Abläufe unter Stress hingegen, hier begründet durch genotoxische Substanzen, von denen sich die Substanz-induzierte DNA-Schadensantwort ableitet, werden gesondert im Kapitel 1.2 aufgeführt.

(1) G1/S-Checkpoint

An diesem Restriktionspunkt wird überprüft, ob die DNA-Synthese beginnen kann bzw. ob unbeschädigte DNA repliziert wird. Ein deregulierter G1/S-Checkpoint ist ein Kennzeichen von zahlreichen Tumoren. Die Schlüsselkomponenten sind die CDK-Komplexe CDK4/6/Cyclin D und CDK2/Cyclin E sowie der Transkriptionskomplex E2F/pRb (Retinoblastomprotein). Das pRb gehört neben dem Phosphoprotein p53 zu den zentralen Tumorsuppressoren im Zellzyklus. Die Aktivität von pRb wird von dem Komplex CDK2/Cyclin E kontrolliert. Das dephosphorylierte pRb inhibiert während der G1-Phase den Transkriptionsfaktor E2F, um auf diese Weise die Zellzyklusprogression zu kontrollieren. Eine Hyperphosphorylierung des pRb durch die CDKs führt zur Freisetzung von E2F, welches somit die Expression vieler Gene stimulieren kann, die für die Progression in die S-Phase benötigt werden. Bedeutende CDKIs aus der INK4-Familie (p15, p16, p18, p19) und aus der KIP-Familie (p21, p27, p57) kontrollieren die CDK-Aktivität und tragen zu einer positiven Rückkopplung bei (Foster et al. 2010; Flatt et al. 2000).

(2) G2/M-Checkpoint

Der primäre Mechanismus für den Eintritt in die Mitose beruht darauf, die Kinasekomplexe CDK1/Cyclin A und insbesondere CDK1/Cyclin B zu aktivieren, wobei die Aktivität von CDK1 durch die Kinasen Wee1 und Myt1 reguliert wird (Ferrell 2002). Ein zentraler Regulator oder Modulator ist Cdc25, der den CDK1/Cyclin B-Komplex mittels Dephosphorylierung von CDK1 aktiviert.

Wee1, Myt1 und Cdc25 werden durch Plk1 und Aurora A reguliert (Archambault und Carmena 2012; Cazales et al. 2005). Ein wichtiger Enzymkomplex, ein Anaphase-fördernder Komplex (APC/C, *anaphase-promoting complex/cyclosome*), wird aktiviert und phosphoryliert (s. M-Checkpoint), um die charakteristischen Mitoseprozesse, wie bspw. Chromosomenkondensation, Auflösung der Kernhülle oder die Ausbildung des Spindelapparates, auszulösen. Eine Inaktivierung von CDK1/Cyclin B durch den

Abbau von Cyclin B wird durch APC ausgelöst. Diese Inaktivierung ist für die Überwindung des Checkpoints notwendig und stellt den Austritt aus der Mitose dar.

(3) M-Checkpoint (auch *spindle assembly checkpoint*, SAC)

Grundlegend wird hier sichergestellt, dass die Schwesterchromatiden sich erst trennen, nachdem alle Chromosomen bzw. deren Ansatzstellen die Kinetochore korrekt an den Spindelfasern ausgerichtet und befestigt sind, sodass mitotische Zellen nicht mit fehlenden oder nicht ordnungsgemäß angehefteten Chromosomen die Mitose verlassen. Das Cyclin B (CDK1) nimmt hierbei eine zentrale Rolle ein. Erst durch den Abbau von CDK1 wird eine erfolgreiche Chromosomenanheftung bzw. die Anheftung der Kinetochore und somit fehlerfreien Trennung auf die beiden Tochterzellen initiiert. Der Abbau von CDK1 wird über den Ubiquitin-vermittelten APC/C-Komplex, ein Enzymkomplex mit E3-Ligase Aktivität, reguliert. Erst durch Assoziation mit dem Protein Cdc20 (APC/C-Cdc20-Komplex) wird der Komplex am Ende der Metaphase aktiviert, dessen Ablauf vom SAC überwacht wird (Peters JM. 2002). Im SAC-Signalweg sind Proteine wie Bub1/3 (*budding uninhibited by benomyl*), BubR1, Hec1 (*highly expressed in cancer*), Mps1 (*monopolar spindle 1*), Plk1 sowie Mad1/2 (*mitotic arrest deficient*) und Aurora B involviert. Insbesondere Mad2 bindet Cdc20 und hält den APC/C-Cdc20-Komplex vorerst inaktiv (Fang et al. 1998). Erst nachdem jedes einzelne Kinetochor korrekt an den Spindelfasern ausgerichtet und befestigt ist, wird der APC/C-Cdc20-Komplex aktiviert und das CDK1 degradiert (Peters 2002). Des Weiteren fördert der aktive APC-Komplex die Chromatidentrennung durch die Ubiquitinierung von Securin. Das Securin fungiert als Separase-Inhibitor, dessen Kinaseaktivität für die Abspaltung von Cohesin (stabilisierender Komplex der Chromatiden) bzw. deren Untereinheit Scc1 notwendig ist (Pesin und Orr-Weaver 2008).

Weiterhin initiieren die SAC-assoziierten Proteine Bub1/3 und Mps1 primär einen Zellzyklusarrest, wenn sich Störungen in der Mikrotubulidynamik auftreten (Flatt et al. 2000), wohingegen die Proteinkinase Aurora B eine bedeutende Rolle innerhalb der Chromosomensegregation zugesprochen wird (Krenn und Musacchio 2015).

1.2 Genotoxische Wirkmechanismen, Folgen und ihre DNA-Schadensantwort

Kommt es zu DNA-Schäden, z. B. durch die Einwirkung genotoxischer Substanzen, wird an den im vorhergehenden Kapitel beschriebenen Checkpoints des Zellzyklus ein anderer Signalweg, der sogenannte *DNA damage response* Signalweg (DDR), initiiert.

Der DDR ist sehr komplex und koordiniert die Übergänge der Zellzyklusphasen sowie die zahlreichen Mechanismen der Reparatur und der Apoptose. Die zelluläre Schadensantwort setzt sich prinzipiell aus vier Organisationsebenen (Komponenten) zusammen. Er beginnt mit der Erkennung des DNA-Schadens über „Sensoren“, gefolgt von der Signalweiterleitung über „Mediatoren“ bis hin zur Signalverstärkung über „Transduktoren“. Letztere führen zur Aktivierung von „Effektoren“, die verschiedene Mechanismen wie den Zellzyklusarrest, die DNA-Reparatur oder Apoptose auslösen (Niida und Nakanishi 2006).

Grundsätzlich können genotoxische Substanzen direkt (ohne metabolischer Aktivierung) oder indirekt (mit metabolischer Aktivierung) ihre schädliche Wirkung auf die DNA entfalten. Die indirekten Genotoxine werden aufgrund der notwendigen Aktivierung daher auch als Promutagene bezeichnet (Baba und Cătoi 2007). Die DNA-Schäden können Chromosomenaberrationen (Verlust von Chromosomenmaterial) herbeiführen, die in in strukturelle (Chromosomenmutationen) und numerische (Genommutationen) Chromosomenaberrationen unterteilt werden. Erstere werden mit DNA-Strangbrüchen assoziiert, während die numerischen Chromosomenmutationen mit Störungen innerhalb der Mitose-Maschinerie in Verbindung stehen, die zu Veränderungen der Chromosomenanzahl (Aneuploidie) führen können (Janssen et al. 2011).

1.2.1 Chromosomenmutation: DNA-Strangbrüche

Schwerwiegende Mutationen wie Veränderungen der Chromosomenstruktur können erfolgen, wenn DNA-Strangbrüche fehlerhaft oder durch Überlastung der Reparaturmaschinerie gar nicht repariert wurden. Auf diese Weise werden chromosomale Umlagerungen wie Translokationen, Deletionen, Insertionen oder

Ringchromosomen generiert, die zur Krebsentstehung beitragen können (Obe et al. 2002). Eine Vielzahl von (Pro-)Mutagenen können DNA-Einzelstrangbrüche (SSBs, *Single Strand Breaks*) oder DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs, *Double Strand Breaks*) induzieren. Je nach MoA können genotoxische Substanzen in verschiedene chemische Klassen eingeteilt werden, die zudem in ihrer DNA-Schadensantwort sehr variieren können. Häufige und mäßige DNA-Schäden wie SSBs können nach der Exposition mit Alkylantien, reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) oder Antimetaboliten durch den Einbau falscher Nukleotide generiert werden (s. Abbildung 2). Im Wesentlichen können direkte DNA-Schäden von den nachfolgenden Reparaturmechanismen behoben werden:

- (1) die direkte DNA-Reparatur mittels der O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT),
- (2) die Basenexzisionsreparatur (BER), initiiert durch die DNA-Glykosylase (AAG) oder die 8-Oxoguanin-Glykolase (OGG1),
- (3) die Nukleotidexzisionsreparatur (NER), unterteilt in zwei komplexe Reaktionswege, den „*short-patch repair*“ (Austausch eines einzelnen Nukleotids) oder den „*long-patch repair*“ (Neusynthese von 2-12 Nukleotiden), die sich hinsichtlich der Schadenserkenkung unterscheiden,
- (4) die Fehlpaarungsreparatur (MMR, *mismatch repair*), initiiert durch diverse Mismatch-Proteine (Msh2/3/6, Mlh1 und PMS2) und
- (5) die homologe Rekombination (HR), initiiert durch den MRN-Komplex (*meiotic recombination 11* (Mre11), das *radiation repair protein 50* (Rad50), das *nijmegen breakage syndrom 1* (Nbs1) und die nicht-homologe Rekombination (NHEJ), ausgelöst durch den Heterodimer Ku70/80 zur Reparatur von DSBs. Dabei bestimmt das Ausmaß der Schädigung, die Zellzyklusphase und der Bedarf an Reparaturgenauigkeit die Wahl des Reparaturwegs (Meas und Smerdon 2016; Petrusseva et al. 2014; Harding et al. 2013; Hsieh und Yamane 2008; Hegde et al. 2008; Mao et al. 2008).

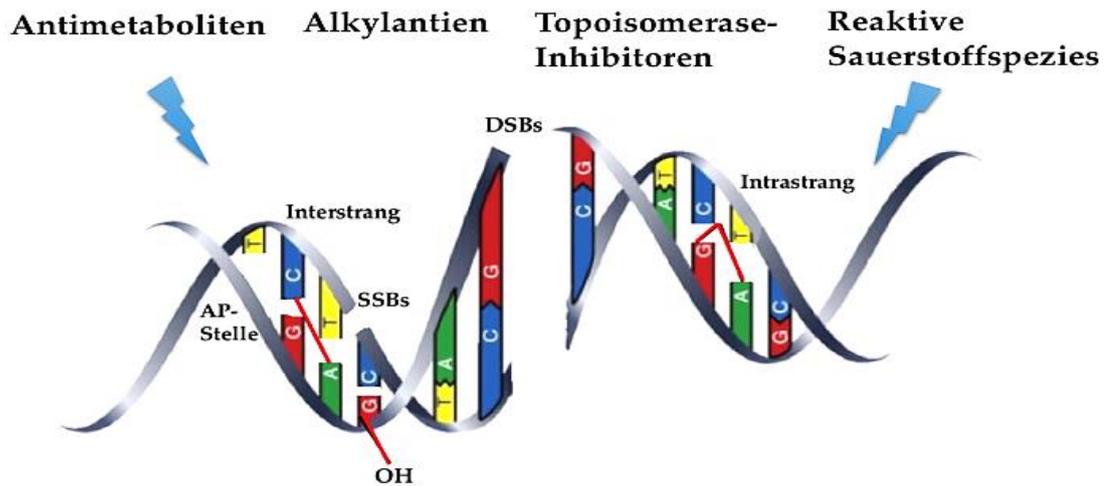


Abbildung 2: Übersicht von DNA-Schäden, die zu Chromosomenmutationen führen können.

Modifiziert nach Weeden und Asselin-Labat 2018.

Im Gegensatz zu SSBs sind DSBs für die Zelle fataler und können sowohl direkt während der DNA-Replikation als auch indirekt als Folge fehlerhafter Reparatur von SSBs entstehen. DSBs zählen zu den schwerwiegendsten DNA-Schäden und können daher die genetische Stabilität sehr gefährden (Ceccaldi et al. 2016).

Im Wesentlichen gibt es vier MoA-Gruppen, die DNA-Strangbrüche hervorrufen können: Topoisomerase-Inhibitoren (Typ I und II), Alkylantien, Antimetaboliten und ROS.

Alkylantien übertragen Alkylgruppen auf die DNA, die entweder monofunktionell wirken (keine Vernetzung von DNA-Strängen), oder bifunktionell (Verursachung von Strangvernetzungen). Es wird hierbei zwischen Interstrang (Vernetzungen zwischen zwei gegenüberliegenden Strängen) und Intrastrang (Vernetzungen auf demselben Strang) unterschieden. Ein bekannter Vertreter mit bifunktionaler Wirkung ist Mitomycin C (MMC). Zu den monofunktionellen Alkylantien gehören primär die Substanzen Methyl- und Ethylmethansulfonat (MMS/EMS), die durch Methylierung oder Ethylierung bestimmter Basen abasische Stellen im DNA-Strang erzeugen (Mohd-Yusoff et al. 2015; Kondo et al. 2010). Das Entfernen dieser DNA-Läsionen erfolgt entweder über das Enzym MGMT oder über die BER, initiiert durch die DNA-Glykosylase AAG, welche die beschädigte Base ausschneidet und auf diese Weise eine AP-Stelle (*apurinic/apyrimidinic site*) generiert. Die Reparatur über MGMT ist mit einer Inaktivierung des Enzyms verbunden, da MGMT das Methyladdukt irreversibel am

aktiven Zentrum an sich bindet (Suizidreaktion). MGMT liegt intrazellulär nur begrenzt vor. Übersteigt die Zahl der Läsionen die Kapazität des Enzyms, kann keine ausreichende Reparatur mehr erfolgen (Thomas et al. 2013). Dahingegen komplexer und toxischer ist das Alkylierungsmittel MMC, das sowohl monofunktionell als auch bifunktionell wirkt. Die Quervernetzungen der komplementären DNA-Stränge blockieren direkt die Replikation und somit die Strangtrennung während der DNA-Synthese. Bei einer fehlerhaften Reparatur über bspw. NER oder HR können als Folge DSBs auftreten (Wenig et al. 2010; Muniandy et al. 2010).

Die zweite MoA-Gruppe, die DNA-Strangbrüche hervorrufen können, sind Antimetaboliten. Antimetaboliten sind strukturelle Analoga von Nucleosiden und Metaboliten wie den Purinen, Pyrimidinen und Folsäure. Die Analoga weisen meist eine höhere Affinität zum aktiven Zentrum eines wichtigen Enzyms oder Rezeptors auf als ihr natürlicher Ligand und werden daher bevorzugt in die DNA oder RNA eingebaut. Als Folge wird die Replikation und Transkription gehemmt oder es werden direkt kritische Enzyme wie bspw. Polymerasen, Kinasen, Ribonucleotidreduktasen, Nucleosid-phosphorylasen und Thymidylat-Synthasen gestört (Zeman und Cimprich 2014). Ein sehr bekannter Antimetabolitvertreter ist das Pyrimidin-Analogon 5-Fluorouracil (5-FU), welches anstelle der Pyrimidinbase Uracil in die RNA eingebaut wird. Nach Umwandlung in die aktiven Metabolite Fluorouridintriphosphat (FUTP) und Fluorodesoxyuridinmonophosphat (FdUMP) werden diese anstelle von Uridintriphosphat (UTP) und Desoxythymidintriphosphat (dTTP) in die RNA eingebaut. Diese falschen Einbauprozesse verursachen zum einen eine Blockade der DNA-Synthese, da die Thymidylatsynthase (notwendig für Nucleosidsynthese) durch FdUMP gehemmt wird und zum anderen, weil die RNA-Synthese durch den Einbau von FUTP gestört wird (Miura et al. 2010; Longley et al. 2003). Durch Reparatur über BER und MMR können zusätzliche, falsche Nucleotide eingebaut werden oder beim Entfernen des Metaboliten FdUMP weitere SSBs generiert werden. Als Folge treten instabile Konformationen in der DNA-Struktur auf, die letztlich zu sekundären Läsionen wie DSBs führen können (Nakagawa et al. 2014).

Topoisomerase-I- und -II-Inhibitoren (Topo) stellen die dritte genotoxische Quelle zur Induktion von DNA-Strangbrüchen dar, deren Mechanismus auf der hemmenden

enzymatischen Aktivität von Topo-I und Topo-II beruht. Grundlegend sind Topos an der Regulation der Supercoil-DNA (Überstruktur der DNA) beteiligt und katalysieren Strukturveränderungen der DNA, die innerhalb der DNA-Duplikation notwendig sind. Während die Topo-I die DNA auflockert bzw. die Supercoils entfernt, indem sie einen einzelnen DNA-Strang aufschneidet und wieder verschließt, schneidet und verbindet die Topo-II zwei DNA-Doppelstränge. Topo-I- und Topo-II-Agenzien hemmen die essentiellen Enzyme und die katalysierten Strangbrüche können nicht wieder repariert werden (Lodish et al. 2000).

Die letzte Quelle zur Induktion von DNA-Strangbrüchen stellen ROS dar. Hierbei liegt ein schädlicher Stoffwechszustand in der Zelle vor, bei dem die Bildung von ROS die Kapazität des zellulären antioxidativen Abwehrsystems übersteigt (oxidativer Stress). Einige Substanzen erzeugen während ihrer metabolischen Umwandlung freie Radikale (Atom oder Molekül mit ungepaarten Elektronen) wie z.B. das Hydroxyl-Radikal (HO), Superoxid-Radikal (O₂⁻) oder den Singulett-Sauerstoff (1O₂), die Proteine und Nukleinsäuren angreifen, was zur Denaturierung und zum Funktionsverlust von Proteinen sowie Basenmodifikationen und DNA-Strangbrüchen führen kann (Phaniendra et al. 2015). Es konnte zudem in Arbeiten von Chang et al. 2002 gezeigt werden, dass oxidativer Stress das Reparatursystem von Basenfehlpaarungen (MMR) hemmt oder inaktiviert (Annovazzi et al. 2017; Swift und Golsteyn 2014; Kondo et al. 2010; Maynard et al. 2009; Matuo et al. 2010). Oxidativer Stress, vermittelt z.B. durch Wasserstoffperoxid (H₂O₂), führt zum bekanntesten ROS-Produkt, dem 8-Oxoguanin (8-OHdG). Die oxidierte Basenläsion kann über BER entfernt werden und paart sich bei nicht erfolgter Reparatur fehlerhaft mit Cytosin oder Adenin während der DNA-Replikation. Als Konsequenz wird die DNA-Replikation gehemmt und SSBs und DSBs können generiert werden (Aguiar et al. 2013; Nakabeppu 2014; Driessens et al. 2009).

1.2.2 Genommutation: Chromosomenfehlverteilungen

Im Gegensatz zu den Strangbruch-induzierenden Substanzen existieren auch diverse andere genotoxische Verbindungen, die die Dynamik der Mikrotubuli (MT) stören oder andere Komponenten der Mitose-Maschinerie schädigen (s. Abbildung 3). Je nach MoA-Target kann man diese Genotoxine unterteilen in:

- Mikrotubuli-Inhibitoren: Stabilisierung (Depolymerisation der MT) und/oder Destabilisierung der Mikrotubuli (Polymerisation der MT),
- Kinaseinhibitoren: Hemmung von Mitosekinasen (Aurora, CDK1) oder Motorproteinen (Eg5 oder CENP-E) und
- Multiprotein-Komplexinhibitoren: Hemmung von Enzymkomplexen (APC oder Proteasom).

Werden Zellen mit diesen sogenannten „Spindelgiften“ behandelt, kann es z.B. zur Bildung atypischer Spindeln kommen, was mit einer dauerhaften Aktivierung des Spindelkontrollpunktes (SAC) einhergeht. Als genotoxischer Endpunkt können Chromosomenfehlverteilungen wie Aneuploidie (einzelne Chromosomen vermehrt oder vermindert) oder Polyploidien (Verdopplung des Chromosomensatzes) resultieren (Potapova und Gorbsky 2017; Juan et al. 2014; Zasadil et al. 2013; Chan et al. 2012; Rudolph et al. 2009).

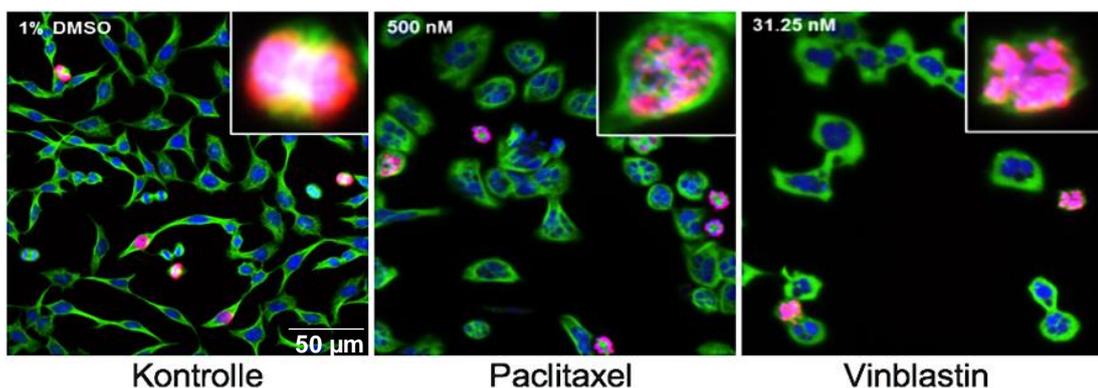


Abbildung 3: Substanz-induzierte Effekte auf die mitotische Spindelorganisation.

Gezeigt sind Substanz-induzierte Effekte auf die Tubulinpolymerisation von Paclitaxel (stabilisierend) und Vinblastin (destabilisierend) an chinesischen Hamsterzellen (V79-Zellen), die am High-Content-Imager aufgenommen wurden (20x Objektiv). Blau: Zellkern, Grün: Mikrotubuli, Pink: Phosphoryliertes Histon H3 (S10) (mitotische Zellen).

Grundlegend wird der Beginn der Anaphase solange vom SAC überwacht und unter Kontrolle verzögert bis alle Kinetochore korrekt an die Spindel-Tubuli angeheftet sind. Es wird angenommen, dass der Beginn der Anaphase durch nicht angeknüpfte Kinetochore, die ein inhibitorisches Signal erzeugen, verzögert wird und Kinetochore daher als Schlüsselkomponenten für die Aktivierung vom SAC gelten (Lara-Gonzalez et al. 2012). Der mitotische Kontrollpunkt ist daher äußerst sensitiv.

Zellen, die den zuvor genannten Wirkstoffgruppen ausgesetzt sind, reagieren entweder mit einem G2/M-Arrest, einem Abbruch der Zellteilung oder der Apoptose. Die Auslöser der Schadensantwort umfassen dabei eine fehlerhafte Anhaftung der Kinetochore an die Mikrotubuli durch abnormale Spindelbildungen, fehlorientierte chromosomale Ausrichtungen oder vorzeitigen/verzögerten Trennung der Chromosomen (Matson und Stukkenberg 2011; Payton et al. 2010).

Bei den Mitoseschäden muss das progressive Checkpoint-Signal für die entscheidende APC/C-Aktivierung durch Assoziation mit Cdc20 negativ moduliert werden, damit die Anaphase verzögert wird. Als Antwort auf fehlende Spindelanheftungen/-spannungen wandern die SAC-Komponenten Mad1 und Mad2 entlang des Chromatins und reichern sich an den Kinetochoren an. Mad1/2 interagieren mit den Kinetochoren und initiieren die Bildung eines MCC-Komplexes (Mad2, BubR1 und Bub3), um zusammen mit Cdc20 die APC-Aktivität zu unterbinden (Lawrence et al. 2015). Die Rekrutierung der SAC-Proteine wird durch Mps1 initiiert, welches wiederum durch die Aurora B Kinase und den Hec1-Komplex (Hec1, Nuf2, Spc24/25) aktiviert wird (Matsuo et al. 2017). Eine stabile Mps1-Aktivität fördert die Rekrutierung von Mad2 für den MMC-Komplex. Mad2 stellt eine Assoziation von Mad1 an den Kinetochoren her und wichtige Checkpoint-Signale werden freigesetzt (Agarwal und Varma 2015; London und Biggins 2013). Weiterhin wurde berichtet, dass bei nicht gebundenen Kinetochoren eine Hyperphosphorylierung von BubR1, vermittelt durch Mad1, erfolgt (Choi und Lee 2008). Der SAC-Komplex ist nicht permanent aktiv und bei längerem Stillstand der Mitose (Mitose-Arrest) wird die Zelle entweder über eine Caspase-abhängige Apoptose eliminiert oder sie "entschlüpft" der Mitose ohne eine Zytokinese zu durchlaufen (*mitotic slippage*).

Diese beschädigten Zellen beinhalten dann eine veränderte Chromosomenzahl und sind somit Träger einer Genommutation. Als sekundäre Folge werden vorrangig polyploide ($2n$, Vervielfachungen des Chromosomensatzes) oder tetraploide Zellen ($4n$, vier Chromosomensätze) gebildet (Nakayama und Inoue 2016; Colin et al. 2015). In der nachfolgenden G1-Phase arretieren die tetraploiden Zellen p53-vermittelt unter Mitwirkung von p21 (postmitotischer Checkpoint). Dadurch soll die Akkumulation

des DNA-Schadens verhindert werden, die andernfalls postreplikativ zu Multiploidien ($8n$) führen kann (Hyun und Jang 2015; Ganem und Pellman 2012).

Zusammenfassend ist allen genotoxischen Mechanismen gemein, dass eine Vielzahl von schadensassoziierten Genen und Proteinen, inklusive posttranslational modifizierten Proteinen, induziert werden. Der DDR stellt ein komplex koordiniertes System dar, zu dem fortlaufend neue Erkenntnisse gewonnen werden, die Wissenslücken schließen und neue Ansätze hinsichtlich der Entwicklung und Charakterisierung von Wirkstoffen sowie von mechanistischen Biomarkern hervorbringen können.

1.3 Pharmazeutische Aspekte: Einteilung und Risikobewertung von Wirkstoffkandidaten

1.3.1 Einteilung von Wirkstoffkandidaten

Bedingt durch den Prozess der Karzinogenese werden Arzneimittelkandidaten bezüglich ihres MoAs in genotoxische und nicht-genotoxische Substanzen unterteilt. Die Zuordnung ist für die Risikobewertung von Wirkstoffen bedeutsam, um die Ableitung von Schwellenwerten für den menschlichen Gebrauch zu unterstützen (s. 1.3.2).

(1) Genotoxische Substanzen

Genotoxine weisen die im Kapitel 1.2 aufgeführten Wirkmechanismen auf, deren Reaktivität strukturelle oder numerische Chromosomenaberrationen hervorrufen kann. Erstere werden zumeist infolge von DNA-Strangbrüchen induziert. Diese Substanzen weisen vorrangig einen DNA-reaktiven Mechanismus auf und werden übergeordnet hinsichtlich ihres MoA in „Klastogene“ zusammengefasst, wohingegen nicht-DNA-reaktive Substanzen numerische Veränderungen (Aneuploidien/ Polyploidien) induzieren können und als „Aneugene“ bezeichnet werden.

Den Substanzklassen ist gemein, dass sie Gen- oder Chromosomenmutationen induzieren können, welche an die Tochterzellen vererbt werden und somit unmittelbar ein Krebsrisiko darstellen können (Kirkland et al. 2016).

(2) Nicht-genotoxische Substanzen

Einzelne Nicht-Genotoxine besitzen die Eigenschaft durch sekundäre Mechanismen (nicht-mutagene Effekte) neoplastische Transformationen zu verursachen (Lee et al. 2014). Die Substanzen weisen diverse Wirkmechanismen auf wie bspw. endokrine Rezeptor- (nicht) vermittelte-Modulationen, Zytotoxizität, Induktion von Entzündungsreaktionen, oxidativem Stress oder xenobiotische Rezeptoraktivierung. Die Identifizierung und korrekte Klassifizierung von Nicht-Genotoxinen stellt eine Herausforderung dar. Zum einen weisen einzelne Verbindungen gleichzeitig mehrere Mechanismen auf, sind gewebespezifisch toxisch und eben nicht genotoxisch. Zum anderen erschweren sie aber die Identifizierung „wahrer“ Genotoxine, weil sie vereinzelt genotoxische Endpunkte induzieren und auf diese Weise falsch positive Ergebnisse erzeugen können (Pérez et al. 2016; Doktorova et al. 2014; Fowler et al. 2014; Lee et al. 2013).

1.3.2 Threshold-Konzepte

Ein wichtiger Bestandteil im Prozess der Risikobewertung von Wirkstoffkandidaten ist die Risikocharakterisierung, einschließlich der Expositionsbewertung und der Bestimmung von Schwellenwerten. Aufgrund der zuvor genannten Unterschiede zwischen genotoxischen und nicht-genotoxischen MoAs hat die Einstufung große Auswirkungen auf die Risikobewertung und Regulierung (MacGregor et al. 2015; Hernández et al. 2013; Guérard et al. 2015; Neumann 2009). Sehr zentral ist dabei die Identifizierung potentieller Schwellenwerte für genotoxische Substanzen, die auf Basis mechanistischer Daten begründet werden können (Bailey et al. 2009; Crump 2011; ICH 2012; Bevan und Harrison 2017). Lange Zeit dominierte das eher konservative Dogma, dass eine lineare Beziehung zwischen exponierter Konzentration von Genotoxinen und Mutationen selbst bei niedrigen Dosen besteht und somit kein sicherer Grenzwert ermittelt werden kann (Kirsch-Volders et al. 2000; Jenkins et al. 2010).

Diese Lehrmeinung berücksichtigt jedoch nicht, dass zytoprotektive Mechanismen im exponierten Organismus, wie Detoxifizierung, DNA-Reparatur und Apoptose sowie Reaktionen mit Nicht-DNA-Molekülen existieren (Oesch et al. 2000; Williams et al. 2000).

Im Laufe der Jahre wurden Methoden sensitiver und moderner, wodurch in zahlreichen Arbeiten Schwellenwerte für genotoxische Substanzen auf Basis mechanistischer Daten demonstriert werden konnten, die vorrangig mit Nicht-DNA-Zielmolekülen reagieren. Diese Genotoxine umfassen z. B. Spindelgifte (Aneugene) Topoisomerase-Inhibitoren oder Alkylantien (einzelne Klastogene) (Parry et al. 2002, Bolt et al. 2004, Cammerer et al. 2010, Doak et al 2007; Lynch et al. 2003, Elhajouji et al. 2011, ICH M7. 2015). Beruht der mutagene Mechanismus direkt auf Interaktionen mit der DNA, stellt der Nachweis eines Schwellenwerts bis heute eine Herausforderung dar. Allerdings konnten für wenige DNA-reaktive Genotoxine, zuverlässige Daten für die Existenz einer Sicherheitsschwelle geliefert werden (Thomas et al. 2013; Lavé et al. 2009; Muller et al. 2009). Allgemein ist festzuhalten, dass sobald der Mechanismus der Mutagenese auf einer Schädigung von anderen Molekülen als der DNA beruht, ein Schwellenwert, begründet durch eine MoA-Analyse, abgeleitet werden kann.

1.3.3 *In vitro* Genotoxizitätstests und deren Limitierungen

Aktuell kann eine große Anzahl von potentiellen Wirkstoffen mit unterschiedlichen und teilweise vielfältigen Wirkmechanismen nur mit wenigen regulatorisch akzeptierten *in vitro* Genotoxizitätstests toxikologisch charakterisiert werden. Allerdings wurden in den letzten Jahrzehnten wesentliche Einschränkungen in diesen Testsystemen demonstriert, die nicht den aktuellen Bedürfnissen der modernen Risikobewertung entsprechen.

Zum einen können sie nur vereinzelt bis gar nicht über den genauen Wirkmechanismus einer Substanz informieren und zum anderen werden relativ häufig falsch positive Ergebnisse generiert, was unnötige *Follow-up* Tests (*in vivo*) zur Folge hat (Cheung et al. 2015; Simon et al. 2014). Diese umfassend validierten regulatorischen Tests sind in den OECD Guidelines (*Organisation for Economic Co-operation and Development*) definiert und beschrieben.

Die geforderten Tests umfassen den Ames-Test, Maus-Lymphom-Test, Mikronukleustest und den Chromosomenaberrationstest, welche nachfolgend kurz mit ihren jeweiligen Limitierungen beschrieben werden.

- Ames Test (Rückmutationstest, OECD Test Guideline Test No 471)

Das Testsystem basiert auf Bakterien verschiedener Stämme (histidinabhängiges Wachstum), die nach Exposition eines Genotoxins in einem histidinfreien Kulturmedium im Vergleich zu den negativen Kontrollstämmen vermehrt Kolonien aufweisen (histidinunabhängiges Wachstum = Rückmutation). Das bakterielle Testsystem dient dem Nachweis einer Genmutation und ist grundsätzlich hochsensitiv, d.h. Mutagene können gut identifiziert werden. Allerdings können nicht-DNA-reaktive Substanzen, wie bspw. Aneugene oder andere Wirkmechanismen, die große DNA-Deletionen induzieren, im Ames-Test verfehlt werden. Weitere Limitierungen sind, dass Antibiotika oder Bakteriozide und Verbindungen mit einem bakterienspezifischen Metabolismus nicht ausreichend untersucht werden können. Insbesondere letztere können falsch positive Ergebnisse generieren.

- Der Maus-Lymphom-Test (Vorwärtsmutationstest, OECD Test Guideline Test No 490)

Der *in vitro* Mouse-Lymphom-Test deckt als toxikologische Endpunkte Chromosomen- und Genmutationen in den Mauslymphomzellen (L5178Y TK[±] (Thymidinkinase) 3.7.2C) ab, weil abhängig vom MoA der Substanz, zwei morphologisch unterschiedliche Typen von Kolonien (kleine Kolonien tendenziell eher assoziiert mit Chromosomenmutation und große Kolonien mit Genmutation), gebildet werden. Das Prinzip des Testsystems beruht darauf, dass genotoxische Substanzen die Enzymaktivität der TK aufgrund einer Mutation inaktivieren und die Zellen trotz der Exposition des toxischen Trifluorothymidin (TFT) überleben, wohingegen kompetente TK-Zellen empfindlich sind und nicht weiter proliferieren. Obwohl die entsprechende Test-Guideline zum Maus-Lymphoma-Test (OECD Test Guideline Test No 490) die Erfassung von Aneugenen einschließt, verweisen mehrere Publikationen darauf, dass dieser Test zur Detektion von Substanzen mit aneugenem Mechanismus Defizite zeigt und einige Modellsubstanzen gar nicht oder erst im zytotoxischen Bereich als positiv detektiert wurden (Fellows et al. 2012, Honma und Hayashi 2001; Wang et al. 2009).

- Der Mikronukleus-Test (OECD Test Guideline Test No 487)

Der Mikronukleus-Test (MNT) zählt zu den gängigsten Genotoxizitätstest und kann gleichzeitig zwei toxikologische Endpunkte, numerische Chromosomenschäden (Aneugene) und strukturelle Chromosomenschäden (Klastogene) an proliferierenden Zellen (Hamster- und humane Zellen), bereitstellen. Mikrokerne (MN) werden als Folge von mitotischen Fehlern gebildet, wenn ganze Chromosomen oder Chromosomenfragmente zurückbleiben und nicht im Hauptkern aufgenommen werden können. Die kleinen Kerne treten mit einer eigenen Kernhülle neben dem Hauptkern auf. Aufgrund seiner einfachen Durchführung, Empfindlichkeit sowie die Möglichkeit die Endpunktbewertung zu automatisieren, wurde der MNT zum meist verwendeten Genotoxizitätstest (Rao 2017; Hayashi 2016).

Neben der in-situ Hybridisierung (FISH-Methode) kann auch eine Anti-Kinetochorfärbung weiterführende mechanistische Information liefern und erlaubt zudem eine Differenzierung, ob der MN aus ganzen Chromosomen (mit Kinetochor; Nachweis Aneugene; s. Abbildung 4) oder aus azentrischen Chromosomenfragmenten (ohne Kinetochor; Nachweis Klastogene). Die DNA-Schädigung in Form von Chromosomenbrüchen oder chromosomalen Verlusten kann, je nach Schweregrad, zur Apoptose oder Nekrose führen. Hierbei sollte die Bewertung der MN-Induktion kritisch durchgeführt werden, da fragmentierte DNA irrtümlich als MN gewertet werden kann und daher falsch positive Ergebnisse generiert werden können (Dearfield et al. 2011). Darüber hinaus wurden in den letzten Jahren Säugerzellen-Tests sehr kritisch durchleuchtet und es wurde aufgezeigt, dass positive Ergebnisse ebenso durch Störungen der physiologischen Bedingungen der Zellen in Kultur nach Substanzbehandlung erzeugt werden können und ein ungeeigneter Zytotoxizitätsparameter herangezogen wurde, welcher die Zytotoxizität unterschätzte (Yamamura et al. 2018).

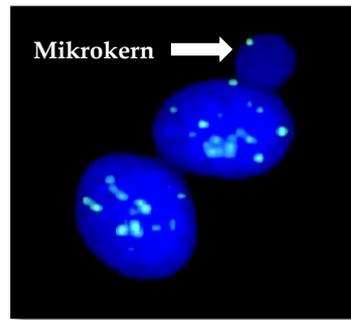


Abbildung 4: Mikrokern mit Kinetochor in V79-Zellen.

Blau: Zellkern; grün: Kinetochor

- Chromosomenaberrationstest (OECD Test Guideline Test No 473)

Bei diesem Test wird der Karyotyp in Hamster- oder humanen Zellen nach der ersten Metaphase untersucht und ähnlich wie im MNT Chromosomenmutationen detektiert. Im Chromosomenaberrationstest ist die Detektion chromosomen-brechender Substanzen (Klastogene) vorrangig. Während aneugene Substanzen polyploide Zellen generieren können, weist Polyploidie allein nicht unbedingt auf ein aneuges Potential der Testsubstanz hin, da diese auch infolge von Zellklusstörungen oder durch Zytotoxizität induziert werden kann. Gemäß der entsprechenden OECD Test Guideline sind polyploide Zellen bzw. der Chromosomenaberrationstest nicht dafür bestimmt Aneuploidie nachzuweisen und es wird daher vielmehr der MNT empfohlen. Entscheidende Nachteile, wie geringes Durchsatzvermögen und begrenzte Automatisierungsmöglichkeiten, limitieren weiterhin seine Anwendung in der modernen Risikobewertung, wodurch die Methode zunehmend durch den MNT abgelöst wird, der Aneugene und Klastogene schneller und leichter nachzuweisen kann. Darüber hinaus muss auch hier die Zytotoxizität nach Substanzbehandlung kritisch kontrolliert werden, um falsch positive Resultate zu vermeiden (Dearfield et al. 2011).

Zusammengefasst lässt sich festhalten, dass mit den gegenwärtigen *in vitro* Testsystemen relativ häufig falsch positive Ergebnisse generiert werden (Kirkland et al. 2011; Hashimoto et al. 2011; Fowler et al. 2012) und die MoA-Information unzureichend ist, wodurch potentiell wertvolle Arzneimittelkandidaten in der Entwicklungsphase ausscheiden können.

1.4 Mechanistische Biomarker: Moderne und vielversprechende Tools in der Arzneimittelentwicklung

Durch die vollständige Entschlüsselung der menschlichen Genomsequenz im Jahr 2003 wurden bedeutende moderne Möglichkeiten, wie bspw. Sequenzierungsmethoden, individualisierte Medizin und die Identifizierung neuer Biomarker eröffnet (Baxevanis 2003). Neuartige Technologien und Optimierungen der Sensitivität stellen bedeutsame Erkenntnisse und Fortschritte hinsichtlich der DNA-Schadensantwort bereit. Umfangreiche Datenbanken mit Informationen von DNA-Schadenssignalwegen wurden generiert, die zur Erweiterung des Wissens über die Funktionen von Genen und Proteinen, sowie von posttranslationalen Modifizierungen (PTM) von Protein- und Chromatinkomponenten führten.

Im konventionellen Ansatz werden Biomarker als messbare Parameter für biologische Prozesse (normale, pathogene oder therapeutische) definiert. Im modern-orientierten Ansatz werden „mechanistische Biomarker“ dem prädiktiven Tool zugeordnet, die sowohl die genetische als auch die proteomische Ebene bedienen. Ihre Identifizierung und Verwendung hat einen großen Mehrwert in der Arzneimittelentwicklung erlangt, da sie entscheidende Rückschlüsse zum vorliegenden Wirkmechanismus einer Substanz liefern können, insbesondere im Hinblick auf genotoxische Wirkungsweisen, und somit die Risikobewertung von Arzneimittelkandidaten verbessern.

Die zuvor genannten neuen Möglichkeiten führten unter anderem zur Entwicklung von Microarrays, welche die simultane Expressionsanalyse einer großen Anzahl bekannter Gene ermöglicht. Diese Arrays werden von mehreren Dienstleistern wie zum Beispiel von ThermoFisher oder Agilent angeboten und werden universell im pharmazeutischen Bereich unter dem Stichpunkt „Toxikogenomik“ (prädiktive substanz-induzierte Toxikologie) bedient, um Methoden zu etablieren, die es ermöglichen, Substanzen über Genexpressionsprofile mechanistisch zu charakterisieren (Lan et al. 2016; Li et al. 2015; Römer et al. 2014). Bisherige Studien haben gezeigt, dass in den humanen HepG2 und TK6-Zellen eine Differenzierung von genotoxischen und nicht-genotoxischen Substanzen auf Basis von Gen-Analysen möglich war (Godderis et al. 2010; Li et al. 2015).

Weiterhin konnten mit einem Set aus Genen, in Kombination mit einem benutzerdefinierten Real-Time PCR-Ansatz, genotoxische Mechanismen in TK6-Zellen differenziert werden (Ellinger-Ziegelbauer et al. 2009). Insgesamt ist die Entwicklung und Etablierung von modernen Testansätzen mit Bemühungen verbunden, um diese als standardisierte Genotoxizitätstests verwenden zu können. Die Studien unterscheiden sich teilweise hinsichtlich der Dauer der Substanzbehandlung, der verwendeten Zellmodelle, dem Set an Genen und der finalen statistischen Analyse, um die toxikogenomischen Signaturen zu erhalten. Um diese Hürden zu überwinden, wurde ein Komitee aus Fachtoxikologen aus der Pharmazie sowie Konsortien aus der Wissenschaft (z.B. *Health and Environmental Sciences Institute*, HESI) und Regierung gebildet, um toxikogenomische Studien zu konzipieren, durchzuführen und zu validieren (Beedanagari et al. 2014). In diesem Zusammenhang wurde mit Unterstützung des Instituts HESI eine neuartige Transkriptom-Biomarker Methode, der TGxDDI Assay in TK6-Zellen entwickelt und validiert, der es ermöglicht, DNA-schadeninduzierte (DNA damage-inducing, DDI) Substanzen von nicht-DDI Substanzen (Aneugene) zu unterscheiden und der darüber hinaus potentiell irrelevant Positive aufdecken kann (Li et al. 2017).

Neben den zahlreichen Toxikogenomik-Aktivitäten ist ebenso die Identifizierung und Verwendung von Proteinen, speziell epigenetischen Proteinen von enormer Bedeutung und geht über das zentrale Dogma „ein Gen für ein Protein“ hinaus. Während das menschliche Genom schätzungsweise zwischen 20.000-25.000 proteinkodierende Gene enthält, wird vermutet, dass das Proteom mehr als eine Millionen Proteine umfasst (Dakubo 2016). Somit eröffnen sich neue Forschungsschwerpunkte zur Identifizierung von „dynamischen“ PTMs, die erst im Zuge von DNA-Schäden quantitativ und abhängig vom Schadenstyp, an unterschiedlichen modifizierten Stellen verändert vorliegen können. Eine reversible oder irreversible Modifikation hat Auswirkungen auf die Reaktions- und Funktionseigenschaft von Proteinen innerhalb zellulärer Prozesse. Die PTMs umfassen dabei Typen wie Phosphoryl-, Acetyl-, Methyl-, Hydroxyl-, Glykosylierungen, sowie auch Ubiquitinierungen, wobei die Bezeichnungen auf die Moleküle, die auf die Proteine übertragen werden, zurückzuführen sind (Khoury et al. 2011).

Generell muss berücksichtigt werden, dass die Identifizierung zuverlässiger Biomarker zur Charakterisierung genotoxischer Substanzen mit einigen Herausforderungen verbunden ist.

In dieser Forschungsarbeit sind Biomarker Indikatoren von mechanistischen zellulären Antworten, die primär dosis- und zeitpunktbezogen sind und deren Bewertungen neue statistische Ansätze für Dosis-Wirkungsanalysen für die MoA-Kategorisierung beinhalten. Dennoch konnte mehrfach in Studien aufgezeigt werden, dass PTMs eine prädiktive Funktion bezüglich Substanz-induzierter DNA-Schäden erfüllen und folglich nützliche mechanistische Biomarker sind und sein können, um die frühe Arzneimittelentwicklung zu optimieren (Nikolaishvilli-Feinberg et al. 2014; Wang und Weaver 2011; Rossetto et al. 2010; Maier et al. 2005; Leeming et al. 2011).

Die folgende Abbildung 5 steht exemplarisch für zahlreiche Möglichkeiten zur Untersuchung eines mechanistischen Markers, welche potenziell aus einem Substanz-induzierten Schaden nach einer bestimmten Expositionsdauer der Zellen resultieren. Daneben repräsentiert p53 zugleich einen von insgesamt vier allgemein anerkannten Biomarkern, der vermehrt zur Detektion genotoxischer Substanzen untersucht wird.

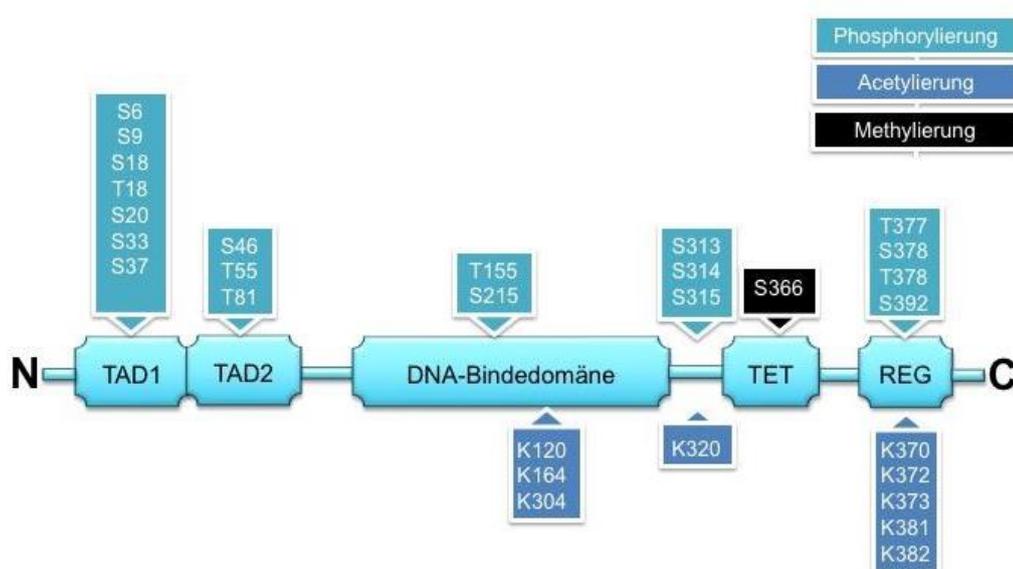


Abbildung 5: Funktionsdomänen von p53 mit bekannten posttranslationalen Modifikationsstellen.

Modifiziert nach Anderson und Apella 2011.

1.4.1 Protein p53

Das Protein p53 repräsentiert das am besten studierte Tumorsuppressorprotein, da es zum einen mit Krebserkrankungen und zum anderen als Hauptregulator mit der zellulären Stressantwort assoziiert wird (Reinhardt und Schumacher 2012). Am p53-Protein konnten bis heute zahlreiche Stellen nachgewiesen werden, die unter Umständen abhängig vom Substanz-induzierten Schaden und Expositionsdauer der Zellen entsprechend modifiziert werden können (s. Abbildung 5).

Als einer der zentralen Transkriptionsfaktoren ist es nicht verwunderlich, dass p53 durch ATM und ATR vielfältig reguliert und direkt oder indirekt durch die Wirkung anderer Substrate phosphoryliert werden kann (Yang et al. 2004). Unter normalen Bedingungen liegt eine sehr geringe Menge an p53 in den Zellen vor. Die Degradation erfolgt durch das Proteasom und unterliegt der Ubiquitinierung über das Regulatorprotein MDM2 (Haupt et al. 1997). Die Ubiquitinierung wird als Reaktion auf zellulären Stress gehemmt und dient zur Stabilisierung von p53. Folglich akkumuliert p53 im Kern als Transkriptionsfaktor und stimuliert die Synthese von diversen DNA-schadensassoziierten Proteinen. Die Phosphorylierung an Serin 15 (S15) und S46 stellen wesentliche PTMs im Rahmen der Stressantwort nach genotoxischer Substanzwirkung dar. Diese Modifikation kann entweder über die zentralen Sensorinasen wie ATM und ATR oder vermittelt durch CDK5 erfolgen (Loughery et al. 2014; Lee et al. 2007; Oda et al. 2000). Weitere nennenswerte Phosphorylierungen an S37 sowie auch an Threonin 18 können vorrangig mit UV- und ionisierenden Strahlen assoziiert werden, wohingegen andere Phosphorylierungen an S6, S20 oder S392 in Verbindung mit genotoxischem Stress stehen (Thompson et al. 2004). Des Weiteren konnten auch Acetylierungen an Lysin 373 und Lysin 382 nach Behandlung mit Antimetaboliten oder RNA-Polymerase-II-Inhibitoren beobachtet werden (Anderson und Apella 2011; Apella und Anderson 2001).

1.4.2 Phosphorylierte Histone: γ H2AX und pH3 (S10)

Histonproteine, die mit der DNA assoziiert sind, stabilisieren das Chromatin und tragen zur kleinsten Verpackungseinheit der DNA bei (s. Abbildung 1). Die Detektion und Reparatur von DNA-Schäden erfolgen innerhalb des Chromatins und involviert die PTMs von Histonen innerhalb der Schadenskaskade.

Besonders die Phosphorylierungen von Histon H2AX (Subtyp vom H2A) und Histon H3 gelten als dynamische Sensoren und können als Antwort auf genotoxischen Stress wertvolle mechanistische Informationen liefern.

Das Histon H2AX wurde bereits im Jahr 1980 beschrieben und repräsentiert die vorherrschende H2A-Variante, die je nach Organismus und Zelltyp 2-25% des gesamten H2A-Pools ausmacht und im gesamten Chromatin ungleich verteilt vorliegt (Savic et al. 2009; Rogakou et al. 1998; West und Bonner 1980).

Genotoxische Substanzen können direkt oder indirekt über sekundäre Läsionen DSBs induzieren, die zu chromosomalen Veränderungen sowie zur Tumorgenese führen können (Liu et al. 2017). Die Schadenserkennung und die Reparatur von DSBs ist komplex und wird sowohl abhängig als auch unabhängig vom MRN-Komplex aktiviert (van den Bosch et al. 2003). Durch die Aktivierung werden wichtige Signalkinasen wie ATM, ATR und DNA-PKcs rekrutiert, die allesamt in der Lage sind H2AX an S139 zu phosphorylieren, welches dann als γ H2AX bezeichnet wird (Maréchal und Zou 2013; An et al. 2010). Die Phosphorylierung stellt eine epigenetische Markierung dar, die zu einer Veränderung der Chromatinstruktur führt, um DNA-Schäden in der Zelle hervorzuheben und dem nachgeschalteten Reparaturprozess Zugang zu den DSBs zu ermöglichen (Chowdhury et al. 2005). Das γ H2AX gilt als frühes Schadensereignis, da H2AX in der Nähe von DSBs hinreichend und schnell (innerhalb von Sekunden) phosphoryliert wird (Wang et al. 2014). Nachdem H2AX phosphoryliert worden ist, entsteht eine Bindungsdomäne für die BRCA1 C-Terminale Domäne-Region des Mediatorproteins MDC1 (*mediator of DNA damage checkpoint*). Durch die Bindung iteriert zum einen der MRN-ATM Feedback-Loop, der das Signal von γ H2AX über mehrere Megabasen hinweg ausbreitet, und zum anderen wird die Ubiquitinierung des Chromatins mittels der Ligasen RNF168 und RNF8 gefördert, die der Besetzung von BRCA1 und 53BP1 (*p53 binding protein 1*) dient (Burgess und Misteli 2015; Price und D'Andrea 2013). Die Kaskade führt letztlich zur Einleitung der beiden DSB-Reparaturwege: HR und NHEJ (Shibata et al. 2014; Scully und Xie 2013). Durch die Kombination von phospho-spezifischen Antikörpern, die den Serin-Rest 139 von γ H2AX erkennen, kann die Induktion von DSBs über sogenannte „Foci“ fluoreszenzmikroskopisch oder durchflusszytometrisch detektiert

werden (Nikolova et al. 2014; Smart et al. 2011). Ein Focus ist ein konzentrierter Schadenskomplex von bis zu tausend γ H2AX-Molekülen und korrespondiert mit einem einzelnen DSB (Ivashkevich et al. 2012).

Aufgrund des mechanistischen Verständnisses, sowie der schnellen Bildung, konnte γ H2AX als sensitiver Marker für DSBs eine führende Stellung einnehmen und wurde demzufolge auch Marker der ersten Wahl, um einen klastogenen Mechanismus von Wirkstoffkandidaten aufzudecken (DSB-Induktion) und zugleich von aneugenischen Wirkungsweisen zu differenzieren (Mishima 2017; Khoury et al. 2016; Harada et al. 2014). Unter bestimmten Umständen muss berücksichtigt werden, dass die Bildung von γ H2AX nicht zwangsläufig mit DSB assoziiert ist, sondern auch durch andere Faktoren wie z.B. Hitze, Replikationsstress, zelluläre Rekombinationsprozesse und Apoptose bedingt sein kann. Insbesondere apoptotische Zellen generieren DSB-unabhängige Hintergrundfoci, die bspw. bei einer durchflusszytometrischen Analyse im Gating-Ansatz ausgeschlossen werden können, da diese im Vergleich zu vitalen Zellen, eine höhere Fluoreszenz aufweisen (Jiang et al. 2017; Bryce et al. 2016; Darzynkiewicz und Zhao 2011).

Die Phosphorylierung vom Histon 3 am Serin 10 und 28, werden als eine der Schlüsselevents in der Mitose und Meiose angesehen. Das pH3 (S10) ist dabei mit der G2-Phase, wohingegen S28 mit der Mitosephase im Zellzyklus assoziiert ist (Pacaud et al. 2015; Van Hooser et al. 1998). Reguliert wird die Phosphorylierung von pH3 (S10) über die JNK-Kinase (*c-Jun N-terminal kinase*), die als Subtyp der MAP-Familie (*mitogen-activated protein*) angehört. Die Aurora-B, RSK2 (*ribosomal S6 kinase 2*) oder PIM1 (*proto-oncogene serine/threonine-protein kinase*) vermittelt werden (Pacaud et al. 2015). Im Gegensatz zum γ H2AX ist das pH3 (S10) nicht direkt oder offensichtlich als PTM in die DNA-Schadensantwort involviert und setzte sich ursprünglich als Mitose-Marker für Analysen zur Zellzyklusprogression durch (Shen et al. 2017; Mir et al. 2015; Tane et al. 2014; Veras et al. 2009). Neben der zuverlässigen Bestimmung des mitotischen Index (mitotische Zellen vs. Gesamtzellanzahl), wurde der Marker pH3 (S10) in Verbindung mit aneugenischen Substanzen untersucht. Bahnbrechend war in diesem Zusammenhang die Arbeit von Muehlbauer und Schuler (2005), die einen dosisabhängigen Anstieg von pH3 (S10) bei aneugenischen Substanzen und eine

dosisabhängige Verminderung bei klastogenen Substanzen fanden. Arretiert die Zelle in der M-Phase aufgrund von schwerwiegenden Störungen während der Chromosomensegregation, verweilt pH3 (S10) im aktiven Zustand und akkumuliert daher in der Zelle. Dadurch konnte sich pH3 (S10) als geeigneter Marker für Substanzen mit einem aneugen Mechanismus etablieren (Bryce et al. 2017; Gollapudi et al. 2016; Khoury et al. 2016; Bryce et al. 2007). Gleichzeitig wird die Differenzierung von klastogenen Substanzen ermöglicht, da es hierbei vorrangig zu einer deutlichen pH3-Abnahme kommt. Dies liegt begründet in der Aktivierung von cleaved PARP1 (Poly(ADP-Ribose)-Polymerase) infolge der DSB-Schäden. Cleaved PARP1 inhibiert im Rahmen der Schadensantwort die Kinaseaktivität von Aurora B, welche aber die Phosphorylierung von H3 vermittelt (Monaco et al. 2005).

