

**Der *in vitro* PI3-A Genmutations-Assay:
Methodenentwicklung eines neuartigen Testsystems zur
Untersuchung auf Mutagenität mittels
durchflusszytometrischer Analyse des
Glycosylphosphatidylinositol-Status von Säugerzellen**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) – Universitätsbereich

genehmigte
DISSERTATION

von

Christopher-Tilman Krüger

staatlich geprüfter Diplom-Lebensmittelchemiker

aus

Pforzheim

Dekan: Prof. Dr. Peter Roesky

Referentin: Prof. Dr. Andrea Hartwig

Koreferent: Prof. Dr. Holger Puchta

Tag der mündlichen Prüfung: 17.04.2015

Karlsruhe 2015

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Darüber hinaus erkläre ich, dass die Arbeit nicht anderweitig als Prüfungsarbeit oder als Dissertation bei einer anderen Fakultät verwendet wird oder wurde.

Christopher-Tilman Krüger

Karlsruhe, 02.03.2015

INHALTSVERZEICHNIS

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	EINLEITUNG	4
2.1	Mutagenese und Kanzerogenese.....	4
2.2	Genotoxizitäts- und Mutagenitäts-Tests	11
2.2.1	In vivo Prüfung auf Genotoxizität und Mutagenität	12
2.2.2	In vitro Prüfung auf Genotoxizität und Mutagenität	14
2.3	Der GPI-Anker und das <i>PIG-A</i> Gen: Molekularbiologische Grundlagen, Pathophysiologie und Indikation mutagener Effekte.....	17
2.4	Proaerolysin	25
2.5	Zelllinien: TK6 und WI-L2-NS	26
3	FRAGESTELLUNG	28
4	MATERIAL UND METHODEN.....	29
4.1	Zellkultur	29
4.1.1	Allgemeines	29
4.1.2	Kryokonservierung	29
4.1.3	Inkulturnahme	29
4.2	Bestimmung der GPI(-) Frequenz in Suspensionszellen mittels Multicolor Durchflusszytometrie	30
4.3	Bestimmung der GPI(-) Frequenz in Suspensionszellen mittels Proaerolysin-Selektion in 96-Well Platten	31
4.4	Abreicherung von GPI(-) Zellen.....	32
4.5	Zytotoxizität von Proaerolysin.....	33
4.6	Generierung einer GPI(-) TK6 Zellpopulation mittels Proaerolysin.....	33
4.7	Behandlung von WI-L2-NS Zellen mit PI-PLC	34
4.8	Methodenvalidierung.....	34
4.8.1	Wiederfindungsanalyse mittels Durchflusszytometrie	34
4.8.2	Durchflusszytometrie vs. Proaerolysin-basierter Selektion	34

4.8.3	Bestimmung der Populationsverdopplungszeit von TK6 und WI-L2-NS Zellen	35
4.9	Bestimmung der Phänotyp-Expressionszeit	35
4.10	Toxizitäts-Bestimmung	36
4.10.1	Relative Zellzahl-Zunahme (RICC).....	36
4.10.2	Relative Zellzahl (RCC).....	36
4.10.3	7-AAD Färbung	37
4.11	Behandlungen	37
4.12	Bestimmung der spontanen GPI(-) Rate.....	38
4.13	Isolierung einzelner TK6-Zellklone mit unterschiedlichem GPI-Status	38
4.14	PCR und Sanger DNA-Sequenzierung.....	39
4.14.1	RNA-Isolierung.....	39
4.14.2	Umschreibung in cDNA	39
4.14.3	PCR Amplifikation	40
4.14.4	Agarose-Gelelektrophorese.....	40
4.14.5	Sanger-Sequenzierung	41
4.15	Next-generation sequencing.....	41
4.16	Sequenzhomologie auf Protein-Level	42
5	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	43
5.1	Entwicklung der durchflusszytometrischen Methode zur Bestimmung des GPI(-) Status von Zellen und der GPI(-) Frequenz.....	43
5.2	Generierung einer GPI(-) TK6 Zellpopulation mittels Proaerolysin.....	47
5.3	Abreicherung von GPI(-) Zellen und Inkulturnahme von GPI(-) abgereicherten Zellen.....	50
5.4	Methodenvalidierung	52
5.4.1	Wiederfindungsanalyse mittels TK6 Zellen und Durchflusszytometrie	52
5.4.2	Durchflusszytometrie vs. Proaerolysin-Selektion	53
5.4.3	Populationsverdopplungszeit von TK6 und WI-L2-NS Zellen in Abhängigkeit des GPI-Status.....	54