1.4.3 Cleaved PARP1 (gespaltenes PARP1)

Das Gegenstück zur Zellproliferation ist die Apoptose, die den kontrollierten Zelltod darstellt. Neben dem regulären homöostatischen Prozess kann eine beschädigte Zelle aufgrund von irreparablen oder zu großen DNA-Schäden die Apoptose strategisch zum Schutz vor Mutationen aktivieren und wird auf diese Weise eliminiert (Borges et al. 2008). Beim Apoptoseprozess wird zwischen frühen und späten Stadien unterschieden, was letztlich für die jeweilige Fragestellung und damit für die Auswahl eines geeigneten Apoptose-Markers von Bedeutung ist.

Die späte Apoptose geht mit einer DNA-Fragmentierung einher, die z.B. enzymatisch mit Hilfe des sogenannten TUNEL-Assays (TdT = Desoxynukleotidyltransferase+ BrdUTP = modifiziertes Nukleotid; 5-Bromo-2'-Deoxyuridin-5'-tri-phosphat) oder über die DNA-Fluoreszenzfarbstoffe 7-Aminoactinomycin (7-AAD) und Propidiumiodid (PI) ermittelt werden kann (Kyrylkova et al. 2012; George et al. 2004).

Um die frühe Apoptose bestimmen zu können, eignen sich Marker wie z.B. Annexin V, Caspase 3/-7, deren Kombination oder cleaved PARP1 (Plesca et al. 2008; Scabini et al. 2011; Soldani et al. 2001) welches zugleich ein Substrat von den Caspasen 3 und 7 darstellt. Die Caspasen 3/7 spalten PARP1 proteolytisch in zwei Fragmente (89 kD C-terminales katalytisches Fragment und in 24 kD N-terminales Peptid) und deaktivieren somit seine Funktion (Soldani und Scovassi 2002). PARP1 stellt neben den anderen 16 Subtypen das am besten untersuchte Kernprotein innerhalb der PARP-

Familie dar. Die katalytische Funktion erfolgt innerhalb der DNA-Reparatur (BER-Prozess) durch die Bindung an DNA-Strangbrüche und fördert somit die Rekrutierung anderer Reparaturproteine wie XRCC1 oder Ligasen zum Strangbruch (Wang et al. 2014). Kann der Schaden nicht repariert werden, wird die Apoptose eingeleitet. Dabei erfolgt die Aktivierung von Effektor-Caspasen (3/6/7), die dem Initiator-Caspasen (2/8/9/10) nachgeschaltet sind und durch diese aktiviert werden (proteolytische Spaltung der Procaspasen 3/6/7). Die aktivierten Effektor-Caspasen können Substrate aktivieren und deaktivieren, Reparaturprozesse einstellen und den charakteristischen, morphologischen Apoptose-Prozess ermöglichen (McIlwain et al. 2013).

1.5 Zielstellungen

In den letzten Jahren wurden wesentliche Einschränkungen wie eine relativ niedrige Spezifität (*in vivo* Relevanz) und unzureichende mechanistische Informationen der *in vitro* Genotoxizitätsmethoden nachgewiesen. Daher sollten mit dieser Arbeit neue *in vitro* Tools zur Überprüfung auf Genotoxizität bereitgestellt werden, um eine bessere Risikobewertung von Wirkstoffkandidaten zu ermöglichen.

Im ersten Teil der Arbeit war das Ziel eine neue – zu diesem Zeitpunkt noch nicht-kommerziell verfügbare – durchflusszytometrische Genotoxizitätsmethode (MultiFlow[®]), zu etablieren und zu bewerten. Die Methode beinhaltet die gleichzeitige Analyse verschiedener Biomarker (γ H2AX, pH3 (S10), p53/cleaved PARP1). Auf der Basis des vorherrschenden MoA von 31 untersuchten Modellsubstanzen wurde *a priori* erwartet, dass nach Substanzbehandlung in den TK6-Zellen alle drei MoA-Gruppen (Aneugen/Klastogen/Nicht-Genotoxin) quantitative Veränderungen in den Biomarkern induzieren, die somit zur Klassifizierung beitragen können. Als Validierungsmethoden wurde der etablierte durchflusszytometrische Mikrokerntest, die Einzel-Detektion der MultiFlow[®] Biomarker mit High-Content-Imaging (HCI) sowie die kommerziell erhältlichen Methoden APO-BrdU TUNEL und Caspase 3/7 Assay herangezogen.

Ziel des zweiten Teils der Arbeit war es, weitere Biomarker auf Gen- und Proteinebene in humanen lymphoblastoiden TK6-Zellen zu identifizieren.

Um wirkmechanistische Charakteristika (Ähnlichkeiten und Unterschiede) von (geno)toxischen Substanzen zuverlässig aufzudecken, wurden bis zu 16 Modellsubstanzen herangezogen, die ein breites Spektrum an DNA-schädigenden Mechanismen aufweisen. Es wurden putative DNA-schadensassoziierte Marker mit Hilfe von traditionellen und modernen Methoden wie die qPCR (FANCD2, CLIP-170, TREX1, TP53I3, ATR, RAD17, PRKDC und NFE2L2), ELISA (p21), QGP Methode (67 verschiedene Gene) und dem HCI (BubR1 (S670), pH3 (S28), 53BP1 (S1778), Nrf2 (S40), p53 (K373), FANCD2 (S1404)) untersucht und statistisch bewertet. Um die Vielzahl an untersuchten Genen in der QGP Methode zu evaluieren und deren Klassifizierungspotential zu ermitteln, wurden logistische Regressionsanalysen durchgeführt, die weiterführend für die Etablierung eines Vorhersagemodells herangezogen wurden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinie

Für die gesamten Experimente wurde die humane Lymphoblastoid-Zelllinie TK6 (CRL-8015) verwendet, die von der Firma ATCC[®] erworben wurde. Aufgrund der vielen Vorzüge wie z.B. der Genomstabilität, der einfachen Handhabung (Suspensionszellen), der p53-Kompetenz, der effizienten DNA-Reparatur sowie der *in vivo* Relevanz, hat sich die Zelllinie in vielen Genotoxizitätstests als nützlich erwiesen und zählt heutzutage zu den meist verwendeten Zelllinien (Lorge et al. 2016; Yamamoto et al. 2017; Verma et al. 2017).

2.1.2 Substanzen und Lösungen

Name	Mode of Action*	Referenz	CAS- /Produktnummer	Hersteller
4-Nitroquinolin-1-oxid	Klastogen; Adduktbildung, (ROS)	Kirkland et al. 2015	56-57-5	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
5-Fluorouracil	Klastogen; Antimetabolit	Kirkland et al. 2015	51-21-8	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
AMG-900	Aneugen; Aurora A/B/C Kinaseinhibitor	Payton et al. 2010	945595-80-2	Selleckchem, Houston, USA
Brefeldin A	NG; ER/Golgi Inhibitor, ER Stress- induzierte Apoptose	Moon et al. 2012	20350-15-6	Apollo Scientific Ltd, Manchester, UK
Benzo[a]pyren	Klastogen; Adduktbildung, S9- Mix Aktivierung	Kirkland et al. 2015	50-32-8	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Name	Mode of Action*	Referenz	CAS- /Produktnummer	Hersteller
Caffein	NG; Mitochondriale Apoptose, ROS möglich	Lu et al. 2008	58-08-2	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Camptothecin	Klastogen; Topo-I-Inhibitor	Attia et al. 2009	7689-03-4	Combi-Blocks, Inc. San Diego, USA
Carbendazim	Aneugen; Spindelgift	Van Hummelen et al. 1995	10605-21-7	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Carbonylcyanid m-chlorophenylhydrazon (CCCP)	NG; Entkoppler oxidativer Phosphorylierung	de Graaf et al. 2004	555-60-2	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
CASY [®] ton	-	-	-	Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland
Cisplatin	Klastogen; Bifunktionelles Alkylanz, Cross-linker	Kirkland et al. 2015	15663-27-1	Merck Chemicals GmbH, Deutschland
Cyclophosphamid	Klastogen; Adduktbildung, S9-Mix Aktivierung	Kirkland et al. 2015	6055-19-2	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
D-Mannitol	NG; Polyol	Krishna et al. 1995	69-65-8	Fluorochem Ltd., Hadfield, UK
Dabrafenib	NG; BRAF-Kinaseinhibitor	FDA	1195765-45-7	abcr GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Name	Mode of Action*	Referenz	CAS- /Produktnummer	Hersteller
Dexamethason	NG; Glukokortikoid- Rezeptor-Agonist	Lotz et al. 2009	50-02-2	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Diethylstilbestrol	Aneugen; Synthetisches Estrogen, Polymerisation Inhibitor	Elhajouji et al. 1997	56-53-1	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	-	-	67-68-5	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Ethanol	-	-	64-17-5	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Ethylmethan- sulfonat	Klastogen; Monounktionelles Alkylanz	Gocke et al. 2009	62-50-0	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Etoposid	Klastogen; Topo-II- Inhibitor	Kirkland et al. 2015	33419-42-0	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Fötales Kälberserum (FCS)	-	-	10270-098	Gibco Life Technologies, Thermo Fischer Scientific, Rockford, USA
Floxin® (Ofloxacin)	NG; Fluorchinolon- Antibiotikum	FDA	82419-36-1	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Name	Mode of Action*	Referenz	CAS- /Produktnummer	Hersteller
Gefitinib	NG; EGRF- Kinasinhibitor	FDA	184475-35-2	Cayman, Neratovice, Tschechische Republik
Gleevec® (Imatinib)	NG; Tyrosinkinase- Inhibitor (Bcr/Abl)	Mariaule et al. 2014	152459-95-5	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Griseofulvin	Aneugen; Spindelgift, Polymerisation Inhibitor	Ermler et al. 2013	126-07-8	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Hydrogenperoxid	Klastogen; ROS	Kimura et al. 2013	7722-84-1	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Hydroxyurea	Klastogen; Antimetabolit	Dertinger et al. 2012	127-07-1	Combi-Blocks, Inc., San Diego, USA
Mebendazol	Aneugen; Spindelgift, Polymerisation Inhibitor	Van Hummelen et al. 1995	31431-39-7	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Methanol	-	-	67-56-1	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Methylmethan- sulfonat	Klastogen; Monounktionelles Alkylanz	Kirkland et al. 2015	66-27-3	Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Mevacor® (Lovastatin)	NG; HMG-CoA- Reduktase-Inhibitor	FDA	75330-75-5	Tocris bioscience, Bristol, UK
Mitomycin C	Klastogen; Bifunktionelles Alkylanz, Cross- linker	FDA	50-07-7	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Name	Mode of Action*	Referenz	CAS- /Produktnummer	Hersteller
NaCl	NG	Matsushima et al. 1999	7647-14-5	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Nocodazol	Aneugen; Spindelgift, Polymerisation Inhibitor	Attia et al. 2013	31430-18-9	Merck Chemicals GmbH, Deutschland
Noscapin	Aneugen; Spindelgift, Polymerisation Inhibitor	Schuler et al. 1999	128-62-1	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Nuclease-Free Water	-	-	4387936	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Paclitaxel	Aneugen; Spindelgift, Depolymerisation Inhibitor	Kirkland et al. 2015	33069-62-4	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Palbociclib	Klastogen; CDK2- Inhibitor	FDA	827022-33-3	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
RPMI-1640	-	-	ATCC®30-2001™	ATCC, Middelsex, UK
RNaseZAP™	-	-	R2020	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Penicillin- Streptomycin- Lösung	-	-	3810-74-0	Gibco Life Technologies, Thermo Fischer Scientific, Rockford, USA

Name	Mode of Action*	Referenz	CAS- /Produktnummer	Hersteller
Phosphate Buffered Saline (PBS)	-	-	D8537	Gibco Life Technologies, Thermo Fischer Scientific, Rockford, USA
Thapsigargin	NG; Stress- induzierte Apoptose	Futami et al. 2005	67526-95-8	Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	-	-	9002-93-1	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Tunicamycin	NG; Glycosylierungs- inhibitor, Stress- induzierte Apoptose	Han et al. 2008	11089-65-9	Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tween®20	-	-	9005-64-5	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Vinblastin	Aneugen; Spindelgift, Polymerisation Inhibitor	Ngan et al. 2001	147-67-9	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Ziegenserum	-	-	16210064	Gibco Life Technologies, Thermo Fischer Scientific, Rockford, USA

*: NG; Nicht-Genotoxisch

2.1.3 Antikörper

Name	Produktnummer	Hersteller
Alexa Fluor® 488 Esel anti-Kaninchen IgG (H+L)	A11034	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Anti-Histon 3 (S28) monoklonal Kaninchen IgG	Ab32388	Abcam, Cambridge, UK
Anti-Histon 3 (S10) polyklonal Kaninchen IgG	A301-844A	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Anti-53BP1 (S1778) polyklonal Kaninchen IgG	PA5-17462	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Anti-Histon H2AX (S139) polyklonal Kaninchen IgG	A300-081A	Bethyl Laboratories, Inc, Montgomery, USA
Anti-BubR1 (S670) monoklonal Kaninchen IgG	Ab200062	Abcam, Cambridge, UK
Anti-p53 (acetyl K373)- AlexaFluor® 647 monoklonal Kaninchen IgG	Ab206055	Abcam, Cambridge, UK
Anti-FANCD2 (S1404) monoklonal Kaninchen IgG	Ab109542	Abcam, Cambridge, UK
Anti-Nrf2 (S40) monoklonal Kaninchen IgG	Ab76026	Abcam, Cambridge, UK

2.1.4 Primer

Gen Bezeichnung	Gen	TaqMan ID	Sequenz
Eukaryotic 18S rRNA	18S	Hs03003631_g1	18s_consensus.0
Ataxia telangiectasia and Rad3 related	ATR	Hs00992123_m1	NM_001184.3
Cytoplasmic linker protein CLIP-170	CLIP-170	Hs00161477_m1	NM_198240.1
Fanconi anemia complementation group D2	FANCD2	Hs00276992_m1	NM_001018115.2
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	Hs02758991_g1	NM_001289746.1
Nuclear factor erythroid 2-related factor 2	NFE2L2	Hs00975960_m1	NM_006164.4
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	PPIA	Hs01565699_g1	NM_001300981.1

Gen Bezeichnung	Gen	TaqMan ID	Sequenz
DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	PRKDC	Hs00179161_m1	NM_001081640.1
RAD17 checkpoint clamp loader component	RAD17	Hs00607830_m1	NM_133339.2
Three prime repair exonuclease 1	TREX1	Hs00947922_g1	NM_007248.3
Transferrin receptor	TFRC	Hs00951093_g1	NM_003234.3
TP53I3 tumor protein p53 inducible protein 3	TP53I3	Hs00936519_m1	NM_147184.3

2.1.5 Kits

Name	Hersteller
TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2X), no AmpErase® UNG	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Image-iT® LIVE Red Caspase-3 and -7 Detection Kit, for microscopy	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
APO-BrdU™ TUNEL Assay Kit, with Alexa Fluor® 488 Anti-BrdU	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
TaqMan® Fast Cells-to-CT™ Kit	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
In vitro MicroFlow®	Litron Laboratories Ltd., Rochester, USA
In vitro MultiFlow®	Litron Laboratories Ltd., Rochester, USA
NucBlue® Fixed Cell ReadyProbes® Reagent	Molecular Probes, Darmstadt, Deutschland
Human p21 (CDKN1A) SimpleStep ELISA® Kit	Abcam, Cambridge, UK
Pierce BCA Protein Assay	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
QuantiGene Plex, Plex Set, human	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
QuantiGene Plex Sample Processing Kit for culture cell	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA

2.1.6 Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
CASY® cup	Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland
Combitips 1/5/10 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Einwegpipetten 5/10/25/50 ml	Costar Corning International, NY, USA
Eppendorfgefäße 1,5/5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Microplatte 96 Well, schwarz, F-Form	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Detuschland
Microplatte 96 Well, U-/F-Form	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Detuschland
MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Sterilfiltersystem	Croning Incorporated, NY, USA
Pipetten Reservoir für Mehrkanalpipetten 25/100 ml	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Pipettenspitzen 10/100/200/300/1000/1200/5000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen mit Filter 10/1000/5000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Tubes Deckel 8x 200 µl	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Tubes 200 µl	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Zellkulturflaschen 25 cm ³ CELLSTAR®	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturflaschen 75 cm ²	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland
Zentrifugationsgefäße CELLSTAR® 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 15 ml	Croning Incorporated, NY, USA

2.1.7 Geräte

Name	Hersteller
BD Accuri™ C6 Flow Cytometer	BD Bioscience, CA, USA
CASY® Model TT	Roche Innovatis AG, Reutlingen, Deutschland
Gefrierschrank (-80°C)	Thermo Scientific, Rockford, USA
Gefrierschrank (-20°C)	Philipp Kirsch GmbH, Offenburg
ImageXpress® Micro	Molecular Devices, LLC., Sunnyvale, CA, USA
Inkubator HERA cell 240i	Thermo Scientific, Rockford, USA
Inkubator BBD6220	Thermo Scientific, Rockford, USA
Kühlschrank	Liebherr Werk Biberach GmbH, Biberach an der Riß, Deutschland
Luminex® 200	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
MACSQuant® Analyzer 10	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
MasterCycler Gradient	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mehrkanalpipette Research plus 100/300 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikroskop Primo Vert	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Multipipette® Stream	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette Research 10/100/200/300/1000/1200µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
qRT- 7900 Fast Real Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Sterilwerkbank Safe 2020	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
SpectraMax M5®	Molecular Devices, LLC. ,Sunnyvale, CA, USA
UV-Lampe	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Vortex Lab dancer	Scientific Industries Inc., New York, USA
Wasserbad	VWR International GmbH, Darmstadt
Zentrifugen 5801R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

2.1.8 Software

Name	Hersteller
7900 Real Time Analysis System	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Genedata Expressionist®	Genedata, Inc., Lexington, MA, USA
GraphPad® Prism 7	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
JMP® 13	A Business Unit of SAS. SAS Campus Drive. Cary, NC, USA
MetaXpress®	Molecular Devices, LLC., Sunnyvale, CA, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung, Zellzahlbestimmung und Behandlung der TK6-Zellen zur Aktivierung der DNA-Schadensantwort

Die Kultivierung der TK6-Zellen erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ in RPMI-1640 Medium, supplementiert mit 10%-igen fötalem Kälberserum und einer 1%-igen Penicillin/Streptomycin-Lösung. Die Subkultivierung wurde kontinuierlich alle 2-3 Tage durchgeführt, um die maximal empfohlene Zelldichte von 1x10⁶ Zellen/ml nicht zu überschreiten. Für die Splittung wurden die Suspensionszellen 5 min bei 80x g zentrifugiert, das verbrauchte Nährmedium wurde mit neuem Medium ersetzt und die Zellen resuspendiert. Anschließend wurden 80 µl der Zellsuspension in einen CASY[®]cup mit 8 ml isotonischer Elektrolytlösung (CASY[®]ton) überführt. Die Bestimmung der Zellkonzentration erfolgte elektronisch mit dem Zellzähler CasyTT, basierend auf dem Detektionsprinzip der Kapillarpartikelzähler mit Pulsflächenanalyse. Lebende Zellen verdrängen durch ihre intakte Membran einen bestimmten Anteil an Elektrolytlösung und dieser erzeugte Widerstand wird in der Kapillare gemessen. Tote Zellen dagegen erbringen keinen elektrischen Widerstand mehr und werden durch ihre Zellkerngröße bestimmt (Roche Innovatis AG, 2002).

Die TK6-Zellen wurden am Tag der Behandlung für die anschließende Analyse durch die MultiFlow[®]-, MicroFlow[®]- und ELISA Methode auf 2x10⁵ Zellen/ml, für die Genexpressionsanalysen (QuantiGene Plex: 2x10⁵ Zellen/ml; qPCR: 6,2x10⁴ Zellen/mL) sowie zur Analyse mittels High-Content-Imaging (HCI) auf 4x10⁵ Zellen/ml (4h) und 2x10⁵ Zellen/ml (24h) eingestellt und mit einem Volumen von 100 µl in eine 96-Well Platte mit vertieftem Boden gegeben. Die Zugabe der Testsubstanzen erfolgte ebenfalls in einem Volumen von 100 µl. Die maximalen Testkonzentrationen der Substanzen basierten auf Empfehlungen der ICH S2 (R1) Richtlinie (1mM) und der OECD 487 Leitlinie (10mM). Die Testverbindungen wurden primär in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, dessen Anteil/Konzentration in der Endanwendung aufgrund seiner sonst zytotoxischer Eigenschaft nicht mehr als 1% (v/v) betrug. Im Falle von den Substanzen NaCl und H₂O₂ wurde Medium als Lösemittel verwendet.

Bei der Behandlung mit Promutagenen wurde dem Medium ein 2%-iger S9-Mix (Bayer AG) als Endkonzentration zugesetzt. Nach einer Behandlungsdauer von 4h wurden die Zellen gewaschen, um die Testsubstanz mit S9-Mix zu entfernen und durch ein äquivalentes Volumen an Medium zu ersetzen.

Mit Ausnahme des MNTs und der Genexpressionsanalysen erfolgte die Analyse der Proben nach 4h und 24h. Hierbei wurde nach der 4h Behandlung eine Erholungs- oder Teilungsphase von mindestens 1,5-2,0 Zellzyklen (20h) eingehalten.

2.2.2 Durchflusszytometrische Methoden zur Genotoxizitätstestung

Mit der Durchflusszytometrie können Zellen, Zellkerne oder synthetisch erzeugte Partikel wie Beads detektiert werden und entsprechend nach ihren Eigenschaften wie Granularität, Größe und Fluoreszenzfärbung in verschiedene Populationen selektiert werden. Das Detektionsprinzip basiert auf einer Laserstrahlungsmessung. Die Bestandteile einer Probe werden mit einer isotonischen Flüssigkeit umgeben, wodurch eine laminare Strömung erreicht wird. Die Strömung ermöglicht, dass die Bestandteile vereinzelt den Laserstrahl durchlaufen können. Als Ergebnis entsteht ein abgelenktes Streulicht, das durch die Parameter Seitwärtsstreulicht (SSC, *side scatter*) und Vorwärtsstreulicht (FSC, *forward scatter*) definiert wird. Das FSC informiert über die Größe der Probe, wohingegen das SSC Aussagen zur Granularität zulässt. Zusätzlich können verschiedene Zellkomponenten mit Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt werden. Die fluoreszierenden Moleküle werden dann in ihrem Fluorochrom-spezifischen Wellenlängenbereich durch den Laser angeregt und die emittierenden Lichtsignale gemessen (Brown und Wittwer 2000).

2.2.2.1 Etablierung der MultiFlow[®] Methode

Um ein genotoxisches Potential von Wirkstoffkandidaten aufzudecken und zwischen den drei MoA-Gruppen Klastogen, Aneugen und Nicht-Genotoxin differenzieren zu können, wurde die neue "MultiFlow[®]" Methode verwendet. Die Aufarbeitung der Proben basiert auf der Freisetzung von Kernen durch die Lyse der Membran (Zugabe von Ribonuklease; RNase) und gleichzeitiger Fluoreszenzmarkierung der folgend beschriebenen Endpunkte, um anschließend Merkmale der DNA-Schadensantwort am Durchflusszytometer zu erfassen:

- Propidiumiodid (PI)
 - DNA-Farbstoff zur Bestimmung der Zellzyklusphasen und polyploiden Zellen
- Anti- γ H2AX -Alexa Fluor® 647
 - Biomarker zur Bestimmung von DSBs
- Anti-pH3 S10-PE (Phycoerythrin)
 - Biomarker zur Ermittlung von mitotischen Zellen
- Anti-p53 (N-Terminale Domäne)-FITC (Fluoresceinisothiocyanat)
 - Biomarker zur Identifizierung von Genotoxizität
- Cleaved PARP1-Alexa Fluor® 647
 - Biomarker zur Bestimmung von Apoptose.

Zusätzlich enthält die Methode sogenannte Counting-Beads (bereitgestellt in der RNase-Lösung), die zur Bestimmung der Zelldichte dienen, um ferner die Zytotoxizität sensitiv berechnen zu können (Bryce et al. 2016). Die Beads werden bei der Aufarbeitung jedem Well zugesetzt um die relative Anzahl an Zellkernen (*relative nuclei count*, RNC) in der Probe zu bestimmen, die letztlich Aussagen zur Zytotoxizität zulassen. Dabei wird das Verhältnis "nuclei-to-bead" bestimmt, das somit Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Zellen anzeigt. Das folgende Beispiel soll die Beziehung nuclei-to-bead zur Zytotoxizität aufzeigen:

Kontrolle: Zellzahl 10.000/ Beads 1000 = 10

Behandlung: Zellzahl 10.000/ Beads 2000 = 20

Zytotoxizität (RNC): $10/20 = 0,5 * 100$ entspricht 50% Zytotoxizität

2.2.2.1.1.1 Versuchsdesign und Durchführung

Die Methodenetablierung und -validierung ist als Ringstudie konzipiert worden, um Informationen zur Reproduzierbarkeit und Übertragbarkeit der Methode zu erhalten. Die Ausführung der Experimente setzte sich aus einem 3-stufigen Studiendesign zusammen:

Phase 1: Einführung der Methode

- Analyse von jeweils ein Klastogen/Aneugen/Nicht-Genotoxin
- Sieben Konzentrationen in Triplikaten

Phase 2: Übertragbarkeit und Validierung

- Analyse von jeweils drei Klastogenen/Aneugen/Nicht-Genotoxinen
- 15 Konzentrationen in Triplikaten+ Positivkontrollen
- Validierung der Multiplexed Biomarker vs. Singleplex Biomarker

Phase 3: Erweiterung der Modellsubstanzen

- Analyse von 22 Modellsubstanzen
- 20 Konzentrationen in Einzelmessungen+ Positivkontrollen
- Cleaved PARP1 ersetzt durch p53

Abbildung 6: Studienübersicht der MultiFlow® Methode.

Die Studien wurden mit Modellsubstanzen durchgeführt, deren MoA gut charakterisiert ist. Die Wirkmechanismen umfassen verschiedene genotoxische (Klastogene/Aneugene) und nicht-genotoxische Substanzen (inklusive Zytotoxine), die in der folgenden Tabelle 1 aufgeführt sind. Auf der Grundlage des vorherrschenden Wirkungsmechanismus der Substanzen wird *a priori* erwartet, dass alle drei MoA-Gruppen einen konzentrationsabhängigen Effekt hinsichtlich der Zytotoxizität (Abnahme der Zellzahl) sowie einen zunehmenden cleaved PARP1-Wert aufzeigen werden, wohingegen Klastogene einen γ H2AX-Anstieg mit gleichzeitiger pH3-Abnahme induzieren und Aneugene dagegen eine Zunahme von pH3 und polyploiden Zellen bewirken.

Tabelle 1: Referenzsubstanzen für die Etablierung und Validierung der MultiFlow® Methode.

Substanz	Mode of Action*	Referenz	Hinweise Studienphasen und max. Konzentration**
Brefeldin A (BFA)	NG; ER/Golgi Inhibitor, ER Stress-induzierte Apoptose	Moon et al. 2012	Stage 2; 1 mM
Caffein	NG; Mitochondriale Apoptose, ROS möglich	Lu et al. 2008	Stage 3; 1 mM
CCCP*	NG; Entkoppler oxidativer Phosphorylierung	de Graaf et al. 2004	Stage 1; 50 μ M
D-Mannitol	NG; Polyol	Krishna et al. 1995	Stage 3; 1 mM

Substanz	Mode of Action*	Referenz	Hinweise Studienphasen und max. Konzentration**
Dexamethason (DEX)	NG; Glukokortikoid-Rezeptor-Agonist	Lotz et al. 2009	Stage 3; 1 mM
Floxin® (Ofloxacin)	NG; Fluorchinolon-Antibiotikum	FDA	Stage 3; 1 mM
Gleevec® (Imatinib)	NG; Tyrosinkinase-Inhibitor (Bcr/Abl)	Mariaule et al. 2014	Stage 3; 1 mM
Mevacor® (Lovastatin)	NG; HMG-CoA- Reduktase-Inhibitor	FDA	Stage 3; 1 mM
NaCl	NG	Matsushima et al. 1999	Stage 3; 1 mM
Thapsigargin (TG)	NG; Stress-induzierte Apoptose	Futami et al. 2005	Stage 2; 1 mM
Tunicamycin (TC)	NG; Glycosylierungsinhibitor, Stress-induzierte Apoptose	Han et al. 2008	Stage 2; 1 mM
4-Nitroquinolin-1-oxid (4-NQO)	Klastogen; Adduktbildung, (ROS)	Kirkland et al. 2015	Stage 3; 0.01 mM
5-Fluorouracil (5-FU)	Klastogen; Antimetabolit	Kirkland et al. 2015	Stage 3; 1 mM
Benzo[a]pyren (BP)	Klastogen; Adduktbildung, S9-Mix Aktivierung	Kirkland et al. 2015	Stage 3; 0.1 mM
Camptothecin (CTH)	Klastogen; Topo-I-Inhibitor	Attia et al. 2009	Stage 2; 1 mM
Cisplatin (CS)	Klastogen; Bifunktionelles Alkylanz, Cross-linker	Kirkland et al. 2015	Stage 3; 0.01 mM
Cyclophosphamid (CP)	Klastogen; Adduktbildung, S9-Mix Aktivierung	Kirkland et al. 2015	Stage 3; 0.1 mM
Ethylmethansulfonat (EMS)	Klastogen; Monounktionelles Alkylanz	Gocke et al. 2009	Stage 3; 1 mM
Etoposid (ETO)	Klastogen; Topo-II-Inhibitor	Kirkland et al. 2015	Stage 1; 1 µM

Substanz	Mode of Action*	Referenz	Hinweise Studienphasen und max. Konzentration**
Hydroxyurea (HU)	Klastogen; Antimetabolit	Dertinger et al. 2012	Stage 2; 1 mM
Hydrogenperoxid (H ₂ O ₂)	Klastogen; ROS	Kimura et al. 2013	Stage 3; 1 mM
Methylmethan-sulfonat (MMS)	Klastogen; Monounktionelles Alkylanz	Kirkland et al. 2015	Stage 2; 1 mM
AMG-900	Aneugen; Aurora A/B/C Kinaseinhibitor	Payton et al. 2010	Stage 3; 0.1 µM
Carbendazim (CBD)	Aneugen; Spindelgift	Van Hummelen et al. 1995	Stage 2; 1 mM
Diethylstilbestrol (DES)	Aneugen; Synthestisches Estrogen, Polymerisation Inhibitor	Elhajouji et al. 1997	Stage 3; 1 mM
Griseofulvin (GF)	Aneugen; Spindelgift, Polymerisation Inhibitor	Ermler et al. 2013	Stage 2; 1 mM
Mebendazol (MEB)	Aneugen; Spindelgift, Polymerisation Inhibitor	Van Hummelen et al. 1995	Stage 3; 0.01 mM
Nocodazol (NOC)	Aneugen; Spindelgift, Polymerisation Inhibitor	Attia et al. 2013	Stage 3; 0.01 mM
Noscapin (NOS)	Aneugen; Spindelgift, Polymerisation Inhibitor	Schuler et al. 1999	Stage 3; 1 mM
Paclitaxel (PT)	Aneugen; Spindelgift, Depolymerisation Inhibitor	Kirkland et al. 2015	Stage 2; 1 mM
Vinblastin (VB)	Aneugen; Spindelgift, Polymerisation Inhibitor	Ngan et al. 2001	Stage 1; 5 ng/mL

*: NG; Nicht-Genotoxisch; CCCP, Carbonylcyanid-m chlorophenylhydrazon

**.: Untersuchte Biomarker: Stage 1 und 2 (pH3, γH2AX, cleaved PARP1), Stage 3 (pH3, γH2AX, p53); Die Konzentrationen der Modellsubstanzen basieren auf Empfehlungen der ICH- (1 mM) und der OECD-Guideline (10 mM). Im Anhang 1 ist eine detaillierte Übersicht der Testkonzentrationen.

Jeweils nach 4h und 24h wurden die behandelten TK6-Zellen mit einer manuellen Multikanalpipette resuspendiert und 25 μ l in eine neue 96-Well Platte überführt, die 50 μ l frisch angesetzte Arbeitslösung (RNase+Antikörper) enthielt. Vor der durchflusszytometrischen Messung mit dem MACSQuant[®] Analyzer 10 oder dem BD AccuriTM C6 wurden die Komponenten sorgfältig, durch mindestens 10-maliges Resuspendieren vermischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden einheitlich mit einem Volumen von 20 μ l gemessen.

Die finale Gating-Strategie der durchflusszytometrischen Analyse von pH3 (S10), γ H2AX und p53 stellte die spezifisch selektierte Zellpopulation mit den entsprechenden veränderten „Counts“ oder „Shifts“ bereit (s. Abbildung 7). Die Bestimmung der pH3-positiven Zellen werden über entsprechende Counts ermittelt, die sich durch eine separat aufgelöste Population der G2-Phase ($\geq 4n$) ergeben. Die Analyse von p53 und γ H2AX erfolgt über die Erfassung der medianen Kanalfluoreszenz (Shift).

Die quantitativen Bestimmungen der schadensassoziierten Endpunkte wurden einheitlich im Konsens der Ringstudie mit dem Faktor „*fold change*“, in Relation zur negativen Kontrolle (DMSO) ausgedrückt. Die notwendigen Formeln können im Anhang eingesehen werden. Wie in der oben aufgeführten Studienübersicht zu entnehmen ist (s. Abbildung 6), wurden insgesamt 31 Modellsubstanzen mit verschiedenen Konzentrationsbereichen analysiert. Eine relevante Modifizierung der Methode wurde in der Phase 3 durchgeführt, in der cleaved PARP1 durch das nukleäre p53 ersetzt wurde.

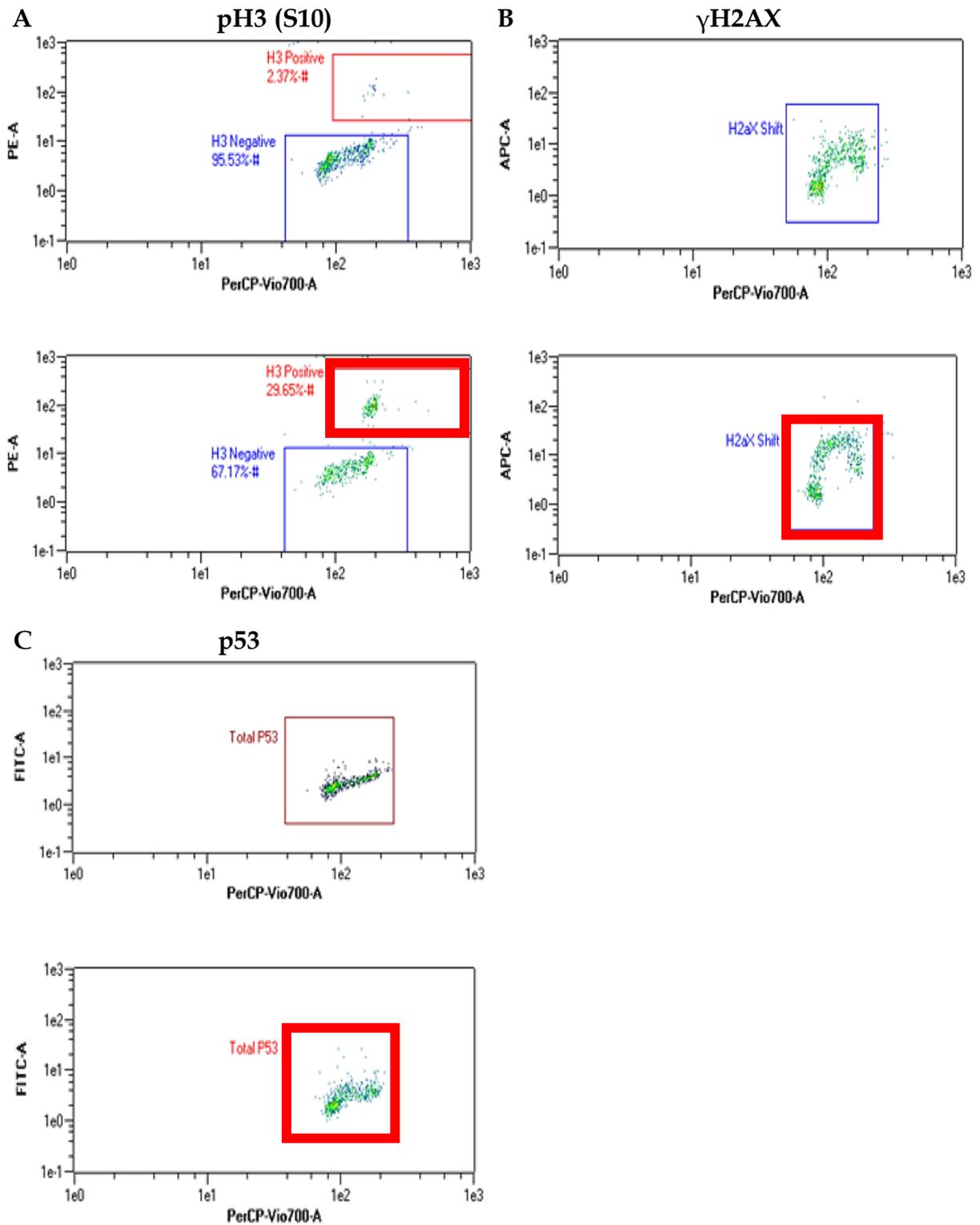


Abbildung 7: Gating-Strategie der MultiFlow® Methode.

Gezeigt ist die durchflusszytometrische Analyse behandelter TK6-Zellen in der MultiFlow® Methode am MACSQuant® Analyzer 10. Die Dot-Plot Analyse erfolgte unter verschiedenen Bedingungen und zeigt die Ergebnisse der verschiedenen Biomarker: (A) γ H2AX-Shift: Kontrolle 1% DMSO (oben), Etoposid (unten) = Anstieg γ H2AX-Shift. (B) pH3 (S10): Kontrolle 1% DMSO (oben), Vinblastin (unten) = Anstieg pH3 (S10). (C) p53-Shift: Kontrolle 1% DMSO (oben), Etoposid (unten) = Anstieg p53-Shift.

2.2.2.1.1.2 Statistische Auswertung

Der statistische Ansatz zur Bewertung der einzelnen Endpunkte (γ H2AX, pH3 (S10), p53, cleaved PARP1 und Polyploidie), inklusive der Expositionszeitpunkte (4h und 24h), erfolgte über die Receiver Operating Characteristic (ROC-Analyse). Auf Basis der ROC-Kurven wurden Grenzwerte der Substanz-induzierenden Effekte auf die entsprechenden Biomarker ermittelt, um zukünftig die mechanistischen Signaturen – Klastogen (γ H2AX), Aneugen (pH3 (S10)) und Genotoxisch (p53) – von unbekanntem Wirkstoffkandidaten zu identifizieren.

Allgemein basiert die Qualität eines Testsystems unter anderem auf den Kenngrößen Sensitivität (Anzahl der richtig-positiven) und Spezifität (Anzahl der richtig-negativen).

Hierbei wird insbesondere im präklinischen Bereich eine hohe Spezifität angestrebt. ROC-Kurven beschreiben die Güte eines diagnostischen Tests (Testsystems) und sind hierbei auf die Klassifikationsgüte des Biomarkers zu übertragen. Die Kurve stellt die Rate der Sensitivität gegen die Rate der Spezifität dar und ermöglicht dadurch die Bestimmung von Grenzwerten. Als Qualitätsmaß wurde die *Area Under The Curve* (AUC) gemäß folgender Einteilung bewertet:

0,90-1,00 = sehr gut; 0,80-0,90 = gut; 0,70-0,80 = moderat; 0,60-0,70 = schwach;

0,50-0,60 = schlecht (Safari et al. 2016).

Ein kritischer Parameter, der die Bewertung der Biomarker beeinflussen kann, ist die Zytotoxizität (RNC), die zu verfälschten prädiktiven Kenngrößen führen kann.

Die Methodenentwickler haben auf Basis von 67 Substanzen einen RNC von 20% festgelegt, der sicherstellt, dass die Biomarker bei einer Zytotoxizität von bis zu 80% weiterhin eine gute Sensitivität aufweisen, ohne dabei die Spezifität zu verschlechtern (Bryce et al. 2016). Demnach wurden die Daten, die zu einer >80% Zytotoxizität (RNC) führten, von der ROC-Analyse ausgeschlossen.

2.2.2.2 MNT MicroFlow® Methode

Um die Leistungsfähigkeit der neuen Methode (MultiFlow®) umfassend zu bewerten, wurden parallel die gleichen Modellsubstanzen und Testkonzentrationen aus

Tabelle 1 mit dem gut etablierten und anerkannten durchflusszytometrischen MNT (MicroFlow) analysiert.

Hierbei wurden die TK6-Zellen zunächst wie bei der MultiFlow® Methode für 4h und 24h in 96-Well Platten behandelt. Diese Methode unterscheidet sich jedoch hinsichtlich des Analysezeitpunktes der 4h-Proben, die erst nach einer Verdopplungszeit erfolgte. Hierdurch wurde das Bewertungskriterium der OECD 487 erfüllt, die beschreibt, dass Zellen mit einer kurzen Behandlungsdauer eine Erholungszeit von mindestens 1,5-2,0 Zellzyklen benötigen, damit die Ausbildung von MN zeitlich erfolgen kann. Daher wurden die Zellen nach 4h mit Medium gewaschen, zweimal zentrifugiert (80x g, 5 min), in frischem Wachstumsmedium resuspendiert und für weitere 20h in den Inkubator gestellt. Nach insgesamt 24h wurden die Proben gemäß der Anleitung der MicroFlow® Methode aufgearbeitet.

Die Methode basiert neben der RNase (Abbau der RNA) und den Counting-Beads (Bestimmung der Zytotoxizität, RNC) auf einer Doppelfärbung der DNA:

- Nuclei Acid Dye A (Ethidiummonoazid, EMA) und Nuclei Acid Dye B (SYTOX® Green)
 - DNA-Farbstoffe zur Bestimmung von apoptotischen/nekrotischen Zellen (EMA, photoaktiviert durch Fluoreszenzlicht) und Quantifizierung von vitalen Zellen sowie MN (SYTOX® Green)
- Lysis Lösungen 1 und 2
 - Lösungen, um EMA auszuwaschen.

Die aufgearbeiteten Proben wurden in zwei unabhängigen Experimenten mit dem Durchflusszytometer BD Accuri™ analysiert. Die Analyse wurde auf 3000 Kerne mit einem max. Probenvolumen von 150 µl gehalten, damit jede Probe die gleiche Anzahl an Zellkernen enthält. Zur Bestimmung der MN-Rate, hypodiploiden (HD) und apoptotischen Zellen wurde der folgende Gating-Ansatz aus Abbildung 8 angewendet.

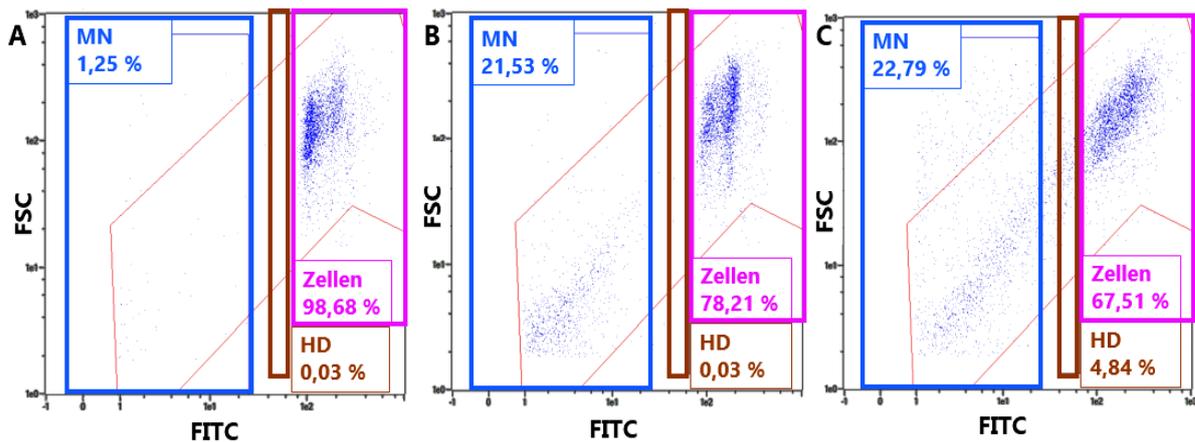


Abbildung 8: Gating-Strategie der MicroFlow® Methode.

Gezeigt ist die durchflusszytometrische Analyse behandelter TK6-Zellen in der MicroFlow® Methode am MACSQuant® Analyser 10. Die Dot-Plot Analyse der Vorwärtsstreuung (FSC) gegenüber der FITC-Fluoreszenz unter verschiedenen Bedingungen: (A) Kontrolle (1% DMSO). (B) Mitomycin C (Klastogen) = Anstieg MN-Rate. (C) Vinblastin (Aneugen) = Anstieg MN-Rate und HD-Kerne. MN = Mikrokerne, HD = Hypodiploide Zellen.

2.2.2.3 APO-BrdUTP TUNEL Methode

Während der Apoptose wird die DNA durch Endonukleasen fragmentiert, wodurch freie 3'-Hydroxyl-Enden entstehen.

Durch den Einbau von fluoreszenzmarkiertem BrdUTP (Bromdeoxyuridinmonophosphat), welches exogen durch TdT (Desoxynukleotidyltransferase) vermittelt wird, kann die Apoptose fluorochrometrisch nachgewiesen werden. Zentrale Schritte vor der Strangbruch-Markierung sind die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen. Insbesondere der Fixierungsschritt verhindert die Vernetzung der fragmentierten DNA mit anderen Zellbestandteilen.

Die Methode basiert auf folgenden Komponenten:

- PI/RNase Puffer
 - DNA-Farbstoff zur Bestimmung der Zellkerne und Zellzyklusphasen
- Anti-BrdUTP-Alexa Fluor 488
 - Markierung apoptotischer Zellen
- TdT
 - Enzym katalysiert den Einbau von BrdUTP

- Reaktions-/Wasch-/Spülpuffer
 - Lösungen, um Überschüsse auszuwaschen.

Zur Bestimmung der Apoptose-Rate (%) wurden die Proben in zwei unabhängigen Versuchen einheitlich mit einem Probenvolumen von 100 µl mit dem MACSQuant® Analyzer 10 analysiert (s. Abbildung 9). Die Daten wurden hinterher durch die Ermittlung des fold change, zusammengefasst als arithmetisches Mittel, aufgezeigt.

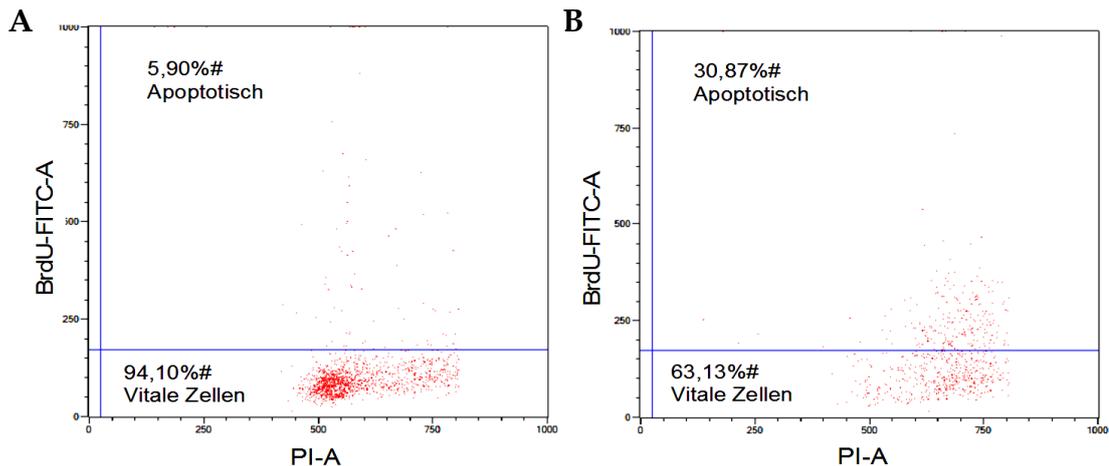


Abbildung 9: Gating-Strategie der APO-BrdUTP TUNEL Methode.

Gezeigt ist die durchflusszytometrische Messung behandelter TK6-Zellen in der APO-BrdUTP TUNEL Methode am MACSQuant® Analyzer 10. Dargestellt ist die Dot-Plot Analyse der Vorwärtsstreuung (FSC) gegenüber der PI-Fluoreszenz unter verschiedenen Bedingungen: (A) Kontrolle (1% DMSO). (B) CCCP (Zytotoxin) = Anstieg apoptotische Zellen.

2.2.3 Immunfluoreszenzfärbung

2.2.3.1 High-Content-Imaging mechanistischer Proteine

Das High-Content-Imaging (HCI) stellt neben dem Western Blot eine sehr gute Alternative dar, um Proteine nachzuweisen, unterscheidet sich jedoch vom Western Blot hinsichtlich der Möglichkeit, mit einem hohen Durchsatzvermögen, Dosis-Wirkungsbeziehungen aufzustellen. Die (fluoreszenzmarkierten) Proben werden mittels automatisierter Mikroskopie aufgenommen und können nachträglich multiparametrisch verarbeitet werden, um quantitative Daten aus den Zellpopulationen zu erhalten. Darüber hinaus kann im Gegensatz zur Durchflusszytometrie oder Immunoblotting-Methode die Zellmorphologie beobachtet werden, die zusätzliche

Informationen hinsichtlich der Substanzeffekte oder Zelldifferenzierung aufzeigen kann.

Die HCI-Technologie ist eine weit verbreitete Methode, um Wirkstoffziele oder Leitstrukturverbindungen zu detektieren und eignet sich hervorragend, um *in vitro* Toxizität zu identifizieren, bewerten und ferner vorherzusagen. Die Bildanalyse oder die quantitative Analyse der Zellobjekte erfolgt über eine bereitgestellte Software der Gerätehersteller.

Hierbei gibt es je nach Gerätehersteller entweder vorinstallierte Auswertetools die benutzerspezifisch angepasst werden können und/oder Möglichkeiten einen spezifischen Bildanalysealgorithmus zu generieren, um bestimmte Merkmale oder Parameter zu bestimmen.

2.2.3.1.1 MultiFlow® Biomarker

Um die neu entwickelte, multiparametrische MultiFlow® Methode hinsichtlich der Funktionalität zu bewerten, wurden die Multiflow Biomarker γ H2AX und pH3 (S10) sowie cleaved PARP1 mit dem Biomarkeranalogon Caspase 3/7 im *LIVE Red Caspase-3 and -7 Detection Kit* einzeln über die HCI-Technologie analysiert und untersucht, ob die Ergebnisse der Multiplex-Biomarker (*fold change*) mit den Singleplex-Messungen korrelieren.

Jeweils nach 4h und 24h Substanzbehandlung (s. Tabelle 2) wurden die 96-Well Platten (U-Vertiefungen) zentrifugiert (80 g, 5 min), einmal mit 100 μ l Wachstumsmedium gewaschen, resuspendiert und in eine neue 96-Well Platte ohne Vertiefung überführt und wiederholt zentrifugiert.

Anschließend wurden die Zellen 10 min bei -20°C mit eiskaltem Methanol fixiert, zentrifugiert (80 g, 5 min) und 5 min mit 0,1% Triton-X in PBS permeabilisiert. Die Zellen wurden mit den primären Antikörpern für 1h bei 37°C inkubiert (anti-pH3 (S10), anti- γ H2AX), gefolgt von einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C mit einem sekundären Antikörper, der mit Alexa Fluor® 488 markiert ist. Auf den zweimaligen Waschschrift mit PBS folgend, wurden die Kerne mit DAPI (NucBlue® Fixed Cell ReadyProbes®-Reagenz) gefärbt und anschließend mittels HCI analysiert. Zur Bestimmung der Apoptose mittels Caspase 3/7 wurden die Zellen zunächst vor der

10-minütigen Fixierung mit eiskaltem Methanol für 1h mit einem 0,5x Caspase 3/7 Lösungsansatz bei 37°C inkubiert.

Vor der Analyse wurden die Kerne mit der DAPI-Reagenz gefärbt. Die Untersuchungen erfolgten mit jeweils drei technischen und zwei biologischen Replikaten, die als arithmetisches Mittel zusammengefasst wurden.

Tabelle 2: Übersicht der Referenzsubstanzen für die Etablierung und Validierung der MultiFlow® Methode

Substanz	Mode of Action	Konzentration
CCCP*	Nicht-Genotoxisch	0,78125/ 1,5625/ 3,125/ 6,25/ 12,5/ 25/ 50 µM
Etoposid	Klastogen	0,015625/ 0,03125/ 0,0625/ 0,125/ 0,25/ 0,5/ 1 µM
Vinblastin	Aneugen	0,000078125/ 0,00015625/ 0,0003125/ 0,000625/ 0,00125/ 0,0025/ 0,005 µg/mL

*: CCCP, Carbonylcyanid-3-chlorphenylhydrazon

Die quantitative Bestimmung der positiven Zellen, die DNA-Doppelstrangbrüche (γ H2AX) aufzeigten, mitotisch (pH3 (S10)) oder apoptotisch (Caspase 3/7) waren, erfolgte über das bereitgestellte und angepasste Software-Tool "*multi-wavelength cell scoring*", welches die gesamte Kernfluoreszenz der Antikörper in Relation zur Gesamtzellzahl (%) setzt. Die folgende Tabelle 3 beschreibt die Zelltyp-spezifisch eingestellten Parameter und Filter, gefolgt von der automatischen Bildanalyse (s. Abbildung 10). Die automatisch gezählten Endpunkte wurden in Microsoft Excel exportiert, um den *fold change* im Verhältnis zur Negativkontrolle zu berechnen. Hinterher wurden die ermittelten Effekthöhen mit den Multiplex-Ergebnissen der MultiFlow® Methode mittels linearer Regressionsanalyse in GraphPad® Prism bewertet.

Tabelle 3: Übersicht der eingestellten Messparameter für die automatische Bildanalyse von mechanistischen Biomarker

Endpunkt	Filter (Ex/Em)	Parameter		
		Minimale Größe [μM]	Maximale Größe [μM]	Intensität über lokalen Hintergrund
Zellkerne	DAPI:			
	377 \pm 50 nm/ 447 \pm 60 nm	5	20	50-2.000
DNA-DSBs (γH2AX)	AlexaFluor [®] 488:			
	475 \pm 34 nm/ 536 \pm 40 nm	5	20	300-8.000
Mitotisch (pH3 (S10))	AlexaFluor [®] 488:			
	475 \pm 34 nm/ 536 \pm 40 nm	5	20	1000-10.000
Apoptotisch (Caspase 3/7)	Cy3:			
	531 \pm 40 nm/ 593 \pm 40 nm	5	22	500-30.000



Abbildung 10: Automatische Bildanalyse am Beispiel von pH3 (S10)-fluoreszenzgefärbten TK6-Zellen.

Die TK6-Zellen wurden über das ImageXpress[®] Micro XLS System mit einem 20x Objektiv aufgenommen und über das integrierte Software-Tool „multi wavelength cell scoring“ analysiert (Parameter aus Tabelle 3). Dadurch werden die Endpunkte im Originalbild „Anzahl Zellkerne“ und „Anzahl positiver Zellkerne“, durch die gesamte Kernfluoreszenz identifiziert und automatisch gezählt. Blau: Zellkern, Grün: phosphoryliertes pH3 (S10), Grau: automatisch gezählte Zellen, Pink: automatisch gezählte pH3 (S10)-positive Zellen.

2.2.3.1.2 Untersuchung von PTMs zur Identifizierung von Genotoxinen

Die in Tabelle 4 aufgeführten putativen Protein-Biomarker wurden separat voneinander über das HCl untersucht und hinsichtlich ihres Potentials, die verschiedenen MoA-Gruppen (Aneugene/Klastogene/Nicht-Genotoxine) zu identifizieren, bewertet.

Tabelle 4: Übersicht der untersuchten PTMs und der eingesetzten Konzentration zur Identifizierung von Genotoxizität.

Antikörper	Finale Konzentration
pH3 (S28)	1,21 µg/ml
53BP1 (S1778)	0,32 µg/ml
BubR1 (S670)	1,152 µg/ml
Nrf2 (S40)	4,06 µg/ml
p53 (K373)	5 µg/ml
FANCD2 (S1404)	9,035 µg/ml

Die Zellen wurden jeweils nach 4h und 24h Substanzbehandlung (s. Tabelle 5) zentrifugiert (80x g, 5 min), mit Medium gewaschen, resuspendiert und in eine neue 96-Well Platte ohne Vertiefung überführt. Daraufhin wurden die Zellen erneut zentrifugiert bevor diese 10 min bei -20°C mit eiskaltem Methanol fixiert wurden. Hinterher wurden die Zellen nochmals zentrifugiert (80x g, 5 min) und mit 100 µl PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe mit 10%-igen Ziegenerum in 1x TBST 25 min bei 37°C blockiert.

Tabelle 5: Übersicht der Referenzsubstanzen für die Untersuchung von PTMs zur Identifizierung von Genotoxizität.

Substanz	Mode of Action	Konzentration
CCCP*	Nicht-Genotoxisch	0,78125/ 1,5625/ 3,125/ 6,25/ 12,5/ 25/ 50 µM
Gleevec® (Imatinib)	Nicht-Genotoxisch	1,4/ 2,8/ 5,5/ 11/ 22,1/ 44,1/ 88,3 µM
5-Fluorouracil	Klastogen	2,8/ 5,5/ 11/ 22,1/ 44,1/ 88,3/ 176 µM
Etoposid	Klastogen	0,015625/ 0,03125/ 0,0625/ 0,125/ 0,25/ 0,5/ 1 µM
Hydrogenperoxid	Klastogen	2,8/ 5,5/ 11/ 22,1/ 44,1/ 88,3/ 176 µM
Hydroxyurea	Klastogen	0,1/ 0,5/ 1/ 5/ 10/ 20/ 50 µM
AMG-900	Aneugen	0,0002/ 0,0011/ 0,00442/ 0,00625/ 0,0125/ 0,025/ 0,05/ 0,1 µM
Carbendazim	Aneugen	0,05/ 0,5/ 1/ 5/ 10/ 100/ 500/ 1000 µM
Diethylstilbestrol	Aneugen	0,05/ 0,5/ 1/ 5/ 10/ 100/ 500/ 1000 µM
Griseofulvin	Aneugen	0,05/ 0,5/ 1/ 5/ 10/ 100/ 500/ 1000 µM
Mebendazol	Aneugen	0,02/ 0,06/ 0,11/ 0,16/ 0,63/ 1,25/ 5/ 10 µM
Nocodazol	Aneugen	0,02/ 0,06/ 0,11/ 0,16/ 0,63/ 1,25/ 5/ 10 µM
Paclitaxel	Aneugen	0,05/ 0,5/ 1/ 5/ 10/ 100/ 500/ 1000 µM
Vinblastin	Aneugen	0,000078125/ 0,00015625/ 0,0003125/ 0,000625/ 0,00125/ 0,0025/ 0,005 µg/ml

*: CCCP, Carbonylcyamid-3-chlorphenylhydrazon

** : Höchste Konzentration entspricht dem OECD Guideline empfohlenen Zytotoxizitätslimit von 55±5% (RNC)

Im Anschluss wurden die verdünnten Primärantikörper, wie in Tabelle 4 angegeben, mit einem Volumen von 15 µl für 1h bei 37°C auf die Zellen gegeben. Nach der Inkubationszeit wurden die Proben zweimalig mit 100 µl 1x TBST gewaschen. Im Anschluss folgte eine 30-minütige Inkubation bei 37°C mit dem Sekundärantikörper Alexa Fluor 488® Ziege anti-Kaninchen IgG (1 µg/ml). Für die Studien mit p53 (K373) war keine Inkubation mit einem Sekundärantikörper notwendig, da dieser bereits direkt mit Alexa Fluor® 647 konjugiert war.

Auf den zweimaligen Waschschrift mit 1x TBST folgend, wurden die Zellkerne mit 100 µl DAPI (NucBlue® Fixed Cell ReadyProbes®-Reagenz) gefärbt und anschließend mittels HCl analysiert.

Die Untersuchungen der putativen Marker wurden wiederholt mit jeweils drei technischen Replikaten durchgeführt. Die technischen Replikate wurden als arithmetisches Mittel berechnet und die zwei unabhängigen Experimente jeweils durch die Ermittlung *fold change* einzeln dargestellt. Die Klassifikationsgüte der Biomarker wurde mittels ROC-Analyse bewertet.

Die fluoreszenzgefärbten Zellen wurden mit einem 20x Objektiv über das HCI aufgenommen. Die automatische Bildanalyse erfolgte entweder über das Software-Tool „*multi-wavelength cell scoring*“ wie im vorigen Abschnitt beschrieben oder über einem individuell angepassten Segmentierungsprozess. Unter Verwendung des interaktiven „*custom module editor*“ wurde innerhalb der Software MetaXpress ein Segmentierungsprozess erzeugt, um die Genauigkeit der automatischen Endpunktidentifizierung zu erhöhen und auf diese Weise möglichen Farbartefakten entgegenzuwirken. Abbildung 11 zeigt eine schematische Darstellung des automatisierten etablierten Ansatzes des putativen Biomarkers 53BP1 (S1778).

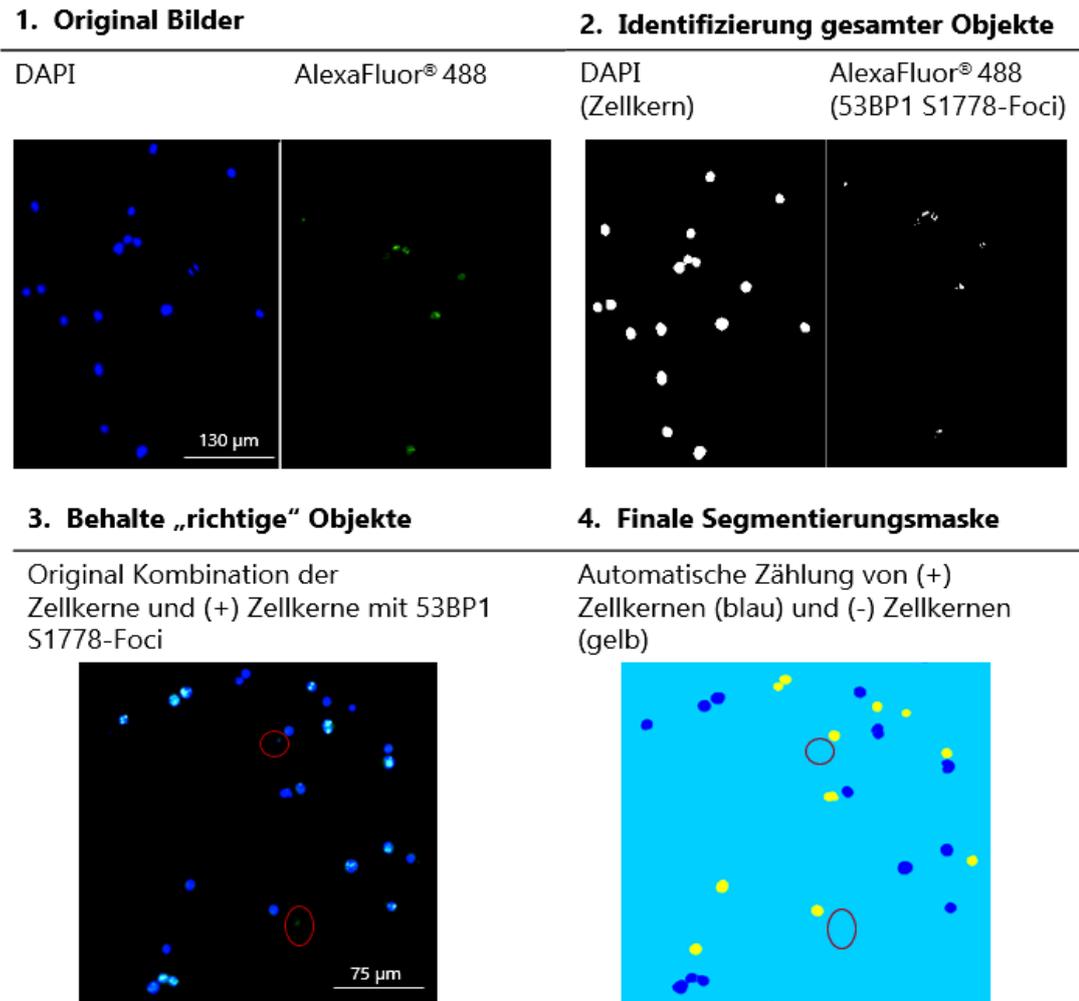


Abbildung 11: Benutzerdefinierter Analyse zur automatischen Quantifizierung putativer Biomarker.

Die TK6-Zellen wurden über das ImageXpress® Micro XLS System mit einem 20x Objektiv aufgenommen und über die interaktive Software Applikation „*custom module editor*“ analysiert.

(1) Das Originalbild zeigt die DNA (blau: DAPI) und das DNA-schadensassoziierte posttranslationale Protein 53BP1 (S1778) (grün: AlexaFluor® 488). (2) Basierend auf dem ursprünglichen DAPI-Bild wurden die Zellkerne über spezifische Parameter definiert (s. Tabelle 3). Über das Anwendungsmodul „*find blobs*“ können die induzierten 53BP1 (S1778)-Foci über die Bildquelle Alexa Fluor® 488 definiert werden. (3) Das ausgewählte Modul dient zur Präzision der 53BP1 (S1778)-Foci im grünen Kanal, die nur im Zellkern vorliegend gezählt werden sollen wie die roten ovalen Markierungen im Bild 3 und 4 verdeutlicht. (4) Die Segmentierungsmaske zeigt die definierten Objekte auf (gelb: Zelle ohne Schaden; blau: Zelle mit Schaden), die automatisch gezählt und simultan in einer angepassten Tabelle aufgelistet wurden, um die Daten anschließend exportieren zu können.

2.2.3.2 Proteinquantifizierung von p21 mittels ELISA

Zur Identifizierung eines Genotoxizitätsmarker wurde auf eine mögliche quantitative Veränderung des Proteins p21 nach 4h und 24h Substanzbehandlung (s. Tabelle 6) unter Verwendung des SimpleStep ELISA Assay hin untersucht.

Tabelle 6: Übersicht der Referenzsubstanzen für die Untersuchung von p21 zur Identifizierung von Genotoxizität.

Substanz	Mode of Action	Konzentration (gering/mittel/hoch ^{**})
CCCP*	Nicht-Genotoxisch	0,78/ 3,15/ 6,25 µM
Gleevec® (Imatinib)	Nicht-Genotoxisch	7,8/ 15,6/ 31,2 µM
Floxin® (Ofloxacin)	Nicht-Genotoxisch	11/ 44,2/ 176,6 µM
5-Fluorouracil	Klastogen	11,1/ 44,2/ 88,3 µM
Hydrogenperoxid	Klastogen	5,5/ 22,1/ 88,3 µM
Hydroxyurea	Klastogen	0,57/ 5/ 75 µM
Methylmethansulfonat	Klastogen	1,5/ 3,125/ 6,25 µM
Palbociclib	Klastogen	0,4/ 2,2/ 6,25 µM
AMG-900	Aneugen	7,8/ 15,6/ 31,2 µM
Diethylstilbestrol	Aneugen	6,25/ 12,5/ 25 µM
Mebendazol	Aneugen	0,04/ 0,16/ 0,31 µM
Nocodazol	Aneugen	0,05/ 0,03/ 0,01 µM

*: CCCP, Carbonylcyanid-3-chlorphenylhydrazon

** : Höchste Konzentration entspricht dem OECD Guideline empfohlenen Zytotoxizitätslimit von 55±5% (RNC)

Das Prinzip im SimpleStep ELISA® basiert auf dem Sandwich-ELISA Format, bei dem zwei Antikörper zur Detektion des Zielproteins verwendet werden, jedoch an unterschiedlichen Epitopen binden. Der *Capture* Antikörper liegt bereits gebunden in jeder Vertiefung der Mikrotiterplatte vor. Der zweite Antikörper umfasst den *Detection* Antikörper, der mit dem Reportenzym HRP (Meerrettichperoxidase) konjugiert ist. Nach der Substanzbehandlung wurden die TK6-Zellen mit Medium gewaschen und hinterher in die immobilisierte Mikrotiterplatte überführt. Anschließend wurden 50 µl

der vorbereiteten Antikörper-Lösung (*Capture-* und *Detection* Antikörper) für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Plattenschüttler auf die Zellen gegeben. Hinterher wurde die Platte dreimalig mit einem Waschpuffer gewaschen und für 10 min mit 100 µl TMB Substrat (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) inkubiert. TMB dient als chromogenes Substrat und reagiert mit der Peroxidase zu einem blauen Farbstoff. Abschließend erfolgte das Abstoppen der Färbereaktion durch die Zugabe von 100 µl Stopp-Lösung, die Schwefelsäure enthält. Es erfolgt ein Farbumschlag von blau zu gelb. Diese Farbentwicklung ist äquivalent zu den gebundenen Analyten und wird bei einer Wellenlänge von 450 nm am Plattenlesegerät (Spectramax) gemessen. Aus technischen Gründen wurde das Experiment nur einmal durchgeführt. Die Bestimmung des Proteingehalts pro Konzentration erfolgte als Dreifachbestimmung und wurde über Excel als *fold change* gegenüber der Negativkontrolle ausgedrückt.

2.2.4 Genexpressionsanalyse

2.2.4.1 QuantiGene® Plex Methode (QGP)

Der QuantiGene® Plex Assay (QGP) von der Firma ThermoFisher ermöglicht mit einem hohen Durchsatzvermögen eine schnelle und simultane Genexpression-quantifizierung von bis zu 80 Zielgenen pro Well im 96-Well Format.

Die Basis der Methode ist die Kombination zweier Verfahren: der *branched* DNA (bDNA; verzweigte DNA) mit der xMAP® *microspheres* Technologie (magnetische Beads). Bei der bDNA Technologie erfolgt im Unterschied zu DNA-Sequenzamplifikationsmethoden wie bei der PCR (Polymerasekettenreaktion) eine Signalamplifikation.

Die Abbildung 12 zeigt das Prinzip der QGP-Technologie: *Capture Probes* (CB; fluoreszierende Beads) binden die spezifischen RNA-Moleküle. Die Besonderheit im QGP-Format liegt im verwendeten SONDENSET (*Probe Set*) und umfasst synthetische Oligonukleotide. Hierbei kommen drei Arten zum Einsatz, deren Sequenzen auf der Basis der Ziel-RNA beruhen: *Capture Extender* (CE) binden zu einer Hälfte sequenzspezifisch die Ziel-RNA und zur anderen Hälfte *Capture Probes* (CP), die immobilisiert auf den CB sind. Die *Label Extender* (LE) binden erneut komplementär einen Teil der Ziel-RNA und zur anderen Hälfte Signalverstärker (*Pre-Amplifier*).

Blockierungssonden (*Blocker Probe*, BP) sollen sequenzunspezifische Bindungen verhindern bzw. unspezifische Hybridisierungen reduzieren und binden an umgebende Sequenzen der RNA und werden nicht von den CEs und LEs erkannt. Den Abschluss der verzweigten Struktur bilden *Amplifier* und biotinylierte Sonden, die die Signalamplifikation durch Bindung an die LEs vermitteln (bDNA).

Jede Amplifikationseinheit enthält Bindungsstellen für die biotinylierten Sonden (*Label Probe*), die das Substrat Streptavidin-konjugiertes R-Phycoerythrin (SAPE) binden. Die Detektion von SAPE erfolgt am Luminex Gerät und ist proportional zur Menge der vorhandenen Ziel-RNA. Das resultierende Fluoreszenzsignal ist dabei jedem einzelnen CB zugeordnet, welche die spezifische Ziel-RNA gebunden haben (ThermoFisher 2014).

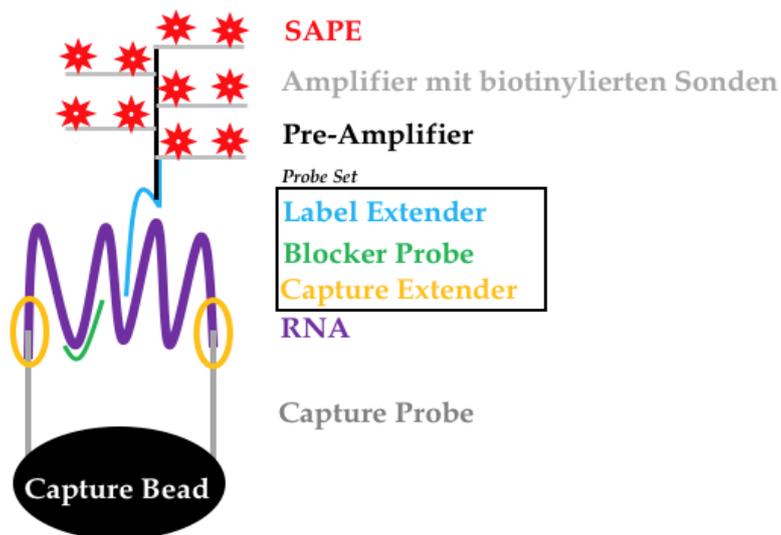


Abbildung 12: Prinzip des QuantiGene® Plex Assay.

(1) Lyse der Zellen (Probenaufbereitung). (2) Ziel-RNA wird sequenzspezifisch an *Probe Set* (*Capture Extender* (CE) und *Label Extender* (LE)) sowie an den *Capture Probes* (CP) gebunden. *Blocker Probe* verhindert unspezifische Hybridisierung. (3) bDNA: Hybridisierung der *Pre-Amplifier* an die LE, *Amplifier* und *Label Probe* (Signalamplifikation). (4) *Label Probe* bindet SAPE. Das Fluoreszenzsignal wird am Luminex Gerät auf Basis der einzelnen CP ausgelesen. Quelle: Modifiziert nach ThermoFisher 2014.

Zunächst wurde in einem Pilotexperiment die optimale Zellzahl von 2×10^5 Zellen/ml nach einer 24h Behandlung ermittelt, um nach Herstellerangaben nicht die Detektionsgrenze von $<1.000-2.000$ mRNA Transkripten/Assay-Well zu überschreiten. Darauf folgend wurde ein kompletter QGP Assay-Durchlauf

durchgeführt und umfasste die Behandlung (s. Tabelle 7) der TK6-Zellen als biologisches Replikat und die Detektion der in Tabelle 8 aufgeführten 67 DNA-schadensassoziierten Gene sowie den Referenzgenen Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT1), *DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB1* (POLR2A) und *transferrin receptor* (TFRC).

Tabelle 7: Übersicht der Referenzsubstanzen mittels QuantiGene® Plex Assay zur Identifizierung von Genotoxizität.

Substanz	Mode of Action	Konzentration [μM] **
CCCP*	Nicht-Genotoxisch	6,25
Dabrafenib	Nicht-Genotoxisch	50
Dexamethason	Nicht-Genotoxisch	249,8
Gefitinib	Nicht-Genotoxisch	25
Gleevec® (Imatinib)	Nicht-Genotoxisch	88,3
Tunicamycin	Nicht-Genotoxisch	0,1
5-Fluorouracil	Klastogen	88,3
Camptothecin	Klastogen	0,05
Etoposid	Klastogen	0,125
Hydroxyurea	Klastogen	100
Methylmethansulfonat	Klastogen	55
Mitomycin C	Klastogen	0,05
Palbociclib	Klastogen	8,8
AMG-900	Aneugen	0,0011
Diethylstilbestrol	Aneugen	15,6
Griseofulvin	Aneugen	25
Paclitaxel	Aneugen	0,01
Vinblastin	Aneugen	6

*: CCCP, Carbonylcyanid-3-chlorphenylhydrazon

** : Testkonzentration unterhalb dem OECD Guideline empfohlenen Zytotoxizitätslimit von $55 \pm 5\%$ (RNC)

Tabelle 8: Übersicht der untersuchten Gene mittels QuantiGene® Plex Assay zur Identifizierung von Genotoxizität.

Kategorie	Gensymbol	Genname	Gene ID
DNA-Reparatur	<i>EXO1</i>	exonuclease 1s	9156
	<i>RAD18</i>	E3 ubiquitin protein ligase	56852
	<i>RAD51</i>	RAD51 recombinase	5888
	<i>TP53BP1</i>	tumor suppressor p53-binding protein 1	7158
	<i>PRKDC</i>	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	5591
	<i>FANCD2</i>	fanconi anemia complementation group D2	2177
	<i>DCLRE1A</i>	DNA cross-link repair 1A	9937
Translänionssynthese	<i>PCNA</i>	proliferating cell nuclear antigen	5111
	<i>TYMS</i>	thymidylate synthase	7298
	<i>POLH</i>	polymerase (DNA) eta	5429
DNA-Schadensantwort	<i>CHD1L</i>	chromodomain helicase DNA binding protein 1-like	9557
	<i>GADD45A</i>	growth arrest and DNA damage inducible alpha	1647
	<i>ATF1</i>	activating transcription factor 1	466
	<i>DDB2</i>	DNA damage-binding protein 2	1643
	<i>SMAD1</i>	SMAD family member 1	4086
	<i>SMAD5</i>	SMAD family member 5	4090
	<i>FOXM1</i>	forkhead box M1	2305
Oxidativer Stress	<i>CYBA</i>	cytochrome b-245 alpha chain	1535
	<i>OGG1</i>	8-oxoguanine DNA glycosylase	4968
	<i>SESN1</i>	sestrin 1	27244
Zellzyklus Prozess	<i>CCNA2</i>	cyclin A2	890
	<i>INHBA</i>	inhibin beta-A	3624
	<i>CHEK1</i>	checkpoint kinase 1	1111
	<i>SKA1</i>	spindle and kinetochore associated complex subunit 1	220134
	<i>SKA2</i>	spindle and kinetochore associated complex subunit 2	348235
	<i>PLK1</i>	polo-like kinase 1	5347

Kategorie	Gensymbol	Gename	Gene ID
	<i>RAC1</i>	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	5879
	<i>RAD9A</i>	checkpoint clamp component A	5883
	<i>MKI67</i>	marker of proliferation	4288
	<i>KIF2A</i>	kinesin heavy chain member	3796
	<i>KIF20A</i>	kinesin family member 20A	10112
	<i>MATR3</i>	matrin 3	9782
	<i>DNMT1</i>	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1	1786
	<i>IL6</i>	interleukin 6	3569
	<i>CDKN1A</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A	1026
	<i>IER5</i>	immediate early response 5	51278
	<i>TP53I3</i>	tumor protein TP53 inducible protein 3	9540
	<i>CLIP-170</i>	CAP-Gly domain containing linker protein 1	6249
	<i>PTTG1</i>	pituitary tumor-transforming 1	9232
	<i>NDC80</i>	kinetochore complex component	10403
	<i>c-ABL</i>	ABL proto-oncogene 1	25
	<i>PRKAB1</i>	protein kinase AMP-activated non-catalytic subunit beta 1	5564
	<i>USP41</i>	ubiquitin specific peptidase 41	373856
	<i>UIMC1</i>	ubiquitin interaction motif containing 1	51720
	<i>HSPE1</i>	heat shock protein family E	3336
	<i>ABCB1</i>	ATP binding cassette subfamily B member 1	5243
	<i>STAT3</i>	signal transducer and activator of transcription 3	6774
	<i>PPP4C</i>	protein phosphatase 4 catalytic subunit	5531
	<i>MCM2</i>	minichromosome maintenance complex component 2	4171
	<i>CDT1</i>	chromatin licensing and DNA replication factor 1	81620
	<i>TUBA1A</i>	tubulin alpha 1a	7846
	<i>TUBB</i>	tubulin beta class I	203068
	<i>TOP1</i>	topoisomerase (DNA) I	7150
	<i>TOP2A</i>	topoisomerase (DNA) II alpha	7153
	<i>PRKACA</i>	protein kinase cAMP-activated catalytic subunit alpha	5566

Kategorie	Gensymbol	Gename	Gene ID
	<i>MAPK1</i>	mitogen-activated protein kinase 1	5594
	<i>MAPK15</i>	mitogen-activated protein kinase 15	225689
	<i>PIM1</i>	pim-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase	5292
	<i>VRK1</i>	vaccinia related kinase 1	7443
	<i>SPRY4</i>	sprouty RTK signaling antagonist 4	81848
	<i>CDK18</i>	cyclin dependent kinase 18	5129
	<i>DYRK1B</i>	dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase 1B	9149
Apoptose	<i>Bik</i>	BCL2-interacting killer	638
	<i>Adm</i>	adrenomedullin coagulation factor III	133
	<i>F3</i>	glycogen synthase kinase 3 beta	2152
	<i>GSK3B</i>	B-cell CLL/lymphoma 2	2932
	<i>BCL2</i>	BCL2-interacting killer	596

Die Aufarbeitung der Proben und Detektion der putativen Gene erfolgte am Luminex® 200 und wurde entsprechend dem QGP Assay *manual* durchgeführt.

2.2.4.1.1 Visualisierung der QuantiGene® Plex Daten

Um die großen Datenmengen auf einen Blick darzustellen und einen allgemeinen Überblick möglicher Datenzusammenhänge zu erkennen, wurden die detektierten Expressionslevel der 67 Gene in Heat Maps visualisiert. Die Heat Maps wurden mit Hilfe der Software Genedata Expressionist® Analyst durch den gebildeten Mittelwert der beiden biologischen Replikate erstellt.

2.2.4.1.2 Statistische Bewertung und Erstellung eines Vorhersagemodells

Unter Verwendung der Software JMP® 13 wurde jedes einzelne Gen, inklusive der Expositionszeitpunkte (4h und 24h) hinsichtlich ihres Potenzials untersucht, um die 17 getesteten Modellsubstanzen jeweils in die drei MoA-Gruppen Aneugen/Klastogen/Nicht-Genotoxin zu kategorisieren. Diese Bewertung wurde mit logistischen Regressionsanalysen (multinomial) durchgeführt. Als Bewertungskriterium oder „Gütemaß“ für jedes einzelne Gen wurde das Pseudo-R² (nach

McFadden) und die sogenannte Konfusionsmatrix betrachtet. Beim Pseudo-R² gilt die Regel, dass Werte, die näher an Eins liegen, eine bessere Modellanpassung bzw. in diesem Kontext eine gute Vorhersage der definierten Klassen (MoA-Gruppen) zeigen. Grundsätzlich und im Gegensatz zu den konventionellen R² werden Pseudo-R² Werte, die zwischen 0,2-0,4 liegen, bereits als eine sehr gute Modellanpassung interpretiert.

Die Konfusionsmatrix stellt die Klassifikationsergebnisse bezüglich des putativen Gens dar und zeigt auf, wie die wahren MoA-Gruppen den vorhergesagten MoA-Gruppen in richtig oder falsch zugeordnet werden konnten. Auf Grundlage der identifizierten Gene und Zeitpunkte, die effektiv MoA-Unterscheidungen zugelassen haben, wurde ein multivariates Trainingsmodell konstruiert und mittels der Leave-One-Out-Kreuzvalidierung (LOOCV) evaluiert, die für diese Zwecke eine gängige und anerkannte Methode darstellt (Huang SH und Tung CW. 2017; Rieswijk et al. 2016; Gusenleitner et al. 2014; Tsujimura et al. 2006). Bei der Durchführung der LOOCV wurde nacheinander jede der 16 Modellsubstanzen aus dem Trainingsmodell entfernt und anschließend separat als unbekannte Substanz in das Modell eingelesen, um eine Vorhersage hinsichtlich ihres MoA (Aneugen/Klastogen/Nicht-Genotoxin) zu machen. Die Bewertung des Testsystems erfolgte über die folgenden prozentualen Maße:

- Spezifität: Anteil positiv identifizierter Nicht-Genotoxine (Anzahl Nicht-Genotoxine/(Anzahl Nicht Genotoxine+Anzahl nicht identifizierter Nicht-Genotoxine)) * 100
- Sensitivität: Anteil positiv identifizierter Genotoxine (Anzahl Genotoxine/(Anzahl Genotoxine+Anzahl nicht identifizierter Genotoxine)) * 100
- Prädiktivität: Anteil der untersuchten Substanzen, die richtig identifiziert wurden (Kirkland und Speit 2008).

2.2.4.2 Quantitative qPCR

Zur Untersuchung der ausgewählten DNA-schadensassoziierten Gene wurde die qPCR im Vergleich zum QGP (Multiplex Format) als Singleplex-Ansatz durchgeführt. Die in Tabelle 10 untersuchten Zielgene wurden untersucht, ob sie eine charakteristische Antwort in den behandelten TK6-Zellen zeigen. Die Zellen wurden

für 4h (+20h Erholungsphase) und 24h mit den in Tabelle 9 aufgeführten Modellsubstanzen behandelt und nach dem *TaqMan*[®] *Fast Cells-to-CT*[™] Format aufgearbeitet. Dieser Ansatz stellt ebenso wie QGP Methode eine Weiterentwicklung der konventionellen qPCR dar und ermöglicht ohne Isolierung und Reinigung von RNA eine nahezu identische Sensitivität und Spezifität, die im Rahmen von Voruntersuchungen bestätigt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Die Aufarbeitung und Detektion der Proben wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

Tabelle 9: Übersicht der Referenzsubstanzen für die Genexpressionsanalyse mittels qPCR zur Identifizierung von Genotoxizität.

Substanz	Mode of Action	Konzentration (gering/mittel/hoch ^{**})
CCCP*	Nicht-Genotoxisch	3,125/ 6,25/ 12,5 µM
Dexamethason	Nicht-Genotoxisch	5,5/ 44,1/ 249,8 µM
Gleevec [®] (Imatinib)	Nicht-Genotoxisch	16/ 44/ 88 µM
5-Fluorouracil	Klastogen	5,5/ 22,1/ 88 µM
Etoposid	Klastogen	0,003/ 0,125/ 0,25 µM
AMG-900	Aneugen	0,0001/ 0,0011/ 0,011 µM
Diethylstilbestrol	Aneugen	3,9/ 15,6/ 88 µM
Vinblastin	Aneugen	3/ 6/ 12 µM

*: CCCP, Carbonylcyanid-3-chlorphenylhydrazon

** : Höchste Konzentration entspricht dem OECD Guideline empfohlenen Zytotoxizitätslimit von 55±5% (RNC)

Tabelle 10: Übersicht der untersuchten Gene und verwendeten Referenzgene mittels qPCR zur Identifizierung von Genotoxizität.

Gensymbol	Gename
<i>FANCD2</i>	Fanconi anemia complementation group D2
<i>CLIP-170</i>	Cytoplasmic linker protein CLIP-170
<i>TREX1</i>	Three prime repair exonuclease 1
<i>TP53I3</i>	TP53I3 tumor protein p53 inducible protein 3

Gensymbol	Genname
<i>ATR</i>	Ataxia telangiectasia and Rad3 related
<i>RAD17</i>	RAD17 checkpoint clamp loader component
<i>PRKDC</i>	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit
<i>NFE2L2</i>	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
<i>TFRC (Referenz)</i>	Transferrin receptor
<i>PPIA (Referenz)</i>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A
<i>18s (Referenz)</i>	18s ribosomal RNA
<i>GAPDH (Referenz)</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

Die behandelten TK6-Zellen wurden zunächst einmalig mit PBS gewaschen und nachfolgend für 5 min mit 50 µl Lysis-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lysate wurden anschließend für 2 min mit 5 µl Lysestopp-Lösung inkubiert und hinterher auf Eis gelagert, um den Master-Mix für die reverse Transkription (RT) in 96-Well PCR Platten für den ThermoCycler vorzubereiten.

- 2x RT Puffer: 2,64 ml
- 20x RT Enzym Mix: 264 µl
- Nuklease freies Wasser: 1,32 ml
- Pro Lysat: 10 µl

Die cDNA-Synthese der biologischen Replikate erfolgte für 60 min bei 37°C (RT), 5 min bei 95°C (RT-Inaktivierung) und dem finalen Abkühlen der cDNA-Produkte bei 4°C, die im Anschluss bis zur Durchführung der PCR bei -20°C gelagert wurden.

Jede PCR-Analyse (s. Tabelle 11) wurde als Dreifachansatz mit mind. 2 Referenzgenen im Fast Mode am 7900HT Fast Real-Time PCR Gerät unter folgenden Bedingungen gefahren: 20 Sek bei 95°C (Enzymaktivierung), gefolgt von 40 Zyklen bei 95°C für 1 Sek und anschließenden 60°C für 20 Sek.

Tabelle 11: Reaktionsansatz für die qPCR im Fast Mode.

Komponente	Volumen pro Reaktion [μ l] *
TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2x)	10
TaqMan® Gen (20x)	1
Nuklease freies Wasser	5
cDNA	4

*: Bei der Negativkontrolle anstatt des TaqMan®Gens Nuklease freies Wasser

Die Berechnung der Genregulation erfolgte über die $\Delta\Delta$ CT-Methode von Livak und Schmittgen (2001). Auf Grundlage der berechneten Genexpressionsstärken wurden die Werte quadriert und als *fold change* dargestellt. Resultierende Werte <1 entsprechen eine Effektzunahme und Werte >1 eine Effektabnahme der Genaktivität.

3 Ergebnisse

3.1 Teil 1: Etablierung der MultiFlow® Methode als *in vitro* Genotoxizitätstest

Es besteht die Notwendigkeit, die in Kapitel 1.3.3 demonstrierten Limitierungen wie unzureichende Spezifität und MoA-Information der etablierten *in vitro* Genotoxizitätsmethoden gemäß der ICH S2 (R1) Richtlinie zu überwinden.

Das erste Ziel war es daher, eine neu entwickelte - zu diesem Zeitpunkt noch nicht-kommerziell erwerbliche - *in vitro* Genotoxizitätsmethode von der Firma Litron Laboratories im Rahmen einer Ringstudie umfassend auf ihre Fähigkeit zur spezifischeren Charakterisierung genotoxischer (Klastogene/Aneugene) und nicht-genotoxischer Substanzen zu untersuchen. Hierbei wurden in humanen TK6-Zellen die DNA-schadensassoziierten Endpunkte (γ H2AX, cleaved PARP1, nukleäres p53, pH3 (S10) und Polyploidie) nach 4h und 24h Behandlung mit 31 Modellsubstanzen quantitativ erfasst und bewertet, ob diese Biomarker charakteristische mechanistische Antworten liefern.

3.1.1 Proteinaktivität und Performance von pH3 (S10)

Die Abbildung 13 hebt die Daten des mitoseassoziierten Protein pH3 (S10) hervor und zeigte nach 4h und 24h eine charakteristische MoA-Antwort. Mit Ausnahme von AMG-900 (4h) und Griseofulvin (GF) (24h) wiesen alle aneugenen Modellsubstanzen eine hohe pH3-Aktivität auf und waren deutlich von den Klastogenen und Nicht-Genotoxinen zu unterscheiden. Die Klastogene Cyclophosphamid (CP) (4h) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (24h) führten zu beiden Zeitpunkten zu einem geringen pH3-Anstieg. Alle anderen Klastogene zeigten keine zunehmende pH3-Antwort, sondern führten eher zu einer pH3-Abnahme.

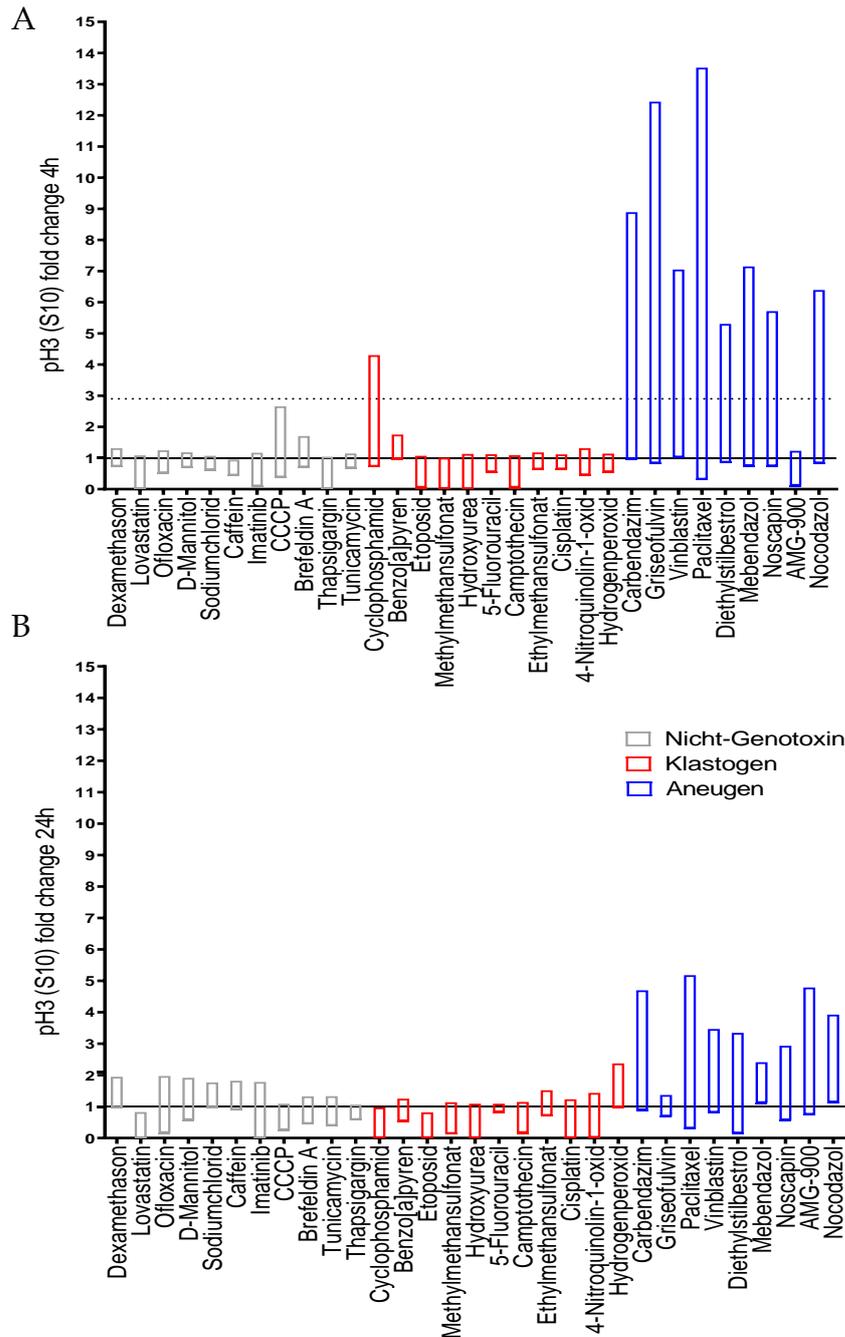


Abbildung 13: Ergebnisse des Biomarkers pH3 (S10) im MultiFlow® Assay.

Dargestellt ist die Proteinaktivität von pH3 (S10) für jede der insgesamt 31 untersuchten Modellsubstanzen nach 4h (A) und 24h (B) Behandlung der TK6-Zellen. Untersucht wurden Dosis-Wirkungsbeziehungen, die als Balken pro Substanz aufgetragen wurden, da jede eine unterschiedliche Konzentration darstellt. Die Ergebnisse werden unter Berücksichtigung der Zytotoxizität (<80%, RNC) aufgezeigt. Die Substanzen sind nach ihrem genotoxischem MoA kodiert: Nicht-Genotoxine = graue Balken, Klastogene = rote Balken und Aneugene = blaue Balken. Die Kontrolle (1% DMSO) wird durch die schwarze Linie und die gestrichelte Linie bei den 4h-Werten durch den berechneten Schwellenwert mittels ROC-Analyse (s. Tabelle 12) dargestellt. CCCP: Carbonylcyanid-3-chlorphenylhydrazon. Modifiziert nach Wilde et al. 2017.

3.1.2 Proteinaktivität und Performance von γ H2AX

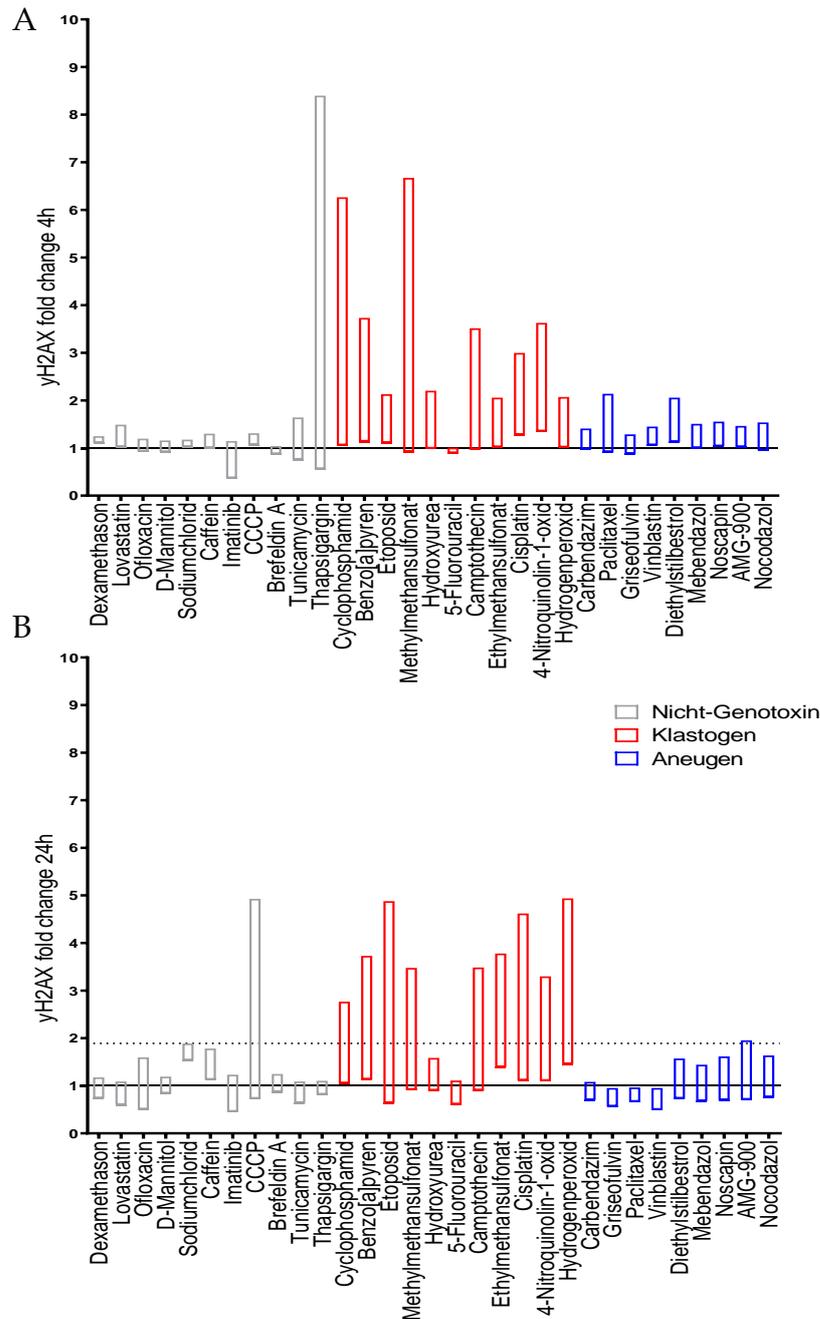


Abbildung 14: Ergebnisse des Biomarkers γ H2AX im MultiFlow® Assay.

Dargestellt ist die Proteinaktivität von γ H2AX für jede der insgesamt 31 untersuchten Modellschubstanzen nach 4h (A) und 24h (B) Behandlung der TK6-Zellen. Untersucht wurden Dosis-Wirkungsbeziehungen, die als Balken pro Substanz aufgetragen wurden, da jede eine unterschiedliche Konzentration darstellt. Die Substanzen sind nach ihrem genotoxischen MoA kodiert: Nicht-Genotoxine = graue Balken, Klastogene = rote Balken und Aneugene = blaue Balken. Die Kontrolle (1% DMSO) wird durch die schwarze Linie und die gestrichelte Linie bei den 24h-Werten durch den berechneten Schwellenwert mittels ROC-Analyse (s. Tabelle 12) dargestellt. CCCP: Carbonylcyanid-3-chlorphenylhydrazon. Modifiziert nach Wilde et al. 2017.

Aus der Abbildung 14 geht hervor, dass das DNA-DSB-assoziierte Protein γ H2AX vorrangig eine erhöhte Aktivität bei Substanzen mit einem klastogenen Mechanismus, mit Ausnahme von 5-Fluorouracil (5-FU) (4h und 24h) und Hydroxyurea (HU) (24h), aufzeigte. Zusätzlich wiesen die Nicht-Genotoxine Thapsigargin (TG) (4h) und CCCP (24h) bei den höchsten Konzentrationen einen Anstieg an γ H2AX auf. Substanzen mit einem aneugenem MoA beeinflussten kaum die γ H2AX-Aktivität.

3.1.3 Proteinaktivität und Performance von nukleären p53

Ein Anstieg des nukleären p53 ist mit genotoxischen Stress verbunden und war sowohl nach 4h für die Klastogene CP, 5-FU, Benzo[a]pyren (BP), Cisplatin (CS) und 4-Nitroquinolin-1-oxid (4-NQO) als auch nach 24h für die insgesamt fünf getesteten Aneugene sowie weiterer Klastogene, mit Ausnahme von Ethylmethansulfonat (EMS), deutlich erhöht (s. Abbildung 15). Mit Ausnahme von Imatinib, induzierten die restlichen Nicht-Genotoxine nur geringfügig das Protein p53.

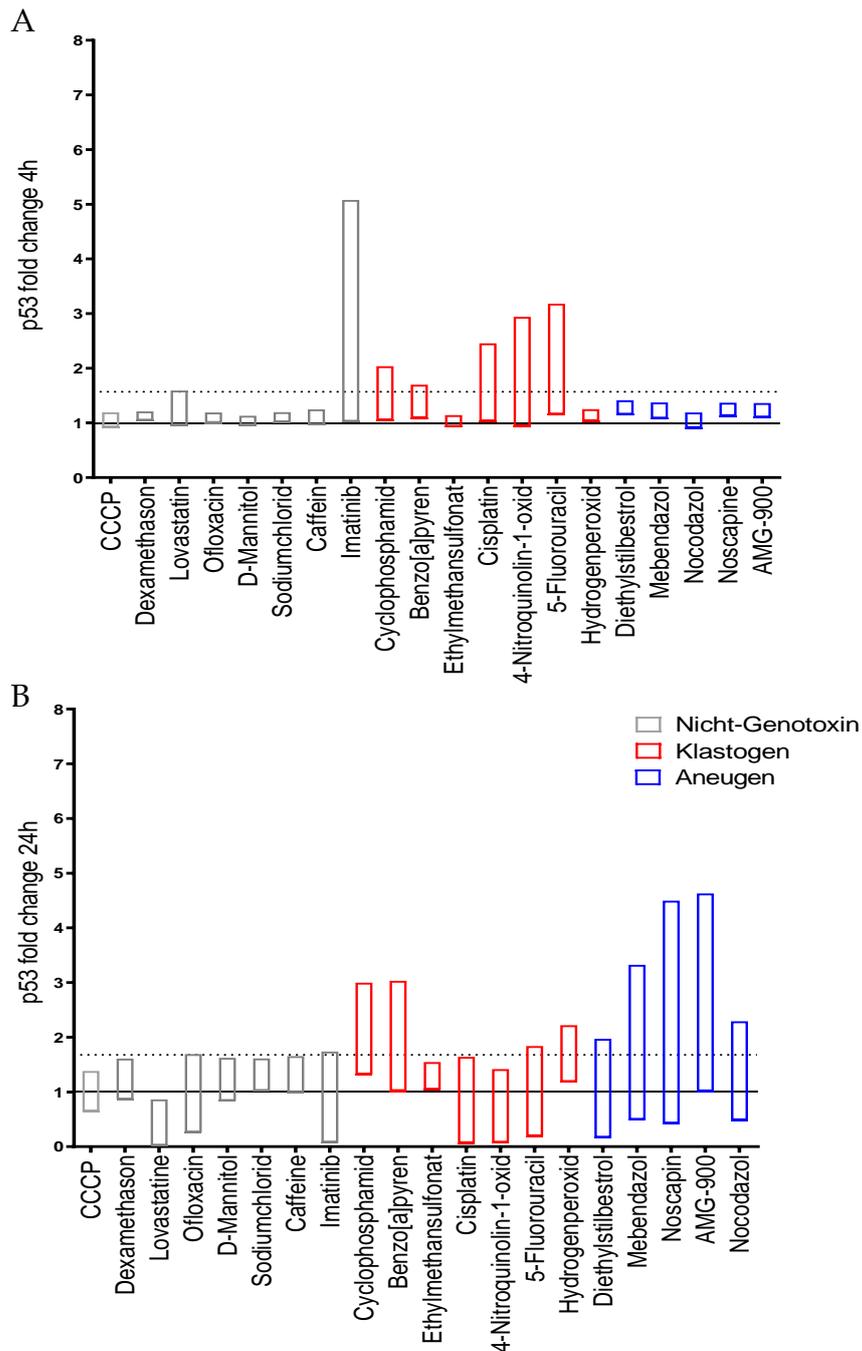


Abbildung 15: Ergebnisse von nukleären p53 im MultiFlow® Assay.

Dargestellt ist die Proteinaktivität von p53 für jede der insgesamt 20 untersuchten Modellsubstanzen nach 4h (A) und 24h (B) Behandlung der TK6-Zellen. Untersucht wurden Dosis-Wirkungsbeziehungen, die als Balken pro Substanz aufgetragen wurden, da jede eine unterschiedliche Konzentration darstellt. Die Ergebnisse werden unter Berücksichtigung der Zytotoxizität (<80%, RNC) aufgezeigt. Die Substanzen sind nach ihrem genotoxischem MoA kodiert: Nicht-Genotoxine = graue Balken, Klastogene = rote Balken und Aneugene = blaue Balken. Die Kontrolle (1% DMSO) wird durch die schwarze Linie und die gestrichelte Linie bei den 4h und 24h Werten durch den berechneten Schwellenwert mittels ROC-Analyse (s. Tabelle 12) dargestellt. CCCP: Carbonylcyanid-3-chlorphenylhydrazon. Modifiziert nach Wilde et al. 2017.

3.1.4 Proteinaktivität und Performance von cleaved PARP1

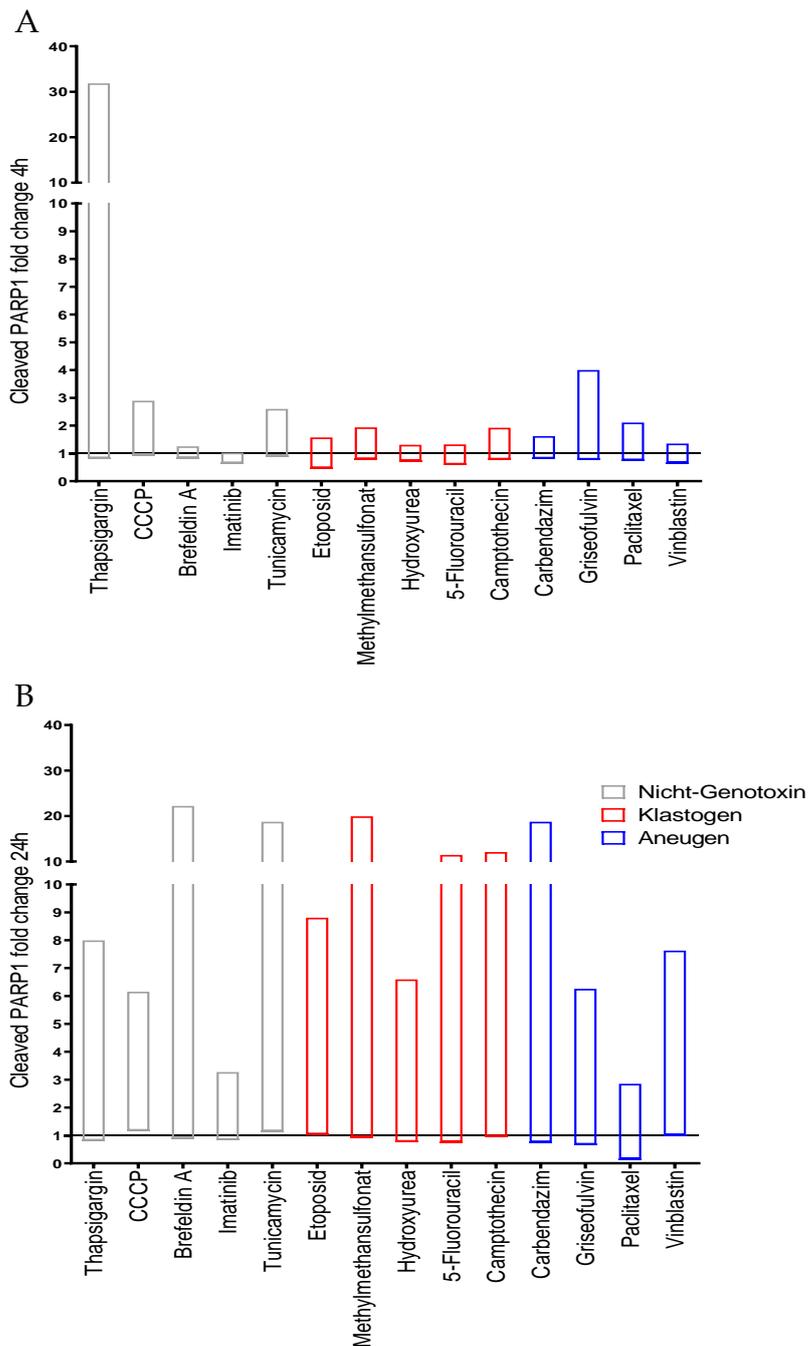


Abbildung 16: Ergebnisse des Biomarkers cleaved PARP1 (Apoptose) im MultiFlow® Assay.

Dargestellt ist die Proteinaktivität von cleaved PARP1 (Apoptose) für jede der insgesamt 14 untersuchten Modellsubstanzen nach 4h (A) und 24h (B) Behandlung der TK6-Zellen. Untersucht wurden Dosis-Wirkungsbeziehungen, die als Balken pro Substanz aufgetragen wurden, da jede eine unterschiedliche Konzentration darstellt. Die Ergebnisse werden unter Berücksichtigung der Zytotoxizität (<80%, RNC) aufgezeigt. Die Substanzen sind nach ihrem genotoxischem MoA kodiert: Nicht-Genotoxine = graue Balken, Klastogene = rote Balken und Aneugene = blaue Balken. Die Kontrolle (1% DMSO) wird durch die schwarze Linie dargestellt. CCCP: Carbonylcyanid-3-chlorphenylhydrazon. Modifiziert nach Wilde et al. 2017.

Ein Anstieg von cleaved PARP1 ist mit Apoptose assoziiert. Cleaved PARP1 wurde bereits nach 4h, vorrangig unabhängig vom MoA aktiviert, wobei das Nicht-Genotoxin TG eine starke Apoptose-Aktivität in den TK6-Zellen hervorbrachte. Zum späteren Zeitpunkt (24h) induzierten nahezu alle Substanzen signifikant cleaved PARP1 (s. Abbildung 16).