5.5	Untersuchung von Positiv- und Negativ-Kontrollen.....	55
5.5.1	Relative Zellzahl-Zunahme (RICC) zur Festlegung der Top-Dosis	55
5.5.2	GPI(-) Phänotyp-Expressionszeit	57
5.5.3	Zusammenfassende Beschreibung der Testdurchführung.....	62
5.5.4	Untersuchung von Positiv- und Negativ-Kontrollen auf Mutagenität	63
5.6	Spontane GPI(-) Rate von TK6 und WI-L2-NS Zellen.....	71
5.7	GPI: Genotyp- zu Phänotyp-Beziehung.....	74
6	ZUSAMMENFASSENDER DISKUSSION	81
7	LITERATURVERZEICHNIS	90
8	ANHANG	97
8.1	Abkürzungsverzeichnis	97
8.2	Verwendete Chemikalien und biologische Materialien.....	99
8.3	Lösungen und Puffer.....	100
8.4	Verbrauchsmaterialien	101
8.5	Verwendete Geräte	101
8.6	Ergänzende Daten	103
8.6.1	Testprotokoll für den in vitro PIG-A Assay.....	103
8.6.2	GPI(-) Frequenzen der Positiv- und Negativ-Kontrollen.....	112
8.6.3	PIG-A mRNA Wildtyp und Mutanten Nukleotid-Sequenz.....	114
8.6.4	Primer für die PIG-A cDNA PCR sowie für die Sanger Sequenzierung	115
	PUBLIKATIONSLISTE	116
	LEBENS LAUF	118
	DANKSAGUNG	119

1 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Methodenentwicklung des *in vitro* PIG-A Genmutations-Assays. Dieser basiert auf dem Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Status von Säugerzellen, wobei GPI als phänotypischer Marker zur Detektion sowie Quantifizierung speziell mutierter, GPI-defizienter (GPI(-)) Zellen dient. GPI wird in eukaryotischen Zellen als Membrananker für mehr als 250 unterschiedliche Proteine verwendet. Bisher wurden 22 Gene identifiziert, die an der GPI-Biosynthese beteiligt sind, wovon einzig das *phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class A (PIG-A)* Gen X-chromosomal lokalisiert ist, weswegen hauptsächlich inaktivierende Mutationen in diesem Gen zu einem GPI(-) Phänotyp führen. Der GPI-Phänotyp ist für die *in vitro* sowie *in vivo* Mutagenitätsforschung von Interesse, da GPI die Untersuchung mutagener Effekte in Zellen mittels Antikörperfärbung von GPI-verankerten Oberflächenproteinen wie *cluster of differentiation (CD)55* und *CD59* nach durchflusszytometrischer Analyse ermöglicht, wobei mutierte Zellen einen GPI(-) und Wildtyp-Zellen einen GPI-profizienten (GPI(+)) Phänotyp aufweisen. Diese neuartige Methodik grenzt sich sowohl durch die mutationsbedingte, phänotypische Veränderung als auch durch den Einsatz der Durchflusszytometrie zur Quantifizierung mutierter Zellen von den bisher etablierten Mutagenitäts-Testsystemen ab. Neben der vorliegenden *in vitro* Arbeit steht der gegenwärtig zu evaluierende *in vivo* PIG-A Assay im Fokus des wissenschaftlichen Interesses.

Für die Etablierung des *in vitro* PIG-A Assays wurden die eng verwandten Zelllinien TK6 sowie WI-L2-NS verwendet. Im Rahmen der Methodenentwicklung wurde zunächst eine Färbestrategie entwickelt, um eine sensitive und reproduzierbare Quantifizierung mutierter GPI(-) Zellen unter Einsatz der Durchflusszytometrie zu realisieren. Die GPI-verankerten Zelloberflächenproteine *CD55* und *CD59* wurden hierfür mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt. Die zusätzliche Färbung des GPI-unabhängigen Transmembranproteins *CD19* verbesserte die Präzision und die Robustheit der Methode, da auf diese Weise unspezifische Events aus der Analyse ausgeschlossen werden konnten.