3.1.5 Genotoxischer Endpunkt und Performance von Polyploidie

Die Analyse von polyploiden Zellen kann aufschlussreich sein, um ein aneugenes Potential aufzuzeigen. Nach frühen und späten Zeitpunkten wiesen nahezu alle Substanzgruppen polyploide Zellen auf. Neben den Aneugenen AMG-900, Noscapin (NOS), Carbendazim (CBD), Paclitaxel (PT) und Vinblastin (VB) erzeugten sowohl Klastogene Etoposid (ETO) und H₂O₂ als auch die Nicht-Genotoxine Brefeldin A, CCCP und Tunicamycin (TC) polyploide Zellen (s. Abbildung 17).

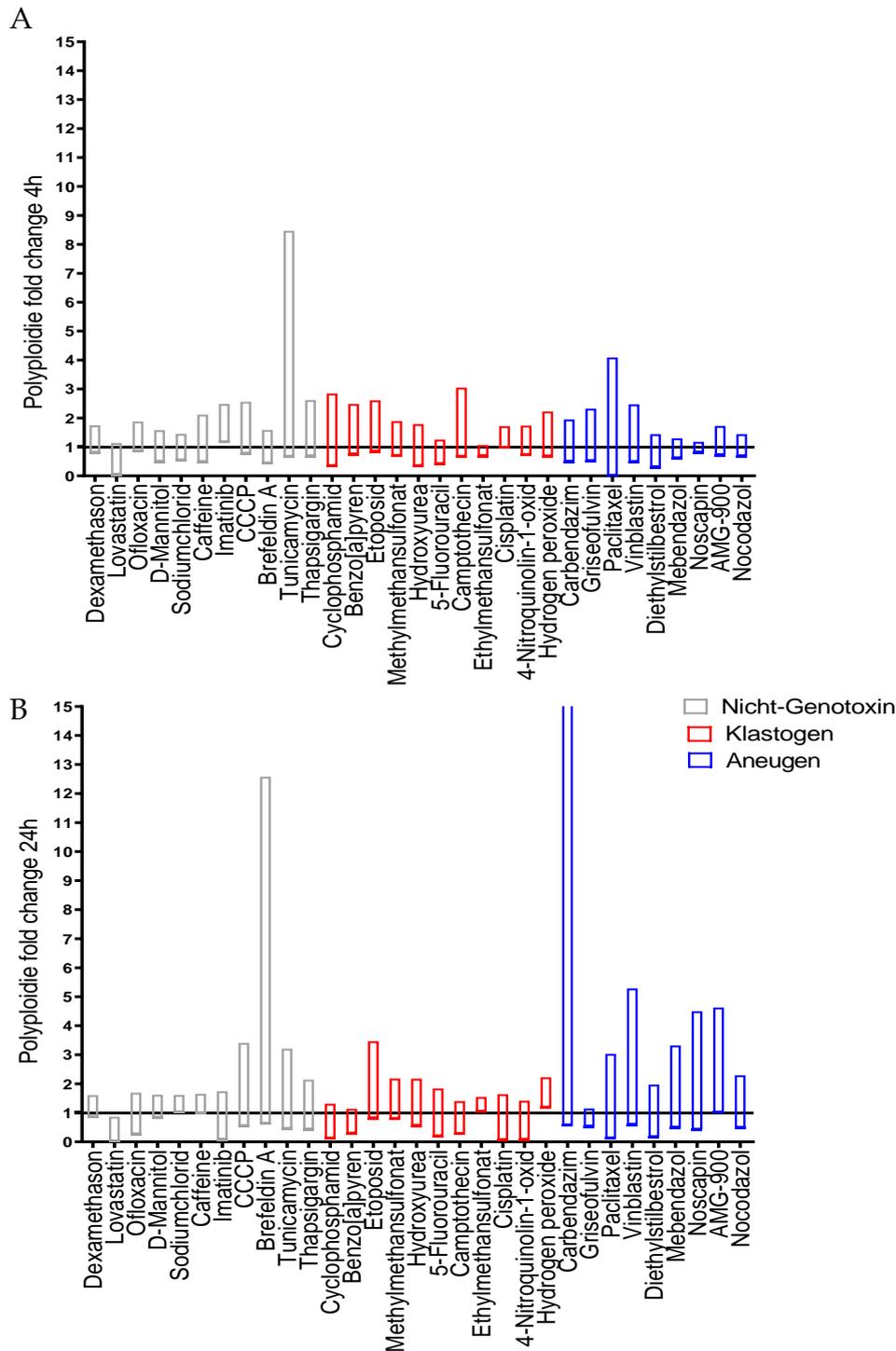


Abbildung 17: Ergebnisse der Analyse polyploider Zellen im MultiFlow® Assay.

Dargestellt sind die Polyploidisierungseffekte (DNA Inhalt = 8n, quantifiziert über PI-Färbung) jede der insgesamt 31 untersuchten Modellsubstanzen nach 4h (A) und 24h (B) Behandlung der TK6-Zellen. Untersucht wurden Dosis-Wirkungsbeziehungen, die als Balken pro Substanz aufgetragen wurden, da jede eine unterschiedliche Konzentration darstellt. Die Substanzen sind nach ihrem genotoxischem MoA kodiert: Nicht-Genotoxine = graue Balken, Klastogene = rote Balken und Aneugene = blaue Balken. Die Kontrolle (1% DMSO) wird durch die schwarze Linie) dargestellt. CCCP: Carbonylcyanid-3-chlorphenylhydrazon. Modifiziert nach Wilde et al. 2017.

3.1.6 Statistische Bewertung der MultiFlow® Endpunkte

Zur Evaluierung der einzelnen Biomarker, um die drei MoA-Gruppen (Aneugen/Klastogen/Nicht-Genotoxin) zum Zeitpunkt X am besten zu differenzieren und einen Schwellenwert abzuleiten, wurden ROC-Analysen in GraphPad® Prism 7 durchgeführt. Hierbei wurden entsprechend zu den jeweiligen Biomarker-Antworten von pH3 (S10), γ H2AX und p53 in den TK6-Zellen zwei MoA-Gruppen (z.B. Gruppe A: Klastogene + Nicht-Genotoxin versus Gruppe B: Aneugene) definiert und das Diskriminierungspotential ermittelt (s. Abbildung 18A-C).

Beim Mitosemarker pH3 (S10) zeigte die ROC-Analyse, dass der 4h Zeitpunkt in Abbildung 18A mit einem abgeleiteten Schwellenwert von 2,91 am sensitivsten war. Dieser Grenzwert resultierte in einer deutlichen Abgrenzung der MoA-Gruppen, bei dem acht von neun Aneugene (außer AMG-900) kategorisiert wurden.

Aus den ROC-Kurven in der Abbildung 18B ist zu entnehmen, dass bei der Bewertung von γ H2AX der späte Zeitpunkt ein besseres Klassifizierungspotential aufwies als der frühe (AUC = 0,7735). Insgesamt zeigten neun von elf Klastogenen (außer 5-FU und HU) sowie das Nicht-Genotoxin CCCP einen deutlichen Effekt auf die γ H2AX-Antwort, bestimmt durch den ermittelten Schwellenwert von 1,89.

Das stressinduzierte Protein p53 zeigte bei frühen (Klastogene) und späten (Aneugene/Klastogene) Zeitpunkten ein Diskriminierungspotential auf und ermöglichte die Unterscheidung zwischen genotoxischen und nicht-genotoxischen Substanzen (s. Abbildung 18C). Die ermittelten Schwellenwerte nach 4h (1,57) und 24h (1,68) ergaben, dass sechs von sieben Klastogene (außer EMS), fünf von fünf Aneugene und die nicht-genotoxische Substanz Imatinib eine signifikante p53-Aktivität aufwiesen.

Für die Endpunkte cleaved PARP1 (Apoptose) und Polyploidie ergaben die ROC-Analysen schlechte AUC-Werte (\emptyset 0,5) und wurden daher von dieser Bewertung ausgeschlossen.

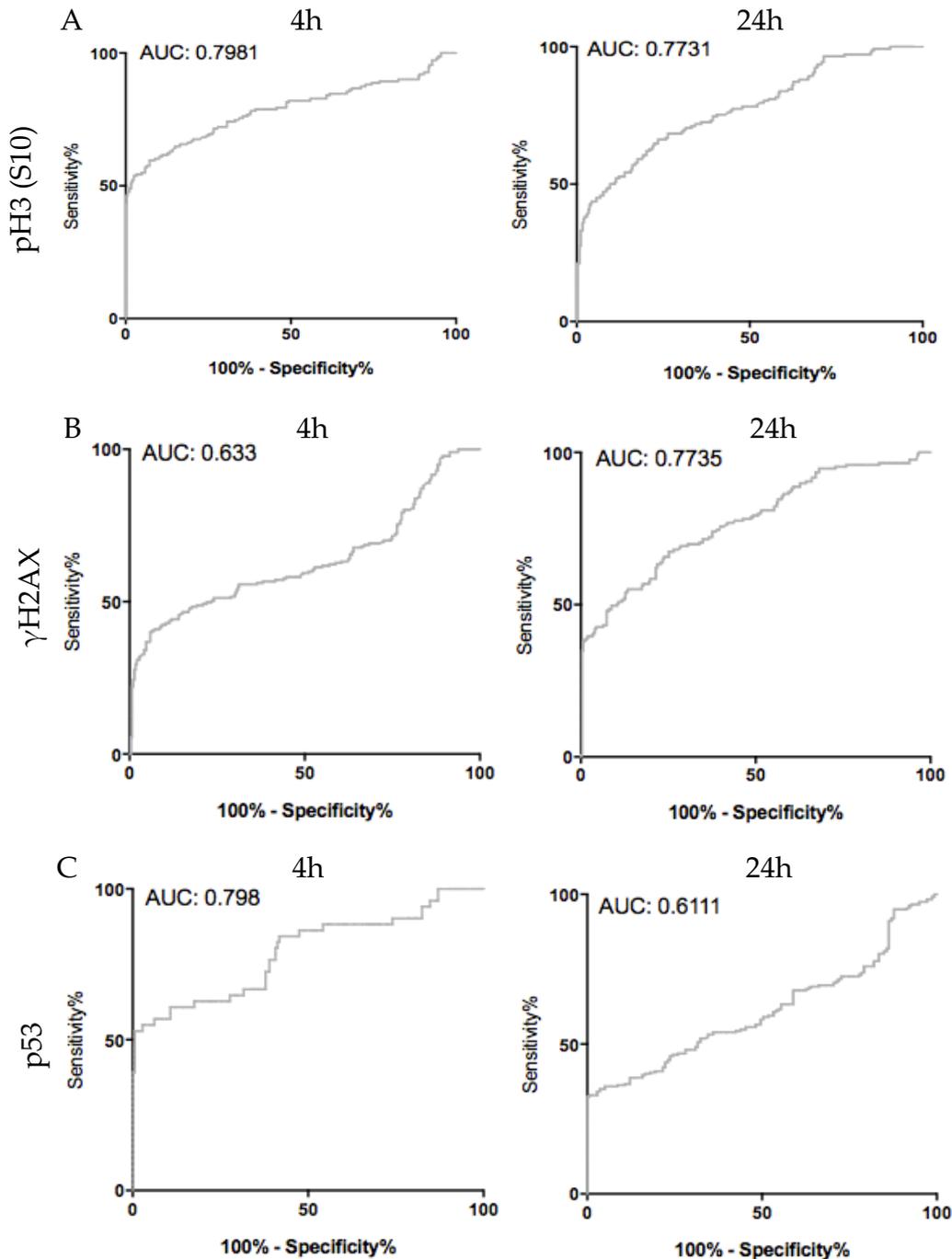


Abbildung 18: Ergebnisse der ROC-Analyse der MultiFlow® Endpunkte.

Die TK6-Zellen wurden für 4h und 24h mit den Substanzen aus Tabelle 1 exponiert und mit der MultiFlow® Methode analysiert. Die ROC-Kurven Analyse wurde durchgeführt, um für jeden einzelnen Biomarker/Zeitpunkt die Sensitivität für die Unterscheidung von MoA-Gruppen (Aneugen/Klastogen/Nicht-Genotoxisch) zu ermitteln und weiterführend Schwellenwerte ableiten zu können, um die Substanzen in eine der drei MoA-Gruppen zu kategorisieren. Trennungsgüte von (A) pH3 (S10) nach 4h und 24h: Aneugene versus Klastogene und Nicht-Genotoxine, (B) γ H2AX nach 4h und 24h: Klastogene versus Aneugene und Nicht-Genotoxine und (C) p53 nach 4h und 24h: Klastogene und Aneugene versus und Nicht-Genotoxine.

Tabelle 12: Übersicht der Ergebnisse zur Bewertung der MultiFlow® Endpunkte.

Biomarker	Zeitpunkt [h]	Grenzwert*	Klassifizierung
pH3 (S10)	4	2,91	8/9 Aneugene
γH2AX	24	1,89	9/11 Klastogene
p53	4; 24	1,57; 1,68	6/7 Klastogene; 5/5 Aneugene

*: Schwellenwertbestimmungen basierten auf einer $\geq 99\%$ -igen Wahrscheinlichkeit (Spezifität) für die Einordnung in eine der drei MoA-Gruppen (s. Abbildung 13-15)

3.1.7 Validierung der MultiFlow® Methode

3.1.7.1 Multiplex- versus Single-Analysen

Die folgende Abbildung 19 demonstriert zusammenfassend die Validierungsergebnisse des Multiplex-Ansatzes. Hierbei wurden die MultiFlow® Resultate von ausgewählten Biomarker-Antworten mit den Ergebnissen aus Single-Messungen am HCl (pH3 (S10), γH2AX und Caspase 3/7 als Analogon zu cleaved PARP1) und am Durchflusszytometer über die APO- TUNEL Methode (BrdU versus cleaved PARP1) verglichen, um die Funktionalität des Multiplex-Ansatzes zu überprüfen.

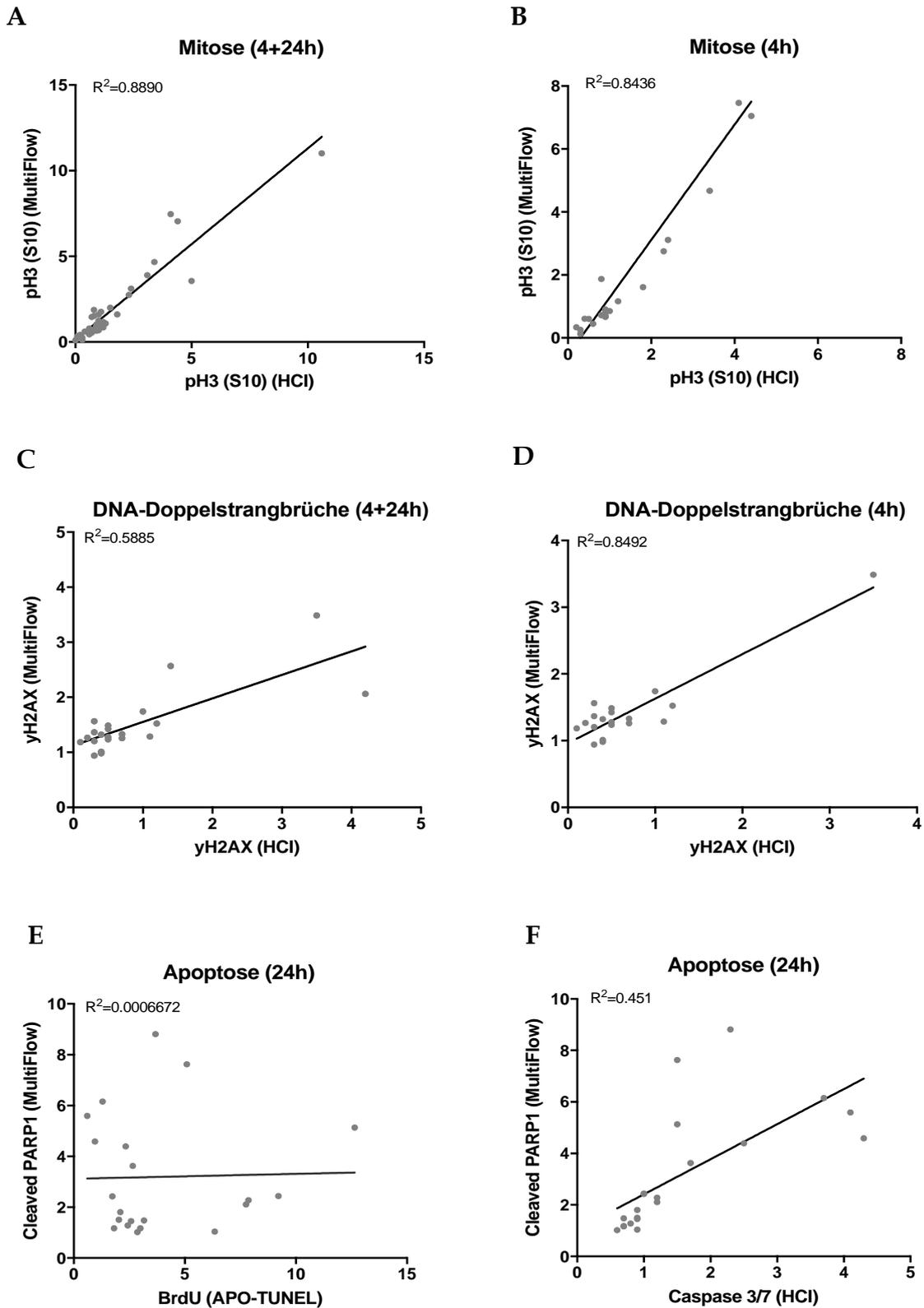


Abbildung 19: Vergleich der Biomarker-Antworten durch Multiplex- und Single Methoden.

Die TK6-Zellen wurden für 4h und 24h mit den Substanzen CCCP, ETO und VB exponiert und mit der MultiFlow® Methode analysiert. Die Experimente wurden mit Einzelmessungen von pH3 (S10), γH2AX und Caspase 3/7 als Analogon zu cleaved PARP1 am HCl und mit einem weiteren ähnlichen Apoptose Marker BrdU in der TUNEL Methode am Durchflusszytometer wiederholt und validiert.

(A) Multiplex pH3-Ergebnisse versus Single pH3-Ergebnisse nach 4h und 24h. (B) Multiplex pH3-Ergebnisse versus Single pH3-Ergebnisse separat nach 4h betrachtet. (C) Multiplex γ H2AX-Ergebnisse versus Single γ H2AX-Ergebnisse nach 4h und 24h. (D) Multiplex γ H2AX-Ergebnisse versus Single γ H2AX-Ergebnisse separat nach 4h betrachtet. (E) Multiplex cleaved PARP1-Ergebnisse versus Single BrdU-Ergebnisse nach 24h. (F) Multiplex cleaved PARP1-Ergebnisse versus Single Caspase 3/7-Ergebnisse nach 24h.

Die Validierung von pH3 (S10) in der Single- (HCI) und Multiplex- (MultiFlow®) Analyse ergab zu beiden Zeitpunkten sehr gute Korrelationswerte (s. Abbildung 19A-B). Die Abbildung 19C zeigt beim Methodenvergleich deutlich eine Abweichung hinsichtlich der γ H2AX-Analyse nach 24h. Dies wird durch die Einzelbetrachtung der 4h Werte in Abbildung 19D hervorgehoben, worin zu erkennen ist, dass die Daten noch an dieser Stelle gut korrelieren.

Als Analogon zu cleaved PARP1 wurde der Einbau von BrdU als Apoptoseereignis herangezogen und zeigte keine Übereinstimmung der Methoden (s. Abbildung 19E). Beim Vergleich der Apoptosemarker zwischen cleaved PARP1 und Caspase 3/7 gab es keine ausreichende Übereinstimmung ($R^2 = 0,451$) der Methoden (s. Abbildung 19F).

3.1.7.2 Identifizierung genotoxischer Substanzen im MNT MicroFlow® Assay

In diesem Ergebnisteil wurden die TK6-Zellen analog zur MultiFlow® Methode mit den gleichen Substanzen und Konzentrationen behandelt (s. Anhang) und mit dem MicroFlow® Assay analysiert.

Der durchflusszytometrische MNT ist ein anerkannter Genotoxizitätstest und wurde herangezogen, um die neue Multiplex Methode zu validieren. Eine Zunahme von MN gilt als Endpunkt für genotoxische Substanzen. Daneben wird die Induktion von HD Kernen in der Methode überwacht, deren Anstieg mit einem aneugenem Wirkmechanismus verbunden ist und daher die Differenzierung zwischen Klastogenen und Aneugenen ermöglichen soll. Nachfolgend sind in der Tabelle 13 die Ergebnisse der etablierten MNT Methode mit den resultierenden Klassifizierungsprofilen für die 31 getesteten Modellsubstanzen aufgeführt. Die MN-Frequenzen wurden herangezogen, um ihren *fold change* relativ zur mitgeführten Kontrolle zu berechnen. Die Bewertungskriterien für die relevanten Erhöhungen von

MN oder HD basierten auf Veröffentlichungen von Litron (Bryce et al. 2011 und 2014) unter Berücksichtigung des durch den OECD anerkannten Zytotoxizitätslimit von $<55 \pm 5\%$ (RNC).

Tabelle 13: Übersicht der Ergebnisse im MNT MicroFlow® Assay nach 4h und 24h Behandlung der TK6-Zellen mit 31 Modellsubstanzen.

Substanz	MoA*	Mikronukleus Induktion				Klassifizierung***	
		Experiment 1		Experiment 2		Genotoxisch	Hypodiploidie
		4h	24h	4h	24h		
Imatinib	NG	-	-	-	-	Nein	Nein
CCCP	NG	-	+	-	-	Ja	Nein
Tunicamycin	NG	+	+	-	-	Ja	Ja
Caffein	NG	-	-	-	-	Nein	Nein
Brefeldin-A	NG	+	-	-	-	Nein	Nein
Thapsigargin	NG	-	+	-	+	Ja	Nein
NaCl	NG	-	-	-	-	Nein	Nein
Ofloxacin	NG	-	-	-	-	Nein	Nein
Lovastatin	NG	-	-	-	-	Nein	Nein
D-Mannitol	NG	-	-	-	-	Nein	Nein
Dexamethason	NG	-	-	-	-	Nein	Nein
Diethylstilbestrol	A	+	+	+	-	Ja	NE
Nocodazol	A	+	+	+	+	Ja	Ja
Mebendazol	A	-	+	-	+	Ja	NE
AMG-900	A	+	+	+	+	Ja	NE
Carbendazim	A	+	+	+	-	Ja	Ja
Griseofulvin	A	+	+	+	-	Ja	Ja
Vinblastin	A	+	+	-	+	Ja	Ja
Noscapin	A	+	-	+	+	Ja	NE

Substanz	MoA*	Mikronukleus Induktion				Klassifizierung***	
		positiv (+) oder negativ (-)**					
		Experiment 1		Experiment 2		Genotoxisch	Hypodiploidie
		4h	24h	4h	24h		
Paclitaxel	A	+	+	+	+	Ja	Ja
EMS	K	+	-	+	+	Ja	Nein
Cisplatin	K	+	+	-	+	Ja	Ja
4-Nitroquiunolin	K	-	+	+	+	Ja	Ja
5-Fluorouracil	K	+	+	+	+	Ja	Ja
Hydrogenperoxid	K	-	-	+	-	NE	Nein
Etoposid	K	-	+	+	+	Ja	Nein
MMS	K	+	-	+	-	Ja	Ja
Hydroxyurea	K	+	+	+	+	Ja	Ja
Camptothecin	K	+	+	+	+	Ja	Ja
Benzo[a]pyren	K	-	•	+	•	NE	Nein
Cyclophosphamid	K	+	•	+	•	Ja	Ja

** : Kriterium positives Ergebnis induzierter Mikrokern basierend auf Bryce et al. 2014:

“+“: >3 fold change; “-“: <3 fold change; “•“: 4h Exposition bei S9-mix

***: Klassifizierungsprofil: Genotoxisch = ≥ 3 fold increase an Mikrokernen (Bryce et al. 2014);

Aneugene Signatur: ≥ 10 fold increase hypodiploider Kerne (Bryce et al. 2011)

Abkürzung: NE, Nicht eindeutig; CCCP, Carbonylcyanid-3-chlorphenylhydrazon;

EMS, Ethylmethansulfonat; MMS, Methylmethansulfonat

Die insgesamt neun untersuchten aneugenen Substanzen, Nocodazol (NOC), Mebendazol (MEB), Diethylstilbestrol (DES), AMG-900, CBD, GF, VB, NOS und PT zeigten in beiden Replikaten eine signifikante MN-Induktion (>3 fold change) gegenüber der 1%-igen DMSO Kontrolle. Konsistente Zunahmen der MN-Frequenzen wiesen nahezu alle Klastogene auf: EMS, CS, 4-NQO, 5-FU, ETO, Methylmethansulfonat (MMS), HU, Camptothecin (CTH) und CP. Nicht eindeutige Ergebnisse wurden mit H₂O₂ und BP erzielt, die nach 24h nur in einem biologischen Replikat eine signifikante Zunahme von MN aufwiesen. Ebenso wurden positive

Ergebnisse für die nicht-genotoxischen Substanzen CCCP, TG und TC beobachtet, die deutlich einen MN-Anstieg in Relation zur Kontrolle erzeugten.

Ein Anstieg von HD Kernen kann mit einem aneugenen MoA assoziiert werden und gilt als genotoxischer Endpunkt in der MicroFlow[®] Methode. Die quantitative Veränderung der HD Zellen gegenüber der Kontrolle unterstützten nicht eindeutig die Unterscheidung von Klastogenen und Aneugenen. Die Aneugene DES, MEB, AMG-900 und NOS induzierten keine wesentlichen Zunahmen hypodiploider Kerne, während die nicht-genotoxischen Substanzen TC und die Klastogene CS, 4-NQO, 5-FU, MMS, HU, CTH und CP gegen die Erwartungen eine ≥ 10 -fache Erhöhung Chromosomenverlust abgeleitete Kerne verursachten.

3.2 Teil 2: Identifizierung mechanistischer Biomarkern zur Charakterisierung von Genotoxinen

Angelehnt am ersten Ziel und vor dem Hintergrund, Möglichkeiten zur Überwindung der aufgezeigten Limitationen zu schaffen, wurden weitere mechanistische Biomarker und *in vitro* Tools etabliert.

Um das Potential ausgewählter mechanistischer Biomarker auf Gen- und Proteinlevel zuverlässig aufzudecken, wurden die TK6-Zellen hinreichend mit genotoxischen (Klastogene/Aneugene) und nicht-genotoxischen Substanzen getestet und unter Verwendung der qPCR, QGP Methode, ELISA und HCI-Technologie Dosis-Wirkungsbeziehungen aufgestellt.

Das Ziel war es, Gemeinsamkeiten innerhalb der MoA-Gruppen und Unterschiede zwischen den verschiedenen Substanzgruppen und der Kontrolle zu identifizieren, um künftig Wirkstoffkandidaten mit einem unbekanntem Wirkmechanismus hinsichtlich ihres genotoxischen Potentials zu charakterisieren.

3.2.1 Genexpressionsuntersuchungen mittels qPCR

Mit der qPCR wurde untersucht, ob einzelne DNA-schadensassoziierte Gene das Potential haben, die drei MoA-Gruppen (Klastogen/Aneugen/nicht-Genotoxin) zu detektieren und einzuteilen. Die TK6-Zellen wurden mit acht verschiedenen Modellsubstanzen (s. Tabelle 9), mit jeweils drei aufsteigenden Testkonzentration, für 4h (+20h Erholungsphase) und 24h behandelt, um anschließend deren Einfluss auf die Genexpression der Gene *RAD17*, *FANCD2*, *CLIP-170*, *TREX1*, *TP53I3*, *ATR*, *PRKDC* und *NFE2L2* zu untersuchen (s. Abbildung 20-21). Die Normalisierung der Gene erfolgte auf die Referenzgene *PPIA*, *TFRC* und *18s*. *GAPDH* wurde aufgrund der teilweisen starken Expressionsdynamik nach Substanzbehandlung ausgeschlossen.

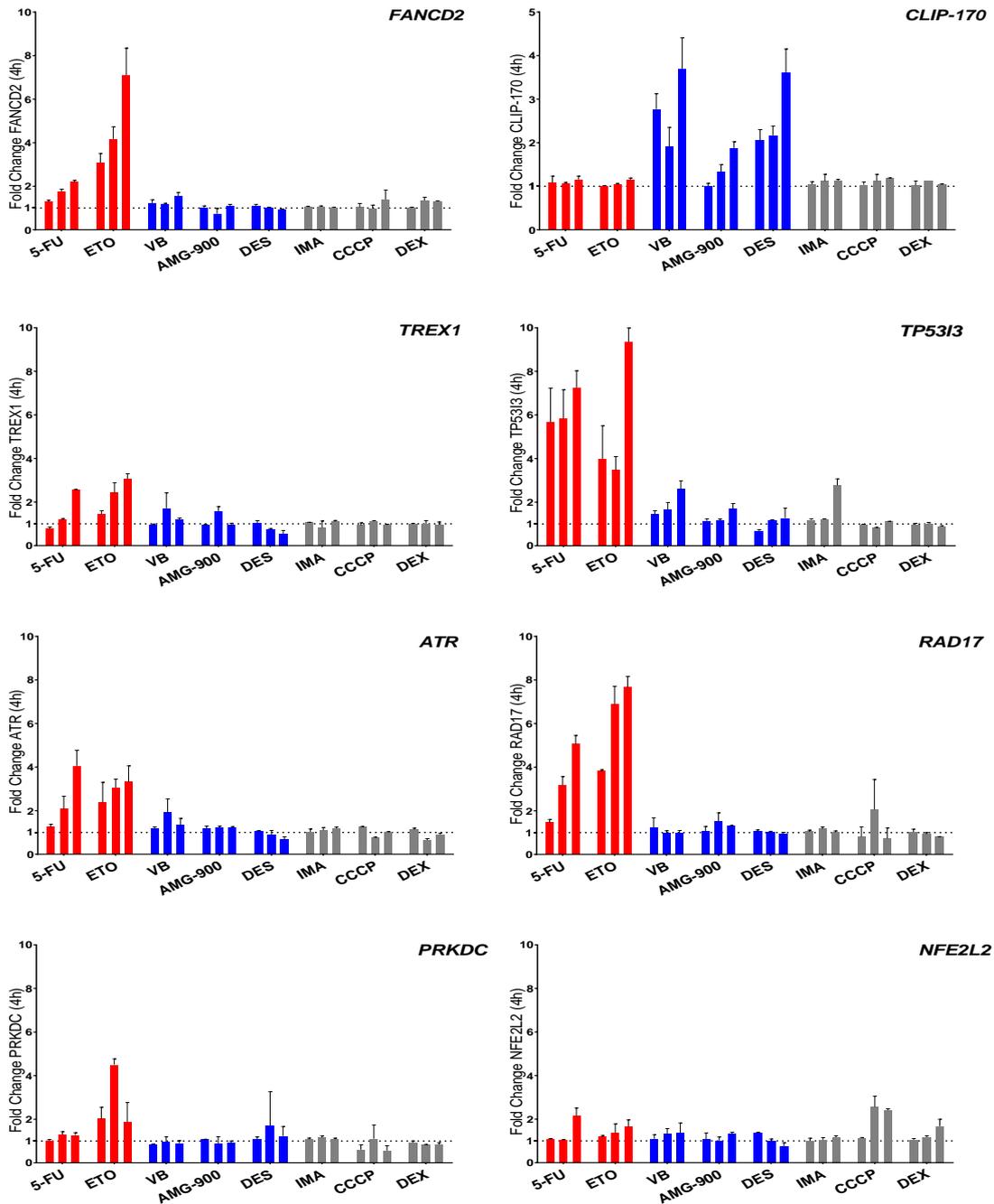


Abbildung 20: Substanz-induzierte Genexpressionsanalyse nach 4h Behandlung.

Gezeigt wird der *fold change* der untersuchten Schadens-assoziierten Gene nach einer 4h Behandlung der TK6-Zellen mit insgesamt neun untersuchten Modellsubstanzen. Untersucht wurden Dosis-Wirkungsbeziehungen, die als drei Balken pro Substanz aufgetragen wurden, da jede eine unterschiedliche Konzentration (von links nach rechts: niedrig, mittel, hoch) mit deren jeweiligen Standardabweichung aus zwei biologischen Replikaten darstellt (Mean+SD). Die Substanzen sind nach ihrem MoA kodiert: Klastogene = rote Balken, Aneugene = blaue Balken und Nicht-Genotoxine = graue Balken. Die Kontrolle (1% DMSO) wird durch die gestrichelte Linie dargestellt. 5-FU: 5-Fluorouracil, ETO: Etoposid, VB: Vinblastin, DES: Diethylstilbestrol, IMA: Imatinib, CCCP: Carbonylcyanid m-chlorophenyl-hydrazon, DEX: Dexamethason.

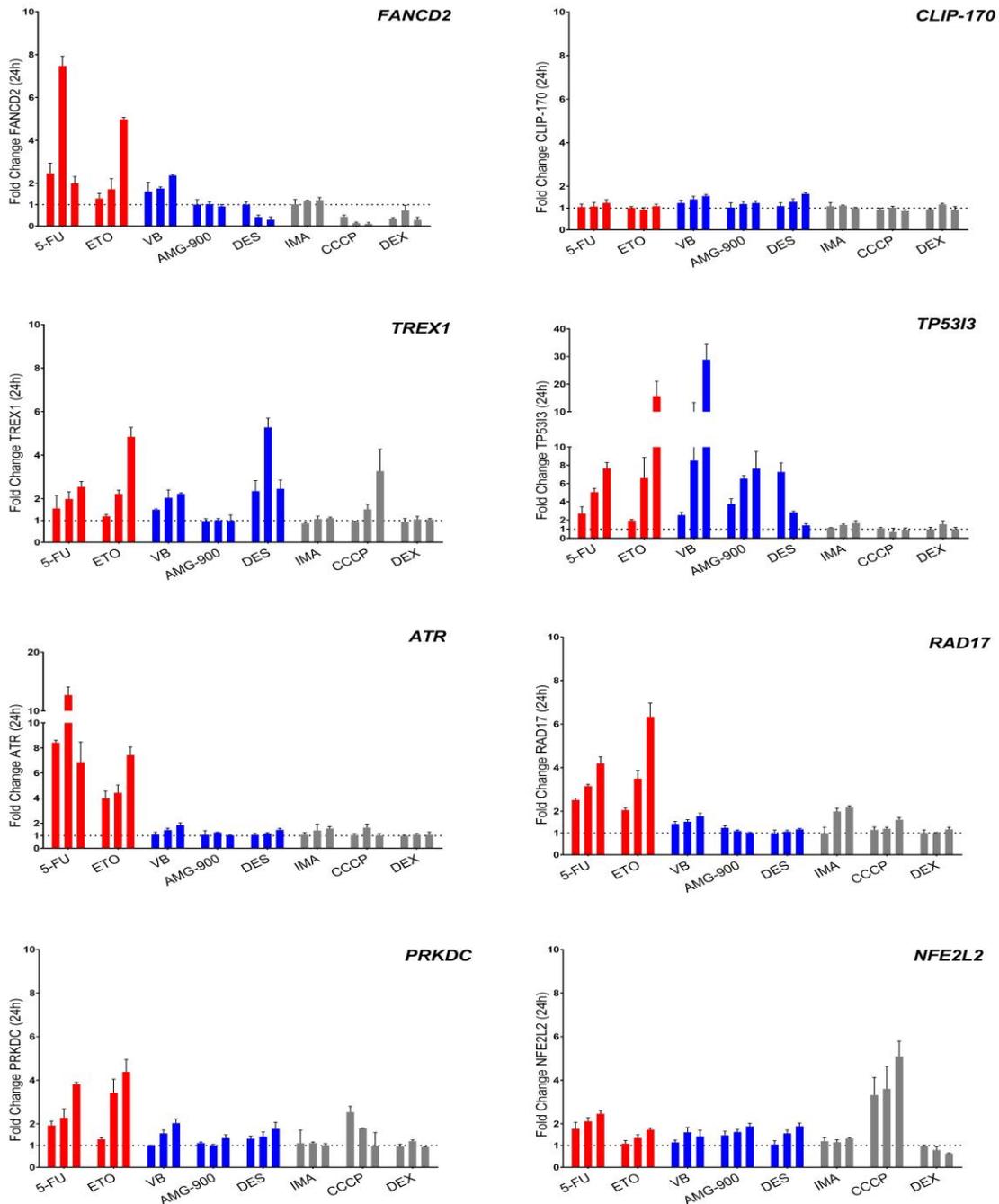


Abbildung 21: Substanz-induzierte Genexpressionsanalyse nach 24h Behandlung.

Gezeigt wird der *fold change* der untersuchten Schadens-assoziierten Gene nach einer 24h Behandlung der TK6-Zellen mit insgesamt neun untersuchten Modellsubstanzen. Untersucht wurden Dosis-Wirkungsbeziehungen, die als drei Balken pro Substanz aufgetragen wurden, da jede eine unterschiedliche Konzentration (von links nach rechts: niedrig, mittel, hoch) mit deren jeweiligen Standardabweichung aus zwei biologischen Replikaten darstellt (Mean+SD). Die Substanzen sind nach ihrem MoA kodiert: Klastogene = rote Balken, Aneugene = blaue Balken und Nicht-Genotoxine = graue Balken. Die Kontrolle (1% DMSO) wird durch die gestrichelte Linie dargestellt. 5-FU: 5-Fluorouracil, ETO: Etoposid, VB: Vinblastin, DES: Diethylstilbestrol, IMA: Imatinib, CCCP: Carbonylcyanid m-chlorophenyl-hydrazon, DEX: Dexamethason.

Untersuchung von FANCD2

FANCD2 wird im Rahmen von DNA-Schäden und insbesondere mit Replikationsstress assoziiert bzw. aktiviert (Monoubiquitinierung). Zum frühen Zeitpunkt induzierte ETO eine signifikante Antwort in den TK6-Zellen (s. Abbildung 20). Die Gen-Aktivität war nach 24h spezifisch für die beiden untersuchten Klastogene, da 5-FU ebenso *FANCD2* hochregulierte (7-fach höher als die Kontrolle). Die höchsten Testkonzentrationen der untersuchten Aneugene VB und AMG-900 und die Nicht-Genotoxine Imatinib (IMA), CCCP und Dexamethason (DEX) führten zu einer moderaten Hochregulation, wobei VB mit bis zu einem 4-fachen Anstieg am stärksten *FANCD2* induzierte.

Untersuchung von CLIP-170

Dem *CLIP-170* Gen wird eine Rolle innerhalb der MT-Dynamik während der Polymerisation (MT-Wachstum) zugeschrieben. Aus der Abbildung 20 geht hervor, dass hochregulierte Expressionslevel von *Clip-170* zunächst mit aneugenischen Substanzen (VB, AMG-900 und DES) assoziiert waren (3-fach über die Kontrolle). Nach 24h wurde keine weitere mechanistische Beziehung mit Aneugenität beobachtet, da das Gen im Vergleich zur Kontrolle und den anderen mechanistischen Gruppen nicht mehr induziert wurde (s. Abbildung 21). Die klastogenen Verbindungen 5-FU und ETO sowie die Nicht-Genotoxine IMA, CCCP und DEX zeigten keinen Effekt auf *Clip-170*.

Untersuchung von TREX1

Die Exonuklease *TREX1* ist speziell in der Reparatur von SSB involviert. Die Substanz-induzierte Expressionsuntersuchung von der Exonuklease demonstrierte, dass nach 4h (s. Abbildung 20) vorrangig Genotoxine das Gen hochreguliert haben (vier von fünf) und nach 24h alle MoA-Gruppen einen Effekt auf das Gen aufwiesen (s. Abbildung 21).

Untersuchung von TP53I3

Wie aus Abbildung 20 hervorgeht, stieg die Expression von TP53I3 mit Ausnahme von DES bei den anderen Genotoxinen zum frühen Analysezeitpunkt gering an. Nach 24h zeigten fünf von fünf Genotoxine einen starken Effekt auf TP53I3 (bis zum 40-fachen

über die Kontrolle), wohingegen die nicht-genotoxischen Substanzen die Gen-Antwort nicht beeinflussten (s. Abbildung 21).

Untersuchung von ATR

Eine Hochregulation von *ATR* war nach 4h MoA-unspezifisch, da klastogene und aneugene Verbindungen die Aktivität des Gens moderat beeinflussten (s. Abbildung 20). Zum späten Zeitpunkt war eine Abgrenzung nach Behandlung mit klastogenen Substanzen möglich, welche die Expression von *ATR* konzentrationsabhängig erhöhten (s. Abbildung 21).

Untersuchung von RAD17

Das Checkpoint-regulierende Gen *RAD17* war zu beiden Analysezeitpunkten nach Behandlung mit den Klastogenen ETO und 5-FU am stärksten hochreguliert (s. Abbildung 20). Die aneugenen und nicht-genotoxischen Verbindungen wiesen zu beiden Zeitpunkten moderate Anstiege auf (s. Abbildung 21).

Untersuchung von PRKDC

PRKDC wird im Rahmen von DNA-Schäden, insbesondere bei Replikationsstress, aktiviert. Wie aus den Abbildung 20-21 hervorgeht, war die Gen-Antwort zu beiden Behandlungszeitpunkten MoA-unspezifisch und ermöglichte keine eindeutige Unterscheidung der Substanzgruppen.

Untersuchung von NFE2L2

Der Transkriptionsfaktor *NFE2L2* ist mit oxidativem Stress assoziiert und wurde nach 4h, mit Ausnahme von IMA, von jeder Testsubstanz aktiviert (s. Abbildung 20). Nach 24h war die Genaktivität bei CCCP am stärksten ausgeprägt (s. Abbildung 21).

3.2.2 Genexpressionsuntersuchungen mittels QGP Methode

Die QGP Methode stellt eine moderne RNA-Quantifizierungsmethode dar, in der 67 ausgewählte DNA-schadensassoziierte Gene bezüglich ihres Potentials, genotoxische Wirkungsweisen zu differenzieren, untersucht wurden.

Die TK6-Zellen wurden hinreichend mit 18 verschiedenen Modellsubstanzen (s. Tabelle 7) in Einzeldosis für 4h (+20h Erholungsphase) und 24h behandelt, um deren Einfluss auf die Genexpression der in Tabelle 8 aufgeführten Gene zu untersuchen. Die Genexpressionen wurden über die Referenzgene *POLR2A* und *TFRC* normalisiert,

da das Referenzgen *HPRT1* teilweise eine große Dynamik innerhalb der Testsubstanzen aufwies. Um zunächst eine globale Übersicht der verschiedenen Expressionsstärken zu erhalten, sind die Heat Maps der beiden Analysezeitpunkte 4h (s. Abbildung 22) und 24h (s. Abbildung 23) dargestellt.

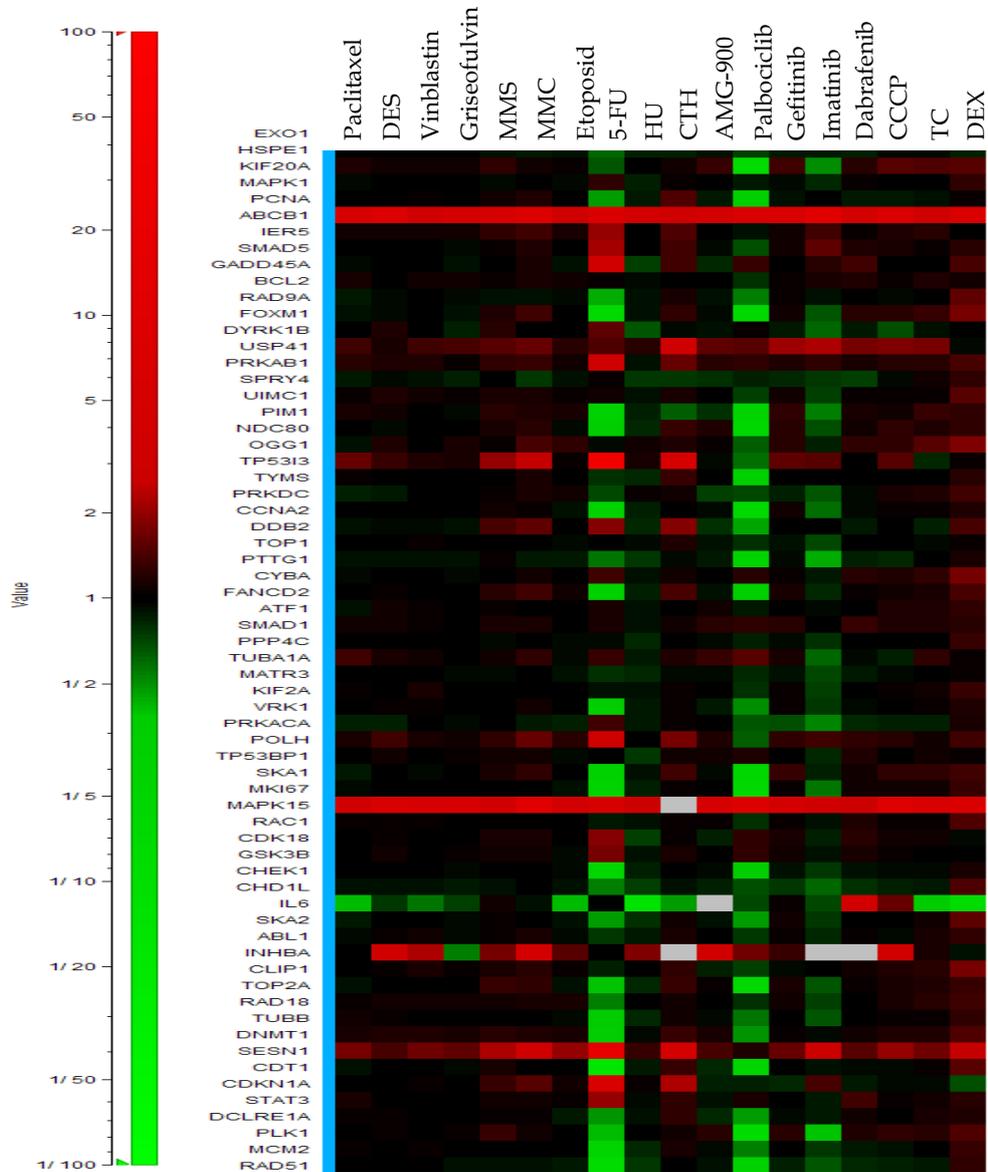


Abbildung 22: Genexpressionsprofile potentieller Markergene zur Klassifizierung genotoxischer Substanzen.

Expressionsstärken (grün: gering; rot: stark) der analysierten Proben im QGP Assay nach einer 4-stündigen Behandlung der TK6-Zellen mit 18 Modellsubstanzen gegenüber der Kontrolle (1% DMSO). Untersucht wurde jeweils eine Einzeldosis im biologischen Replikate und dargestellt sind die berechneten Mittelwerte von den normierten Werten gegenüber der Kontrolle auf die Referenzgene *POLR2A* und *TFRC*. DES: Diethylstilbestrol, MMS: Methylmethansulfonat, MMC: Mitomycin C, 5-FU: 5-Fluorouracil, HU: Hydroxyurea, CTH: Camptothecin, CCCP: Carbonylcyanid m-chlorophenylhydrazon, TC: Tunicamycin, DEX: Dexamethason.

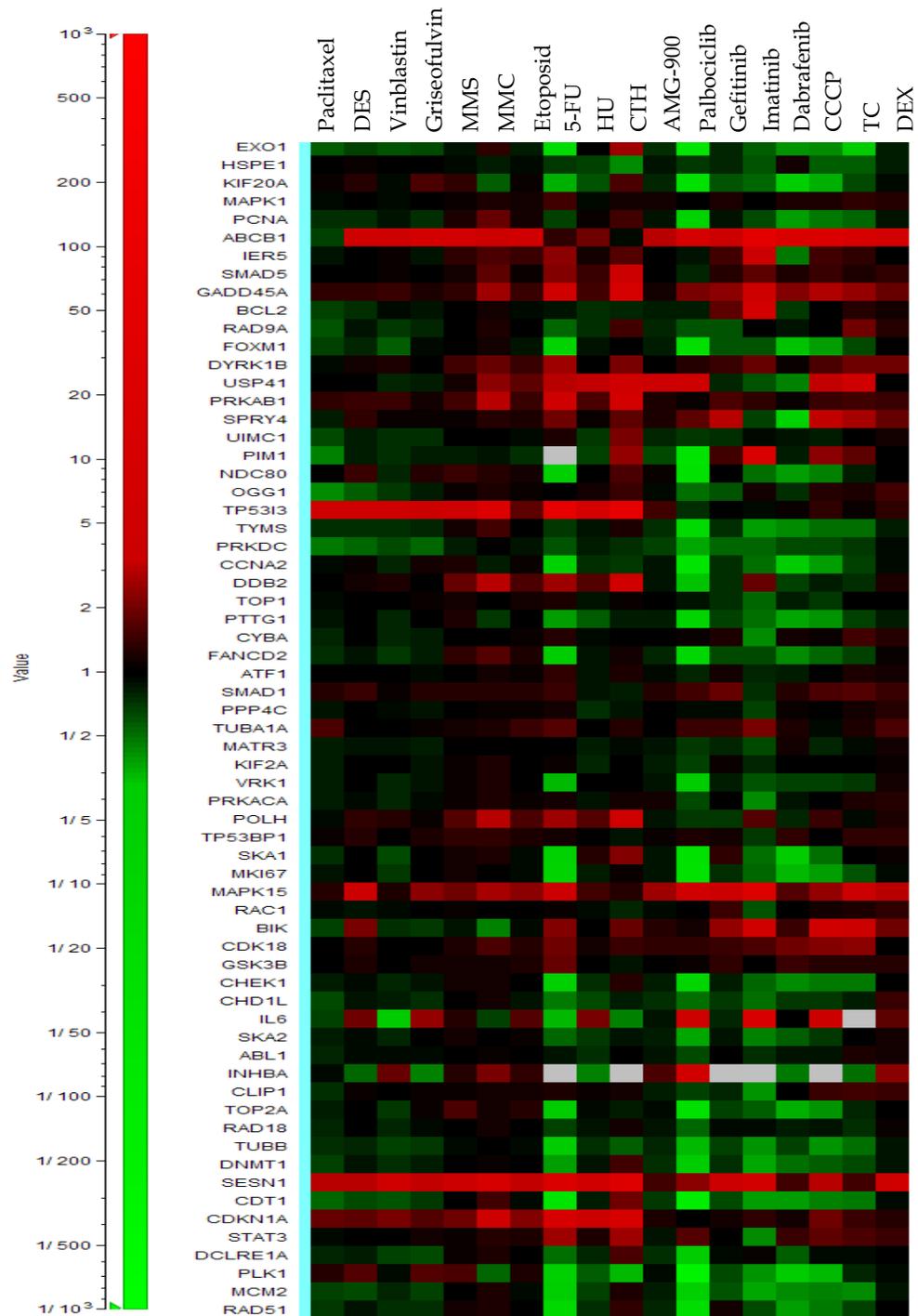


Abbildung 23: Genexpressionsprofile potentieller Markergene zur Klassifizierung genotoxischer Substanzen.

Expressionsstärken (grün: gering; rot: stark) der analysierten Proben im QGP Assay nach einer 24-stündigen Behandlung der TK6-Zellen mit 18 Modellsubstanzen. Untersucht wurde jeweils eine Einzeldosis im biologischen Replikat und dargestellt sind die berechneten Mittelwerte von den normierten Werten gegenüber der Kontrolle auf die Referenzgene POLR2A und TFRC. DES: Diethylstilbestrol, MMS: Methylmethansulfonat, MMC: Mitomycin C, 5-FU: 5-Fluorouracil, HU: Hydroxyurea, CTH: Camptothecin, CCCP: Carbonylcyanid m-chlorophenyl-hydrazon, TC: Tunicamycin, DEX: Dexamethason.

Wie sich der Abbildung 23 entnehmen lässt, wurden die Apoptosemarker (*BIK* und *GSK3B*) zum späten Zeitpunkt der Genexpression durch die Nicht-Genotoxine stark induziert (7-fach über der Kontrolle), wohingegen die Genotoxine nur einen leichten Einfluss auf die Gen-Aktivität aufzeigten (2-fach über der Kontrolle). Die aneugene MoA-Gruppe zeigte vorrangig nach 24h eine Herunterregulation von *BIK* (<1). Das DNA-Reparatur und oxidativem Stress zugeordnete Gen *Sestrin 1* wurde nach 4h und 24h in allen drei MoA-Gruppen stark hochreguliert (s. Abbildung 22-23). Die 8-Oxoguanin DNA Glycosylase 1 *OGG1* reagierte nach 4h am stärksten und lag nach Behandlung mit Nicht-Genotoxinen hoch exprimiert vor. Nach 24h wurde beobachtet, dass primär die aneugen Substanzen die Genaktivität von *OGG1* herunterreguliert haben.

Aus Abbildung 23 geht weiter hervor, dass nahezu alle untersuchten Substanzen, die Gene *EXO1*, *PRKDC*, *FANCD2*, und *Rad51* runterreguliert sowie *TP53BP1*, *ABCB1*, und *MAPK15* hochreguliert haben. Die untersuchten Markergene haben keine Einteilungsmöglichkeiten zugelassen. Das Gen *POLH* wurde nach einer 24h Behandlung mit klastogenen Substanzen stark hochreguliert, wohingegen die Gene *PCNA* und *TYMS* deutlich von nahezu allen Nicht-Genotoxinen runterreguliert wurden. Die Expression der DNA-schadens-assoziiierter Genen zeigt, dass nahezu alle Klastogene einen Effekt auf das Gen *DDB2* aufzeigten. Die Zellzyklus-assoziierten Gene wie *CDKN1A*, *TP53I3*, *PIM1* offerierten zum späten Zeitpunkt Unterscheidungen zwischen genotoxischen und nicht-genotoxischen Verbindungen. Besonders die Induktion von *TP53I3* wurde stark mit Genotoxizität in Verbindung gebracht, da nach 24h 11 von 12 Genotoxinen signifikante Gen-Antworten induzierten.

3.2.2.1 Statistische Bewertung der Gene und Etablierung eines Vorhersagemodells

Die Genexpressionsdaten aus den vorangestellten Heat Maps wurden in der Statistikapplikation JMP® 13 nach Ihren MoA-Gruppen (Klastogen, Aneugen und Nicht-Genotoxin) und den entsprechenden Behandlungszeitpunkten (4h und 24h) kategorisiert eingelesen. Mit den Daten wurden zunächst univariate Analysen durchgeführt, um jedes Gen aus dem untersuchten Panel von 67 Genen (s. Tabelle 8) zu evaluieren und somit einen nützlichen Marker zur Einteilung von Substanzen in

eine der drei MoA-Gruppen identifizieren zu können. Bei der Bewertung der Gene wurde in der Statistikplattform iterativ der MoA gegenüber dem jeweiligen Markergen aufgetragen und analysiert. Erfolgversprechende Gene wurden miteinander kombiniert und multivariat analysiert, um hinterher ein Vorhersagemodell zur Einteilung von unbekanntem Wirkstoffkandidaten zu konstruieren.

Die Datendarstellung der durchgeführten univariaten Analysen führte jeweils in einer graphischen Beschreibung mit relevanten Parametern, welche die Güte des Modells oder ferner die Klassifikationsstärke des Gens aufzeigten. Die nachfolgenden Abbildungen 24-25 stellen die Bewertung vom Gen *TP53I3* dar, die illustrativ für jede Bewertung der insgesamt 67 untersuchten Gene steht.

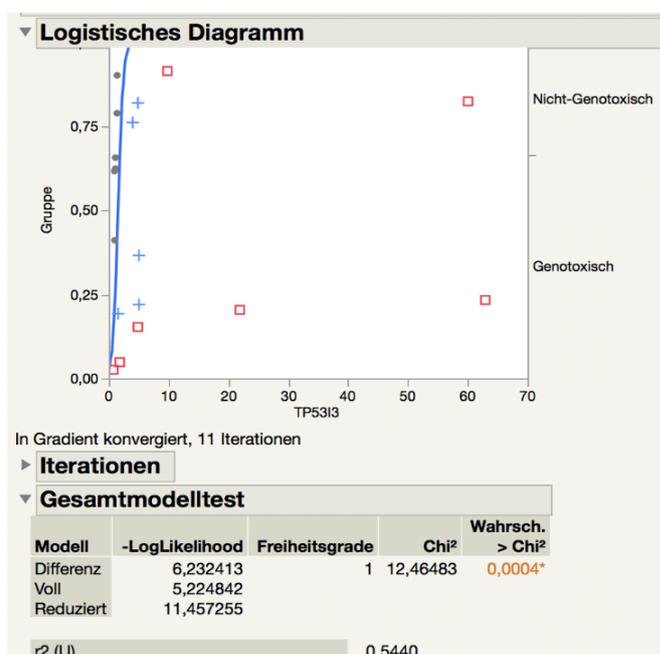


Abbildung 24: Univariete Analyse am Beispiel von TP53I3.

Zur Identifizierung eines potentiellen Markers zur MoA-Klassifizierung wurden die 67 untersuchten Gene univariat mittels der Statistikapplikation JMP® 13 untersucht, wie hier am Beispiel von *TP53I3* gezeigt. Bei der Bewertung der Gene wurde iterativ der MoA gegenüber dem jeweiligen Markergen aufgetragen. Das Gen *TP53I3* zeigte mit einem Pseudo-R²-Wert von 0,54 bereits eine sehr gute Klassifikationsstärke auf, um Genotoxine von Nicht-Genotoxinen zu differenzieren.

Die Konfusionsmatrix in der Abbildung 25 diente als weitere Möglichkeit den identifizierten Marker *TP53I3* zu evaluieren, bei dem die wahren Genotoxine

gegenüber den klassifizierten Gruppen betrachtet wurden und somit die Vorhersagegenauigkeit des Gens aufzeigte.

		Training	
		Vorhergesagte Anzahl	
Beobachtet Gruppe		Genotoxisch	Nicht- Genotoxisch
	Genotoxisch		10
Nicht-Genotoxisch		0	6

Abbildung 25: Vorhersagewerte am Beispiel von TP53I3.

Auf Basis eines guten Pseudo-R²-Werts von 0,54 (s. Abbildung 24) wurde *TP53I3* als Kandidat zur MoA-Klassifizierung identifiziert und zeigte nach weiterer Evaluierung eine sehr gute Vorhersagegenauigkeit. Mit *TP53I3* wurden 10 von 12 Genotoxinen und 6 von 6 Nicht-Genotoxinen korrekt charakterisiert.

Anhand der zuvor beschriebenen Bewertungsstrategie stellte sich zunächst insgesamt heraus, dass der 24-stündige Behandlungszeitpunkt mit den untersuchten Substanzen und Testkonzentrationen die besseren Einteilungsmöglichkeiten aufgrund der verschiedenen Expressionsstärken unter den MoA-Gruppen zugelassen hat, als der 4h Zeitpunkt. Dies demonstrierten die relativ niedrigen ermittelten Pseudo-R² Werte, die vorrangig zwischen 0,05-0,10 lagen. Daneben wiesen die frühen Behandlungszeitpunkte relativ geringe unterschiedliche Expressionsstärken in den MoA-Gruppen auf, die somit das Modell insgesamt instabiler gemacht hätten.

Aus dem untersuchten Gen-Panel (s. Tabelle 8) wurden die folgenden Gene mit den Vorhersagewerten aus den univariaten Analysen identifiziert und weiterführend für die Etablierung des Vorhersagemodells herangezogen:

CDKN1A (Pseudo-R²: 0,29) und *TP53I3* wurden jeweils beide stark nach der Behandlung genotoxischer Verbindungen exprimiert und haben daher eine gute Differenzierung zwischen genotoxischen und nicht-genotoxischen Substanzen zugelassen. Die hochregulierten Gene *POLH* (Pseudo-R²: 0,21), *DDB2* (Pseudo-R²: 0,15) und *TYMS* (Pseudo-R²: 0,12) waren charakteristisch, um klastogene Verbindungen zu detektieren, wohingegen Aneugene den Marker *OGG1* (Pseudo-R²: 0,22) runterreguliert haben. Die nicht genotoxischen Verbindungen regulierten vorrangig die Marker *PCNA* (Pseudo-R²: 0,15) und *KIF20A* (Pseudo-R²: 0,24) herunter und *BIK* (Pseudo-R²: 0,51) stark hoch.

Diese identifizierten Biomarker wurden in verschiedenen Kombinationen (aus 3-5 Genen) wie bei der oben beschriebenen univariaten Analyse beurteilt, die zusammen (multivariat) die besten Vorhersagen ergaben. Das Kriterium war, dass mit dem Modell die 16 untersuchten Modellsubstanzen korrekt in die jeweilige MoA-Gruppe klassifiziert worden waren, was am Ende mit der Kombination aus den fünf Genen *BIK*, *TP53I3*, *KIF20A*, *DDB2* und *OGG1* erreicht werden konnte (s. Abbildung 26).

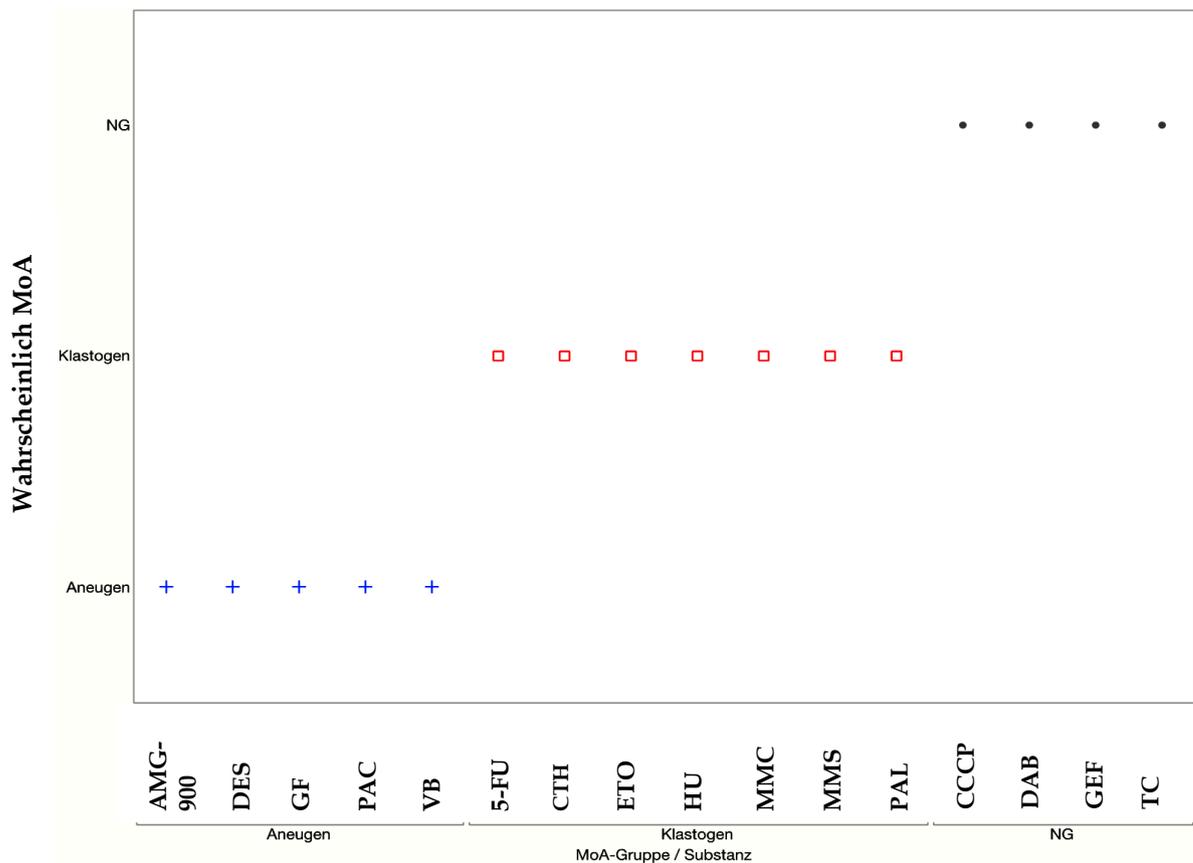


Abbildung 26: Vorhersagemodell zur Charakterisierung genotoxischer und nicht-genotoxischer Substanzen.

Etablierung des multivariaten Modells auf Basis mechanistischer Gene mittels Statistikapplikation JMP® 13. Durch univariaten Analysen wurden die Gene *BIK*, *TP53I3*, *KIF20A*, *DDB2* und *OGG1* identifiziert und kombiniert angewandt, das zu einer 100%-igen Klassifizierung der untersuchten Modellsubstanzen führte. Blau = Aneugen, Rot = Klastogen, Schwarz = Nicht-Genotoxin. DES: Diethylstilbestrol, GF: Griseofulvin, PAC: Paclitaxel, VB: Vinblastin, 5-FU: 5-Fluorouracil, CTH: Camptothecin, ETO: Etoposid, HU: Hydroxyurea, MMC: Mitomycin C, MMS: Methylmethansulfonat, PAL: Palbociclib, CCCP: Carbonylcyanid-3-chlorphenylhydrazon, DAB: Dabrafenib, DEX: Dexamethason, GEF: Gefitinib, IMA: Imatinib, TC: Tunicamycin.

Mit dem multivariaten Modell wurde eine 100%-ige Performance erreicht, da 16 von 16 Substanzen korrekt kategorisiert wurden. Allerdings könnte dies jedoch auch ein Indiz für eine Überanpassung (*Overfitting*) des Modells sein und somit die künftige Vorhersagegenauigkeit mit unbekanntem Substanzen unzuverlässiger machen. Um dies zu vermeiden und das Modell zu bewerten, wurde das Testsystem mit der LOOCV validiert (s. Abbildung 27). Im Validierungsprozess wurden HU, Palbociclib (PAL) und Gefitinib falsch klassifiziert. Die klastogenen Substanzen HU und PAL wurden jeweils beide als Nicht-Genotoxin eingestuft, wohingegen die nicht-genotoxische Substanz Gefitinib als Aneugen charakterisiert wurde. Für das etablierte Modell konnte aufgrund der zwei fehklassifizierten Genotoxine eine Sensitivität von 86% berechnet werden. Es wurde eine Spezifität von 83% ermittelt, da ein Nicht-Genotoxin von insgesamt vier falsch charakterisiert wurde. Abschließend wurden 13 von 18 Substanzen richtig kategorisiert und das Testsystem resultierte in einer Prädiktivität von 85%.

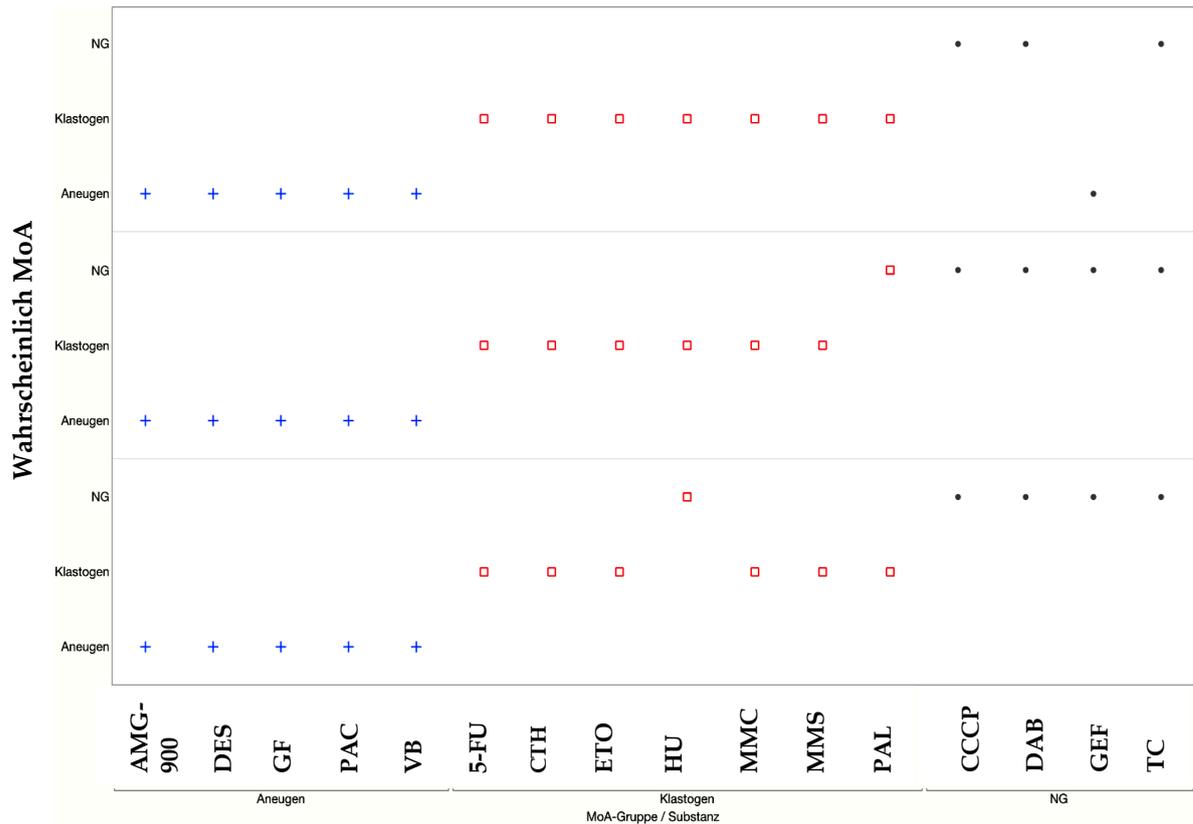


Abbildung 27: Validierung des etablierten Vorhersagemodells zur Charakterisierung genotoxischer und nicht-genotoxischer Substanzen.

Klassifikationswahrscheinlichkeiten des multivariaten Modells auf Basis der mechanistischen Gene *BIK*, *TP53I3*, *KIF20A*, *DDB2* und *OGG1*. Die 16 Modellsubstanzen wurden der Reihe nach aus dem etablierten Modell entfernt und als unbekannte Substanz *a priori* in einer der drei MoA-Gruppen kategorisiert (Leave-One-Out Kreuzvalidierung). Von den 16 Substanzen wurden HU, PAL und Gefitinib missklassifiziert. Blau = Aneugen, Rot = Klastogen, Schwarz = Nicht-Genotoxin. DES: Diethylstilbestrol, GF: Griseofulvin, PAC: Paclitaxel, VB: Vinblastin, 5-FU: 5-Fluorouracil, CTH: Camptothecin, ETO: Etoposid, HU: Hydroxyurea, MMC: Mitomycin C, MMS: Methylmethansulfonat, PAL: Palbociclib, CCCP: Carbonylcyanid-3-chlorphenylhydrazon, DAB: Dabrafenib, DEX: Dexamethason, GEF: Gefitinib, IMA: Imatinib, TC: Tunicamycin.

Zur weiteren Evaluierung des Modells wurden als „unbekannte“ Verbindungen DEX und IMA in das Klassifikationsmodell eingelesen. Aus Abbildung 28 geht hervor, dass die beiden Testverbindungen korrekt als Nicht-Genotoxine eingeteilt werden konnten.

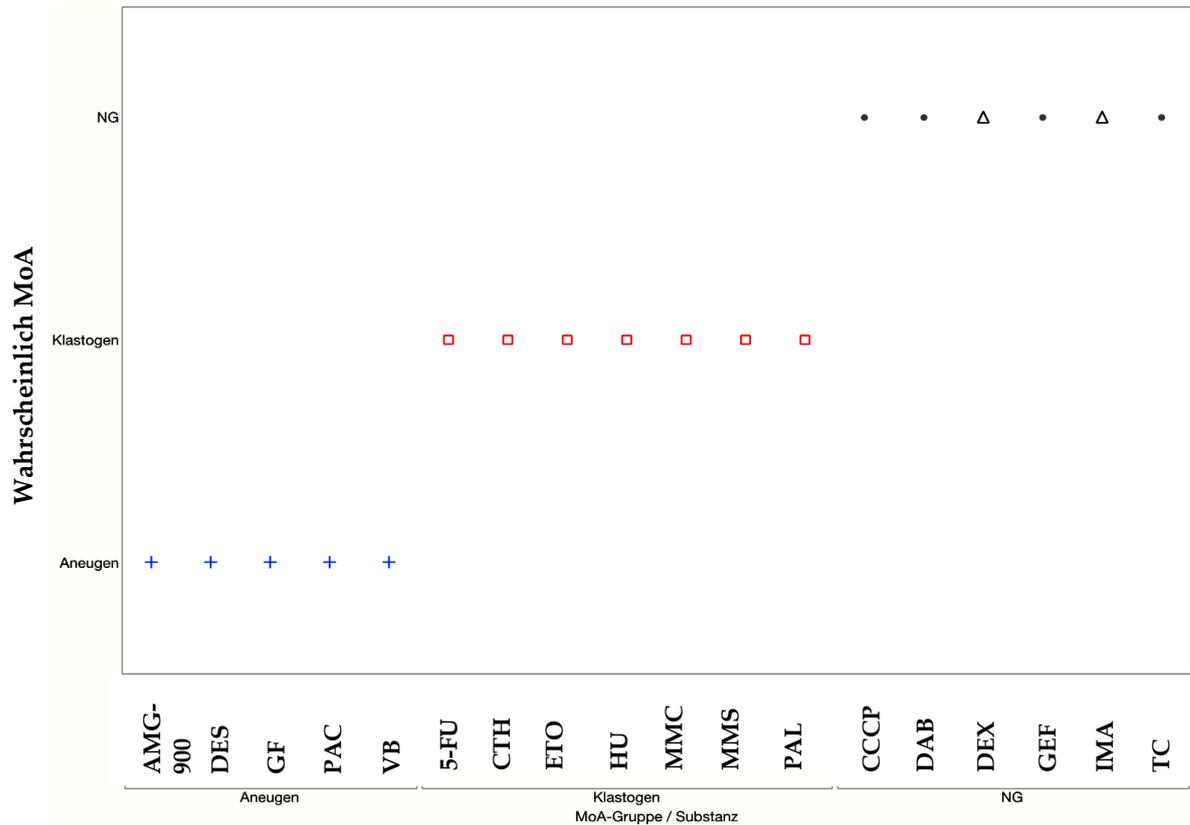


Abbildung 28: Validierung des etablierten Vorhersagemodells zur Charakterisierung "unbekannter" Substanzen.

Mit dem etablierten Vorhersagemodell aus den mechanistischen Genen *BIK*, *TP53I3*, *KIF20A*, *DDB2* und *OGG1* wurden zwei "unbekannte" Substanzen DEX und IMA in das Modell eingelesen und korrekt als Nicht-Genotoxine kategorisiert (Symbol Dreieck). Blau = Aneugen, Rot = Klastogen, Schwarz = Nicht-Genotoxin. DES: Diethylstilbestrol, GF: Griseofulvin, PAC: Paclitaxel, VB: Vinblastin, 5-FU: 5-Fluorouracil, CTH: Camptothecin, ETO: Etoposid, HU: Hydroxyurea, MMC: Mitomycin C, MMS: Methylmethansulfonat, PAL: Palbociclib, CCCP: Carbonylcyanid-3-chlorphenylhydrazon, DAB: Dabrafenib, DEX: Dexamethason, GEF: Gefitinib, IMA: Imatinib, TC: Tunicamycin.

3.2.3 Proteinveränderungen zur Charakterisierung von Genotoxizität

3.2.3.1 Untersuchung von p21 mittels ELISA

Aufgrund der engen Interaktion von p21 mit p53 im Rahmen von DNA-Schäden, wurde p21 mittel Hilfe des ELISA detektiert und die Ergebnisse als *fold change* in der folgenden Abbildung 29 dargestellt. Mit Ausnahme von 5-FU, bei einer mittleren Testkonzentration von 44,2 μM , wurde kein Anstieg der Proteinkonzentration bei den restlichen Substanzbehandlungen zum frühen Zeitpunkt beobachtet.

Nach 24h induzierten alle Aneugene, zwei von fünf Klastogenen und ein von drei Nicht-Genotoxinen das Protein p21.

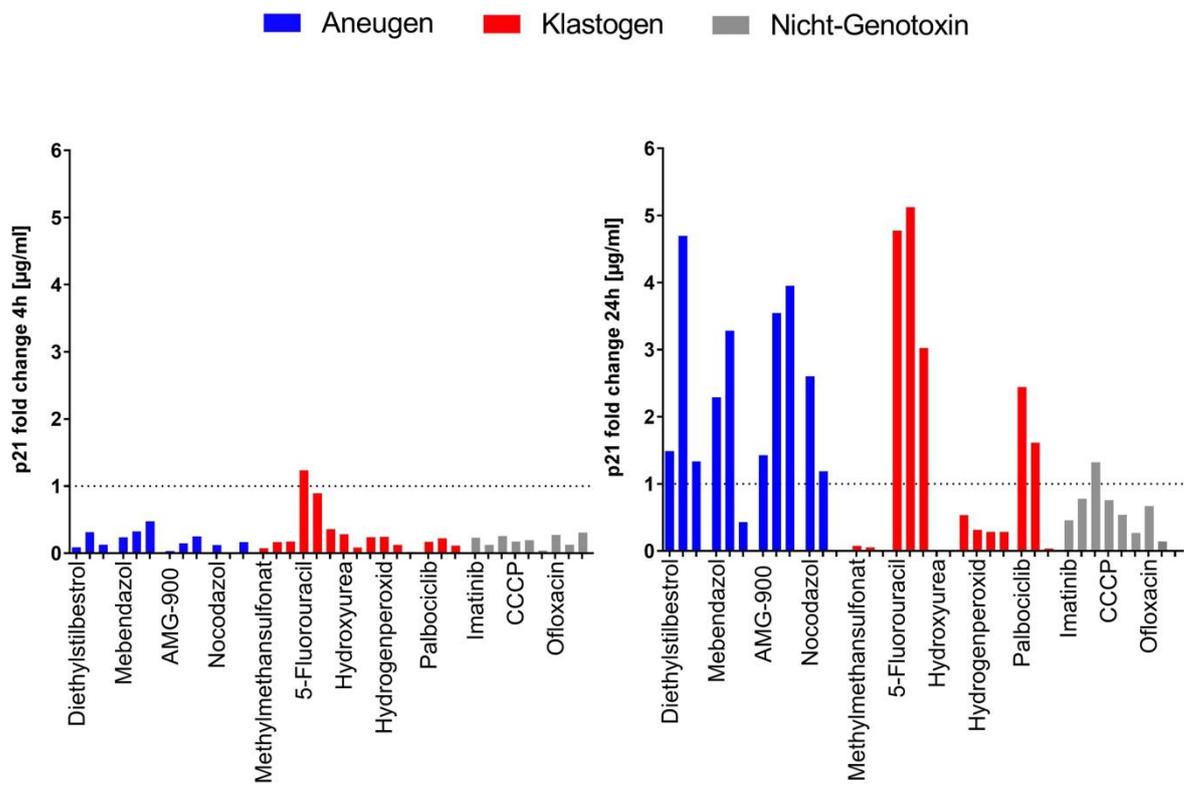


Abbildung 29: Proteinaktivität und Performance von p21.

Substanz-induzierte Antwort des Proteins p21 bezogen auf die Gesamtproteinmenge nach einer 4- (links) und 24-stündigen (rechts) Behandlung der TK6-Zellen mit insgesamt 12 untersuchten Modellsubstanzen. Untersucht wurden Dosis-Wirkungsbeziehungen, die als drei Balken pro Substanz aufgetragen wurden, da jede eine unterschiedliche Konzentration darstellt (von links nach rechts: niedrig, mittel, hoch). Die Substanzen sind nach ihrem genotoxischem MoA kodiert: Klastogene = rote Balken, Aneugene = blaue Balken und Nicht-Genotoxine = graue Balken. Die Kontrolle (1% DMSO) wird durch die schwarze Linie dargestellt. CCCP: Carbonylcyanid-3-chlorphenylhydrazon.

3.2.3.2 Untersuchung von PTMs mittels HCI

Mit Hilfe der HCI-Technologie wurden ausgewählte DNA-Schadensantwort-assoziierte Proteine (PTMs) jeweils nach 4h und 24h in zwei unabhängigen Experimenten einzeln voneinander detektiert, um zu untersuchen, ob sie für die Identifizierung und Charakterisierung genotoxischer Substanzen geeignet sind.

Die Abbildungen 30-31 zeigen die Bildaufnahmen der immunfluoreszenz-gefärbten TK6-Zellen, welche die Substanz-induzierten Proteinantworten der untersuchten PTMs im Vergleich zur Kontrolle darstellen.

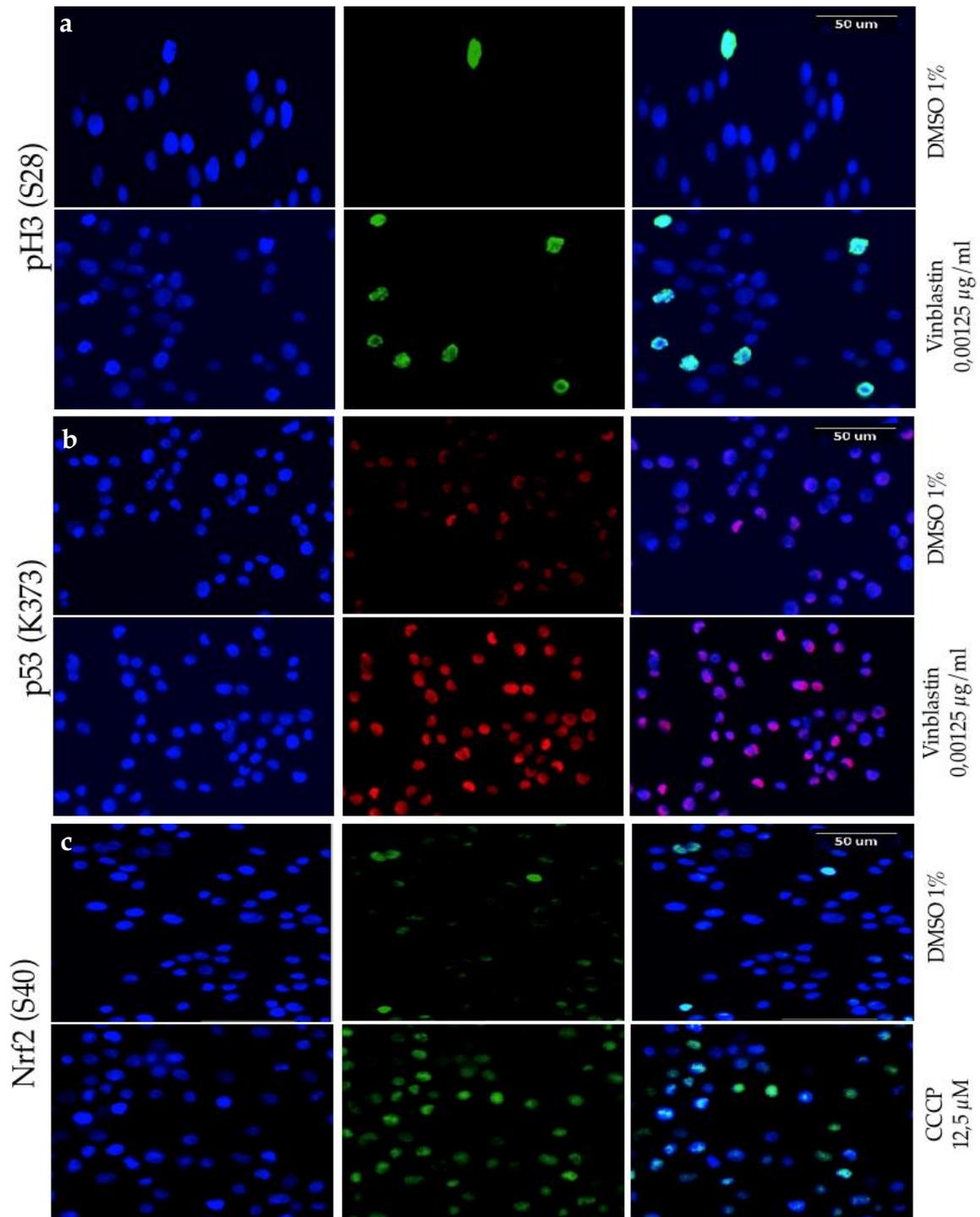


Abbildung 30: Untersuchungen von Immunfluoreszenz-gefärbten TK6-Zellen zur Identifizierung proteomischer Biomarker.

Gezeigt sind Substanz-induzierte Proteinantworten der TK6-Zellen von a) pH3 (S28), b) p53 (K373), c) Nrf2 (S40) (Eichbalken 50µm). Unter Verwendung eines 20x Objektiv am High-Content-Imager wurden die Zellkerne über DAPI (blau) und die Proteine über AlexaFluor® 488 (grün) oder AlexaFluor® 647 (rot) detektiert.

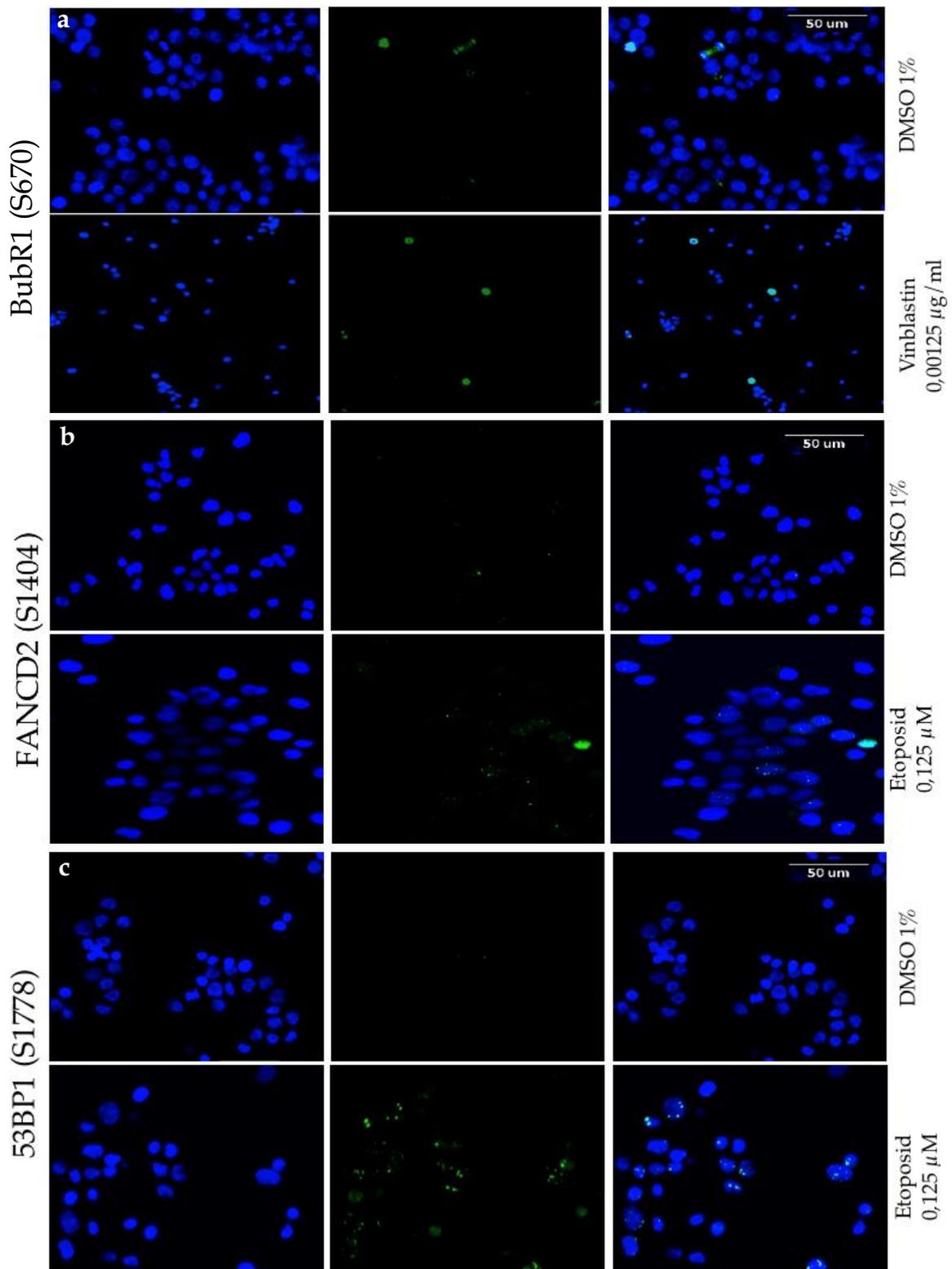


Abbildung 31: Untersuchungen von Immunfluoreszenz-gefärbten TK6-Zellen zur Identifizierung proteomischer Biomarker.

Gezeigt sind Substanz-induzierte Proteinantworten der TK6-Zellen von a) BubR1 (S670), b) FANCD2 (S1404) und c) 53BP1 (S1778) (Eichbalken 50µm). Unter Verwendung eines 20x Objektiv am High-Content-Imager wurden die Zellkerne über DAPI (blau) und die Proteine über AlexaFluor® 488 (grün) detektiert.

Die Ergebnisse der Dosis-Wirkungsbeziehungen wurden separat pro untersuchtem Biomarker als *fold change* dargestellt (s. Abbildung 32-37). Um eine falsche Biomarker-Antwort und ferner Klassifikation durch Zytotoxizität (relative Zellzahl in einem definierten Feld) zu vermeiden, wurden Testkonzentrationen, welche die Zellzahl auf unter 40% reduzierten, ausgeschlossen.

Mit Ausnahme von 5-FU, nahm die Proteinaktivität des phosphorylierten Markers 53BP1 an Serin 1778 nach 4h und 24h nach Behandlung mit den klastogenen Verbindungen HU und ETO stark zu (s. Abbildung 32). Die Aneugene VB und AMG-900 beeinflussten die Proteinaktivität nur mäßig, wohingegen CCCP zum späten Zeitpunkt eine signifikante 53BP1 (S1778)-Antwort induzierte. Die 4-stündige Proteinantwort war zur Klassifizierung von Klastogenen sensitiver als der spätere Zeitpunkt, begründet durch eine AUC von 0,8798 und einen p-Wert von <0,0001.

Die Schadensantwort des untersuchten Mitose-Checkpoint Proteins BubR1 (S670) war zu frühen und späten Zeitpunkten deutlich nach Behandlung mit aneugen Substanzen (VB, GF und AMG-900) angestiegen, wobei der frühe Zeitpunkt eine effektivere Antwort aufzeigte (AUC: 0,9558, p-Wert: <0,0001). Sowohl die klastogenen Verbindungen ETO und 5-FU als auch das Nicht-Genotoxin IMA wiesen keinen signifikanten Effekt auf das Protein auf (s. Abbildung 33).

Das Mitoseprotein pH3 (S28) detektierte zu beiden Zeitpunkten alle Aneugene, wohingegen die Klastogene HU, ETO und das Nicht-Genotoxin CCCP keine Induktion von pH3 (S28) zeigte (s. Abbildung 34). Die ROC-Analyse brachte hervor, dass der frühe Zeitpunkt sehr gut geeignet ist, um Aneugene zu identifizieren (AUC: 0,9687, p-Wert: <0,0001).

In der Abbildung 35 sind die Dosis-Wirkungsbeziehungen des potentiellen Markerproteins Nrf2 (S40) dargestellt. Das oxidative Stress-assoziierte Protein war zu beiden Zeitpunkten nach Behandlung von VB, H₂O₂, ETO, 5-FU, IMA und CCCP erhöht, dennoch wiesen die potenten ROS-induzierenden Substanzen CCCP und H₂O₂ einen signifikanten Anstieg auf und waren jeweils nach 4h und 24h von den anderen Substanzklassen abzugrenzen. Die Proteinaktivität war nach 4h am sensitivsten, errechnet durch einen AUC-Wert von 0,9031 und einen p-Wert von <0,0001.

Die Biomarker-Antwort des acetylierten p53 (K373) war zum späten Zeitpunkt sehr spezifisch, um die gesamten genotoxischen Verbindungen VB, AMG-900, ETO und 5-FU von den nicht-genotoxischen Substanzen IMA und CCCP zu unterscheiden, da eine AUC von 0,9987 und ein p-Wert von $<0,0001$ ermittelt wurde (s. Abbildung 36).

Die nach 4h und 24h ansteigenden Antworten von FANCD2 (S1404)-positiven Zellen waren charakteristisch für Klastogene (ETO, HU und mäßig 5-FU) und ermöglichte wirkmechanistisch die Abgrenzung von VB, CCCP und IMA (s. Abbildung 37). Dabei waren die späten Antworten sensitiver, um drei von drei Klastogene zu erfassen (AUC: 0,898, p-Wert: $<0,0001$).

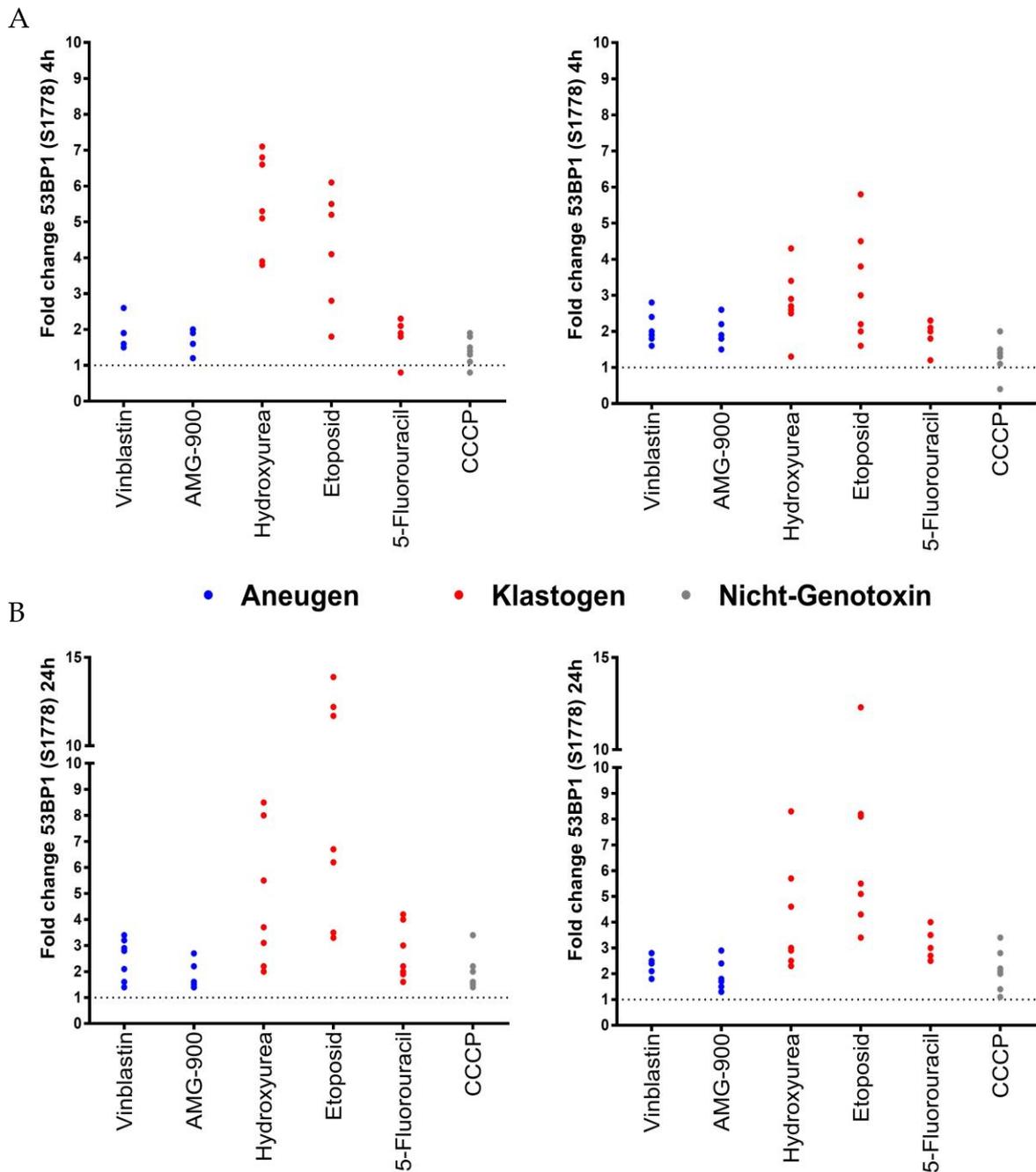


Abbildung 32: Untersuchung von 53BP1 (S1778).

Abgebildet sind die Effekt-Antworten vom Biomarker 53BP1 (S1778) in behandelten TK6-Zellen nach 4h (A) und 24h (B). Untersucht wurden Dosis-Wirkungsbeziehungen, die pro Substanzkonzentration als Punkte aufgetragen wurden, da jeder eine unterschiedliche Konzentration darstellt. Die Substanzen sind nach ihrem MoA kodiert: Klastogene = rote Punkte, Aneugene = blaue Punkte und Nicht-Genotoxine = graue Punkte. Die Kontrolle (1% DMSO) wird durch die gestrichelte Linie dargestellt.

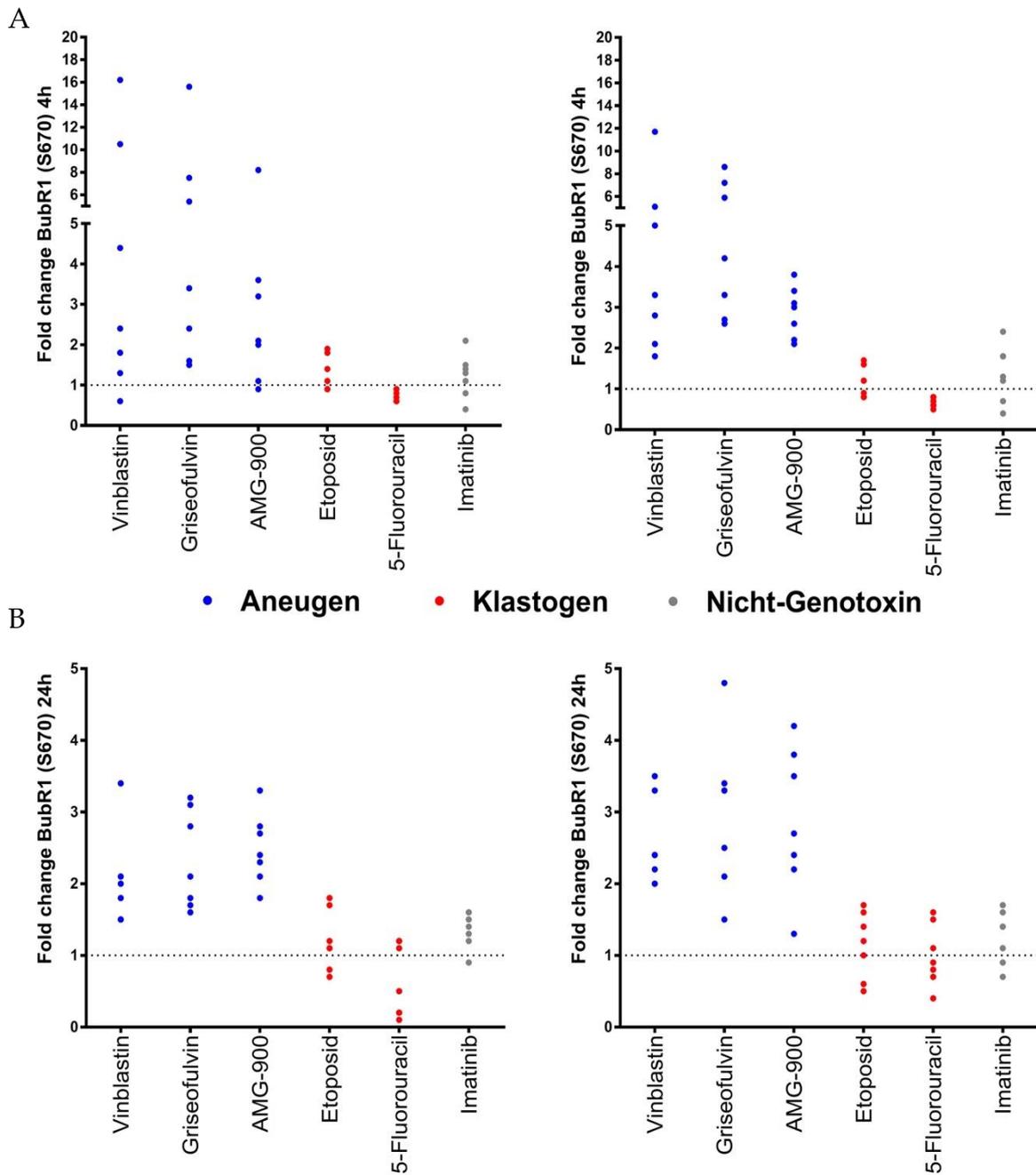


Abbildung 33: Untersuchung von BubR1 (S670).

Abgebildet sind die Effekt-Antworten vom Biomarker BubR1 (S670) in behandelten TK6-Zellen nach 4h (A) und 24h (B). Untersucht wurden Dosis-Wirkungsbeziehungen, die pro Substanzkonzentration als Punkte aufgetragen wurden, da jeder eine unterschiedliche Konzentration darstellt. Die Substanzen sind nach ihrem MoA kodiert: Klastogene = rote Punkte, Aneugene = blaue Punkte und Nicht-Genotoxine = graue Punkte. Die Kontrolle (1% DMSO) wird durch die gestrichelte Linie dargestellt.

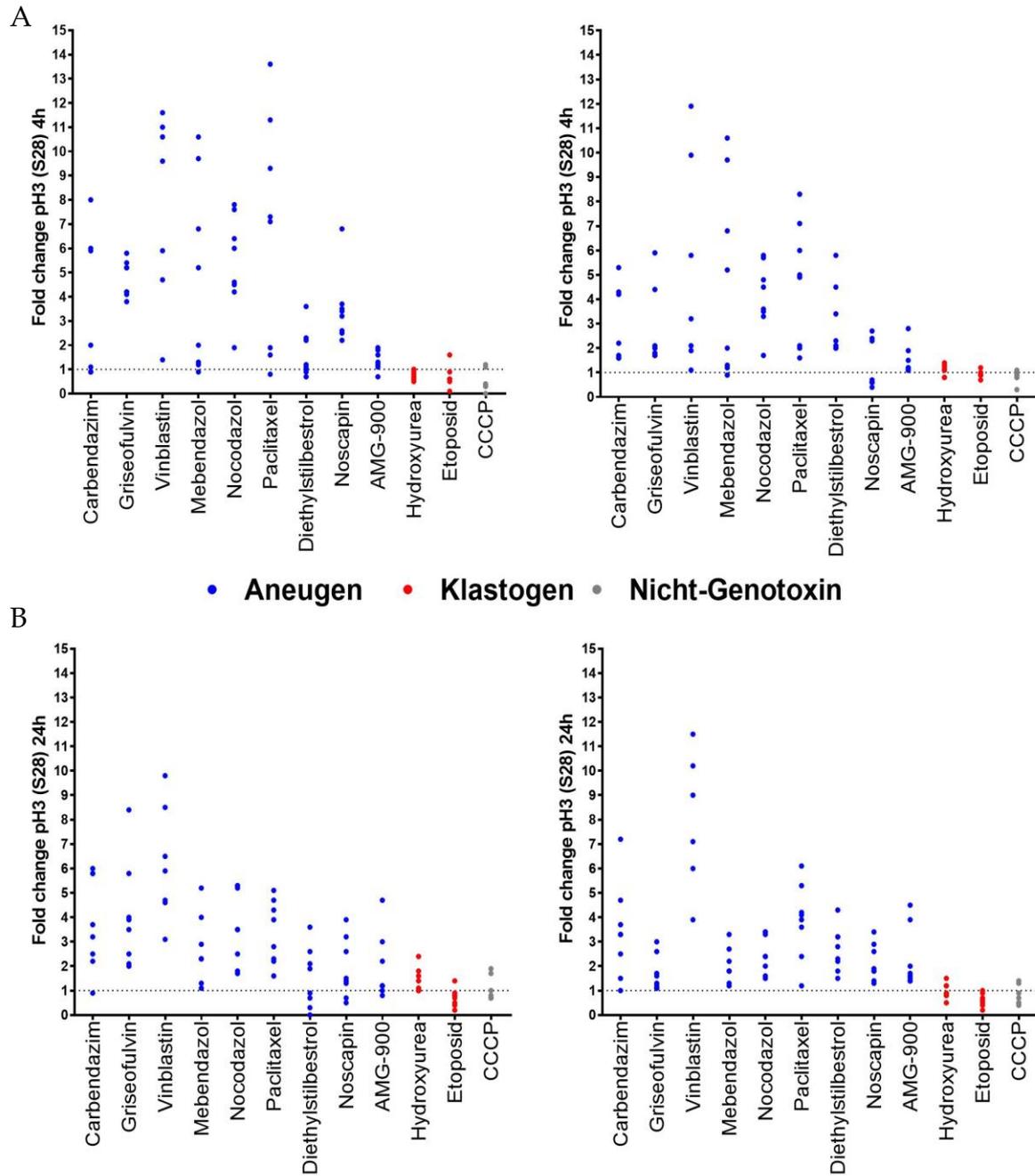


Abbildung 34: Untersuchung von pH3 (S28).

Abgebildet sind die Effekt-Antworten vom Biomarker pH3 (S28) in behandelten TK6-Zellen nach 4h (A) und 24h (B). Untersucht wurden Dosis-Wirkungsbeziehungen, die pro Substanzkonzentration als Punkte aufgetragen wurden, da jeder eine unterschiedliche Konzentration darstellt. Die Substanzen sind nach ihrem MoA kodiert: Klastogene = rote Punkte, Aneugene = blaue Punkte und Nicht-Genotoxine = graue Punkte. Die Kontrolle (1% DMSO) wird durch die gestrichelte Linie dargestellt.

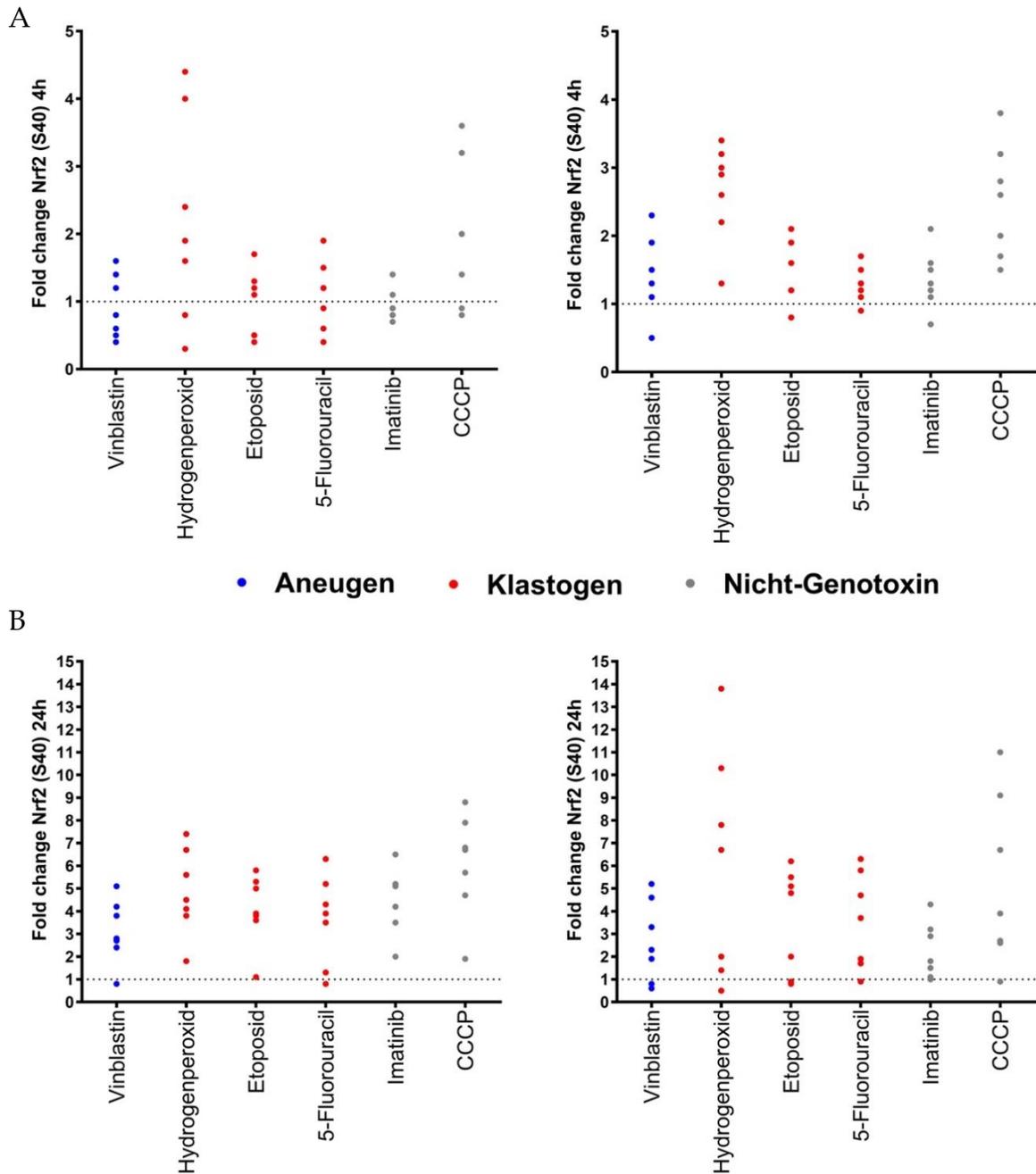


Abbildung 35: Untersuchung von Nrf2 (S40).

Abgebildet sind die Effekt-Antworten vom Biomarker Nrf2 (S40) in behandelten TK6-Zellen nach 4h (A) und 24h (B). Untersucht wurden Dosis-Wirkungsbeziehungen, die pro Substanzkonzentration als Punkte aufgetragen wurden, da jeder eine unterschiedliche Konzentration darstellt. Die Substanzen sind nach ihrem MoA kodiert: Klastogene = rote Punkte, Aneugene = blaue Punkte und Nicht-Genotoxine = graue Punkte. Die Kontrolle (1% DMSO) wird durch die gestrichelte Linie dargestellt.

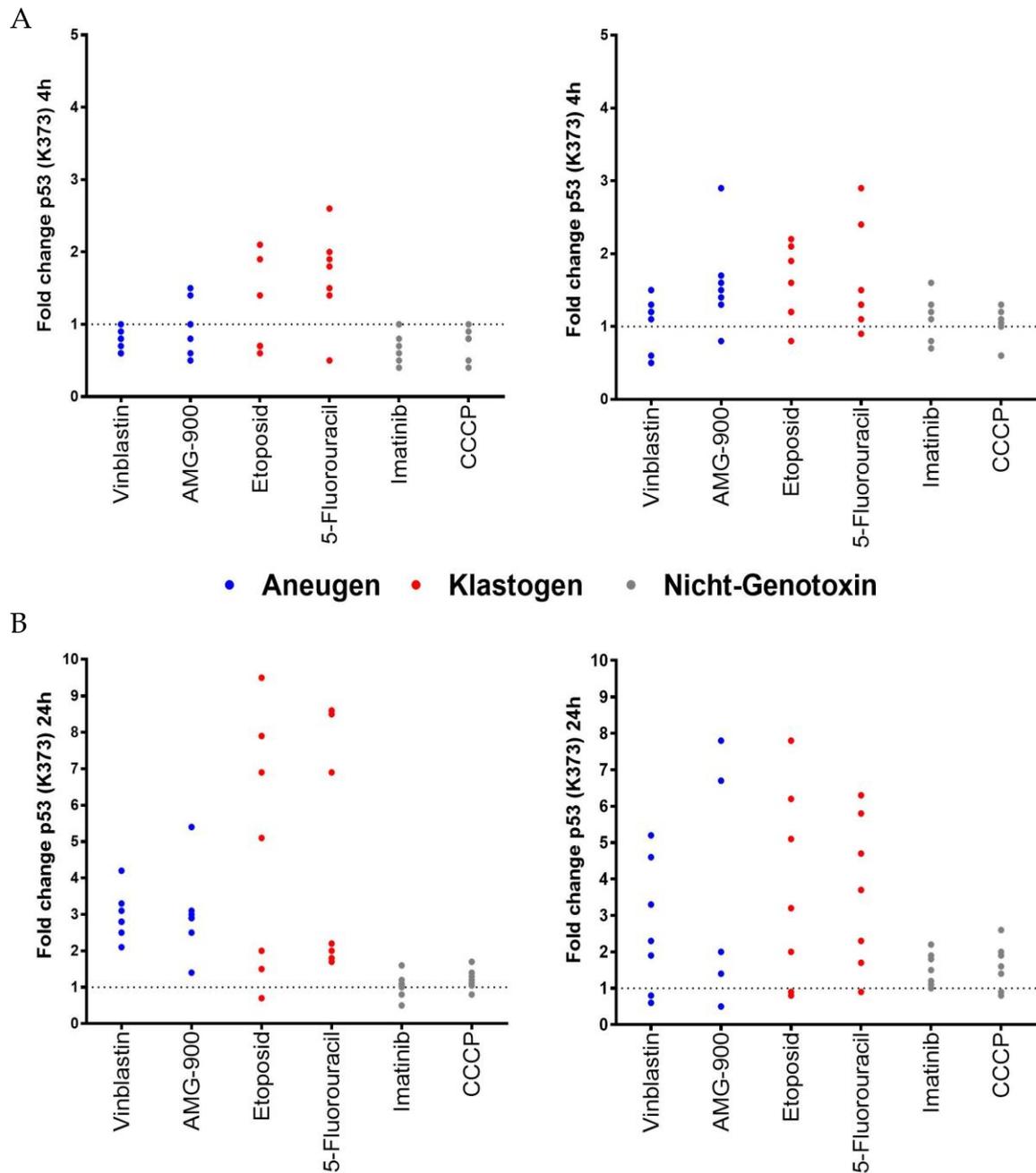


Abbildung 36: Untersuchung von p53 (K373).