Aufgrund des hohen Gehalts bereits vorhandener GPI(-) Zellen (~ 3000 in 10^6) in der käuflich erworbenen TK6 Zelllinie, war die Abreicherung von GPI(-) Zellen für die weitere Verwendung dieser Zelllinie essentiell. Eine Abreicherungs-Methodik konnte erfolgreich mittels Antikörper-bindenden Zellkulturschalen realisiert werden, wobei der Gehalt an GPI(-) Zellen auf < 20 in 10^6 reduziert werden konnte.

Im Rahmen der Methodvalidierung konnte unter Verwendung von GPI(-) TK6 Zellen die Funktionalität der entwickelten Färbestrategie sowie die Eignung der Durchflusszytometrie zur Quantifizierung mutierter GPI(-) Zellen demonstriert werden. Untersuchungen bezüglich der Populationsverdopplungszeit (PVZ) von TK6 Zellen mit unterschiedlichem GPI-Status ergaben, dass dieser keinen Einfluss auf die PVZ aufwies.

Nach erfolgter Methodvalidierung wurden mutagene (Positiv-Kontrollen) sowie nicht-mutagene Agentien (Negativ-Kontrollen) mit dem *in vitro* PIG-A Testsystem untersucht. Hierfür wurde zunächst eine optimale Phänotyp-Expressionszeit von 10 Tagen für 4 h Inkubationen und von 11 Tagen für 24 h Inkubationen ermittelt. Anschließend konnte in TK6 Zellen die Mutagenität der Positiv-Kontrollen Ethylmethansulfonat (EMS), UV-C Bestrahlung und 4-Nitrochinolin-N-oxid (NQO) durch eine dosisabhängige, statistisch signifikante Zunahme an GPI(-) Zellen in Behandlungsansätzen im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden. Demgegenüber führten Inkubationen mit den Negativ-Kontrollen Pyridin und Cycloheximid zu keiner statistisch signifikanten Zunahme an GPI(-) Zellen. Unter Verwendung von WI-L2-NS Zellen wurde EMS als Positiv-Kontrolle untersucht. Die Mutagenität von EMS wurde dabei zwar dosisabhängig und statistisch signifikant nachgewiesen, jedoch weniger sensitiv im Vergleich zu TK6. In WI-L2-NS Zellen zeigte die Negativ-Kontrolle Pyridin in der höchsten Konzentration von 10 mM eine statistisch erhöhte GPI(-) Frequenz (Anzahl GPI(-) Zellen in 10^6 Zellen) im Vergleich zur Kontrolle. Demnach wurde die Mutagenität von EMS unter Verwendung der WI-L2-NS Zelllinie korrekt erkannt, jedoch führte die Pyridin-Behandlung zu einem „irrelevant-positiven“ Testergebnis.

Nach der Phänotyp-Expressionszeit wiesen unbehandelte Kontrollen von TK6 Zellen eine höhere GPI(-) Frequenz im Vergleich zu WI-L2-NS auf. Dies konnte experimentell auf eine höhere spontane GPI(-) Entstehungsrate von TK6 Zellen zurückgeführt werden. Aufgrund weiterer Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die höhere spontane GPI(-) Rate der TK6 Zellen wahrscheinlich die gesamte Zelllinie betrifft und nicht auf eine hypermutable Subpopulation zurückzuführen ist.

Um die höhere spontane GPI(-) Entstehungsrate sowie die höhere Empfindlichkeit der TK6 Zelllinie gegenüber EMS-induzierter Mutagenität auf genetischer Ebene zu erklären, wurde das GPI-betreffende Genotyp- zu Phänotyp-Verhältnis untersucht. Experimentell wurde dies zunächst anhand von Sanger DNA-Sequenzierung des *PIG-A* Gens auf mRNA-Ebene realisiert. Dabei zeigte sich ein kausaler Zusammenhang zwischen dem *PIG-A* Gen und einem GPI(-) Phänotyp für TK6 Zellen, wobei dieser jedoch nicht bei allen untersuchten GPI(-) Zellklonen auf das *PIG-A* Gen zurückgeführt werden konnte. Aufgrund dessen wurde