Abgebildet sind die Effekt-Antworten vom Biomarker p53 (K373) in behandelten TK6-Zellen nach 4h (A) und 24h (B). Untersucht wurden Dosis-Wirkungsbeziehungen, die pro Substanzkonzentration als Punkte aufgetragen wurden, da jeder eine unterschiedliche Konzentration darstellt. Die Substanzen sind nach ihrem MoA kodiert: Klastogene = rote Punkte, Aneugene = blaue Punkte und Nicht-Genotoxine = graue Punkte. Die Kontrolle (1% DMSO) wird durch die gestrichelte Linie dargestellt.

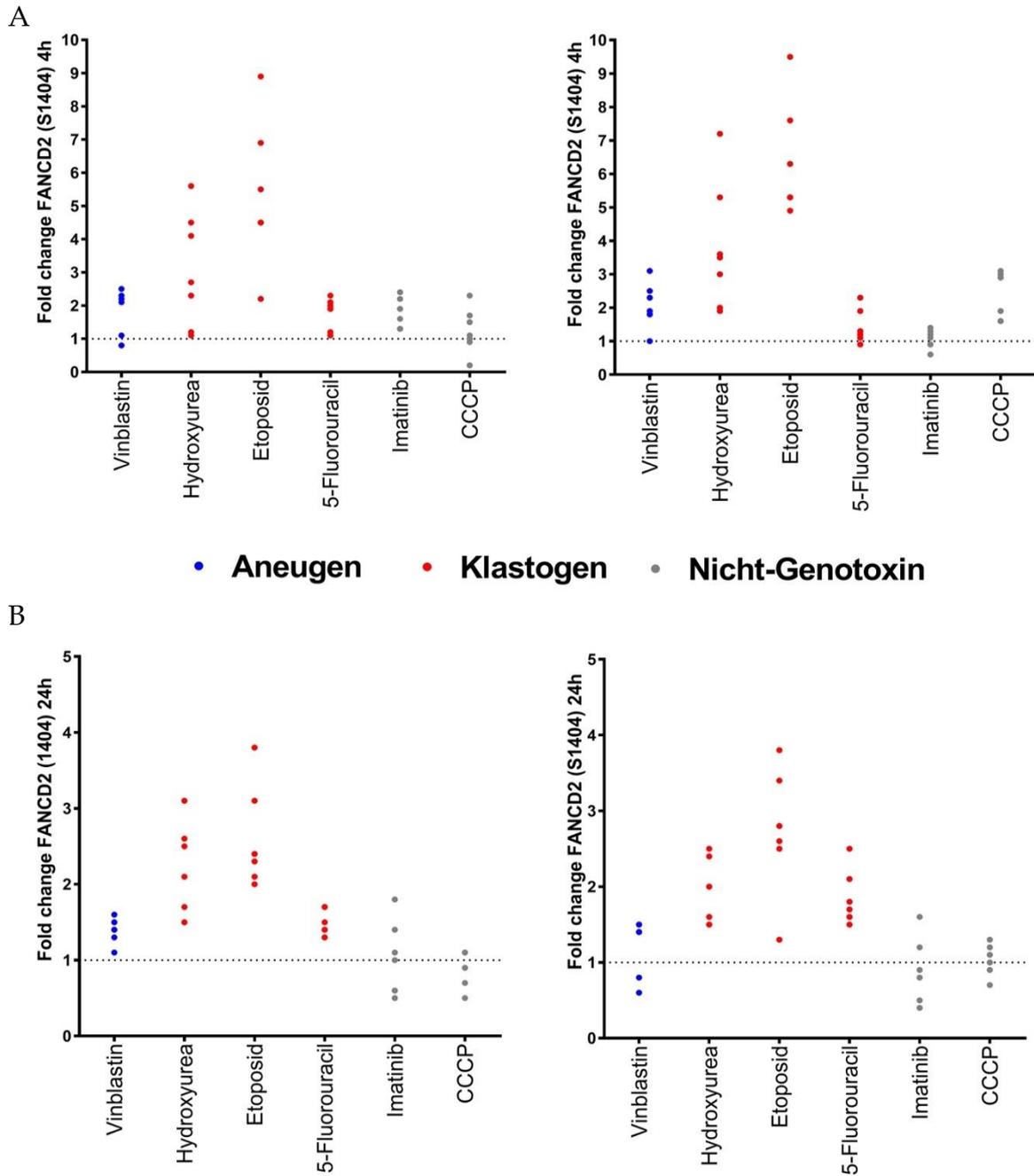


Abbildung 37: Untersuchung von FANCD2 (S1404).

Abgebildet sind die Effekt-Antworten vom Biomarker FANCD2 (S1404) in behandelten TK6-Zellen nach 4h (A) und 24h (B). Untersucht wurden Dosis-Wirkungsbeziehungen, die pro Substanzkonzentration als Punkte aufgetragen wurden, da jeder eine unterschiedliche Konzentration darstellt. Die Substanzen sind nach ihrem MoA kodiert: Klastogene = rote Punkte, Aneugene = blaue Punkte und Nicht-Genotoxine = graue Punkte. Die Kontrolle (1% DMSO) wird durch die gestrichelte Linie dargestellt.

4 Diskussion

4.1 Teil 1: Bewertung der MultiFlow® Methode Genotoxine zu klassifizieren

In den letzten Jahren haben sich die Methoden um Genotoxizität zu identifizieren und zu bewerten, bedeutend neu gestaltet. Publierte Artikel haben mehrere Limitationen wie Spezifität, Durchsatzvermögen und MoA-Information in den OECD anerkannten *in vitro* Methoden aufgezeigt, die dadurch unzureichend zu einer modernen Risikobewertung beitragen (Kirkland et al. 2011; Hashimoto et al. 2011; Fowler et al. 2012). Daher sind bis heute viele Aktivitäten unternommen worden, um die Einschränkungen für eine adäquate Risikobewertung zu überwinden. Neben Modifizieren und Optimieren etablierter *in vitro* Methoden gemäß der ICH S2 (R1) Richtlinie werden viele neue *in vitro* Tools untersucht und entwickelt. In diesem Zusammenhang griff die Firma Litron Laboratories die oben genannten Limitierungen auf und entwickelte die MultiFlow® Methode, die im Rahmen einer Ringstudie umfassend geprüft werden sollte, bevor sie kommerziell erhältlich wird. Mit dieser Methode soll eine erhöhte Spezifität durch die Wirkstoffprüfung an humanen TK6-Zellen erreicht werden. Des Weiteren sollen pharmarelevante MoA-Informationen durch das Heranziehen von mechanistischen Biomarkern bereitgestellt werden, um zwischen den drei MoA-Gruppen Klastogene, Aneugene und Nicht-Genotoxine unterscheiden zu können. Die Methode stellt einen durchflusszytometrischen Multiplex-Ansatz dar und ermöglicht die simultane Detektion der mechanistischen Biomarker pH3 (S10), γ H2AX, cleaved PARP1/p53 und dem genotoxischen Endpunkt Polyploidie. Im ersten Ergebnisteil wurde die neu entwickelte Methode etabliert, umfassend bewertet und validiert.

4.1.1 Validierung des Multiplex-Ansatzes

Die MultiFlow® Endpunkte (pH3 (S10), γ H2AX und cleaved PARP1) wurden mit etablierten Single-Methoden verglichen, um den Multiplex-Ansatz auf Funktionalität zu überprüfen. Insgesamt zeigten diese Ergebnisse eine gute Übereinstimmung zwischen dem MultiFlow® Assay und den Benchmarking-Methoden.

Mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,8 zeigten die Daten von pH3 (S10) eine sehr gute quantitative Übereinstimmung und stützen die MultiFlow[®] Methode als Multiplex-Ansatz. Die Untersuchung von DSBs über die quantitative Erfassung von γ H2AX-positiven Zellen scheint im MultiFlow[®] Assay genauer zu sein als der High-Content-Imaging-Ansatz. Die Vergleiche der frühen Zeitpunkte der jeweiligen Methoden wies mit einem Maß von 0,88 zunächst eine gute Übereinstimmung auf, wurde jedoch unter Einbeziehung der 24h Daten bei einem R-Wert von 0,59 ungenauer. Ein Grund hierbei könnte die unterschiedliche Analyse der jeweiligen Methoden sein. Die MultiFlow[®] Methode ermöglicht den Ausschluss von hochfluoreszierenden γ H2AX-positiven Kernen, die etwa von apoptotischen Zellen generiert werden (Bryce et al. 2016). Eine Induktion von γ H2AX ist ebenso mit Apoptose assoziiert und geht mit einer DNA-Fragmentierung einher (Rogakou et al. 2000; Podhorecka et al. 2010). Im quantitativen Single-Ansatz mittels Imaging sollten daher bei der Erfassung von DSBs über den etablierten Histon-Marker die unspezifischen DSB-markierten Zellen berücksichtigt werden, die durch eine simultanene Färbung mit Apoptosemarkern spezifisch ausgeschlossen werden können.

Der Vergleich der beiden frühen Apoptosemarker (cleaved PARP1 vs. Caspase 3/7) zeigte eine geringe Übereinstimmung. Eine Aufgabe der Effektorcaspase Caspase 3/7 ist die Spaltung von PARP1 und unterstützt daher das Ergebnis aufgrund der zeitlich versetzten Apoptose-Aktivitäten der beiden Endpunkte (Walsh et al. 2008). Der Vergleich zwischen den Apoptosemarkern cleaved PARP1 und BrdUTP zeigte keine Korrelation. Das gespaltene PARP1 scheint daher sehr sensitiv zu sein, um die frühe Phase der Apoptose in Zellen zu messen, wohingegen der Einbau von BrdUTP im APO-BrdU TUNEL-Assay mit der späten Apoptose (fragmentierte DNA) in Verbindung gebracht wird. Darüber hinaus kann nicht ausgeschlossen werden, dass ebenso nekrotische Zellen im TUNEL-Assay gemessen werden können (Grasl-Kraupp et al. 1995).

Zusammenfassend wurde mit diesem Teil der Arbeit aufgezeigt, dass mit der Multiplex-Methode verlässliche Daten generiert wurden und (1) die spezifische Analyse von DSBs über den Anstieg von γ H2AX, von (2) mitototische Zellen mittels pH3 (S10) und (3) der frühen Apoptose über cleaved PARP1 bereitstellt.

4.1.2 Identifizierung von Genotoxinen mit etablierten und neuen Methoden

Die Leistungsfähigkeit der neuen Methode (MultiFlow[®]) wurde erstmalig durch einen direkten Vergleich der Ergebnisse unter gleichen Versuchsbedingungen mit dem etablierten durchflusszytometrischen MNT (MicroFlow[®]) bewertet.

Hierbei wurden Dosis-Wirkungsbeziehungen von insgesamt 31 Modellsubstanzen mit unterschiedlichen Testkonzentrationen in den TK6-Zellen für 4h (MNT: +20h Ruhephase) und 24h am Durchflusszytometer analysiert.

Die Untersuchungen auf Genotoxizität im MNT wurden als positiv angesehen, wenn eine 3-fache Zunahme der MN-Rate im Vergleich zur 1% DMSO Kontrolle beobachtet wurde (Bryce et al. 2014).

Zusammenfassend wurden im durchflusszytometrischen MNT zwei genotoxische Verbindungen (H₂O₂ und BP) als nicht eindeutig bewertet und drei nicht-genotoxische Substanzen (CCCP, TG und TC) wurden fälschlicherweise positiv getestet. Die Ergebnisse demonstrierten somit die oftmals irreführenden positiven Ergebnisse im MNT aufgrund von sekundären Effekten wie Stress oder Apoptose (Cheung et al. 2015; Bryce et al. 2014; Sobol et al. 2012; Walmsley und Billinton 2011). Ein weiterer Aspekt, der Einfluss auf die Bewertung haben kann, ist die Bestimmung der Zytotoxizität. Das von der OECD empfohlene Zytotoxizitätslimit von 55±5% kann über mehrere Zytotoxizitätsparameter berechnet werden, die folglich die Interpretation der Daten beeinflussen. Die Zytotoxizitätsmessungen im MNT basierten auf den RNC, der im Vergleich zu den Zytotoxizitätsparametern "relative Populations-verdopplung (RPD)" oder "relative Zunahme der Zellzahl (RICC)", vermehrt die Zytotoxizität unterschätzt (OECD TG 487 2014; Galloway et al. 2011; Fellows et al. 2008). Daher könnte die MNT Methode durch die Verwendung der Zytotoxizitätsparameter RPD oder RICC optimiert werden und die erzeugten falsch positiven Ergebnisse als negativ anzeigen. Dieser Aspekt sollte aber genauer untersucht werden.

Es wurden insgesamt 20 verschiedene Genotoxine im MNT auf Induktion von MN getestet und zwei Substanzen konnten nicht eindeutig als solches identifiziert werden. Die klastogene Substanz BP induzierte nur in einem Experiment einen schwachen ≥3,25 MN-fachen Anstieg gegenüber der Kontrolle und ebenso wurde beim Klastogen

H₂O₂ nur in einem der zwei unabhängigen Replikate eine signifikanter MN-Anstieg gegenüber der Kontrolle beobachtet. Eine positive Bewertung stützte sich auf das Annahmekriterium von Litron (≥ 3 -fache Zunahme von MN in Hamsterzellen V79). In Anbetracht der unklaren Ergebnisse kann empfohlen werden, die Kriterien für ein positives Ergebnis erneut unter Einbeziehung der in der OECD 487 Richtlinie (2016) angegebenen Akzeptanzkriterien zu bewerten (z.B. historische Bereiche der Kontrolle oder statistische Signifikanz) und ebenso die Ruhephase (nach Behandlung) zelltypspezifisch, insbesondere im Hinblick auf die promutagene Substanz BP, anzupassen. In Arbeiten von Sobol et al. 2012 konnte aufgezeigt werden, dass durch eine Verlängerung der Ruhephase von 24h auf 40h eine höhere Induktion von MN generiert wurde.

Ein weiterer Endpunkt der in der MicroFlow[®] Methode erfasst wird, ist die Bildung von hypodiploiden Kernen, deren Zunahme mit einem aneugenem Potential einer Testsubstanz assoziiert ist und daher die Unterscheidung zwischen Klastogenen und Aneugenen bereitstellen soll (Bryce et al. 2010; Cheung et al. 2015). Ein ≥ 10 -facher Anstieg hypodiploider Zellen, entsprach der festgelegten Effekthöhe gegenüber der Kontrolle (Bryce et al. 2011) und wurde dementsprechend als positiv bewertet. Es wiesen nur fünf von neun Aneugenen diese signifikante Effekthöhe auf. Gegen die Erwartungen, induzierten ebenso sieben von elf Klastogenen sowie das Nicht-Genotoxin TC Chromosomenverlust-abgeleitete Zellen. Hierbei sollte nachgeprüft werden, ob zum einen der Zeitpunkt und/oder die Zelllinie für die Erfassung hypodiploider Kerne geeignet sind. Die erste Annahme stützt sich auf Ergebnisse von Shi et al. 2010, die erst nach einer 28-stündigen Exposition der TK6-Zellen mit Aneugenen eine starke Zunahme von hypodiploiden Zellen erfassten. Standardmäßig werden neben den Mauslymphomzellen (L5178Y) und den chinesischen Hamsterzellen (V79 oder CHO-K1) auch die TK6-Zellen in diesem Genotoxizitätstest eingesetzt. Interessanterweise wurde erstmalig die Bildung bzw. die Population von hypodiploiden Kernen in den TK6-Zellen nach Behandlung von Aneugenen im Gating-Ansatz, durch die Fluoreszenzverschiebung der MN-Population beobachtet und auch als solche definiert. In weiterführenden Studien wurde diese Population ebenso in den CHO-K1 Zellen vorgefunden, wobei diese tendenziell mit einer stärkeren Verschiebung verbunden war als in den L5178Y- und TK6-Zellen und

folglich besser geeignet sein sollen, um zwischen den beiden Wirkungsmechanismen unterschieden zu können (Bryce et al. 2007; Bryce et al. 2009). Im Vergleich zu murinen- und menschlichen Zellen, vermuten die Entwickler dieser Methode, dass dies mit der durchschnittlich höheren Anzahl an Hamsterchromosomen assoziiert ist.

Die neue Multiplex-Methode (MuiltFlow[®]) stellt eine innovative Plattform für die Risikobewertung von Wirkstoffkandidaten dar und soll auf Grundlage von mechanistischen Biomarkern genotoxische Wirkungsweisen identifizieren und klassifizieren: γ H2AX = DSBs (Klastogene), pH3 (S10) = mitotische Zellen (Aneugene), cleaved PARP1 = apoptotische Zellen und/oder nukleäres p53 = Genotoxizität (Bryce et al. 2016). Für die Bewertung der Biomarker wurden ROC-Analysen durchgeführt, um die effektivste Biomarker-Antwort (4h/24h) mit der bestmöglichen Klassifizierungsrate auf Basis des abgeleiteten Grenzwertes aus der ROC-Kurve zu identifizieren. Ergebnisse die zu einer $\geq 80\%$ -igen Zytotoxizität nach einer 24h Behandlung führten, wurden von der Bewertung ausgeschlossen. In den Arbeiten von Bryce et al. 2016 konnte auf Grundlage der zahlreichen Ringstudiendaten aufgezeigt werden, dass die hohe ermittelte Zytotoxizitätsgrenze die Spezifität der Methode nicht beeinflusst und die Klassifizierung unter den MoA-Gruppen grundlegend verbessert, welches im Konsens mit unseren Daten war.

Wie aus der Arbeit hervorgeht, war ein Anstieg von pH3 (S10)-positiven Zellen nach 4h Behandlung spezifisch für aneugene Substanzen, mit Ausnahme von AMG-900, welches durch sein MoA begründet werden kann. Als Aurorakinaseinhibitor bindet AMG-900 selektiv an die Aurora-Kinasen A, B und C und inhibiert deren Enzymaktivität im Rahmen der Zellteilung, welches unter anderem die Phosphorylierung von Histon H3, vermittelt durch die Aurora-B-Kinase, involviert (Juan et al. 2014; Sampath et al. 2004; Terada et al. 1998). Es wurde ein moderater Anstieg des Mitosemarkers bei den klastogenen Verbindungen CP und BP beobachtet. Allerdings konnte in dieser Arbeit deren vorherrschende klastogene Aktivität durch einen stärkeren γ H2AX-Anstieg aufgezeigt werden. Bei der Wirkung von CP ist ebenso eine aneugene Aktivität bekannt (Schuler et al. 1997; Melo et al. 2014) und es lässt sich anhand der Arbeit bestätigen, dass sowohl CP als auch BP die Zellzykluskinetik über andere Wirkmechanismen stören und so die Phosphorylierung

von pH3 leicht beeinflussen. Beiden Verbindungen ist gemein, dass sie erhebliche genetische Schäden induzieren können, die zu einem Zellzyklusarrest führen und daher eine Akkumulation von pH3 bewirken können (Stellas et al. 2014; Aguilar-Mahecha et al. 2005). Auf Basis der ROC-Analyse konnte ein Grenzwert (pH3-Effekthöhe: 2,91) für den 4h Zeitpunkt zur MoA-Einteilung abgeleitet werden und ermöglichte, dass acht von neun untersuchten Aneugenen korrekt als solche charakterisiert werden konnten.

Eine Effektzunahme des mechanistischen Biomarkers γ H2AX war nahezu charakteristisch für Klastogene und lieferte zu beiden Zeitpunkten ähnliche Ergebnisse. Die logistische Regressionsanalyse legte dar, dass nach 24h die beste wirkmechanistische Trennung gegenüber den anderen MoA-Gruppen erreicht werden konnte und führte daher zur korrekten Klassifizierung für neun von elf Klastogene. Interessanterweise verursachte 5-FU zu beiden Zeitpunkten keine Zunahme von γ H2AX-positiven Zellen und zusätzlich wies HU nach 24h eine reduzierte γ H2AX-Aktivität auf. Die beiden klastogenen Verbindungen induzierten allerdings deutlich p53, wie aus dieser Arbeit und der Publikation von Bryce et al. 2016 hervorgeht, dass somit die Klassifizierung in ein genotoxisches Wirkungsprofil unterstützte. Es liegt nahe, dass die fehlende γ H2AX-Induktion bei 5FU mit der Enzymaktivität der TK6-Zellen assoziiert ist, da aufgezeigt werden konnte, dass 5-FU eine unterschiedliche genotoxische Sensitivität in verschiedenen Zelllinien wie L5178Ytk^{+/-}, WTK-1 und TK6 aufwies (Oka et al. 2006). Oka und Kollegen sowie Khoury et al. 2016 demonstrierten eine p53-unabhängige γ H2AX-Antwort, welche daher als möglicher Grund ausgeschlossen werden kann. Die nicht-genotoxische Substanz CCCP hatte in der höchsten Konzentration und zum späten Zeitpunkt einen sehr deutlichen Effekt auf die γ H2AX-Expression in den TK6-Zellen, das allerdings auf die sehr hohe Testkonzentration von 50 μ M zurückzuführen ist. Sehr wahrscheinlich wurden hierbei hochfluoreszierende γ H2AX-positive Zellen aufgrund von Apoptose analysiert, die durch das nachjustieren des entsprechenden Gates ausgeschlossen werden können (Bryce et al. 2017).

Ein interessantes Antwortprofil zeigte der Biomarker p53, der als Reaktion auf genotoxischen Stress im Kern stabilisiert wird.

Die Analysen von p53 waren nach 4h mit einem moderaten Anstieg nach der Behandlung mit Klastogenen assoziiert, wohingegen die Effekttantworten nach 24h mit Klastogenen und Aneugenen deutlicher ausgeprägt waren. Auf Basis der abgeleiteten Grenzwerte zum frühen (1,57) und späten (1,68) Behandlungszeitpunkt konnten annähernd alle genotoxischen Substanzen (mit Ausnahme von EMS) durch die p53-Aktivität von den nicht-genotoxischen Verbindungen (mit Ausnahme von Imatinib) differenziert werden. Bei Imatinib wurde eine genotoxische Wirkung detektiert, da der frühe Zeitpunkt eine deutliche Effektzunahme auf den p53-Biomarker zeigte, gleichzeitig jedoch keine Zunahme von γ H2AX und pH3 (S10) erfasst wurde. Die p53-Aktivierung ist durch die Inhibition der BCR-ABL-Tyrosinkinase und MDM2 Translation nach Behandlung mit Imatinib begründet (Wendel et al. 2006; Al-Kuraishy et al. 2018).

Die bekannte genotoxische Aktivität von EMS konnte nicht über p53 erfasst werden, da keine Induktion beobachtet werden konnte. Allerdings wurde ein deutlicher Anstieg an γ H2AX-positiven Zellen beobachtet, welches die Identifizierung als Klastogen ermöglichte. Summarisch lässt sich festhalten, dass die Ergänzung von p53 eine wertvolle Erweiterung der MultiFlow[®] Methode darstellt, da mit Hilfe der Analyse elf von zwölf Genotoxinen – mitunter auch solche, die nicht durch γ H2AX (5-FU) und pH3 (S10) (AMG-900) erkannt wurden – klassifiziert werden konnten.

Die Analyse der Veränderung des Anteils polyploiden Kernen war nahezu unspezifisch, um abgrenzend zu den anderen MoA-Gruppen ausschließlich Aneugene zu identifizieren. Dies konnte ebenso mit den Ergebnissen aus dem MNT demonstriert werden. Die Bildung polyploider Kerne und letztlich deren Substanz-induzierten Anstieg mit einem aneugenem Mechanismus zu assoziieren, scheint zelltypspezifisch bzw. vom p53-Status abhängig zu sein. In mehreren Arbeiten konnte aufgezeigt werden, dass p53-mutierte Zellen im Vergleich zu p53-kompetenten Zellen, die Polyploidisierung begünstigen (Vogel et al. 2004; Kalejs et al. 2006; Nair et al. 2012; Zhang et al. 2017).

Darüber hinaus sollte ebenso nachgeprüft werden, ob der Zeitpunkt der Analyse sinnvoll ist. In einer anderen Studie wurde aufgezeigt, dass bei einer 24-stündigen Behandlung mit einer anschließenden Erholungsphase von 12h eine bessere

Polyploidie-Antwort durch die aneugene Substanz Fisetin erreicht wurde (Gollapudi et al. 2014). Der Biomarker p53 stellt weitere mechanistische Einblicke bereit, um Genotoxizität zu identifizieren.

Zusammenfassend können mit dem neuen Multiplex-Ansatz:

1. irreführende oder falsche Ergebnisse, wie sie in den MNT-Daten beobachtet wurden, reduziert und
2. mechanistische Unterscheidungen zwischen Klastogenen, Aneugenen und Nicht-Genotoxinen bereitgestellt werden.

Wie aus der folgenden Tabelle 14 hervorgeht, wurde durch die erstmalige Bewertung der neuen Methode aufgezeigt, dass mechanistische Biomarker die drei MoA-Gruppen zuverlässiger in den TK6-Zellen identifizieren und differenzieren, als die Rate induzierter Mikrokerne in Kombination mit hypodiploiden Kernen, die im MNT als weiterer genotoxischer Endpunkt herangezogen werden, um eine aneugene Wirkung anzuzeigen. Die MultiFlow[®] Methode verspricht ein effizientes *in vitro* Tool zu werden, das fortan im Rahmen der Wirkstoffentwicklung eingesetzt werden kann, um eine moderne Risikobewertung durchzuführen.

Tabelle 14: Performance der *in vitro* Testsysteme: MNT-Methode (MicroFlow[®]) versus Multiplex-Methode (MultiFlow[®]).

MoA-Gruppen	Klassifizierungsrate	Klassifizierungsrate	Vergleich Methoden Performance	
	MicroFlow	MultiFlow	MicroFlow	MultiFlow
Nicht-Genotoxine	8/11 (73%)	10/11 (91%)	Sensitivität: 90%	Sensitivität: 95%
Genotoxine	18/20 (90%)	19/20 (95%)	Spezifität: 72%	Spezifität: 90%
Aneugene	5/9 (56%)	8/9 (89%)	MoA-Klassifizierungsrate: 45%	MoA-Klassifizierungsrate: 85%
Klastogene	4/11 (36%)	9/11 (82%)		

4.1.3 Challenges der MultiFlow® Methode und weitere moderne *in vitro* Tools

Die neue etablierte MultiFlow® Methode hat, verglichen zum durchflusszytometrischen MNT (MicroFlow® Methode), eine eindeutige bessere Performance erzielt. Dennoch konnten einzelne Schwachstellen erkannt werden.

Die Modellsubstanzen AMG-900 (Aneugen), 5-FU und HU (Klastogene) induzierten keine entsprechende oder erwartete Biomarker-Antwort in den TK6-Zellen, um die Genotoxine wirkmechanistisch voneinander differenzieren zu können. Zudem zeigte die klastogene Substanz EMS keinen zunehmenden Effekt auf p53, wohingegen die nicht-genotoxische Substanz IMA eine deutliche p53-Antwort induzierte. Die klastogene Substanz CTH konnte nur durch eine Testkonzentration, welche eine Effektzunahme von γ H2AX im akzeptieren Zytotoxizitätsbereich induzierte, als solches kategorisiert werden. Die korrekten Klassifizierungen bei den geneotoxischen Substanzen CS, DES, NOC, H₂O₂ stützten sich auf relativ schwache Effektzunahmen auf den Biomarker p53 in Relation zur Kontrolle. Die Klassifizierungen in diesem Teil der Arbeit beruhten auf abgeleiteten Schwellenwerten zum jeweiligen Biomarker, die durch die ROC-Kurvenanalyse mit einer Spezifität von $\geq 99\%$ ermittelt wurden. Der Multiplex-Ansatz stellt eine moderne Methode dar, die zugleich neue Herausforderungen mit sich bringt. Insbesondere die bestmögliche Auswertung der Daten, welche auf umfangreichen Dosis-Wirkungsbeziehungen mit unterschiedlichen Biomarker-Antworten zu unterschiedlichen Zeitpunkten beruhen, ist hierbei sehr umfangreich. Die Methodenentwickler stützen sich auf die Anwendung eines multinomialen logistischen Regressionsansatzes. Hierbei wurden die mechanistischen Endpunkte kombiniert betrachtet (z.B. p53 plus γ H2AX oder pH3 plus Polyploidie) sowie ein Vorhersagemodell etabliert, das auf den gesamten Daten der Ringstudienteilnehmer beruhte. Das *in vitro* Vorhersage-Tool erwies sich als nützlich, um die Methode zu verbessern. So wurde in den Arbeiten von Bryce et al. 2016 und 2017 demonstriert, dass der maschinelle Lernansatz beispielsweise 5-FU als Klastogen identifizieren konnte. Ebenso konnte mit der Bewertung der Methode gezeigt werden, dass die Biomarker heterogener ausgewählt werden sollten, um somit auch atypische Wirkmechanismen innerhalb einer MoA-Gruppe zu berücksichtigen, da

beispielsweise bei der klastogenen Wirkung von 5-FU kein γ H2AX-Anstieg gezeigt werden konnte.

Daher offeriert die Methode neue statistische Bewertungsansätze zur korrekten Klassifizierung und/oder die Einbindung zusätzlicher mechanistischer Biomarker.

Wie bereits ausführlich besprochen, sind in den letzten Jahren viele Aktivitäten unter Verwendung von Biomarkern (Gen- und Proteinveränderungen) aufgenommen worden, um neue Tools zur Identifizierung und Einteilung von Genotoxinen für die Risikobewertung von Wirkstoffkandidaten zur Verfügung zu stellen (Williams et al. 2015; Li et al. 2015; Hendriks et al. 2016).

Die etablierte MultiFlow[®] Methode erzielte eine gute Testperformance: Sensitivität von 95%, Spezifität von 90% und eine MoA-Klassifizierungsrate von 85%.

Weitere moderne Genotoxizitätstest erreichten vergleichend zur MultiFlow[®] Methode ebenso eine gute Performance, die im Folgenden kurz vorgestellt werden:

(1) Anthem's Genotoxicity Screen:

- p53-kompetente Zellen (HCT116)
- Biomarker: Single-Analyse von *p21*, *GADD153*, *p53*)
- Endpunktbestimmung: Genotoxizität; keine parallele Zytotoxizitätsmessung
- 95,2% Sensitivität, 95,7% Spezifität (Rajakrishna et al. 2014)

(2) ToxTrack Assay

- Embryonale Maus-Stammzellen
- Biomarker: Multiplex-Analyse von *Bscl2*, *Rtkn*, *Srxn1*, *Ddit3*)
- Endpunktbestimmung: Oxidativer Stress, Protein Stress, DNA-Schäden, Zelluläre Stress
- Unterscheidung von Aneugene und Klastogene
- 95% Sensitivität, 94% Spezifität (Hendriks et al. 2016)

(3) GreenScreen HC und BlueScreen HC

- p53-kompetente Zellen (TK6)
- Biomarker: Single-Analyse von *GADD45a*-GFP (GreenScreen HC) oder *GADD45a*-Gluc (BlueScreen HC)
- Endpunktbestimmung: Genotoxizität (BlueScreen), alle Genotoxine (Greenscreen)

- Sensitivität 87%/80% (GreenScreen HC/BlueScreen HC), Spezifität 95% (Hughes et al. 2012)

(4) γ H2AX In-Cell Western Assay

- p53-kompetente Zellen (HepG2)
- Biomarker: Single-Analyse von γ H2AX
- Endpunktbestimmung: Genotoxizität
- 75% Sensitivität, 90-100% Spezifität (Khoury et al. 2016)

(5) Luziferase-basierter Assay

- p53-kompetente Zellen (HepG2)
- Biomarker: RAD51C, Cystatin A, p53, Nrf2
- Endpunktbestimmung: Genotoxizität, Oxidativer Stress; keine parallele Zytotoxizitätsmessung
- 85% Sensitivität, Spezifität 81% (Westerink et al. 2010)

Zusammenfassend konnte durch die Gegenüberstellung aufgezeigt werden, dass mit Ausnahme von Toxikogenomik-Assays (die jedoch auf einem umfangreichen Gen-Set basieren und mit einem erhöhten Zeitaufwand verbunden sind) und der MultiFlow[®] Methode, kaum andere Testsysteme verfügbar sind, welche die Differenzierung von Aneugenen versus Klastogenen und Genotoxinen versus Nicht-Genotoxinen sowie der gleichzeitigen Zytotoxizitätsbestimmung in einer Methode parallel zulassen (Li et al. 2017; Lan et al. 2016; Li et al. 2015; Ellinger-Ziegelbauer et al. 2009).

Daher ist es weiterhin ein bedeutendes Ziel, mechanistische Biomarker zu identifizieren, die entweder in bestehende und vielversprechende Methoden aufgenommen werden oder neue Methodenansätze anbieten können.

4.2 Teil 2: Bewertung von potentiellen Biomarkern zur Klassifizierung von Genotoxinen

Bei der Untersuchung und Bewertung der neuen *in vitro* Genotoxizitätsmethode (MultiFlow[®] Methode) konnte aufgezeigt werden, dass diese zuverlässig Genotoxine identifizieren und vor allem anders im Vergleich zum etablierten MNT (MicroFlow[®] Methode), zwischen den relevanten genotoxischen MoA-Gruppen (Klastogene/Aneugene) mit Hilfe der mechanistischen Biomarker (pH3 (S10), γ H2AX, nukleäres p53), besser differenzieren konnte. Diese Methode bestätigt, dass mechanistische Biomarker gut geeignet sind, um zukünftig Wirkstoffkandidaten besser wirkmechanistisch charakterisieren und der modernen Risikobewertung bezüglich der Ableitung von Schwellenwerten und Reduktion von *in vivo* Studien entgegenkommen zu können. Weiterhin wurde durch die Bewertung aufgezeigt, dass mit dem neuen Forschungs- oder Detektionssansatz ebenso Optimierungen möglich sind, um mit neu identifizierten Biomarkern, die MoA-Klassifizierungen noch zuverlässiger zu gestalten sowie ferner die Identifizierung weiterer MoA-Gruppen zu verfeinern (z.B. direkt DNA-wirkenden Klastogenen oder ROS-induzierende Substanzen).

Daher wurden im zweiten Ergebnisteil Gen- und Proteinveränderungen in den TK6-Zellen nach Exposition mit verschiedenen Modellsubstanzen untersucht, um Biomarker zu identifizieren, die Einteilungsmöglichkeiten von Substanzen zulassen.

4.2.1 Genomische Marker

4.2.1.1 Identifizierung klastogener Substanzen

Die untersuchten Klastogene 5-FU und ETO konnten zum späten Zeitpunkt von 24h durch die Induktion von *ATR* und *RAD17* deutlich von den Aneugenen und Nicht-Genotoxinen abgegrenzt werden. Beide Marker weisen viele Funktionen infolge von DSBs und Replikationsstress auf.

RAD17 interagiert mit *Nbs1* innerhalb der DSB-Reparatur durch HR, fördert die Aktivierung von *ATM* und die posttranslationale Modifikation von *RAD17* ist für eine wirksame DSB-Reparatur zentral (Wang et al. 2014).

ATR zählt neben ATM und den DNA-PKcs zu den zentralen Kinasen des DDR-Signalweges. Als frühes DSB-Signal wird das Histonprotein H2AX durch ATM und ebenso durch ATR zu γ H2AX phosphoryliert (Stiff et al. 2004; Kuo und Yang 2008). Die Hochregulation von ATR nach Behandlung mit 5-FU scheint nicht mit der Aktivierung von γ H2AX assoziiert zu sein, da 5-FU keinen γ H2AX-Anstieg in der MultiFlow[®] Methode aufwies und sich daher im Vergleich zu den anderen Klastogenen atypisch zeigt. Die ATR-Antwort in den TK6-Zellen ist mit dem 5-FU-induzierten Replikationsstress assoziiert (Kitao et al. 2018; Shiotani und Zou 2016; Flynn und Zou 2011). Dieser Schaden scheint vorrangig in der hier verwendeten Zelllinie präsent zu sein und es kann angenommen werden, dass die Detektion des Replikationsschadens durch ATR sensitiver ist als die Detektion von DSBs über γ H2AX. Die fehlende Induktion von γ H2AX könnte sehr wahrscheinlich mit der metabolischen Konstitution der TK6-Zellen assoziiert und nicht auf den p53-Status zurückzuführen sein, da andere p53-kompetente Zelllinien wie beispielweise die HepG2-Zellen einen γ H2AX-Anstieg nach Exposition mit 5-FU aufzeigten (Khoury et al. 2016). Die Arbeiten von Oka et al. 2006 demonstrierten anhand ihrer gewonnenen Daten eine unterschiedliche genotoxische Sensitivität in den verschiedenen 5-FU behandelten Zellen (L5178Ytk^{+/-}, WTK-1 und TK6) und zeigten auf, dass der unterschiedliche p53-Status die Sensitivität von 5-FU nicht beeinflusste. Sie identifizierten einen zelltypspezifischen Metabolismus von 5-FU, der für die genotoxische Antwort entscheidend war. Es liegt nahe, dass dadurch verschiedene γ H2AX-Antworten aufgrund einer unterschiedlichen metabolischen Enzymaktivität in den Zellen resultieren könnten, wie es in dieser Arbeit bestätigt werden konnte.

Das Gen *FANCD2* demonstrierte nach 24h Substanzbehandlung ebenso eine charakteristisch-mechanistische Antwort in den TK6-Zellen, da die Klastogene das Gen am stärksten hochreguliert haben. *FANCD2* gehört neben den anderen bekannten *FANC*-Genen (mind. 22) zu dem FA-Signalweg, der im Rahmen der DNA-Replikation/-Schädigung aktiviert wird. *FANCD2* weist zahlreiche Funktionen innerhalb der DNA-Reparatur auf und interagiert infolge von DNA-Intrastrang Vernetzungen unter anderem mit *FANCI* zu einem FANCD2-FANCI Komplex (Nepal et al. 2017). Mehrere Arbeiten demonstrierten einen Protein-Anstieg von FANCD2

nach Behandlungen mit den klastogenen Verbindungen CS (Oda et al. 2017), MMC sowie HU (Andreassen et al. 2004) und Temozolomid (Patil et al. 2014).

Im QGP Assay wurden die Gene *POLH* und *DDB2* mit der Identifizierung klastogener Verbindungen assoziiert, da diese eine starke Genexpression induzierten. *POLH* kodiert die DNA-Polymerase η und ist für die Translasionssynthese innerhalb der DNA-Reparatur zuständig (Masutani et al. 2000). Wie die Ergebnisse zeigten, ist die Hochregulation von *POLH* mit dem DSB-induzierenden Mechanismus klastogener Verbindungen verbunden und steht im Einklang mit den veröffentlichten Daten von Liu und Chen, die herausgefunden haben, dass *POLH* unter Einwirkung ionisierender Strahlung sowie Substanz-induziert durch CTH hochreguliert wurde (Lui und Chen 2006). *DDB2* wurde im Vergleich zu *POLH*, das eine initiale Funktion innerhalb der NER-Reparatur einnimmt (Luijsterburg et al. 2007) und eine Induktion nach Behandlung von CS (Barakat et al. 2008) aufzeigt, weniger stark induziert.

4.2.1.2 Identifizierung aneugener Substanzen

Die Induktion von *CLIP-170* war nur zum frühen Zeitpunkt für die aneugen Substanzen VB, DES und AMG-900 spezifisch, da zum späten Zeitpunkt keine Veränderung des Gens mehr beobachtet werden konnte. *CLIP-170* reguliert die Bindung der MT an den Chromosomen und assoziiert mit ungebundenen Kinetochoren während der Prometaphase und verschwindet wieder nach Anhaftung der Kinetochore (Kakeno et al. 2014; Tanenbaum et al. 2006; Dujardin et al. 1998). Die Aneugene VB und DES sind bekannte MT-Toxine und verhindern deren Polymerisation, wohingegen AMG-900 die zentralen Mitosekinasen Aurora A und B inhibiert (Elhajouji et al. 1997; Ngan et al. 2001; Payton et al. 2010). Wirkmechanistisch führt das zu vermehrten fehlorientierten Anheftungen der Chromosomen an die MT (keine Biopolarität). Die beschädigte Zelle verweilt in der Mitose, damit die Schäden repariert werden können. An dieser Stelle kann der Schaden bzw. der Mitose-Arrest mit einem Anstieg oder genauer gesagt mit einer Akkumulation von p $\text{H}3$ (S10) assoziiert werden, wie es bereits in dieser Arbeit demonstriert werden konnte und daher als zuverlässiger Marker für Substanzen mit einem aneugen Mechanismus dienen konnte. Vader und seine Kollegen machten bereits im Jahr 2007 bekannt, dass *CLIP-170* als guter Marker für ungebundene Kinetochore geeignet ist und

demonstrierten die Persistenz von *CLIP-170* nach Behandlung mit dem Aneugen Taxol (Paclitaxel) (Vader et al. 2007). Weitere Arbeiten konnten ebenso aufzeigen, dass Paclitaxel-exponierte Zellen eine intrazelluläre Vermehrung von *CLIP-170* bewirkten (Karna et al. 2011). Der Marker scheint aber nicht mit den in dieser Arbeit untersuchten aneugenischen Verbindungen sensitiv genug zu sein, da die *CLIP-170*-Induktion nach 24h verschwand.

4.2.1.3 Identifizierung ROS-induzierender Substanzen

Die hochregulierte Expression von *NFE2L2* war nach 4h und 24h spezifisch für ROS-produzierende Substanzen wie bereits bei 5-FU veröffentlicht wurde (Takano et al. 2015). Insbesondere die zytotoxische und nicht-genotoxische Substanz CCCP induzierte eine dosis-abhängige ROS-Antwort in den TK6-Zellen. CCCP ist ein bekannter „Entkoppler“ und infolge einer Exposition kommt es zum Verlust des Membranpotentials in den Mitochondrien (Kane et al. 2018). In den Arbeiten von Park et al. 2015 konnte aufgezeigt werden, dass CCCP Keap-1 degradiert und dadurch Nrf2 (kodiert von *NFE2L2*) aktiviert wird.

Die Aktivität von *TYMS* war vorrangig nach Behandlung mit den Nicht-Genotoxinen (5 von 6) deutlich runterreguliert, wie die Ergebnisse im QGP Assay demonstrierten. *TYMS* spielt eine wichtige Rolle bei der DNA-Replikation und -Reparatur durch die Bereitstellung von Nukleotiden (Anderson et al. 2011). Nicht-Genotoxine wie TC inhibieren deutlich das Zellwachstum, z.B. durch Auslösung von ER-Stress (Racek et al. 2008). Mechanistisch ist das durch die Inhibierung von E2F1 begründet. Die Kontrolle der *TYMS*-Genexpression wird vorrangig durch den Retinoblastom 1 (RB1) E2F1-Weg reguliert. Im Allgemeinen interagiert pRB1 mit kritischen regulatorischen Faktoren einschließlich der E2F-Familie der Transkriptionsfaktoren, deren Aktivität für die Zellzyklusprogression (G1/S-Phase) bekannt ist (Thwaites et al. 2017). Die Ergebnisse zeigten auf, dass die untersuchten Nicht-Genotoxine eine moderate bis starke anti-proliferative Wirkung auf die Zellen haben, was beispielweise bei IMA oder TC durch die Arbeit von Milovancev et al. 2016 bestätigt wird.

4.2.2 Etablierung eines Vorhersagemodells zur Identifizierung (geno)toxischer Substanzen

Die toxikogenomische Studie mit Hilfe des QGP Assays ermöglichte die Identifizierung weiterer Markergene zur Einteilung von MoA-Gruppen.

Es wurden univariate Analysen der 67 putativen Markergene durchgeführt, um die vielversprechendsten Gene zu identifizieren. Auf Basis von statistischen Maßen (Pseudo R^2 und Konfusionsmatrix) wurde festgestellt, dass beim 24h Zeitpunkt nach Behandlung mit je einer Testkonzentration pro Substanz die stärksten Genexpressionsveränderungen auftraten.

Zehn von zwölf genotoxischen Verbindungen induzierten die Expression von *CDKN1A*. Außerdem wurde diese moderat durch das Nicht-Genotoxin CCCP beeinflusst. Das Markergen *TP53I3* wurde stärker und spezifischer als *CDKN1A* durch die genotoxischen Verbindungen reguliert, da elf von zwölf Genotoxinen eine *TP53I3*-Antwort zeigten und dabei kein einziges Nicht-Genotoxin die Biomarker-Antwort beeinflusste. Diese Ergebnisse lassen sich durch weitere Arbeiten bestätigen, in denen sie ebenso eine Hochregulation von *CDKN1A* (Sakai et al. 2014; Lee et al. 2014) und *TP53I3* (Lee et al. 2014) demonstrierten und sich demnach für die Bewertung als Genotoxizität geeignet zeigten. Interessanterweise haben Sakai und Mitarbeiter aufgezeigt, dass *KIF20A* ebenso mit Genotoxizität assoziiert werden konnte und deren verwendete Testsubstanzen zu einer Runterregulation des Gens führten. Diese Daten stimmten bei der Behandlung mit MMS und ETO mit unseren Daten überein, jedoch wurden die Marker-Effekte auch von den untersuchten Nicht-Genotoxinen stark beeinflusst, die ebenfalls das Gen herunterreguliert haben. Weiterhin zeigte die klastogene Substanz PAL keinen Effekt auf die beiden Markergene und konnte daher nicht als Genotoxin identifiziert werden. Die quantitative Proteinbestimmung von p21 mittels ELISA deckte jedoch eine p21-Antwort nach Behandlung von PAL auf. Es lässt sich vermuten, dass im Toxikogenomik-Ansatz die ausgewählte Testkonzentration von 8,8 μM nicht mehr geeignet war, um die Genaktivität nachzuweisen, da im ELISA die niedrige und mittlere Testkonzentration (0,4 - 2,2 μM) p21 in den TK6-Zellen nach 24h induzierte, aber nicht mehr die höchste von 6,25 μM .

An dieser Stelle zeigt sich, wie bedeutend die Untersuchungen von Dosis-Wirkungsbeziehungen sind bzw. wie die Auswahl einer einzelnen Testkonzentration die Detektion eines genotoxischen Potentials beeinflussen kann. Ebenso wurde keine *TP53I3*-Antwort induziert, was in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Perez und Kollegen ist, die unter anderem die Proteinaktivität von p53 untersucht haben (Perez et al. 2015).

Apoptose-regulierende Gene wie *BIK* gehören der großen *BCL-2* Genfamilie an und unterscheiden sich funktionell in proapoptotische (z.B. *BIK* und *BAX*) und antiapoptotische (z.B. *BCL-2* und *MCL-1*) Signalwege (Jiang A und Clark EA. 2001). *BCL-2* gehört zu den bekanntesten antiapoptotischen Markern und seine Hochregulation ist mit vielen Krebsarten assoziiert, die so die Apoptose umgehen (Portt et al. 2011). *BIK* ist vorrangig im ER lokalisiert und löst die Apoptose über den mitochondrialen Weg, durch die räumliche Mobilisierung des Calciums aus dem ER zu den Mitochondrien aus. Die Verringerung des Calciums im ER führt zur Stressantwort (ER-Stress-vermittelte Apoptose) Die *BIK*-induzierte Apoptose wird selektiv durch den Effektor *BAX* vermittelt (Chinnadurai et al. 2008).

Jede untersuchte nicht-genotoxische Verbindung induzierte ER-Stress (6 von 6), da starke Expressionen von *BIK* beobachtet wurden. Ein bekannter Vertreter der ER-Stress-induzierenden Substanzen stellt Thapsigargin dar, das den Calciumhaushalt stört (Thastrup et al. 1990). In dieser Studie wurde unter anderem Tunicamycin untersucht, von dem ebenfalls bekannt ist, ER-Stress auszulösen. Die Substanz inhibiert im inneren des ERs (ER-Lumen) die Bildung N-glykosylierter Proteine, was zur Anreicherung von Proteinen im ER-Lumen führt (Leavitt et al. 1977).

Die klastogenen Verbindungen 5-FU und CTH wiesen ebenso eine starke Hochregulation von *BIK* auf. In den Arbeiten von Yadunandam et al. 2012 konnte demonstriert werden, dass 5-FU ebenfalls den Calciumhaushalt hochgradig stört und daher ER-Stress auslöst und neuere Arbeiten demonstrierten, dass CTH indirekt die Aktivität des Protoonkogens c-MYC im ER verstärkt und dadurch Stress auslöst (Jayasooriya et al. 2018). Im Gegensatz zu den Klastogenen, regulierten vorrangig Aneugene (4 von 5) das Gen *OGG1* runter. 8-OxoG zählt zu bekanntesten ROS-Produkt und ein bestehender DNA-Schaden führt zur Mutation. Die Beseitigung des

Schadens wird durch die *OGG1*-Aktivität innerhalb des BER-Reparaturweges katalysiert (Bonde et al. 2007), so dass eine Hochregulation mit der Bildung von ROS assoziiert werden kann, wie es nach der 4h Behandlung mit fünf von sechs Nicht-Genotoxinen und dem Klastogen MMC der Fall war (Clarke et al. 1997; Liddiard et al. 2010).

Diese identifizierten Markergene wurden anschließend multivariat analysiert, um ein Vorhersagemodell zu konstruieren. Die synergistische Kombination aus den fünf Genen *BIK*, *TP53I3*, *KIF20A*, *DDB2* und *OGG1* zeigte die beste Konstellation zur mechanistischen Klassendiskriminierung. Die Validierung des Modells erfolgte über die LOOCV-Methode und das etablierte Testsystem resultierte in einer Spezifität von 83%, Sensitivität von 86% und in einer Prädiktivität von 85%. Als „unbekannte“ Substanzen wurden DEX und IMA *a priori* korrekt als Nicht-Genotoxine klassifiziert. Durch die hinreichende Untersuchung verschiedener Substanzklassen, konnte aufgezeigt werden, dass sich die Identifizierung eines spezifischen Markers mit dem zusammengestellten Gen-Panel schwierig gestaltet. Die Genexpressionsveränderungen der nicht-genotoxischen Verbindungen haben sich mehrfach mit den Genotoxinen durch sekundär-induzierte Stresssignale überschritten und griffen komplex in die Zellregulation, DNA-Reparatur und Zellproliferation ein. Dies wird sehr gut am Beispiel von IMA verdeutlicht, welches ebenso das Genotoxizitäts-assoziierte Gen *TP53I3* stark induziert hat. Anhand des ausgewählten Gen-Panels konnte kein Gen identifiziert werden, welches spezifisch mit Aneugenität assoziiert werden kann.

4.2.3 Proteomische Marker

4.2.3.1 Identifizierung klastogener Substanzen

Die PTMs 53BP1 (S1778) und FANCD2 (S1404) zeigten eine charakteristische Antwort nach Behandlung mit klastogenen Substanzen. Die 53BP1 (S1778)-positiven Zellen nahmen zu beiden Zeitpunkten nach Behandlung mit ETO und HU zu, jedoch nicht nach 5-FU-Behandlung. Neben der Rekrutierung von γ H2AX, MDC1 oder BRCA1 infolge von DSBs, wird ebenso 53BP1 (S1778) als zentraler Mediator im NHEJ-Weg mobilisiert und kann nach Fluoreszenzfärbung als Foci co-lokalisiert mit γ H2AX

sichtbar gemacht werden (Feng et al. 2015). Das Protein 53BP1 weist mehrere Phosphorylierungsstellen, wie mitunter durch die ATM- und ATR-vermittelten Stellen an S13, S25, S176 und S1778, auf. In der Studie von Lee et al. 2009 konnte abgeleitet werden, dass 53BP1 (S1778) relevanter für den Reparaturprozess von DSBs ist als 53BP1 (S25). 5-FU löste keine 53BP1 (S1778)-Antwort in den Zellen aus, dass mit dem Ergebnis zur Untersuchung des Biomarkers γ H2AX übereinstimmt. Es wurde bereits vorangehend im ersten Teil diskutiert, dass die Erfassung von 5-FU-induzierten DSBs für die verwendete TK6-Zelllinie aufgrund der metabolischen Konstellation nicht sensitiv zu sein scheint und der p53-Status keinen Einfluss auf eine γ H2AX-Antwort hat (Oka et al. 2006; Khoury et al. 2016). Anders hingegen fiel die Untersuchung des Markers FANCD2 (S1404) vielversprechender und detektierte die gesamten Klastogene ETO, HU und moderat 5-FU, deren Schadensantwort deutlich von den Aneugenen und Nicht-Genotoxinen abzugrenzen war. FANCD2 ist ein charakterisierter mechanistischer Marker, der infolge von Replikationsstress und DNA-Interstrang Schäden vermehrt exprimiert wird (Howlett et al. 2005). Das Protein hat mehrere Phosphorylierungsstellen, darunter an Serin 1404, das nach Behandlung mit den klastogenen Substanzen Mitomycin C oder HU aktiviert wird (Boisvert und Howlett 2014).

4.2.3.2 Identifizierung aneugener Substanzen

Die Antwort des untersuchten Mitose-Checkpoint Proteins BubR1 (S670) und pH3 (S28) war zu frühen und späten Zeitpunkten deutlich nach Behandlung von aneugen Substanzen angestiegen und hat die wirkmechanistische Differenzierung zu Klastogenen und Nicht-Genotoxinen zugelassen.

Die Phosphorylierung von BubR1 an Serin 670 ist essentiell für die Fehlerkorrektur und für die Anhaftung der Kinetochore. Ferner deuten *in vitro* Daten darauf hin, dass der Phosphorylierungsstatus von BubR1 für die Checkpoint-Inhibition des APC-Komplexes wichtig ist. In Arbeiten von Suijkerbuijk et al. 2012 konnte bereits aufgezeigt werden, dass mit NOC und PAC-behandelte Zellen eine erhöhte Proteinaktivität von BubR1 (S670) aufzeigten, was durch unsere untersuchten Aneugene VB, AMG-900 und GF bestätigt werden konnte.

Die Phosphorylierung von pH3 (S28) zeigte ähnliche gute Ergebnisse wie mit der Modifikation an Serin10 auf, mit dem bedeutenden Unterschied, dass pH3 (S28), ebenso wie BubR1 (S670), auch nach 4h Behandlung eine Effekt-Antwort durch AMG-900 aufzeigte. Funktionell sind pH3 (S28) und BubR1 (S670) mit der M-Phase assoziiert, wohingegen pH3 (S10) mit der späten S- sowie G2-Phase assoziiert ist. AMG-900 ist ein atypisches Aneugen und inhibiert die Aurora-vermittelte Phosphorylierung von pH3 (Juan et al. 2014; Sampath et al. 2004). Die Inhibierung scheint transient zu sein und/oder nicht nur durch die Aurora-Kinasen vermittelt zu sein, da nach 24h ebenso die Akkumulation von pH3 (S10) bei AMG-900 zu beobachten war (Juan et al. 2014).

4.2.3.3 Identifizierung ROS-induzierender und genotoxischer Substanzen

Das oxidative Stress-assoziierte Protein Nrf2 (S40) war zu beiden Zeitpunkten bei allen Substanzklassen signifikant erhöht, allerdings war die Proteinaktivität in einem biologischen Replikat nach 24h bei H₂O₂ mit einem 11-fachen Anstieg gegenüber der Kontrolle und CCCP mit einem 14-fachen Anstieg am deutlichsten ausgeprägt. Die Stress-induzierte Aktivierung des Proteinmarkers kann durch die Arbeiten von Jimenez-Blasco et al. 2015 und Covas et al. 2013 bestätigt werden.

Es ist bekannt, dass die Acetylierung von sechs Lysinen (K370, K372, K373, K381 und K382) für die Stabilisierung von p53 wichtig ist (Liu et al. 1999; Brooks und Gu 2003) und diese Protein-Modifikation mit genotoxischen Ereignissen in den Zellen assoziiert werden kann (Chang et al. 2013; Luo et al. 2016). Die Untersuchungen des acetylierten p53 (K373) war zum späten Zeitpunkt zur Detektion von genotoxischen Verbindungen VB, AMG-900, ETO und 5-FU spezifisch und ermöglichte daher eine eindeutige Differenzierung zu den nicht-genotoxischen Substanzen IMA und CCCP). In Übereinstimmung mit den anderen p53-Daten induzierte auch IMA moderat die acetylierte p53-Form zum frühen Zeitpunkt.

5 Schlussfolgerung und Ausblick

Im Rahmen der Arbeit konnte im ersten Teil gezeigt werden, dass die von der Firma Litron Laboratories entwickelte *in vitro* Genotoxizitätsmethode – die MultiFlow[®] Methode – durch die quantitative Erfassung von γ H2AX, pH3 (S10) und nukleärem p53 in den humanen TK6-Zellen für die Charakterisierung von Wirkstoffkandidaten (Aneugen/Klastogen/Nicht-Genotoxin) einen bedeutenden Mehrwert darstellt sowie insgesamt vergleichend zu weiteren verfügbaren Methoden eine moderne Risikobewertung ermöglicht. Die Performance der MultiFlow[®] Methode konnte durch einen erstmaligen direkten Vergleich zwischen den Ergebnissen aus dem anerkannten durchflusszytometrischen MNT (MicroFlow[®] Methode) und den Ergebnissen aus der MultiFlow[®] Methode demonstriert werden und ergab eine verbesserte Sensitivität von 95%, Spezifität von 90% und eine MoA-Klassifizierungsrate von 85% (Aneugen vs. Klastogen).

Weitere Optimierungen könnten die Methode noch zukunftsorientierter und allgemeingültiger machen. So könnte die Verwendung p53-kompetenter Zellen der relativen niedrigen Spezifität entgegenwirken. Dagegen kann die Spezifität ebenso von der Zytotoxizität beeinträchtigt werden und es ist wichtig, die Parameter zur Ermittlung der Zytotoxizität zu vergleichen. Die Zytotoxizitätsstudien in der vorliegenden Arbeit basierten auf Zytotoxizitätsmessungen, die den relativen Anteil lebender Zellen erfassen (RNC). Dagegen wurde für den RNC gezeigt, dass er im Vergleich zur relativen Populationsverdopplung (RPD) oder der relativen Zunahme der Zellzahl (RICC) unterschätzt wurde. So könnte die Verwendung der primären Parameter – RPD oder RICC – gemäß der OECD Guideline die Spezifität weiterhin erhöhen. Durch die Übertragung der Methode auf eine andere Zelllinie, wie beispielsweise chinesische Hamsterzellen (V79), könnte die Methode noch mehr an Attraktivität und Sensitivität gewinnen, da diese Zelllinie zu den weitverbreitetsten Standardtestsystemen gehört. Ebenfalls ist zu vermuten, dass der Einsatz von V79-Zellen den zusätzlichen MultiFlow[®] Endpunkt – polyploide Zellen – besser erfassen kann als die TK6-Zellen, um einen aneugenen Mechanismus einer Substanz synergistisch mit pH3 (S10) zuverlässiger anzuzeigen. Trotz der genannten

Verbesserungsmöglichkeiten kann die Methode als bereits besonders vorteilhaft bewertet werden. Die Aufarbeitung der Proben und die gleichzeitige multiparametrische Analyse machen es möglich, schnell und mit geringem Substanzbedarf Wirkstoffkandidaten auf Genotoxizität zu untersuchen und zu klassifizieren.

Im zweiten Teil der Arbeit konnte ein Vorhersagemodell auf genomics-basierten Daten in den TK6-Zellen zur Kategorisierung von aneugenen, klastogenen und nicht-genotoxischen Substanzen entwickelt werden, welches auf einer kombinierten Gen-Antwort von *BIK*, *KIF20A*, *TP53I3*, *DDB2* und *OGG1* basiert. Weiterhin konnten mittels der qPCR im Rahmen von Single-Genanalysen und durch die Verwendung der HCI-Technologie MoA-Marker auf Gen- und Proteinebene identifiziert werden, die funktionell in die Substanz-induzierte DNA-Schadensantwort eingebunden sind.

Die Bewertung des multivariaten Vorhersagemodells ergab eine Sensitivität von 86%, eine Spezifität von 83% und eine Prädiktivität von 85%. Trotz der guten Performance des Testsystems sollte das Modell sowohl auf Spezifität und Sensitivität überprüft als auch optimiert werden. Die Genexpressionsdaten, die mit Hilfe der QGP Methode gewonnen wurden, haben aufgezeigt, dass es zum einen schwierig ist, geeignete Marker zu identifizieren, die eindeutig zwischen genotoxischen und nicht-genotoxischen Verbindungen unterscheiden und zum anderen Genmarker zu identifizieren, welche die Aneugenität vorhersagen. Durch die Einbindung von 6 Nicht-Genotoxinen konnte visuell anhand der Heat Maps aufgezeigt werden, dass diese Verbindungen ebenso die DNA-Schadensantwort regulieren und durch sekundäre Signale wie Zellstress in diese eingebunden sind. Ein gutes Beispiel stellen die Verbindungen IMA oder CCCP dar (beides Nicht-Genotoxine), welche nach 4h einen Effekt auf *TP53I3* (Genotoxizität) zeigten. Weiterhin konnte auf Basis der ausgewählten untersuchten Marker kein Gen eindeutig identifiziert werden, welches spezifisch mit Aneugenität assoziiert werden kann. Daher sollten die Nachfolgearbeiten sich darauf konzentrieren, weitere genomische Studien zur Erforschung zusätzlicher Biomarker, welche funktionell in die Antwort auf aneugene Verbindungen eingebunden sein könnten, durchzuführen. Als potentielle Marker könnten zum Beispiel *MAP9*, *XMAP215* sowie *XKCM1* im Rahmen der

Spindelbildung als auch *MKI67*, *MCM2*, *MCM3* und *Nup88* als Mitose-Marker untersucht werden. Zum anderen sollte das System mit weiteren Modellsubstanzen, wie es zum Beispiel von der ECVAM (62 Substanzen) empfohlen wird, validiert werden, um die künftige Charakterisierung unbekannter Substanzen zu verbessern. Abschließend muss generell bei der Verwendung des neuen Testsystems berücksichtigt werden, dass die hier herausgearbeitete kombinierte Genexpressionsantwort charakteristisch für TK6-Zellen ist und die Daten auf Basis einer ausgewählten Testkonzentration beruhen.

Die Analyse der genomischen (qPCR) und proteomischen (HCI und ELISA) Substanz-induzierten Zellaktivitäten brachten potentielle und zuverlässige mechanistische Biomarker hervor, die für die Entwicklung oder Optimierung von *in vitro* Tools genutzt werden können.

Zur Substanzcharakterisierung können auf Genebene spezifische Marker herangezogen werden, um klastogene (*ATR*, *RAD17* oder *POLH*) und zytotoxische (*NFE2LE*) sowie genotoxische von nicht-genotoxischen Verbindungen (*TP53I3*) zu unterscheiden. Untersuchungen zu PTMs, die funktionell in die Substanz-induzierte DNA-Schadensantwort eingebunden sind, konnten zuverlässig Aneugene (BubR1 (S670) und pH3 (S28)), Klastogene (53BP1 (S1778) und FANCD2 (S1404)), Zytotoxine (Nrf2 (S40)) identifizieren sowie durch die Einbindung von p53 (K373) die Differenzierung zwischen Genotoxinen und Nicht-Genotoxinen ermöglichen. Die Etablierung einer HCI-Methode zur (Geno)toxizitätstestung mit den vorangestellten identifizierten Proteinen könnte durch ihre Eignung zur Multiendpunkt-Analyse als Nachfolgearbeit zunächst weitere Substanzen testen und Grenzwerte der Biomarker-Antwort ermitteln. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Studien zeigten insgesamt auf, dass Dosis-Wirkungsbeziehungen (vorrangig in hohen Testkonzentrationen) sowie die Wahl der Konzentration die zuverlässige Identifizierung eines Biomarkers stark beeinflussen.

In dieser Arbeit konnte aufgezeigt werden, dass die Wirkstoffcharakterisierung mit der neuen *in vitro* Genotoxizitätsmethode, dem MultiFlow® Assay, sowie durch die identifizierten mechanistischen Biomarker verbessert wird. Durch die vorgestellte Methodenetablierung und Bereitstellung potentieller Biomarker sind neue *in vitro*

Tools verfügbar, die bedeutende mechanistische Daten zum vorliegenden Wirkmechanismus einer Substanz bereitstellen und ferner über die Ableitung von Schwellenwerten für (geno)toxische Verbindungen informieren. Herauszustellen ist, dass diese Arbeit dazu beiträgt *in vivo* Nachfolgetests durch uneindeutigen Ergebnissen zu vermeiden und/oder durch die Anwendung als Screeningmethode potent geno(toxische) Verbindungen frühzeitig zu identifizieren und durch die Modifizierung der Leitstruktur weniger potent (geno(toxisch)) die Tierstudien erreichen.

Literaturverzeichnis

- An J, Huang YC, Xu QZ, Zhou LJ, Shang ZF, Huang B, Wang Y, Liu XD, Wu DC, Zhou PK. 2010. DNA-PKcs plays a dominant role in the regulation of H2AX phosphorylation in response to DNA damage and cell cycle progression. *BMC Mol Biol.* 11:18.
- Anderson DD, Quintero CM, Stover PJ. 2011. Identification of a de novo thymidylate biosynthesis pathway in mammalian mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(37):15163-8.
- Andreassen PR, D'Andrea AD, Taniguchi T. 2004. ATR couples FANCD2 monoubiquitination to the DNA-damage response. *Genes Dev.* 18(16):1958-63.
- Agarwal S und Varma D. 2015. How the SAC gets the axe: Integrating kinetochore microtubule attachments with spindle assembly checkpoint signaling. *Bioarchitecture.* 5(1-2):1-12.
- Aguiar PH, Furtado C, Repolês BM, Ribeiro GA, Mendes IC, Peloso EF, Gadelha FR, Macedo AM, Franco GR, Pena SD, Teixeira SM, Vieira LQ, Guarneri AA, Andrade LO, Machado CR. 2013. Oxidative stress and DNA lesions: the role of 8-oxoguanine lesions in *Trypanosoma cruzi* cell viability. *PLoS Negl Trop Dis.* 7(6):e2279
- Aguilar-Mahecha A, Hales BF, Robaire B. 2005. Effects of acute and chronic cyclophosphamide treatment on meiotic progression and the induction of DNA double-strand breaks in rat spermatocytes. *Biol Reprod.* 72(6):1297-304.
- Al-Kuraishy HM, Al-Gareeb AI, Al-Buhadilly AK. 2018. p53 Gene (NY-CO-13) Levels in Patients with Chronic Myeloid Leukemia: The Role of Imatinib and Nilotinib. *Diseases* 6(1).
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2002. *Molecular biology of the cell* (4th ed.). New York: Garland Science
- Ando M, Yoshikawa K, Iwase Y, Ishiura S. 2014. Usefulness of monitoring γ -H2AX and cell cycle arrest in HepG2 cells for estimating genotoxicity using a high-content analysis system. *J Biomol Screen.* 19:1246-54.

- Annovazzi L, Mellai M, Schiffer D. 2017. Chemotherapeutic Drugs: DNA Damage and Repair in Glioblastoma. *Cancers (Basel)*. 9(6).
- Annunziato AT. 2008. DNA Packaging: Nucleosomes and Chromatin. *Nature Education* 1(1):26.
- Appella E und Anderson CW. 2001. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur J Biochem*. 268: p. 2764-2772.
- Archambault V und Carmena M. 2012. Polo-like kinase-activating kinases: Aurora A, Aurora B and what else? *Cell Cycle*. 11(8):1490-5.
- Attia SM, Aleisa AM, Bakheet SA, Al-Yahya AA, Al-Rejaie SS, Ashour AE, Al-Shabanah OA. 2009. Molecular cytogenetic evaluation of the mechanism of micronucleus formation induced by camptothecin, topotecan, and irinotecan. *Environ Mol Mutagen* 50:145-151.
- Attia SM. 2013. Molecular cytogenetic evaluation of the mechanism of genotoxic potential of amsacrine and nocodazole in mouse bone marrow cells. *J Appl Toxicol* 33:426-433.
- Baba AI und Cătoi C. 2007. *Comparative Oncology*. Chapter 2. Carcinogenesis. Bucharest: The Publishing House of the Romanian Academy.
- Bailey GS, Reddy AP, Pereira CB, Harttig U, Baird W, Spitsbergen JM, Hendricks JD, Orner GA, Williams DE, Swenberg JA. 2009. Nonlinear cancer response at ultralow dose: a 40800-animal ED(001) tumor and biomarker study. *Chem Res Toxicol*. 22(7):1264-76.
- Barakat BM, Wang QE, Han C, Milum K, Yin DT, Zhao Q, Wani G, Arafa el-SA, El-Mahdy MA, Wani AA. 2010. Overexpression of DDB2 enhances the sensitivity of human ovarian cancer cells to cisplatin by augmenting cellular apoptosis. *Int J Cancer*. 127(4):977-88.
- Baxevanis AD. 2003. Using Genomic Databases for Sequence-Based Biological Discovery. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)* (9-12):185-192.
- Bevan RJ und Harrison PT. 2017. Threshold and non-threshold chemical carcinogens: A survey of the present regulatory landscape. *Regul Toxicol Pharmacol*. pii: S0273-2300(17)30003-X.

- Birrell L, Cahill P, Hughes C, Tate M, Walmsley RM. 2010. GADD45a-GFP GreenScreen HC assay results for the ECVAM recommended lists of genotoxic and non-genotoxic chemicals for assessment of new genotoxicity tests. *Mutat Res.* 695(1-2):87-95.
- Boisvert RA und Howlett NG. 2014. The Fanconi anemia ID2 complex: dueling axes at the crossroads. *Cell Cycle.* 13(19):2999-3015.
- Bolt HM, Foth H, Hengstler JG, Degen GH. 2004. Carcinogenicity categorization of chemicals-new aspects to be considered in a European perspective. *Toxicol Lett* 151:29-41.
- Bonde P, Gao D, Chen L, Duncan M, Miyashita T, Montgomery E, Harmon JW, Wei C. 2007. Selective decrease in the DNA base excision repair pathway in squamous cell cancer of the esophagus. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 133(1):74-81.
- Bondi H, Zilocchi M, Mare MG, D'Agostino G, Giovannardi S, Ambrosio S, Fasano M, Alberio T. 2015. Dopamine induces mitochondrial depolarization without activating PINK1-mediated mitophagy. *J Neurochem.*
- Borges HL, Linden R, Wang JY. 2008. DNA damage-induced cell death: lessons from the central nervous system. *Cell Res.* 18(1):17-26. Review.
- Brooks CL und Gu W. 2003. Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 15(2):164-71.
- Brown M und Wittwer C. 2000. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clin Chem.*46(8 Pt 2):1221-9.
- Bryce SM, Shi J, Nicolette J, Diehl M, Sonders P, Avlasevich S, Raja S, Bemis JC, Dertinger SD. 2010. High content flow cytometric micronucleus scoring method is applicable to attachment cell lines. *Environ Mol Mutagen.*51(3):260-6.
- Bryce SM, Avlasevich SL, Bemis JC, Dertinger SD. 2011. Miniaturized flow cytometry-based CHO-K1 micronucleus assay discriminates aneugenic and clastogenic modes of action. *Environ Mol Mutagen* 52(4):280-6.
- Bryce SM, Bemis JC, Mereness JA, Spellman RA, Moss J, Dickinson D, Schuler MJ, Dertinger SD. 2014. Interpreting in vitro micronucleus positive results: simple

- biomarker matrix discriminates clastogens, aneugens, and misleading positive agents. *Environ Mol Mutagen* 55:542-555.
- Bryce SM, Bernacki DT, Bemis JC, Dertinger SD. 2016. Genotoxic mode of action predictions from a multiplexed flow cytometric assay and a machine learning approach. *Environ Mol Mutagen* 57(3):171-89.
- Bryce SM, Bernacki DT, Bemis JC, Spellman RA, Engel ME, Schuler M, Lorge E, Heikkinen PT, Hemmann U, Thybaud V, Wilde S, Queisser N, Sutter A, Zeller A, Guérard M, Kirkland D, Dertinger SD. 2017. Interlaboratory evaluation of a multiplexed high information content in vitro genotoxicity assay. *Environ Mol Mutagen*. 58(3):146-161.
- Cammerer Z, Schumacher MM, Kirsch-Volders M, Suter W, Elhajouji A. 2010. Flow cytometry peripheral blood micronucleus test in vivo: determination of potential thresholds for aneuploidy induced by spindle poisons. *Environ Mol Mutagen* 51:278-84.
- Cazales M, Schmitt E, Montembault E, Dozier C, Prigent C, Ducommun B. 2005. CDC25B phosphorylation by Aurora-A occurs at the G2/M transition and is inhibited by DNA damage. *Cell Cycle*. 4(9):1233-8.
- Ceccaldi R, Rondinelli B, D'Andrea AD. 2016. Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. *Trends Cell Biol*. 26(1):52-64.
- Chan KS, Koh CG, Li HY. 2012. Mitosis-targeted anti-cancer therapies: where they stand. *Cell Death Dis* 3:e41.
- Chen Z, Place RF, Jia ZJ, Pookot D, Dahiya R, Li LC. 2008. Antitumor effect of dsRNA-induced p21(WAF1/CIP1) gene activation in human bladder cancer cells. *Mol Cancer Ther* 7:698-703.
- Cheung JR, Dickinson DA, Moss J, Schuler MJ, Spellman RA, Heard PL. 2015. Histone markers identify the mode of action for compounds positive in the TK6 micronucleus assay. *Mutat Res* 777:7-16.
- Chinnadurai G, Vijayalingam S, Rashmi R. 2008. BIK, the founding member of the BH3-only family proteins: mechanisms of cell death and role in cancer and pathogenic processes. *Oncogene* 27 Suppl 1:S20-9.

- Choi E und Lee H. 2008. Chromosome damage in mitosis induces BubR1 activation and prometaphase arrest. *FEBS Lett.* 582(12):1700-6.
- Chowdhury D, Keogh MC, Ishii H, Peterson CL, Buratowski S, Lieberman J. 2005. gamma-H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair. *Mol Cell.* 20(5):801-9.
- Clarke AA, Philpott NJ, Gordon-Smith EC, Rutherford TR. 1997. The sensitivity of Fanconi anaemia group C cells to apoptosis induced by mitomycin C is due to oxygen radical generation, not DNA crosslinking. *Br J Haematol.* 96(2):240-7.
- Colin DJ, Hain KO, Allan LA, Clarke PR. 2015. Cellular responses to a prolonged delay in mitosis are determined by a DNA damage response controlled by Bcl-2 family proteins. *Open Biol.* 5(3):140156.
- Cordon-Cardo C. 1995. Mutations of cell cycle regulators. Biological and clinical implications for human neoplasia. *Am J Pathol.* 147(3):545-60.
- Covas G, Marinho HS, Cyrne L, Antunes F. 2013. Activation of Nrf2 by H2O2: de novo synthesis versus nuclear translocation. *Methods Enzymol.* 528:157-71.
- Crump KS. 2011. Use of threshold and mode of action in risk assessment.. *Crit Rev Toxicol.* 41(8):637-50.
- Dakubo GD. 2016. Cancer Biomarkers in Body Fluids. *Biomarkers in Circulation.* Springer International Publishing, Cham, Switzerland pp 299.
- Darzynkiewicz Z und Zhao H. 2011. Detection of DNA strand breaks in apoptotic cells by flow- and image-cytometry. *Methods Mol Biol.* 682:91-101.
- de Graaf AO, van den Heuvel LP, Dijkman HB, de Abreu RA, Birkenkamp KU, de White T, van der Reijden BA, Smeitink JA, Jansen JH. 2004. Bcl-2 prevents loss of mitochondria in CCCP-induced apoptosis. *Exp Cell Res* 299:533-540.
- Dearfield KL, Thybaud V, Cimino MC, Custer L, Czich A, Harvey JS, Hester S, Kim JH, Kirkland D, Levy DD, Lorge E, Moore MM, Ouédraogo-Arras G, Schuler M, Suter W, Sweder K, Tarlo K, van Benthem J, van Goethem F, Witt KL. 2011. Follow-up actions from positive results of in vitro genetic toxicity testing. *Environ Mol Mutagen.* 52(3):177-204.

- Dertinger SD, Phonethepswath S, Avlasevich SL, Torous DK, Mereness J, Bryce SM, Bemis JC, Bell S, Weller P, MacGregor JT. 2012. Efficient monitoring of in vivo Pig-a gene mutation and chromosomal damage: Summary of 7 published studies and results from 11 new reference compounds. *Toxicol Sci* 130:328-348.
- Doak SH, Jenkins GJ, Johnson GE, Quick E, Parry EM, Parry JM. 2007. Mechanistic influences for mutation induction curves after exposure to DNA-reactive carcinogens. *Cancer Res.* 67(8):3904-11.
- Doktorova TY, Ates G, Vinken M, Vanhaecke T, Rogiers V. 2014. Way forward in case of a false positive in vitro genotoxicity result for a cosmetic substance? *Toxicol In Vitro.* 28(1):54-9.
- Dujardin D, Wacker UI, Moreau A, Schroer TA, Rickard JE, De Mey JR. 1998. Evidence for a role of CLIP-170 in the establishment of metaphase chromosome alignment. *J Cell Biol.* 141(4):849-62.
- Eastmond DA, Hartwig A, Anderson D, Anwar WA, Cimino MC, Dobrev I, Douglas GR, Nohmi T, Phillips DH, Vickers C. 2009. Mutagenicity testing for chemical risk assessment: update of the WHO/IPCS Harmonized Scheme. *Mutagenesis* 24:341-9.
- EFSA 2016. Review of the Threshold of Toxicological Concern (TTC) approach and development of new TTC decision tree.
- El-Awady RA, Saleh EM, Dahm-Daphi J. 2010. Targeting DNA double-strand break repair: is it the right way for sensitizing cells to 5-fluorouracil? *Anticancer Drugs* 21:277-287.
- El-Deiry WS, Tokino T, Veculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW and Vogelstein B. 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75: 817-825.
- Elhajouji A, Lukamowicz M, Cammerer Z, Kirsch-Volders M. 2011. Potential thresholds for genotoxic effects by micronucleus scoring. *Mutagenesis* 199-204.
- Elhajouji A, Tibaldi F, Kirsch-Volders M. 1997. Indication for thresholds of chromosome non-disjunction versus chromosome lagging induced by spindle inhibitors in vitro in human lymphocytes. *Mutagenesis* 12:133-140.

- Elhajouji A, Van Hummelen P, Kirschvolders M. 1995. Indications for a threshold of chemically-induced aneuploidy in vitro in human lymphocytes. *Environ. Mol. Mutagen.* vol. 26 (pg. 292-304).
- Ellinger-Ziegelbauer H, Aubrecht J, Kleinjans JC, Ahr HJ. 2009. Application of toxicogenomics to study mechanisms of genotoxicity and carcinogenicity. *Toxicol Lett* 186:36-44.
- Ermler S, Scholze M, Kortenkamp A. 2014. Genotoxic mixtures and dissimilar action: concepts for prediction and assessment. *Arch Toxicol* 88(3):799-814.
- Fang G, Yu H, Kirschner MW. 1998. Direct binding of CDC20 protein family members activates the anaphase-promoting complex in mitosis and G1. *Mol Cell.* 2(2):163-71.
- Floxin [package insert]. Raritan, NJ: Ortho-McNeil, 2008. http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2008/019735s0591b1.pdf.
- FDA 2006. Guidance for Industry Investigating Out-of-Specification (OOS) Test Results for Pharmaceutical Production.
- Fellows MD, O'Donovan MR, Lorge E, Kirkland D. 2008. Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the in vitro micronucleus test. II: Practical aspects with toxic agents. *Mutat Res.* 655(1-2):4-21.
- Fellows MD, Boyer S, O'Donovan MR. 2011. The incidence of positive results in the mouse lymphoma TK assay (MLA) in pharmaceutical screening and their prediction by MultiCase MC4PC. *Mutagenesis.* 529-32.
- Fellows MD, Luker T, Cooper A, O'Donovan MR. 2012. Unusual structure-genotoxicity relationship in mouse lymphoma cells observed with a series of kinase inhibitors. *Mutat Res.* 746, 21-8.
- Feng L, Li N, Li Y, Wang J, Gao M, Wang W, Chen J. 2015. Cell cycle-dependent inhibition of 53BP1 signaling by BRCA1. *Cell Discov.* 1:15019.
- Ferrell JE. Jr. 2002. Self-perpetuating states in signal transduction: positive feedback, double-negative feedback and bistability. *Cell Biol.* 14, 140-148.

- Fowler P, Smith K, Young J, Jeffrey L, Kirkland D, Pfuhler S, Carmichael P. 2012. Reduction of misleading ("false") positive results in mammalian cell genotoxicity assays. I. Choice of cell type. *Mutat Res.*742(1-2):11-25.
- Fowler P, Smith R, Smith K, Young J, Jeffrey L, Carmichael P, Kirkland D, Pfuhler S. 2014. Reduction of misleading ("false") positive results in mammalian cell genotoxicity assays. III: sensitivity of human cell types to known genotoxic agents. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.*767:28-36.
- Flatt PM, Tang LJ, Scatena CD, Szak ST, Pietenpol JA. 2000. p53 regulation of G(2) checkpoint is retinoblastoma protein dependent. *Mol Cell Biol.* 20(12):4210-23.
- Flynn RL und Zou L. 2011. ATR: a master conductor of cellular responses to DNA replication stress. *Trends Biochem Sci.* 36(3):133-40.
- Foster DA, Yellen P, Xu L, Saqcena M. 2010. Regulation of G1 Cell Cycle Progression: Distinguishing the Restriction Point from a Nutrient-Sensing Cell Growth Checkpoint(s). *Genes Cancer.* 1(11):1124-31.
- Funk JO. 2006. Cell Cycle Checkpoint Genes and Cancer. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0006046>.
- Funk JO. 1999. Cancer cell cycle control. *Anticancer Res.* 19(6A):4772-80.
- Futami T, Miyagishi M, Taira K. 2005. Identification of a network involved in thapsigargin-induced apoptosis using a library of small interfering RNA expression vectors. *J Biol Chem* 280:826-831.
- Galloway S, Lorge E, Aardema MJ, Eastmond D, Fellows M, Heflich R, Kirkland D, Levy DD, Lynch AM, Marzin D, Morita T, Schuler M, Speit G. 2011. Workshop summary: Top concentration for in vitro mammalian cell genotoxicity assays; and report from working group on toxicity measures and top concentration for in vitro cytogenetics assays (chromosome aberrations and micronucleus). *Mutat Res.*723(2):77-83.
- Ganem NJ und Pellman D. 2012. Linking abnormal mitosis to the acquisition of DNA damage. *J Cell Biol.* 199(6):871-81.
- Gartel AL and Tyner AL. 2002. The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther* 1:639-49.

- George TC, Basiji DA, Hall BE, Lynch DH, Ortyrn WE, Perry DJ, Seo MJ, Zimmerman CA, Morrissey PJ. 2004. Distinguishing modes of cell death using the ImageStream multispectral imaging flow cytometer. *Cytometry A*. 59(2):237-45.
- Gleevec [package insert]. East Hanover, NJ: Novartis, 2001. http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2008/021588s0241b1.pdf
- Godderis L, Thomas R, Hubbard AE, Tabish AM, Hoet P, Zhan L, Smith MT, Veulemans H, McHale CM. 2012. Effect of chemical mutagens and carcinogens on gene expression profiles in human TK6 cells. *PLoS ONE* 7:e39205.
- Gocke E, Bürgin H, Müller L, Pfister T. 2009. Literature review on the genotoxicity, reproductive toxicity, and carcinogenicity of ethyl methanesulfonate. *Toxicol Lett* 190:254-265.
- Gocke E und Müller L. 2009. In vivo studies in the mouse to define a threshold for the genotoxicity of EMS and ENU. *Mutat Res*. 678(2):101-7.
- Goldenson B und Crispino JD. 2015. The aurora kinases in cell cycle and leukemia. *Oncogene*. 34(5):537-45.
- Gollapudi P, Hasegawa LS, Eastmond DA. 2014. A comparative study of the aneugenic and polyploidy-inducing effects of fisetin and two model Aurora kinase inhibitors. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 767:37-43.
- Grasl-Kraupp B, Ruttkey-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R. 1995. In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology* 21:1465-8.
- Guérard M, Baum M, Bitsch A, Eisenbrand G, Elhajouji A, Epe B, Habermeyer M, Kaina B, Martus HJ, Pfuhler S, Schmitz C, Sutter A, Thomas AD, Ziemann C, Froetschl R. 2015. Assessment of mechanisms driving non-linear dose-response relationships in genotoxicity testing. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 763:181-201.
- Gusenleitner D, Auerbach SS, Melia T, Gómez HF, Sherr DH, Monti S. 2014. Genomic models of short-term exposure accurately predict long-term chemical

- carcinogenicity and identify putative mechanisms of action. *PLoS One*. 2014 Jul 24;9(7):e102579.
- Gustavino B, Bassani B, Pacchierotti F. 1991. Vinblastine-induced numerical chromosome changes and selection processes in mouse bone marrow cells. *Mutat Res* 248:45-50.
- Han C, Nam MK, Park HJ, Seong YM, Kang S, Rhim H. 2008. Tunicamycin-induced ER stress upregulates the expression of mitochondrial HtrA2 and promotes apoptosis through the cytosolic release of HtrA2. *J Microbiol Biotechnol* 18:1197-1202.
- Harada A, Matsuzaki K, Takeiri A, Mishima M. 2014. The predominant role of apoptosis in γ H2AX formation induced by aneugens is useful for distinguishing aneugens from clastogens. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 771:23-9.
- Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. 1997. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387:296-9.
- Hashimoto K, Nakajima Y, Matsumura S, Chatani F. 2010. An in vitro micronucleus assay with size-classified micronucleus counting to discriminate aneugens from clastogens. *Toxicol In vitro* 24:208-16.
- Hashimoto K, Nakajima Y, Matsumura S, Chatani F. 2011. "Comparison of Four Different Treatment Conditions of Extended Exposure in the in Vitro Micronucleus Assay Using TK6 Lymphoblastoid Cells." *Regulatory Toxicology and Pharmacology*!: RTP 59 (1): 28-36.
- Hashizume C, Nakano H, Yoshida K, Wong RW. 2010. Characterization of the role of the tumor marker Nup88 in mitosis. *Mol Cancer*. 9:119.
- Hayashi M. 2016. The micronucleus test-most widely used in vivo genotoxicity test. *Genes Environ*. 38:18.
- Hegde ML, Hazra TK, Mitra S. 2008. Early Steps in the DNA Base Excision/Single-Strand Interruption Repair Pathway in Mammalian Cells. *Cell Res*. 18(1):27-47.

- Hendriks G, Derr RS, Misovic B, Morolli B, Calléja FM, Vrieling H. 2016. The Extended ToxTracker Assay Discriminates Between Induction of DNA Damage, Oxidative Stress, and Protein Misfolding. *Toxicol Sci.* 150(1):190-203.
- Hernández LG, van Benthem J, Johnson GE. 2013. A Mode-of-Action Approach for the Identification of Genotoxic Carcinogens. *PLoS One.* 8(5):e64532.
- Hinz W, Grüninger S, De Pover A, Chiesi M. 1999. Properties of the human long and short isoforms of the uncoupling protein-3 expressed in yeast cells. *FEBS Lett* 462:411-5.
- Honma M und Hayashi M. 2011. Comparison of in vitro micronucleus and gene mutation assay results for p53-competent versus p53-deficient human lymphoblastoid cells. *Environ Mol Mutagen.* 52(5):373-84.
- Honma M, Momose M, Sakamoto H, Sofuni T und Hayashi M. 2001. Spindol poisons induce allelic loss in mouse lymphoma cells through mitotic non-disjunction. *Mutat. Res.*, 493, 101-114.
- Howlett NG, Taniguchi T, Durkin SG, D'Andrea AD, Glover TW. 2005. The Fanconi anemia pathway is required for the DNA replication stress response and for the regulation of common fragile site stability. *Hum Mol Genet.* 14(5):693-701.
- Hsieh P und Yamane K. 2008. DNA mismatch repair: molecular mechanism, cancer, and ageing. *Mech Ageing Dev.* 129(7-8):391-407.
- Huang SH und Tung CW. 2017. Identification of consensus biomarkers for predicting non-genotoxic hepatocarcinogens. *Sci Rep* 7: 41176.
- Hughes C, Rabinowitz A, Tate M, Birrell L, Allsup J, Billinton N, Walmsley RM. 2012. Development of a high-throughput Gaussia luciferase reporter assay for the activation of the GADD45a gene by mutagens, promutagens, clastogens, and aneugens. *J Biomol Screen.* 17(10):1302-15.
- Hynes L. 2010. Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the in vitro micronucleus test without cytokinesis block. *Mutat Res.* 702(2):181-8.
- Hyun SY und Jang YJ. 2015. p53 activates G1 checkpoint following DNA damage by doxorubicin during transient mitotic arrest. *Oncotarget.* 6(7):4804-15.

- ICH Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use S2 (R1). 2012.
- ICH Guidance M7 Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk. 2017.
- Ivashkevich A, Redon CE, Nakamura AJ, Martin RF, Martin OA. 2012. Use of the γ -H2AX assay to monitor DNA damage and repair in translational cancer research. *Cancer Lett.* 327(1-2):123-33.
- Janssen A, van der Burg M, Szuhai K, Kops GJ, Medema RH. 2011. Chromosome segregation errors as a cause of DNA damage and structural chromosome aberrations. *Science.* 333(6051):1895-8.
- Jayasooriya RGPT, Dilshara MG, Karunarathne WAHM, Molagoda IMN, Choi YH, Kim GY. 2018. Camptothecin enhances c-Myc-mediated endoplasmic reticulum stress and leads to autophagy by activating Ca²⁺-mediated AMPK. *Food Chem Toxicol.* 121:648-656.
- Jenkins GJ, Zair Z, Johnson GE, Doak SH. 2010. Genotoxic thresholds, DNA repair, and susceptibility in human populations. *Toxicology.* 278(3):305-10.
- Jiang L, Paone S, Caruso S, Atkin-Smith GK, Phan TK, Hulett MD, Poon IKH. 2017. Determining the contents and cell origins of apoptotic bodies by flow cytometry. *Sci Rep.* 7(1):14444.
- Jimenez-Blasco D, Santofimia-Castaño P, Gonzalez A, Almeida A, Bolaños JP. 2015. Astrocyte NMDA receptors' activity sustains neuronal survival through a Cdk5-Nrf2 pathway. *Cell Death Differ.* 22(11):1877-89
- Juan G, Bush TL, Ma C, Manoukian R, Chung G, Hawkins JM, Zoog S, Kendall R, Radinsky R, Loberg R, Friberg G, Payton M. 2014. AMG 900, a potent inhibitor of aurora kinases causes pharmacodynamic changes in p-Histone H3 immunoreactivity in human tumor xenografts and proliferating mouse tissues. *J Transl Med* 12:307.
- Kakeno M, Matsuzawa K, Matsui T, Akita H, Sugiyama I, Ishidate F, Nakano A, Takashima S, Goto H, Inagaki M, Kaibuchi K, Watanabe T. 2014. Plk1 phosphorylates CLIP-170 and regulates its binding to microtubules for chromosome alignment. *Cell Struct Funct.* 39(1):45-59.

- Kalejs M, Ivanov A, Plakhins G, Cragg MS, Emzinsh D, Illidge TM, Erenpreisa J. 2006. Upregulation of meiosis-specific genes in lymphoma cell lines following genotoxic insult and induction of mitotic catastrophe. *BMC Cancer*. 6:6.
- Kane MS, Paris A, Codron P, Cassereau J, Procaccio V, Lenaers G, Reynier P, Chevrollier A. 2018. Current mechanistic insights into the CCCP-induced cell survival response. *Biochem Pharmacol*. 148:100-110.
- Karna P, Rida PC, Pannu V, Gupta KK, Dalton WB, Joshi H, Yang VW, Zhou J, Aneja R. 2011. A novel microtubule-modulating noscapinoid triggers apoptosis by inducing spindle multipolarity via centrosome amplification and declustering. *Cell Death Differ*. 8(4):632-44.
- Khoury L, Zalko D, Audebert M. 2016. Evaluation of four human cell lines with distinct biotransformation properties for genotoxic screening. *Mutagenesis*. 31(1):83-96.
- Khoury GA, Baliban RC, Floudas CA. 2011. Proteome-wide post-translational modification statistics: frequency analysis and curation of the swiss-prot database. *Scientific Reports* volume 1, Article number: 90.d.
- Kimura A, Miyata A, Honma M. 2013. A combination of in vitro comet assay and micronucleus test using human lymphoblastoid TK6 cells. *Mutagenesis* 28:583-90.
- Kirkland D, Aardema M, Henderson L, Müller L. 2005. Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens I. Sensitivity, specificity and relative predictivity. *Mutat Res* 584:1-256.
- Kirkland D, Pfuhler S, Tweats D, Aardema M, Corvi R, Darroudi F, Elhajouji A, Glatt H, Hastwell P, Hayashi M, Kasper P, Kirchner S, Lynch A, Marzin D, Maurici D, Meunier JR, Müller L, Nohynek G, Parry J, Parry E, Thybaud V, Tice R, van Benthem J, Vanparys P, White P. 2007. How to reduce false positive results when undertaking in vitro genotoxicity testing and thus avoid unnecessary follow-up animal tests: Report of an ECVAM Workshop. *Mutat Res*. 628(1):31-55.

- Kirkland D und Speit G. 2008. Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens III. Appropriate follow-up testing in vivo. *Mutat Res.* 654(2):114-32.
- Kirkland D, Kasper P, Martus H-J, Müller L, van Benthem J, Madia F, Corvi R. 2015. Updated recommended lists of genotoxic and non-genotoxic chemicals for assessment of the performance of new or improved genotoxicity tests. In press, *Mutat Res.*
- Kirkland D, Kasper P, Martus HJ, Müller L, van Benthem J, Madia F, Corvi R. 2016. Updated recommended lists of genotoxic and non-genotoxic chemicals for assessment of the performance of new or improved genotoxicity tests. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 795:7-30
- Kirsch-Volders M, Decordier I, Elhajouji A, Plas G, Aardema MJ, Fenech M. 2011. In vitro genotoxicity testing using the micronucleus assay in cell lines, human lymphocytes and 3D human skin models. *Mutagenesis* 26:177-84.
- Kitao H, Iimori M, Kataoka Y, Wakasa T, Tokunaga E, Saeki H, Oki E, Maehara Y. 2018. DNA replication stress and cancer chemotherapy. *Cancer Sci.* 109(2):264-271.
- Kondo N, Takahashi A, Ono K, Ohnishi T. 2010. DNA damage induced by alkylating agents and repair pathways. *J Nucleic Acids.* 2010:543531.
- Krenn V und Musacchio A2. 2015. The Aurora B Kinase in Chromosome Bi-Orientation and Spindle Checkpoint Signaling. *Front Oncol.* 5:225.
- Krishna G, Urda G, Tefera W, Lalwani ND, Theiss J. 1995. Simultaneous evaluation of dexamethasone-induced apoptosis and micronuclei in rat primary spleen cell cultures. *Mutat Res.* 332:1-8.
- Kuo Li und Yang LX. 2008. Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo.* 22(3):305-9.
- Kyrylkova K, Kyryachenko S, Leid M, Kioussi C. 2012. Detection of apoptosis by TUNEL assay. *Methods Mol Biol.* 887:41-7.
- Lan J, Gou N, Rahman SM, Gao C, He M, Gu AZ. 2016. A Quantitative Toxicogenomics Assay for High-throughput and Mechanistic Genotoxicity Assessment and Screening of Environmental Pollutants. *Environ Sci Technol.* 50(6):3202-14.

- Langelier MF, Riccio AA, Pascal JM. 2014. PARP-2 and PARP-3 are selectively activated by 5' phosphorylated DNA breaks through an allosteric regulatory mechanism shared with PARP-1. *Nucleic Acids Res* 42(12):7762-75.
- Lara-Gonzalez P, Westhorpe FG, Taylor SS. 2012. The spindle assembly checkpoint. *Curr Biol*. 22(22):R966-80.
- Lavé T, Paehler A, Grimm HP, Gocke E, Müller L. 2009. Modelling of patient EMS exposure: translating pharmacokinetics of EMS in vitro and in animals into patients. *Toxicol Lett*. 190(3):310-6.
- Lawrence KS, Chau T, Engebrecht J. 2015. DNA damage response and spindle assembly checkpoint function throughout the cell cycle to ensure genomic integrity. *PLoS Genet*. 11(4):e1005150.
- Leavitt R, Schlesinger S, Kornfeld S. 1977. Tunicamycin inhibits glycosylation and multiplication of Sindbis and vesicular stomatitis viruses. *J Virol* 21, 375-385.
- Lee WJ, Kim SC, Lee SJ, Lee J, Park JH, Yu KS, Lim J, Kwon SW. 2014. Investigating the Different Mechanisms of Genotoxic and Non-Genotoxic Carcinogens by a Gene Set Analysis. *PLoS One*. 9(1):e86700.
- Lee SY, Jang C, Lee KA. 2014. Polo-like kinases (plks), a key regulator of cell cycle and new potential target for cancer therapy. *Dev Reprod*. 18(1):65-71.
- Lee JH, Cheong HM, Kang MY, Kim SY, Kang Y. 2009. Ser1778 of 53BP1 Plays a Role in DNA Double-strand Break Repairs. *Korean J Physiol Pharmacol*. 13(5):343-8.
- Li HH, Hyduke DR, Chen R, Heard P, Yauk CL, Aubrecht J, Fornace AJ Jr. 2015. Development of a toxicogenomics signature for genotoxicity using a dose-optimization and informatics strategy in human cells. *Environ Mol Mutagen*. 56(6):505-19.
- Li HH, Chen R, Hyduke DR, Williams A, Frötschl R, Ellinger-Ziegelbauer H, O'Lone R, Yauk CL, Aubrecht J, Fornace AJ Jr. 2017. Development and validation of a high-throughput transcriptomic biomarker to address 21st century genetic toxicology needs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 114(51):E10881-E10889.

- Li Z, Long Y, Zhong L, Song G, Zhang X, Yuan L, Cui Z, Dai H. 2016. RNA sequencing provides insights into the toxicogenomic response of ZF4 cells to methyl methanesulfonate. *J Appl Toxicol.* 36(1):94-104.
- Liddiard K, Hills R, Burnett AK, Darley RL, Tonks A. 2010. OGG1 is a novel prognostic indicator in acute myeloid leukaemia. *Oncogene.* 29(13):2005-12.
- Liebsch M, Grune B, Seiler A, Butzke D, Oelgeschläger M, Pirow R, Adler S, Riebeling C, Luch A. 2011. Alternatives to animal testing: current status and future perspectives. *Arch Toxicol.* 85(8):841-58.
- Liu G und Chen X. 2006. DNA polymerase eta, the product of the xeroderma pigmentosum variant gene and a target of p53, modulates the DNA damage checkpoint and p53 activation. *Mol Cell Biol.* 26(4):1398-413.
- Liu L, Scolnick DM, Trievel RC, Zhang HB, Marmorstein R, Halazonetis TD, Berger SL. 1999. p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage. *Mol Cell Biol.* 19(2):1202-9.
- Lodish H, Berk A, Lawrence Zipursky S, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. 2000. *Molecular Cell Biology*, 4th edition. Section 12.3 The Role of Topoisomerases in DNA Replication. New York: W. H. Freeman.
- London N und Biggins S. 2013. Mad1 kinetochore recruitment by Mps1-mediated phosphorylation of Bub1 signals the spindle checkpoint. *Genes Dev.* 28(2):140-52.
- Lorge E, Moore MM, Clements J, O'Donovan M, Fellows MD, Honma M, Kohara A, Galloway S, Armstrong MJ, Thybaud V, Gollapudi B, Aardema MJ, Tanir JY. 2016. Standardized cell sources and recommendations for good cell culture practices in genotoxicity testing. *Mutat Res.* 809:1-15.
- Lotz AS, Havla JB, Richter E, Frölich K, Staudenmaier R, Hagen R, Kleinsasser NH. 2009. Cytotoxic and genotoxic effects of matrices for cartilage tissue engineering. *Toxicol Lett* 190:128-33.
- Lu P-Z, Lai C-Y, Chan W-H. 2008. Caffeine induces cell death via activation of apoptotic signal and inactivation of survival signal in human osteoblasts. *Int J Mol Sci* 9:698-718.

- Liu G und Chen X. 2006. DNA polymerase ϵ , the product of the xeroderma pigmentosum variant gene and a target of p53, modulates the DNA damage checkpoint and p53 activation. *Mol Cell Biol.* 26(4):1398-413.
- Luijsterburg MS, Goedhart J, Moser J, Kool H, Geverts B, Houtsmuller AB, Mullenders LH, Vermeulen W, van Driel R. 2007. Dynamic in vivo interaction of DDB2 E3 ubiquitin ligase with UV-damaged DNA is independent of damage-recognition protein XPC. *J Cell Sci.* 2007 Aug 1;120(Pt 15):2706-16. *J Cell Sci.* 120(Pt 15):2706-16.
- Lutz WK. 1998. Dose-response relationships in chemical carcinogenesis: superposition of different mechanisms of action, resulting in linear-nonlinear curves, practical thresholds, J-shapes. *Mutat Res.* 405(2):117-24.
- Lynch A, Harvey J, Aylott M, Nicholas E, Burman M, Siddiqui A, Walker S, Rees R. 2003. Investigations into the concept of a threshold for topoisomerase inhibitor-induced clastogenicity. *Mutagenesis* 18:345-53.
- MacGregor JT, Frötschl R, White PA, Crump KS, Eastmond DA, Fukushima S, Guérard M, Hayashi M, Soeteman-Hernández LG, Kasamatsu T, Levy DD, Morita T, Müller L, Schoeny R, Schuler MJ, Thybaud V, Johnson GE. 2015. IWGT report on quantitative approaches to genotoxicity risk assessment I. Methods and metrics for defining exposure-response relationships and points of departure (PoDs). *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 783:55-65.
- Malumbres M. 2014. Cyclin-dependent kinases. *Genome Biol.* 15(6):122.
- Maréchal A und Zou L. 2013. DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 5(9).
- Mariaule G and Belmont P. 2014. Cyclin-dependent kinase inhibitors as marketed anticancer drugs: where are we now? A short survey. *Molecules* 19:14366-82.
- Masutani C, Kusumoto R, Yamada A, Yuasa M, Araki M, Nogimori T, Yokoi M, Eki T, Iwai S, Hanaoka F. 2000. Xeroderma pigmentosum variant: from a human genetic disorder to a novel DNA polymerase. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 65:71-80.
- Matson DR und Stukkenberg PD. 2011. Spindle poisons and cell fate: a tale of two pathways. *Mol Interv.* (2):141-50.

- Matsushima T, Hayashi M, Matsuoka A, Ishidate M Jr, Miura KF, Shimizu H, Suzuki Y, Morimoto K, Ogura H, Mure K, Koshi K, Sofuni T. 1999. Validation study of the in vitro micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU). *Mutagenesis* 14:569-580.
- Matsuo Y, Maurer SP, Surrey T, Toda T. 2017. Purification and characterisation of the fission yeast Ndc80 complex. *Protein Expr Purif.* 135:61-69.
- Matsuzaki K, Harada A, Takeiri A, Tanaka K, Mishima M. 2010. Whole cell-ELISA to measure the gammaH2AX response of six aneugens and eight DNA-damaging chemicals. *Mutat Res* 700:71-9.
- McIlwain DR, Berger T, Mak TW. 2013. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 5(4):a008656.
- Meas R und Smerdon MJ. 2016. Nucleosomes determine their own patch size in base excision repair. *Sci Rep.* 6:27122.
- Melo KM, Grisolia CK, Pieczarka JC, de Souza LR, Filho Jde S, Nagamachi CY. 2014. FISH in micronucleus test demonstrates aneugenic action of rotenone in a common freshwater fish species, Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Mutagenesis.* 29(3):215-9.
- Mevacor [package insert]. Whitehouse Station, NJ: Merck & Co., Inc., 2012. http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2012/019643s0851b1.pdf
- Mohd-Yusoff NF, Ruperao P, Tomoyoshi NE, Edwards D, Gresshoff PM, Biswas B, Batley J. Scanning the effects of ethyl methanesulfonate on the whole genome of *Lotus japonicus* using second-generation sequencing analysis. *G3 (Bethesda).* 5(4):559-67.
- Milovancev M, Helfand SC, Marley K, Goodall CP, Löhr CV, Bracha S. 2016. Antiproliferative effects of masitinib and imatinib against canine oral fibrosarcoma in vitro. *BMC Vet Res.* 12:85.
- Mir RA, Bele A, Mirza S, Srivastava S, Olou AA, Ammons SA, Kim JH, Gurumurthy CB, Qiu F, Band H, Band V. 2015. A Novel Interaction of Ecdysoneless (ECD) Protein with R2TP Complex Component RUVBL1 Is Required for the Functional Role of ECD in Cell Cycle Progression. *Mol Cell Biol.* 36(6):886-99.

- Mishima M. 2017. Chromosomal aberrations, clastogens vs aneugens. *Front Biosci (Schol Ed)*. 9:1-16.
- Monaco L, Kolthur-Seetharam U, Loury R, Murcia JM, de Murcia G, Sassone-Corsi P. 2005. Inhibition of Aurora-B kinase activity by poly(ADP-ribosyl)ation in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:14244-8.
- Moon JL, Kim SY, Shin SW, Park J-W. 2012. Regulation of brefeldin A-induced ER stress and apoptosis by mitochondrial NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun* 417:760-764.
- Morgan DO. 2008. *Cell Cycle: Principles of Control*. Yale J Biol Med. 80(3): 141-142.
- Muehlbauer PA und Schuler MJ. 2005. Detection of numerical chromosomal aberrations by flow cytometry: a novel process for identifying aneugenic agents. *Mutat Res*. 585(1-2):156-69.
- Mueller L, Gocke E, Lavé T, Pfister T. 2009. Ethyl methanesulfonate toxicity in Viracept--a comprehensive human risk assessment based on threshold data for genotoxicity. *Toxicol Lett*. 190(3):317-29.
- Muniandy PA, Liu J, Majumdar A, Liu ST, Seidman MM. 2010. DNA interstrand crosslink repair in mammalian cells: step by step. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 45(1):23-49.
- Nair JS, Ho AL, Schwartz GK. 2012. The induction of polyploidy or apoptosis by the Aurora A kinase inhibitor MK8745 is p53-dependent. *Cell Cycle*. 11(4):807-17.
- Nakabeppu Y. 2014. Cellular Levels of 8-Oxoguanine in either DNA or the Nucleotide Pool Play Pivotal Roles in Carcinogenesis and Survival of Cancer Cells. *Int J Mol Sci*. 15(7):12543-57.
- Nakagawa Y, Kajihara A, Takahashi A, Kondo N, Mori E, Kirita T, Ohnishi T. 2014. The BRCA2 gene is a potential molecular target during 5-fluorouracil therapy in human oral cancer cells. *Oncol Rep*. 31(5):2001-6.
- Nakayama Y und Inoue T. 2016. Antiproliferative Fate of the Tetraploid Formed after Mitotic Slippage and Its Promotion; A Novel Target for Cancer Therapy Based on Microtubule Poisons. *Molecules*. 21(5).

- Neumann HG. 2009. Risk assessment of chemical carcinogens and thresholds. *Crit Rev Toxicol.* 39(6):449-61.
- Nepal M, Che R, Ma C, Zhang J, Fei P. 2017. FANCD2 and DNA Damage. *Int J Mol Sci.* 18(8).
- Ngan VK, Bellman K, Hill BT, Wilson L, Jordan MA. 2001. Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by the semisynthetic Vinca alkaloids vinorelbine and its newer derivative vinflunine. *Mol Pharmacol* 60(1):225-32.
- Niida H und Nakanishi M. 2006. DNA damage checkpoints in mammals. *Mutagenesis.* 21(1):3-9.
- Nikolova T, Dvorak M, Jung F, Adam I, Krämer E, Gerhold-Ay A, Kaina B. 2014. The γ H2AX assay for genotoxic and nongenotoxic agents: Comparison of H2AX phosphorylation with cell death response. *Toxicol Sci* 140:103-117.
- Obe G, Pfeiffer P, Savage JR, Johannes C, Goedecke W, Jeppesen P, Natarajan AT, Martínez-López W, Folle GA, Drets ME. 2002. Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. *Mutat Res.* 504(1-2):17-36.
- Oda Y, Hidaka M, Suzuki A. 2017. Caffeine Has a Synergistic Anticancer Effect with Cisplatin via Inhibiting Fanconi Anemia Group D2 Protein Monoubiquitination in Hepatocellular Carcinoma Cells. *Biol Pharm Bull.* 40(11):2005-2009.
- OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS: In Vitro Mammalian Chromosomal Aberration Test. 2016.
- Oesch F, Herrero ME, Hengstler JG, Lohmann M, Arand M. 2000. Metabolic detoxication: implications for thresholds. *Toxicol Pathol* 28:382-7.
- Oka H, Ikeda K, Yoshimura H, Ohuchida A, Honma M. 2006. Relationship between p53 status and 5-fluorouracil sensitivity in 3 cell lines. *Mutat Res* 606:52-60.
- Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. 2010. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a001008.
- Onfelt A. 1983. Spindle disturbances in mammalian cells. I. Changes in the quantity of free sulfhydryl groups in relation to survival and C-mitosis in V79 Chinese

- hamster cells after treatment with colcemid, diamide, carbaryl and methyl mercury. *Chem Biol Interact* 46:201-17.
- Onfelt A. 1986. Mechanistic aspects on chemical induction of spindle disturbances and abnormal chromosome numbers. *Mutat Res* 168:249-300.
- Pacaud R, Cheray M, Nadaradjane A, François M, Vallette, Pierre-François Cartron. 2015. Histone H3 Phosphorylation in GBM: a New Rational to Guide the Use of Kinase Inhibitors in anti-GBM Therapy. *Theranostics*. 5(1): 12-22.
- Pacchierotti F, Bassani B, Marchetti F, Tiveron C. 2002. Griseofulvin induces mitotic delay and aneuploidy in bone marrow cells of orally treated mice. *Mutagenesis* 17:219-22.
- Parry EM, Parry JM, Corso C, Doherty A, Haddad F, Hermine TF, Johnson G, Kayani M, Quick E, Warr T, Williamson J. 2002. Detection and characterization of mechanisms of action of aneugenic chemicals. *Mutagenesis* 17:509-21.
- Park JS, Kang DH, Bae SH. 2015. p62 prevents carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazine (CCCP)-induced apoptotic cell death by activating Nrf2. *Biochem Biophys Res Commun*. 464(4):1139-44.
- Patil AA, Sayal P, Depondt ML, Beveridge RD, Roylance A, Kriplani DH, Myers KN, Cox A, Jellinek D, Fernando M, Carroll TA, Collis SJ. 2014. FANCD2 re-expression is associated with glioma grade and chemical inhibition of the Fanconi Anaemia pathway sensitises gliomas to chemotherapeutic agents. *Oncotarget*. 5(15):6414-24.
- Payton M, Bush TL, Chung G, Ziegler B, Eden P, McElroy P, Ross S, Cee VJ, Deak HL, Hodous BL, Nguyen HN et al. 2010. Preclinical evaluation of AMG 900, a novel potent and highly selective pan-aurora kinase inhibitor with activity in taxane-resistant tumor cell lines. *Cancer Res* 70:9846-9854.
- Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. 2015. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem*. 30(1):11-26.
- Phillips DH und Arlt VM. 2009. Genotoxicity: damage to DNA and its consequences. *EXS*. 99:87-110.

- Pérez LO, González-José R, García PP. 2016. Prediction of Non-Genotoxic Carcinogenicity Based on Genetic Profiles of Short Term Exposure Assays. *Toxicol Res.* 32(4):289-300.
- Pesin JA und Orr-Weaver TL. 2008. Regulation of APC/C activators in mitosis and meiosis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 24:475-99.
- Pesin JA und Orr-Weaver TL. 2008. Developmental role and regulation of cortex, a meiosis-specific anaphase-promoting complex/cyclosome activator. *PLoS Genet.* 3(11):e202.
- Peters JM. 2002. The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol Cell.* 9(5):931-43.
- Petruseva IO, Evdokimov AN, Lavrik OI. 2014. Molecular mechanism of global genome nucleotide excision repair. *Acta Naturae.* 6(1):23-34.
- Plesca D, Mazumder S, Almasan A. 2008. DNA damage response and apoptosis. *Methods Enzymol.* 446:107-22.
- Podhorecka M, Skladanowski A, Bozko P. 2010. H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy. *J Nucleic Acids.*
- Portt L, Norman G, Clapp C, Greenwood M, Greenwood MT. 2011. Anti-apoptosis and cell survival: a review. *Biochim Biophys Acta* 1813(1):238-59.
- Potapova T, Gorbsky GJ. 2017. The Consequences of Chromosome Segregation Errors in Mitosis and Meiosis. *Biology (Basel).* 6(1).
- Price BD und D'Andrea AD. 2013. Chromatin remodeling at DNA double-strand breaks. *Cell.* 152(6):1344-54.
- Prieto P, Burton J, Graepel R, Price A, Whelan M, Worth A. 2014. EURL ECVAM Strategy to replace, reduce and refine the use of animals in the assessment of acute mammalian systemic toxicity.
- Racek T, Buhlmann S, Rüst F, Knoll S, Alla V, Pützer BM. 2008. Transcriptional repression of the prosurvival endoplasmic reticulum chaperone GRP78/BIP by E2F1. *J Biol Chem.* 283(49):34305-14.
- Rajakrishna L, Krishnan Unni S, Subbiah M, Sadagopan S, Nair AR, Chandrappa R, Sambasivam G, Sukumaran SK. 2014. Validation of a human cell based high-

- throughput genotoxicity assay 'Anthem's Genotoxicity screen' using ECVAM recommended lists of genotoxic and non-genotoxic chemicals. *Toxicol In Vitro*. 28(1):46-53.
- Rao KS. 2017. Practical Considerations in the Conduct of Micronucleus Test. *BEMS Reports*. 3(1): 11-12.
- Reinhardt HC und Schumacher B. 2012. The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer. *Trends Genet*. 28(3):128-36.
- Rieswijk L, Brauers KJ, Coonen ML, Jennen DG, van Breda SG, Kleinjans JC. 2016. Exploiting microRNA and mRNA profiles generated in vitro from carcinogen-exposed primary mouse hepatocytes for predicting in vivo genotoxicity and carcinogenicity. *Mutagenesis*. 31(5):603-15.
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. 1998. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273(10):5858-68.
- Rogakou EP, Nieves-Neira W, Boon C, Pommier Y, Bonner WM. 2000. Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *J Biol Chem* 275:9390-9395.
- Rudolph D, Steegmaier M, Hoffmann M, Grauert, Baum A, Quant J, Haslinger C, Garin-Chesa P, Adolf GR. 2009. BI 6727, a Polo-like kinase inhibitor with improved pharmacokinetic profile and broad antitumor activity. *Clin Cancer Res* 15, 3094-3102.
- Safari S, Baratloo A, Elfil M, Negida A. 2016. Evidence Based Emergency Medicine; Part 4: Pre-test and Post-test Probabilities and Fagan's nomogram. *Emerg (Tehran)*. 4(1):48-51.
- Sakai R, Morikawa Y, Kondo C, Oka H, Miyajima H, Kubo K, Uehara T. 2014. Combinatorial measurement of CDKN1A/p21 and KIF20A expression for discrimination of DNA damage-induced clastogenicity. *Int J Mol Sci*. 15(10):17256-69.
- Sampath SC, Ohi R, Leismann O, Salic A., Pozniakovski A, Funabiki H. 2004. The chromosomal passenger complex is required for chromatin-induced microtubule stabilization and spindle assembly. *Cell*, 118, 187-202.

- Savic V, Yin B, Maas NL, Bredemeyer AL, Carpenter AC, Helmink BA, Yang-Iott KS, Sleckman BP, Bassing CH. 2009. Formation of dynamic gamma-H2AX domains along broken DNA strands is distinctly regulated by ATM and MDC1 and dependent upon H2AX densities in chromatin. *Mol Cell*. 34(3):298-310.
- Scabini M, Stellari F, Cappella P, Rizzitano S, Texido G, Pesenti E. 2011. In vivo imaging of early stage apoptosis by measuring real-time caspase-3/7 activation. *Apoptosis*. 16(2):198-207.
- Scully R und Xie A. 2013. Double strand break repair functions of histone H2AX. *Mutat Res*. 750(1-2):5-14.
- Schuler M, Muehlbauer P, Guzzie P, Eastmond DA. 1999. Noscapine hydrochloride disrupts the mitotic spindle in mammalian cells and induces aneuploidy as well as polyploidy in cultured human lymphocytes. *Mutagenesis* 14:51-56.
- Schuler M, Rupa DS, Eastmond DA. 1997. A critical evaluation of centromeric labeling to distinguish micronuclei induced by chromosomal loss and breakage in vitro. *Mutat Res*. 392(1-2):81-95.
- Shen Y, Vignali P, Wang R. 2017. Rapid Profiling Cell Cycle by Flow Cytometry Using Concurrent Staining of DNA and Mitotic Markers. *Bio Protoc*. 7(16).
- Sherr CJ und Roberts JM. 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*. 13(12):1501-12.
- Shi J, Bezabhie R, Szkudlinska A. 2010. Further evaluation of a flow cytometric in vitro micronucleus assay in CHO-K1 cells: a reliable platform that detects micronuclei and discriminates apoptotic bodies. *Mutagenesis*.25(1):33-40.
- Shi Q und King RW. 2005. Chromosome nondisjunction yields tetraploid rather than aneuploid cells in human cell lines. *Nature*. 437(7061):1038-42.
- Shiotani B und Zou L. 2016. Signaling of DNA Replication Stress Through the ATR Checkpoint. *DNA Replication, Recombination, and Repair* pp 405-428
- Simon TW, Simons SS Jr, Preston RJ, Boobis AR, Cohen SM, Doerrer NG, Fenner-Crisp PA, McMullin TS, McQueen CA, Rowlands JC; RISK21 Dose-Response Subteam. 2014. The use of mode of action information in risk assessment:

- quantitative key events/dose-response framework for modeling the dose-response for key events. *Crit Rev Toxicol. Suppl* 3:17-43.
- Smart DJ, Halicka HD, Schmuck G, Traganos F, Darzynkiewicz Z, Williams GM. 2008. Assessment of DNA double-strand breaks and gammaH2AX induced by the topoisomerase II poisons etoposide and mitoxantrone. *Mutat Res* 641:43-7.
- Smart DJ, Ahmed KP, Harvey JS, Lynch AM. 2011. Genotoxicity screening via the gammaH2AX by flow assay. *Mutat Res* 715:25-31.
- Sobol Z, Homiski ML, Dickinson DA, Spellman RA, Li D, Scott A, Cheung JR, Coffing SL, Munzner JB, Sanok KE, Gunther WC, Dobo KL, Schuler M. 2012. Development and validation of an in vitro micronucleus assay platform in TK6 cells. *Mutat Res.*746(1):29-34.
- Soldani C1 und Scovassi AI. 2002. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update. *Apoptosis.* 7(4):321-8.
- Soldani C, Lazzè MC, Bottone MG, Tognon G, Biggiogera M, Pellicciari CE, Scovassi AI. 2001. Poly(ADP-ribose) polymerase cleavage during apoptosis: when and where? *Exp Cell Res.* 269(2):193-201.
- Sonnenblick A, de Azambuja E, Azim HA Jr, Piccart M. 2015. An update on PARP inhibitors--moving to the adjuvant setting. *Nat Rev Clin Oncol* 12:27-41.
- Soussi T, Asselain B, Hamroun D, Kato S, Ishioka C, Claustres M, Bérout C. 2006. Meta-analysis of the p53 mutation database for mutant p53 biological activity reveals a methodologic bias in mutation detection. *Clin Cancer Res* 12:62-9.
- Stellas D, Souliotis VL, Bekyrou M, Smirlis D, Kirsch-Volders M, Degrossi F, Cundari E, Kyrtopoulos SA. 2014. *Mutat Res.*769:59-68.
- Stiff T, O'Driscoll M, Rief N, Iwabuchi K, Löbrich M, Jeggo PA. 2004. ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res.* 64(7):2390-6.
- Swift LH und Golsteyn RM. 2014. Genotoxic anti-cancer agents and their relationship to DNA damage, mitosis, and checkpoint adaptation in proliferating cancer cells. *Int J Mol Sci.* 15(3):3403-31.

- Tane S, Kubota M, Okayama H, Ikenishi A, Yoshitome S, Iwamoto N, Satoh Y, Kusakabe A, Ogawa S, Kanai A, Molkenin JD, Nakamura K, Ohbayashi T, Takeuchi T. 2014. Repression of cyclin D1 expression is necessary for the maintenance of cell cycle exit in adult mammalian cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 289(26):18033-44.
- Tanenbaum ME, Galjart N, van Vugt MA, Medema RH. 2006. CLIP-170 facilitates the formation of kinetochore-microtubule attachments. *EMBO J.* 25(1):45-57.
- Takano H, Momota Y, Kani K, Aota K, Yamamura Y, Yamanoi T, Azuma M. 2015. γ -Tocotrienol prevents 5-FU-induced reactive oxygen species production in human oral keratinocytes through the stabilization of 5-FU-induced activation of Nrf2. *Int J Oncol* 46(4):1453-60.
- Tennekes HA. 2016. A Critical Appraisal of the Threshold of Toxicity Model for Non-Carcinogens. *J Environ Anal Toxicol Vol* 6(5): 408.
- Thastrup O, Cullen PJ, Drobak BK, Hanley MR, Dawson AP. 1990. Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 2466-2470.
- Thomas AD, Jenkins GJ, Kaina B, Bodger OG, Tomaszowski KH, Lewis PD, Doak SH, Johnson GE. 2013. Influence of DNA repair on nonlinear dose-responses for mutation. *Toxicol Sci.* 132(1):87-95.
- Thompson T, Tovar C, Yang H, Carvajal D, Vu BT, Xu Q, Wahl GM, Heimbros DC, Vassilev LT. 2004. Phosphorylation of p53 on key serines is dispensable for transcriptional activation and apoptosis. *J Biol Chem.* 279(51):53015-22.
- Thwaites MJ, Cecchini MJ, Passos DT, Welch I, Dick FA. 2017. Interchangeable Roles for E2F Transcriptional Repression by the Retinoblastoma Protein and p27KIP1-Cyclin-Dependent Kinase Regulation in Cell Cycle Control and Tumor Suppression. *Mol Cell Biol.* 37(2)
- Topham CH, Billinton N, Walmsley RM. 2012. Nongenotoxic apoptosis inducers do not produce misleading positive results in the TK6 cell-based GADD45a-GFP genotoxicity assay. *Toxicol Sci.* 128(1):79-91.

- Tsujimura K, Asamoto M, Suzuki S, Hokaiwado N, Ogawa K, Shirai T. 2006. Prediction of carcinogenic potential by a toxicogenomic approach using rat hepatoma cells. *Cancer Sci.* 97(10):1002-10.
- van den Bosch M, Bree RT, Lowndes NF. 2003. The MRN complex: coordinating and mediating the response to broken chromosomes. *EMBO Rep.* 4(9):844-9.
- Van Hooser A, Goodrich DW, Allis CD, Brinkley BR, Mancini MA. 1998. Histone H3 phosphorylation is required for the initiation, but not maintenance, of mammalian chromosome condensation. *J Cell Sci.* 111 (Pt 23):3497-506.
- Van Hummelen P, Elhajouji A, Kirsch-Volders M. 1995. Clastogenic and aneugenic effects of three benzimidazole derivatives in the in vitro micronucleus test using human lymphocytes. *Mutagenesis* 10:23-29.
- Venoux M, Delmouly K, Milhavel O, Vidal-Eychenié S, Giorgi D, Rouquier S. 2008. Gene organization, evolution and expression of the microtubule-associated protein ASAP (MAP9). *BMC Genomics.* 9:406.
- Veras E, Malpica A, Deavers MT, Silva EG. 2009. Mitosis-specific marker phospho-histone H3 in the assessment of mitotic index in uterine smooth muscle tumors: a pilot study. *Int J Gynecol Pathol.* 28(4):316-21
- Terada Y, Tatsuka M, Suzuki F, Yasuda Y, Fujita S, Otsu M. 1998. AIM-1: a mammalian midbody-associated protein required for cytokinesis. *Embo j*, 17: 667-76.
- Vader G, Cruijsen CW, van Harn T, Vromans MJ, Medema RH, Lens SM. 2007. The chromosomal passenger complex controls spindle checkpoint function independent from its role in correcting microtubule kinetochore interactions. *Mol Biol Cell.* 18(11):4553-64.
- Verma JR, Rees BJ, Wilde EC, Thornton CA, Jenkins GJS, Doak SH, Johnson GE. 2017. Evaluation of the automated MicroFlow® and Metafer™ platforms for high-throughput micronucleus scoring and dose response analysis in human lymphoblastoid TK6 cells. *Archives of Toxicology* Volume 91, Issue 7, pp 2689-2698
- Vogel C, Kienitz A, Hofmann I, Müller R, Bastians H. 2004. Crosstalk of the mitotic spindle assembly checkpoint with p53 to prevent polyploidy. *Oncogene.* 23(41):6845-53. Nair JS, Ho AL, Schwartz GK. 2012. *Cell Cycle.* 11(4):807-17.

- Walsh JG, Cullen SP, Sheridan C, Lüthi AU, Gerner C, Martin SJ. 2008. Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:12815-9.
- Walmsley RM und Billinton N. 2011. How accurate is in vitro prediction of carcinogenicity? *Br J Pharmacol* 162(6):1250-8.
- Wang H, Adhikari S, Butler BE, Pandita TK, Mitra S, Hegde ML. 2014. A Perspective on Chromosomal Double Strand Break Markers in Mammalian Cells. *Jacobs J Radiat Oncol.* 1(1).
- Wang J, Sawyer JR, Chen L, Chen T, Honma M, Mei N, Moore MM. 2009. The mouse lymphoma assay detects recombination, deletion, and aneuploidy. *Toxicol Sci.* 109(1):96-105. Wang Q, Goldstein M, Alexander P, Wakeman TP, Sun T, Feng J, Lou Z, Kastan MB, Wang XF. 2014. Rad17 recruits the MRE11-RAD50-NBS1 complex to regulate the cellular response to DNA double-strand breaks. *EMBO J.* 33(8):862-77
- Watters GP, Smart DJ, Harvey JS, Austin CA. 2009. H2AX phosphorylation as a genotoxicity endpoint. *Mutat Res.* 679:50-8.
- Weeden CE und Asselin-Labat ML. 2018. Mechanisms of DNA damage repair in adult stem cells and implications for cancer formation. *Biochim Biophys Acta.*1864(1):89-101.
- Wendel HG, de Stanchina E, Cepero E, Ray S, Emig M, Fridman JS, Veach DR, Bornmann WG, Clarkson B, McCombie WR, Kogan SC, Hochhaus A, Lowe SW. 2006. Loss of p53 impedes the antileukemic response to BCR-ABL inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(19):7444-9.
- Wenzel ES und Singh ATK. 2018. Cell-cycle Checkpoints and Aneuploidy on the Path to Cancer. *In Vivo.* 32(1):1-5.
- West MH und Bonner WM. 1980. Histone 2A, a heteromorphous family of eight protein species. *Biochemistry.* 19(14):3238-45.
- Westerink WM, Stevenson JC, Horbach GJ, Schoonen WG. 2010. The development of RAD51C, Cystatin A, p53 and Nrf2 luciferase-reporter assays in metabolically competent HepG2 cells for the assessment of mechanism-based genotoxicity

- and of oxidative stress in the early research phase of drug development. *Mutat Res.* 696(1):21-40.
- Whitwell J, Smith R, Jenner K, Lyon H, Wood D, Clements J, Aschcroft-Hawley K, Gollapudi B, Kirkland D, Lorge E, Pfuhler S, Tanir JY, Thybaud V. 2015. Relationships between p53 status, apoptosis and induction of micronuclei in different human and mouse cell lines in vitro: Implications for improving existing assays. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 789-790:7-27.
- Wilde S, Dambowsky M, Hempt C, Sutter A, Queisser N. 2017. Classification of in vitro genotoxicants using a novel multiplexed biomarker assay compared to the flow cytometric micronucleus test. *Environ Mol Mutagen.* 58(9):662-677.
- Williams A, Buick JK, Moffat I, Swartz CD, Recio L, Hyduke DR, Li HH, Fornace AJ Jr, Aubrecht J, Yauk CL. 2015. A predictive toxicogenomics signature to classify genotoxic versus non-genotoxic chemicals in human TK6 cells. *Data Brief.* 5:77-83.
- Williams GM, Iatropoulos MJ, Jeffrey AM. 2000. Mechanistic basis for nonlinearities and thresholds in rat liver carcinogenesis by the DNA-reactive carcinogens 2-acetylaminouorene and diethylnitrosamine. *Toxicol Pathol* 28:388-95.
- Yadunandam AK, Yoon JS, Seong YA, Oh CW, Kim GD. 2012. Prospective impact of 5-FU in the induction of endoplasmic reticulum stress, modulation of GRP78 expression and autophagy in Sk-Hep1 cells. *Int J Oncol* 41(3):1036-42.
- Yamamoto A, Hirouchi T, Kawamorita S, Nakashima K, Sugiyama A, Kato Y. 2017. Radioprotective activity of blackcurrant extract evaluated by in vitro micronucleus and gene mutation assays in TK6 human lymphoblastoid cells. *Genes Environ.* 39:22.
- Yamamura E, Aruga C, Muto S, Baba N, Uno Y. 2018. Correlation between the results of in vitro and in vivo chromosomal damage tests in consideration of exposure levels of test chemicals. *Genes Environ.* 40:6
- Yan H, Merchant AM, Tye BK. 1993. Cell cycle-regulated nuclear localization of MCM2 and MCM3, which are required for the initiation of DNA synthesis at chromosomal replication origins in yeast. *Genes Dev.* 2149-60.

-
- Yang J, Xu ZP, Huang Y, Hamrick HE, Duerksen-Hughes PJ, Yu YN. 2008. ATM and ATR: sensing DNA damage. *World J Gastroenterol.* 10(2):155-60.
- Zaldívar JM, Mennecozzi M, Macko P, Rodrigues R, Bouhifd M, Baraibar J. 2011. A biology-based dynamic approach for the modelling of toxicity in cell assays: part II. Models for cell population growth and toxicity. EUR 24374 EN.
- Zasadil LM, Britigan EM, Weaver BA. 2013. 2n or not 2n: Aneuploidy, polyploidy and chromosomal instability in primary and tumor cells. *Semin Cell Dev Biol.* 24(4):370-9.
- Zeman MK und Cimprich KA. 2014. Causes and consequences of replication stress. *Nat Cell Biol.* 16(1):2-9.
- Zhang H, Hannon GJ, Beach D. 1994. p21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states. *Genes Dev* 8:1750-8.
- Zhang M, Zhuang G, Sun X, Shen Y, Wang W, Li Q, Di W. 2017. TP53 mutation-mediated genomic instability induces the evolution of chemoresistance and recurrence in epithelial ovarian cancer. *Diagn Pathol.* 12(1):16.

Abkürzungsverzeichnis

53BP1	p53 Binding Protein 1
4-NQO	4-Nitroquinolin-1-oxid
5-FU	5-Fluorouracil
AUC	Area under the curve
APC	Anaphase-promoting complex
BER	Basenexzisionsreparatur
BP	Benzo[a]pyren
BrdUTP	Bromdeoxyuridinmonophosphat
BFA	Brefeldin A
BubR1	Budding uninhibited by benzimidazole-related 1
CS	Cisplatin
CTH	Camptothecin
CBD	Carbendazim
CCCP	Carbonylcyanid m-chlorophenyl-hydrazon
CDK	Cyclin-Dependent Kinase
CDKI	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor
CP	Cyclophosphamid
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DDR	DNA damage response
DDI	DNA damage-inducing
DES	Diethylstilbestrol
DEX	Dexamethason
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSB	Double strand break

ETO	Etoposid
EMS	Ethylmethansulfonat
FANCD2	Fanconi anemia group D2 protein
FCS	Fötale Kälberserum
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forward scatter
GF	Griseofulvin
H ₂ O ₂	Hydrogenperoxid
HCI	High-Content-Imaging
HD	Hypodiploid
Hec1	Highly expressed in cancer protein
HR	Homologe Rekombination
HU	Hydroxyurea
ICH	International Conference on Harmonisation
IMA	Imatinib
LOOCV	Leave-one-out cross validation
ml	Milliliter
MEB	Mebendazol
MMC	Mitomycin C
MMR	Mismatch-Reparatur
MMS	Methylmethansulfonat
MGMT	O-6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MT	Mikrotubulin
MNT	Mikrokerntest
MoA	Mode of Action (Wirkmechanismus)
MRN	MRE1-RAD50-NBS1-Komplex

Mps1	Monopolar spindle 1
NHEJ	Nicht-Homologe End-Joining
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NG	Nicht-Genotoxisch
Nrf2	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
NOC	Nocodazol
NOS	Noscapin
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
OGG1	8-Oxoguanin-Glykolase
p53	Tumorsuppressor p53
PAC	Paclitaxel
PARP1	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1
PAL	Palbociclib
pH3	Phosphoryliertes Histon 3
PI	Propidiumiodid
Plks	Polo-like kinases
pRb	Retinoblastom-Protein
PTM	Posttranslationale Proteinmodifikationen
QGP	QuantiGene Plex
RNC	Relative nuclei count
ROC	Receiver operating characteristics
SAC	Spindle assembly checkpoint (M-Checkpoint)
SSB	Single strand break
SSC	Side scatter
TBST	Tris-buffered saline mit Tween20
TdT	Desoxynukleotidyltransferase
TG	Thapsigargin

TOPO	Topoisomerase Inhibitor
VB	Vinblastin
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Organisation der DNA im Kern.....	12
Abbildung 2: Übersicht von DNA-Schäden, die zu Chromosomenmutationen führen können.....	19
Abbildung 3: Substanz-induzierte Effekte auf die mitotische Spindelorganisation....	22
Abbildung 4: Mikrokern mit Kinetochor in V79-Zellen.	29
Abbildung 5: Funktionsdomänen von p53 mit bekannten posttranslationalen Modifikationsstellen.....	32
Abbildung 6: Studienübersicht der MultiFlow [®] Methode.	53
Abbildung 7: Gating-Strategie der MultiFlow [®] Methode.	57
Abbildung 8: Gating-Strategie der MicroFlow [®] Methode.....	60
Abbildung 9: Gating-Strategie der APO-BrdUTP TUNEL Methode.....	61
Abbildung 10: Automatische Bildanalyse am Beispiel von pH3 (S10)-fluoreszenzgefärbten TK6-Zellen.....	64
Abbildung 11: Benutzerdefinierter Analyse zur automatischen Quantifizierung putativer Biomarker.	68
Abbildung 12: Prinzip des QuantiGene [®] Plex Assay.....	71
Abbildung 13: Ergebnisse des Biomarkers pH3 (S10) im MultiFlow [®] Assay.....	81
Abbildung 14: Ergebnisse des Biomarkers γ H2AX im MultiFlow [®] Assay.....	82
Abbildung 15: Ergebnisse von nukleären p53 im MultiFlow [®] Assay.....	84
Abbildung 16: Ergebnisse des Biomarkers cleaved PARP1 (Apoptose) im MultiFlow [®] Assay.	85
Abbildung 17: Ergebnisse der Analyse polyploider Zellen im MultiFlow [®] Assay.	87
Abbildung 18: Ergebnisse der ROC-Analyse der MultiFlow [®] Endpunkte.....	89
Abbildung 19: Vergleich der Biomarker-Antworten durch Multiplex- und Single Methoden.....	91
Abbildung 20: Substanz-induzierte Genexpressionsanalyse nach 4h Behandlung....	97
Abbildung 21: Substanz-induzierte Genexpressionsanalyse nach 24h Behandlung...	98

Abbildung 22: Genexpressionsprofile potentieller Markergene zur Klassifizierung genotoxischer Substanzen.	101
Abbildung 23: Genexpressionsprofile potentieller Markergene zur Klassifizierung genotoxischer Substanzen.	102
Abbildung 24: Univariate Analyse am Beispiel von TP53I3.	104
Abbildung 25: Vorhersagewerte am Beispiel von TP53I3.	105
Abbildung 26: Vorhersagemodell zur Charakterisierung genotoxischer und nicht-genotoxischer Substanzen.	106
Abbildung 27: Validierung des etablierten Vorhersagemodells zur Charakterisierung genotoxischer und nicht-genotoxischer Substanzen.	108
Abbildung 28: Validierung des etablierten Vorhersagemodells zur Charakterisierung "unbekannter" Substanzen.	109
Abbildung 29: Proteinaktivität und Performance von p21.	110
Abbildung 30: Untersuchungen von Immunfluoreszenz-gefärbten TK6-Zellen zur Identifizierung proteomischer Biomarker.	111
Abbildung 31: Untersuchungen von Immunfluoreszenz-gefärbten TK6-Zellen zur Identifizierung proteomischer Biomarker.	112
Abbildung 32: Untersuchung von 53BP1 (S1778).	115
Abbildung 33: Untersuchung von BubR1 (S670).	116
Abbildung 34: Untersuchung von pH3 (S28).	117
Abbildung 35: Untersuchung von Nrf2 (S40).	118
Abbildung 36: Untersuchung von p53 (K373).	119
Abbildung 37: Untersuchung von FANCD2 (S1404).	120

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Referenzsubstanzen für die Etablierung und Validierung der MultitFlow® Methode.	53
Tabelle 2: Übersicht der Referenzsubstanzen für die Etablierung und Validierung der MultitFlow® Methode	63
Tabelle 3: Übersicht der eingestellten Messparameter für die automatische Bildanalyse von mechanistischen Biomarker	64
Tabelle 4: Übersicht der untersuchten PTMs und der eingesetzten Konzentration zur Identifizierung von Genotoxizität.	65
Tabelle 5: Übersicht der Referenzsubstanzen für die Untersuchung von PTMs zur Identifizierung von Genotoxizität.	66
Tabelle 6: Übersicht der Referenzsubstanzen für die Untersuchung von p21 zur Identifizierung von Genotoxizität.	69
Tabelle 7: Übersicht der Referenzsubstanzen mittels QuantiGene® Plex Assay zur Identifizierung von Genotoxizität.	72
Tabelle 8: Übersicht der untersuchten Gene mittels QuantiGene® Plex Assay zur Identifizierung von Genotoxizität.	73
Tabelle 9: Übersicht der Referenzsubstanzen für die Genexpressionsanalyse mittels qPCR zur Identifizierung von Genotoxizität.	77
Tabelle 10: Übersicht der untersuchten Gene und verwendeten Referenzgene mittels qPCR zur Identifizierung von Genotoxizität.	77
Tabelle 11: Reaktionsansatz für die qPCR im Fast Mode.	79
Tabelle 12: Übersicht der Ergebnisse zur Bewertung der MultiFlow® Endpunkte.	90
Tabelle 13: Übersicht der Ergebnisse im MNT MicroFlow® Assay nach 4h und 24h Behandlung der TK6-Zellen mit 31 Modellsubstanzen.	93
Tabelle 14: Performance der in vitro Testsysteme: MNT-Methode (MicroFlow®) versus Multiplex-Methode (MultiFlow®).	128

Anhang

Anhang 1: Testkonzentration in der MultiFlow[®] und MicroFlow[®] Methode..... 183

Anhang 2: Formeln der MultiFlow[®] Methode 190

Anhang 1: Testkonzentration in der MultiFlow[®] und MicroFlow[®] Methode

MoA	Substanz	Konzentration (µM)	MoA	Substanz	Konzentration (µM)	MoA	Substanz	Konzentration (µM)
NG	Brefeldin A	0,0001	Aneugen	AMG 900	0,0001377	Klastogen	4-Nitroquiunolin	0,013771
NG	Brefeldin A	0,0005	Aneugen	AMG 900	0,0001948	Klastogen	4-Nitroquiunolin	0,019478
NG	Brefeldin A	0,0001	Aneugen	AMG 900	0,0002755	Klastogen	4-Nitroquiunolin	0,027551
NG	Brefeldin A	0,005	Aneugen	AMG 900	0,0003897	Klastogen	4-Nitroquiunolin	0,038968
NG	Brefeldin A	0,01	Aneugen	AMG 900	0,0005512	Klastogen	4-Nitroquiunolin	0,055118
NG	Brefeldin A	0,05	Aneugen	AMG 900	0,0007796	Klastogen	4-Nitroquiunolin	0,077960
NG	Brefeldin A	0,1	Aneugen	AMG 900	0,0011027	Klastogen	4-Nitroquiunolin	0,110269
NG	Brefeldin A	0,5	Aneugen	AMG 900	0,0015597	Klastogen	4-Nitroquiunolin	0,155967
NG	Brefeldin A	1	Aneugen	AMG 900	0,0022060	Klastogen	4-Nitroquiunolin	0,220604
NG	Brefeldin A	5	Aneugen	AMG 900	0,0031203	Klastogen	4-Nitroquiunolin	0,312028
NG	Brefeldin A	10	Aneugen	AMG 900	0,0044134	Klastogen	4-Nitroquiunolin	0,441341
NG	Brefeldin A	50	Aneugen	AMG 900	0,0062425	Klastogen	4-Nitroquiunolin	0,624245
NG	Brefeldin A	100	Aneugen	AMG 900	0,0088295	Klastogen	4-Nitroquiunolin	0,882950
NG	Brefeldin A	500	Aneugen	AMG 900	0,012489	Klastogen	4-Nitroquiunolin	1,248868
NG	Brefeldin A	1000	Aneugen	AMG 900	0,017664	Klastogen	4-Nitroquiunolin	1,766433
NG	Caffein	1,37711073	Aneugen	AMG 900	0,024985	Klastogen	4-Nitroquiunolin	2,498490
NG	Caffein	1,947822815	Aneugen	AMG 900	0,035339	Klastogen	4-Nitroquiunolin	3,533932
NG	Caffein	2,755053486	Aneugen	AMG 900	0,0500	Klastogen	4-Nitroquiunolin	4,998490
NG	Caffein	3,896822469	Aneugen	AMG 900	0,0707	Klastogen	4-Nitroquiunolin	7,070
NG	Caffein	5,511771527	Aneugen	AMG 900	0,1	Klastogen	4-Nitroquiunolin	10
NG	Caffein	7,795999331	Aneugen	Carbendazim	0,0001	Klastogen	5-Fluorouracil	1,37711073
NG	Caffein	11,02687317	Aneugen	Carbendazim	0,0005	Klastogen	5-Fluorouracil	1,947822815
NG	Caffein	15,59670887	Aneugen	Carbendazim	0,0001	Klastogen	5-Fluorouracil	2,755053486
NG	Caffein	22,06040858	Aneugen	Carbendazim	0,005	Klastogen	5-Fluorouracil	3,896822469
NG	Caffein	31,20284099	Aneugen	Carbendazim	0,01	Klastogen	5-Fluorouracil	5,511771527
NG	Caffein	44,13414568	Aneugen	Carbendazim	0,05	Klastogen	5-Fluorouracil	7,795999331

NG	Caffein	62,42453419	Aneugen	Carbendazim	0,1	Klastogen	5-Fluorouracil	11,02687317
NG	Caffein	88,29495643	Aneugen	Carbendazim	0,5	Klastogen	5-Fluorouracil	15,59670887
NG	Caffein	124,8867842	Aneugen	Carbendazim	1	Klastogen	5-Fluorouracil	22,06040858
NG	Caffein	176,6432591	Aneugen	Carbendazim	5	Klastogen	5-Fluorouracil	31,20284099
NG	Caffein	249,8490228	Aneugen	Carbendazim	10	Klastogen	5-Fluorouracil	44,13414568
NG	Caffein	353,393243	Aneugen	Carbendazim	50	Klastogen	5-Fluorouracil	62,42453419
NG	Caffein	499,849	Aneugen	Carbendazim	100	Klastogen	5-Fluorouracil	88,29495643
NG	Caffein	707	Aneugen	Carbendazim	500	Klastogen	5-Fluorouracil	124,8867842
NG	Caffein	1000	Aneugen	Carbendazim	1000	Klastogen	5-Fluorouracil	176,6432591
NG	CCCP	0,78125	Aneugen	Diethylstilbestrol	1,37711073	Klastogen	5-Fluorouracil	249,8490228
NG	CCCP	1,5625	Aneugen	Diethylstilbestrol	1,947822815	Klastogen	5-Fluorouracil	353,393243
NG	CCCP	3,125	Aneugen	Diethylstilbestrol	2,755053486	Klastogen	5-Fluorouracil	499,849
NG	CCCP	6,25	Aneugen	Diethylstilbestrol	3,896822469	Klastogen	5-Fluorouracil	707
NG	CCCP	12,5	Aneugen	Diethylstilbestrol	5,511771527	Klastogen	5-Fluorouracil	1000
NG	CCCP	25	Aneugen	Diethylstilbestrol	7,795999331	Klastogen	Benzo[a]pyren	1,37711073
NG	CCCP	50	Aneugen	Diethylstilbestrol	11,02687317	Klastogen	Benzo[a]pyren	1,947822815
NG	D-Mannitol	1,37711073	Aneugen	Diethylstilbestrol	15,59670887	Klastogen	Benzo[a]pyren	2,755053486
NG	D-Mannitol	1,947822815	Aneugen	Diethylstilbestrol	22,06040858	Klastogen	Benzo[a]pyren	3,896822469
NG	D-Mannitol	2,755053486	Aneugen	Diethylstilbestrol	31,20284099	Klastogen	Benzo[a]pyren	5,511771527
NG	D-Mannitol	3,896822469	Aneugen	Diethylstilbestrol	44,13414568	Klastogen	Benzo[a]pyren	7,795999331
NG	D-Mannitol	5,511771527	Aneugen	Diethylstilbestrol	62,42453419	Klastogen	Benzo[a]pyren	11,02687317
NG	D-Mannitol	7,795999331	Aneugen	Diethylstilbestrol	88,29495643	Klastogen	Benzo[a]pyren	15,59670887
NG	D-Mannitol	11,02687317	Aneugen	Diethylstilbestrol	124,8867842	Klastogen	Benzo[a]pyren	22,06040858
NG	D-Mannitol	15,59670887	Aneugen	Diethylstilbestrol	176,6432591	Klastogen	Benzo[a]pyren	31,20284099
NG	D-Mannitol	22,06040858	Aneugen	Diethylstilbestrol	249,8490228	Klastogen	Benzo[a]pyren	44,13414568
NG	D-Mannitol	31,20284099	Aneugen	Diethylstilbestrol	353,393243	Klastogen	Benzo[a]pyren	62,42453419
NG	D-Mannitol	44,13414568	Aneugen	Diethylstilbestrol	499,849	Klastogen	Benzo[a]pyren	88,29495643
NG	D-Mannitol	62,42453419	Aneugen	Diethylstilbestrol	707	Klastogen	Benzo[a]pyren	124,8867842
NG	D-Mannitol	88,29495643	Aneugen	Diethylstilbestrol	1000	Klastogen	Benzo[a]pyren	176,6432591
NG	D-Mannitol	124,8867842	Aneugen	Griseofulvin	0,0001	Klastogen	Benzo[a]pyren	249,8490228
NG	D-Mannitol	176,6432591	Aneugen	Griseofulvin	0,0005	Klastogen	Benzo[a]pyren	353,393243

NG	D-Mannitol	249,8490228	Aneugen	Griseofulvin	0,0001	Klastogen	Benzo[a]pyren	499,849
NG	D-Mannitol	353,393243	Aneugen	Griseofulvin	0,005	Klastogen	Benzo[a]pyren	707
NG	D-Mannitol	499,849	Aneugen	Griseofulvin	0,01	Klastogen	Benzo[a]pyren	1000
NG	D-Mannitol	707	Aneugen	Griseofulvin	0,05	Klastogen	Camptothecin	0,0001
NG	D-Mannitol	1000	Aneugen	Griseofulvin	0,1	Klastogen	Camptothecin	0,0005
NG	Dexamethason	1,37711073	Aneugen	Griseofulvin	0,5	Klastogen	Camptothecin	0,0001
NG	Dexamethason	1,947822815	Aneugen	Griseofulvin	1	Klastogen	Camptothecin	0,005
NG	Dexamethason	2,755053486	Aneugen	Griseofulvin	5	Klastogen	Camptothecin	0,01
NG	Dexamethason	3,896822469	Aneugen	Griseofulvin	10	Klastogen	Camptothecin	0,05
NG	Dexamethason	5,511771527	Aneugen	Griseofulvin	50	Klastogen	Camptothecin	0,1
NG	Dexamethason	7,795999331	Aneugen	Griseofulvin	100	Klastogen	Camptothecin	0,5
NG	Dexamethason	11,02687317	Aneugen	Griseofulvin	500	Klastogen	Camptothecin	1
NG	Dexamethason	15,59670887	Aneugen	Griseofulvin	1000	Klastogen	Camptothecin	5
NG	Dexamethason	22,06040858	Aneugen	Mebendazol	0,013771107	Klastogen	Camptothecin	10
NG	Dexamethason	31,20284099	Aneugen	Mebendazol	0,019478228	Klastogen	Camptothecin	50
NG	Dexamethason	44,13414568	Aneugen	Mebendazol	0,027550535	Klastogen	Camptothecin	100
NG	Dexamethason	62,42453419	Aneugen	Mebendazol	0,038968225	Klastogen	Camptothecin	500
NG	Dexamethason	88,29495643	Aneugen	Mebendazol	0,055117715	Klastogen	Camptothecin	1000
NG	Dexamethason	124,8867842	Aneugen	Mebendazol	0,077959993	Klastogen	Cisplatin	1,37711073
NG	Dexamethason	176,6432591	Aneugen	Mebendazol	0,110268732	Klastogen	Cisplatin	1,947822815
NG	Dexamethason	249,8490228	Aneugen	Mebendazol	0,155967089	Klastogen	Cisplatin	2,755053486
NG	Dexamethason	353,393243	Aneugen	Mebendazol	0,220604086	Klastogen	Cisplatin	3,896822469
NG	Dexamethason	499,849	Aneugen	Mebendazol	0,31202841	Klastogen	Cisplatin	5,511771527
NG	Dexamethason	707	Aneugen	Mebendazol	0,441341457	Klastogen	Cisplatin	7,795999331
NG	Dexamethason	1000	Aneugen	Mebendazol	0,624245342	Klastogen	Cisplatin	11,02687317
NG	Imatinib	1,37711073	Aneugen	Mebendazol	0,882949564	Klastogen	Cisplatin	15,59670887
NG	Imatinib	1,947822815	Aneugen	Mebendazol	1,248867842	Klastogen	Cisplatin	22,06040858
NG	Imatinib	2,755053486	Aneugen	Mebendazol	1,766432591	Klastogen	Cisplatin	31,20284099
NG	Imatinib	3,896822469	Aneugen	Mebendazol	2,498490228	Klastogen	Cisplatin	44,13414568
NG	Imatinib	5,511771527	Aneugen	Mebendazol	3,53393243	Klastogen	Cisplatin	62,42453419
NG	Imatinib	7,795999331	Aneugen	Mebendazol	4,99849	Klastogen	Cisplatin	88,29495643

NG	Imatinib	11,02687317	Aneugen	Mebendazol	7,07	Klastogen	Cisplatin	124,8867842
NG	Imatinib	15,59670887	Aneugen	Mebendazol	10	Klastogen	Cisplatin	176,6432591
NG	Imatinib	22,06040858	Aneugen	Nocodazol	0,013771107	Klastogen	Cisplatin	249,8490228
NG	Imatinib	31,20284099	Aneugen	Nocodazol	0,019478228	Klastogen	Cisplatin	353,393243
NG	Imatinib	44,13414568	Aneugen	Nocodazol	0,027550535	Klastogen	Cisplatin	499,849
NG	Imatinib	62,42453419	Aneugen	Nocodazol	0,038968225	Klastogen	Cisplatin	707
NG	Imatinib	88,29495643	Aneugen	Nocodazol	0,055117715	Klastogen	Cisplatin	1000
NG	Imatinib	124,8867842	Aneugen	Nocodazol	0,077959993	Klastogen	Cyclophosphamid	1,37711073
NG	Imatinib	176,6432591	Aneugen	Nocodazol	0,110268732	Klastogen	Cyclophosphamid	1,947822815
NG	Imatinib	249,8490228	Aneugen	Nocodazol	0,155967089	Klastogen	Cyclophosphamid	2,755053486
NG	Imatinib	353,393243	Aneugen	Nocodazol	0,220604086	Klastogen	Cyclophosphamid	3,896822469
NG	Imatinib	499,849	Aneugen	Nocodazol	0,31202841	Klastogen	Cyclophosphamid	5,511771527
NG	Imatinib	707	Aneugen	Nocodazol	0,441341457	Klastogen	Cyclophosphamid	7,795999331
NG	Imatinib	1000	Aneugen	Nocodazol	0,624245342	Klastogen	Cyclophosphamid	11,02687317
NG	Lovastatin	1,37711073	Aneugen	Nocodazol	0,882949564	Klastogen	Cyclophosphamid	15,59670887
NG	Lovastatin	1,947822815	Aneugen	Nocodazol	1,248867842	Klastogen	Cyclophosphamid	22,06040858
NG	Lovastatin	2,755053486	Aneugen	Nocodazol	1,766432591	Klastogen	Cyclophosphamid	31,20284099
NG	Lovastatin	3,896822469	Aneugen	Nocodazol	2,498490228	Klastogen	Cyclophosphamid	44,13414568
NG	Lovastatin	5,511771527	Aneugen	Nocodazol	3,53393243	Klastogen	Cyclophosphamid	62,42453419
NG	Lovastatin	7,795999331	Aneugen	Nocodazol	4,99849	Klastogen	Cyclophosphamid	88,29495643
NG	Lovastatin	11,02687317	Aneugen	Nocodazol	7,07	Klastogen	Cyclophosphamid	124,8867842
NG	Lovastatin	15,59670887	Aneugen	Nocodazol	10	Klastogen	Cyclophosphamid	176,6432591
NG	Lovastatin	22,06040858	Aneugen	Noscapin	0,013771107	Klastogen	Cyclophosphamid	249,8490228
NG	Lovastatin	31,20284099	Aneugen	Noscapin	0,019478228	Klastogen	Cyclophosphamid	353,393243
NG	Lovastatin	44,13414568	Aneugen	Noscapin	0,027550535	Klastogen	Cyclophosphamid	499,849
NG	Lovastatin	62,42453419	Aneugen	Noscapin	0,038968225	Klastogen	Cyclophosphamid	707
NG	Lovastatin	88,29495643	Aneugen	Noscapin	0,055117715	Klastogen	Cyclophosphamid	1000
NG	Lovastatin	124,8867842	Aneugen	Noscapin	0,077959993	Klastogen	Ethylmethansulfonat	1,37711073
NG	Lovastatin	176,6432591	Aneugen	Noscapin	0,110268732	Klastogen	Ethylmethansulfonat	1,947822815
NG	Lovastatin	249,8490228	Aneugen	Noscapin	0,155967089	Klastogen	Ethylmethansulfonat	2,755053486
NG	Lovastatin	353,393243	Aneugen	Noscapin	0,220604086	Klastogen	Ethylmethansulfonat	3,896822469

NG	Lovastatin	499,849	Aneugen	Noscapin	0,31202841	Klastogen	Ethylmethansulfonat	5,511771527
NG	Lovastatin	707	Aneugen	Noscapin	0,441341457	Klastogen	Ethylmethansulfonat	7,795999331
NG	Lovastatin	1000	Aneugen	Noscapin	0,624245342	Klastogen	Ethylmethansulfonat	11,02687317
NG	NaCl	1,37711073	Aneugen	Noscapin	0,882949564	Klastogen	Ethylmethansulfonat	15,59670887
NG	NaCl	1,947822815	Aneugen	Noscapin	1,248867842	Klastogen	Ethylmethansulfonat	22,06040858
NG	NaCl	2,755053486	Aneugen	Noscapin	1,766432591	Klastogen	Ethylmethansulfonat	31,20284099
NG	NaCl	3,896822469	Aneugen	Noscapin	2,498490228	Klastogen	Ethylmethansulfonat	44,13414568
NG	NaCl	5,511771527	Aneugen	Noscapin	3,53393243	Klastogen	Ethylmethansulfonat	62,42453419
NG	NaCl	7,795999331	Aneugen	Noscapin	4,99849	Klastogen	Ethylmethansulfonat	88,29495643
NG	NaCl	11,02687317	Aneugen	Noscapin	7,07	Klastogen	Ethylmethansulfonat	124,8867842
NG	NaCl	15,59670887	Aneugen	Noscapin	10	Klastogen	Ethylmethansulfonat	176,6432591
NG	NaCl	22,06040858	Aneugen	Paclitaxel	0,0001	Klastogen	Ethylmethansulfonat	249,8490228
NG	NaCl	31,20284099	Aneugen	Paclitaxel	0,0005	Klastogen	Ethylmethansulfonat	353,393243
NG	NaCl	44,13414568	Aneugen	Paclitaxel	0,0001	Klastogen	Ethylmethansulfonat	499,849
NG	NaCl	62,42453419	Aneugen	Paclitaxel	0,005	Klastogen	Ethylmethansulfonat	707
NG	NaCl	88,29495643	Aneugen	Paclitaxel	0,01	Klastogen	Ethylmethansulfonat	1000
NG	NaCl	124,8867842	Aneugen	Paclitaxel	0,05	Klastogen	Etoposid	0,0015625
NG	NaCl	176,6432591	Aneugen	Paclitaxel	0,1	Klastogen	Etoposid	0,003125
NG	NaCl	249,8490228	Aneugen	Paclitaxel	0,5	Klastogen	Etoposid	0,0625
NG	NaCl	353,393243	Aneugen	Paclitaxel	1	Klastogen	Etoposid	0,125
NG	NaCl	499,849	Aneugen	Paclitaxel	5	Klastogen	Etoposid	0,25
NG	NaCl	707	Aneugen	Paclitaxel	10	Klastogen	Etoposid	0,5
NG	NaCl	1000	Aneugen	Paclitaxel	50	Klastogen	Etoposid	1
NG	Ofloxacin	1,37711073	Aneugen	Paclitaxel	100	Klastogen	Hydrogenperoxid	1,37711073
NG	Ofloxacin	1,947822815	Aneugen	Paclitaxel	500	Klastogen	Hydrogenperoxid	1,947822815
NG	Ofloxacin	2,755053486	Aneugen	Paclitaxel	1000	Klastogen	Hydrogenperoxid	2,755053486
NG	Ofloxacin	3,896822469	Aneugen	Vinblastin	0,0078125 µg/ml	Klastogen	Hydrogenperoxid	3,896822469
NG	Ofloxacin	5,511771527	Aneugen	Vinblastin	0,15625 µg/ml	Klastogen	Hydrogenperoxid	5,511771527
NG	Ofloxacin	7,795999331	Aneugen	Vinblastin	0,3125 µg/ml	Klastogen	Hydrogenperoxid	7,795999331
NG	Ofloxacin	11,02687317	Aneugen	Vinblastin	0,625 µg/ml	Klastogen	Hydrogenperoxid	11,02687317
NG	Ofloxacin	15,59670887	Aneugen	Vinblastin	1,25 µg/ml	Klastogen	Hydrogenperoxid	15,59670887

NG	Ofloxacin	22,06040858	Aneugen	Vinblastin	2,5	µg/ml	Klastogen	Hydrogenperoxid	22,06040858
NG	Ofloxacin	31,20284099	Aneugen	Vinblastin	5	µg/ml	Klastogen	Hydrogenperoxid	31,20284099
NG	Ofloxacin	44,13414568					Klastogen	Hydrogenperoxid	44,13414568
NG	Ofloxacin	62,42453419					Klastogen	Hydrogenperoxid	62,42453419
NG	Ofloxacin	88,29495643					Klastogen	Hydrogenperoxid	88,29495643
NG	Ofloxacin	124,8867842					Klastogen	Hydrogenperoxid	124,8867842
NG	Ofloxacin	176,6432591					Klastogen	Hydrogenperoxid	176,6432591
NG	Ofloxacin	249,8490228					Klastogen	Hydrogenperoxid	249,8490228
NG	Ofloxacin	353,393243					Klastogen	Hydrogenperoxid	353,393243
NG	Ofloxacin	499,849					Klastogen	Hydrogenperoxid	499,849
NG	Ofloxacin	707					Klastogen	Hydrogenperoxid	707
NG	Ofloxacin	1000					Klastogen	Hydrogenperoxid	1000
NG	Thapsigargin	0,0001					Klastogen	Hydroxyurea	0,0001
NG	Thapsigargin	0,0005					Klastogen	Hydroxyurea	0,0005
NG	Thapsigargin	0,0001					Klastogen	Hydroxyurea	0,0001
NG	Thapsigargin	0,005					Klastogen	Hydroxyurea	0,005
NG	Thapsigargin	0,01					Klastogen	Hydroxyurea	0,01
NG	Thapsigargin	0,05					Klastogen	Hydroxyurea	0,05
NG	Thapsigargin	0,1					Klastogen	Hydroxyurea	0,1
NG	Thapsigargin	0,5					Klastogen	Hydroxyurea	0,5
NG	Thapsigargin	1					Klastogen	Hydroxyurea	1
NG	Thapsigargin	5					Klastogen	Hydroxyurea	5
NG	Thapsigargin	10					Klastogen	Hydroxyurea	10
NG	Thapsigargin	50					Klastogen	Hydroxyurea	50
NG	Thapsigargin	100					Klastogen	Hydroxyurea	100
NG	Thapsigargin	500					Klastogen	Hydroxyurea	500
NG	Thapsigargin	1000					Klastogen	Hydroxyurea	1000
NG	Tunicamycin	0,0001					Klastogen	Metilmethansulfonat	0,0001
NG	Tunicamycin	0,0005					Klastogen	Metilmethansulfonat	0,0005
NG	Tunicamycin	0,0001					Klastogen	Metilmethansulfonat	0,0001
NG	Tunicamycin	0,005					Klastogen	Metilmethansulfonat	0,005

NG	Tunicamycin	0,01
NG	Tunicamycin	0,05
NG	Tunicamycin	0,1
NG	Tunicamycin	0,5
NG	Tunicamycin	1
NG	Tunicamycin	5
NG	Tunicamycin	10
NG	Tunicamycin	50
NG	Tunicamycin	100
NG	Tunicamycin	500
NG	Tunicamycin	1000

Klastogen	Metylmethansulfonat	0,01
Klastogen	Metylmethansulfonat	0,05
Klastogen	Metylmethansulfonat	0,1
Klastogen	Metylmethansulfonat	0,5
Klastogen	Metylmethansulfonat	1
Klastogen	Metylmethansulfonat	5
Klastogen	Metylmethansulfonat	10
Klastogen	Metylmethansulfonat	50
Klastogen	Metylmethansulfonat	100
Klastogen	Metylmethansulfonat	500
Klastogen	Metylmethansulfonat	1000

Anhang 2: Formeln der MultiFlow[®] Methode

$$\text{Zelldichte} = \frac{\text{Counts der 2n polyploiden Kerne} *}{\text{Counts der Beads}}$$

$$\frac{\text{Anzahl der Beads pro mL in der bereitgestellten RNaseSolution} * \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Korrekturwert 1,042mL}}$$

$$\% \text{ RNC} = \frac{\text{Zelldichte}_{\text{Behandlung}}}{\text{Zelldichte}_{\text{Kontrolle (n=3)}}} * 100$$

$$\% \text{ pH3} = \frac{\text{Counts der pH3 positiven Zellen } (\geq 4n)}{\text{Counts der 2n polyploiden Kerne}} * 100$$

$$\% \text{ Polyploidie} = \frac{\text{Counts der 8n polyploiden Kerne}}{\text{Counts der 2n polyploiden Kerne}} * 100$$

$$\gamma\text{H2AX shift} = \frac{\text{Median Fluoreszenz}_{\text{Behandlung}}}{\text{Median Fluoreszenz}_{\text{Kontrolle}}}$$

$$\text{p53 shift} = \frac{\text{Median Fluoreszenz}_{\text{Behandlung}}}{\text{Median Fluoreszenz}_{\text{Kontrolle}}}$$

Publikationen

Artikel (Dissertation)

Wilde S, Dambowsky M, Hempt C, Sutter A, Queisser N. 2017. Classification of in vitro genotoxicants using a novel multiplexed biomarker assay compared to the flow cytometric micronucleus test. *Environ Mol Mutagen.* 58(9):662-677.

Bryce SM, Bernacki DT, Bemis JC, Spellman RA, Engel ME, Schuler M, Lorge E, Heikkinen PT, Hemmann U, Thybaud V, Wilde S, Queisser N, Sutter A, Zeller A, Guérard M, Kirkland D, Dertinger SD. 2017. Interlaboratory evaluation of a multiplexed high information content in vitro genotoxicity assay. *Environ Mol Mutagen.* 58(3):146-161.

Artikel (Masterarbeit)

Wilde S, Queisser N, Holz C, Raschke M, Sutter A. 2018. Differentiation of Aneugens and Clastogens in the In Vitro Micronucleus Test by Kinetochore Scoring Using Automated Image Analysis. *Environ Mol Mutagen.* doi: 10.1002/em.22259.

Vorträge

Wilde S. Investigation of DNA damage biomarkers for identification of genotoxic mode of action. GUM Young Scientist Workshop. Helmholtz Zentrum München - German Research Center for Environmental Health (Oktober 2016)

Wilde S. A multiplexed flow cytometric assay covering mechanistic biomarkers of genotoxicity- experience @Bayer. 44th Annual Meeting of the EEMGS. Clarion Congress Hotel Prag (August 2015)

Poster

Wilde S, Raschke M, Bryce S, Dertinger SD, Sutter A. 2016. A multiplexed flow cytometric assay covering mechanistic biomarkers of genotoxicity–experience @Bayer. 45th Annual Meeting of the EEMGS. Panum Institut der Universität Kopenhagen (August 2016)

Wilde S, Hempt C, Queisser N, Raschke M, Dertinger SD, Bryce S, Sutter A. 2016. A multiplexed flow cytometric assay covering mechanistic biomarkers of genotoxicity. 82. Jahrestagung DGPT. Henry-Ford-Bau der Freien Universität Berlin (März 2016)

Wilde S, Raschke M, Pawletta M, Sutter, A. 2015. Automated evaluation of kinetochore staining for mode of action analysis in the In Vitro Micronucleus Test. 81. Jahrestagung DGPT. Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (März 2015)

Eidestattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation: „Einsatz von mechanistischen Biomarkern zur Charakterisierung und Bewertung von *in vitro* Genotoxinen“, 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.

Weiterhin erkläre ich, dass bei allen Abbildungen und Texten bei denen die Verwertrungsrechte (Copyright) nicht bei mir liegen, diese von den Rechtsinhabern eingeholt wurden und die Textstellen bzw. Abbildungen entsprechend den rechtlichen Vorgaben gekennzeichnet sind sowie bei Abbildungen, die dem Internet entnommen wurden, der entsprechende Hypertextlink angegeben wurde.

Würzburg, den 10.04.2019

Sabrina Willde