ein *next-generation sequencing* (NGS) durchgeführt. Anhand dieser das komplette Genom abdeckenden Methodik konnte in einem GPI(+) TK6 Klon eine Heterozygotie des autosomalen, für die GPI-Biosynthese essentiellen *PIG-L* Gens identifiziert werden. Zwei weitere mittels NGS untersuchte GPI(-) TK6 Klone zeigten ebenfalls diese Heterozygotie im *PIG-L* Gen, wobei hier durch eine weitere Deletion in dem bis dato funktionellen *PIG-L* Allel *loss of heterozygosity* (LOH) auftrat, was den beobachteten GPI(-) Phänotyp induzierte.

Durch die vorliegende Arbeit konnte gezeigt werden, dass der GPI-Status von Säugerzellen als phänotypischer Marker für Mutagenität geeignet ist. Das entwickelte Test-Protokoll zur Bestimmung der GPI(-) Frequenz sowie die Auswertung mittels Durchflusszytometrie konnten erfolgreich validiert werden und ermöglichten eine sensitive sowie reproduzierbare Bestimmung der GPI(-) Frequenz. Für das unterschiedliche Verhalten der beiden verwendeten Zelllinien TK6 und WI-L2-NS konnte auf genetischer Ebene mit der *PIG-L* Heterozygotie in TK6 eine Erklärung gefunden werden. Die *PIG-L* Heterozygotie stellte jedoch keinen Nachteil für die TK6 Zelllinie in dem Testsystem dar. Vielmehr führte diese genetische Situation, trotz einer im Vergleich zu WI-L2-NS erhöhten, spontanen GPI(-) Rate, zu einer verbesserten Sensitivität von TK6 gegenüber der Behandlung mit dem Mutagen EMS. Durch die höheren GPI(-) Frequenzen in unbehandelten Kontrollen erwies sich TK6 ebenfalls als nicht anfällig für „irrelevant-positive“ Testbefunde, wie es bei WI-L2-NS der Fall war. Somit stellt der *in vitro* PIG-A Assay unter Verwendung von TK6 Zellen ein vielversprechendes *in vitro* Testsystem zur Prüfung auf Mutagenität dar.

2 EINLEITUNG

2.1 Mutagenese und Kanzerogenese

Mutationen bildeten einst die Grundlage für die große Artenvielfalt auf unserem Planeten und sind ein unverzichtbarer Bestandteil der Evolution. Durch das Auftreten von Mutationen in der Desoxyribonukleinsäure (englisch *deoxyribonucleic acid*, DNA) sind die frühen Lebensformen divergiert und diejenigen, die durch eine Mutation einen Überlebensvorteil gegenüber ihren Konkurrenten aufwiesen, haben sich im Laufe der Evolution durchgesetzt. Durch dieses Prinzip, einst durch Darwin als „*survival of the fittest*“ bezeichnet, konnten unterschiedlichste ökologische Lebensräume besiedelt werden.

Die Evolution führte letztlich aufgrund dieser Dynamik und anderen Faktoren zu einem beeindruckenden Artenspektrum. Schätzungen zufolge leben 8,7 Millionen Arten auf der Erde, wovon noch ca. 90% unbekannt sein sollen (Mora et al., 2011). So essentiell Mutationen für die Entwicklung des Lebens auf der Erde gewesen sein mögen, aus Sicht des Menschen sind Mutationen als ambivalent zu bewerten, da sie unterschiedliche biologische Wirkungen aufweisen können. Bestimmte Mutationen sind in der Lage, eine Kanzerogenese und somit Krebs auszulösen, weswegen Agentien, die Mutationen in der DNA induzieren können, als potentiell krebserregend eingestuft werden.

Der Begriff Mutation (von lat. *mutare* ändern, verwandeln) beschreibt eine dauerhafte Veränderung der DNA und geht auf den Botaniker Hugo de Vries im Jahre 1901 zurück (Vries, 1901-1903), ca. 50 Jahre bevor der strukturelle Aufbau der DNA als Doppelhelix durch James Watson und Francis Crick beschrieben wurde (Watson und Crick, 1953). Eine Klassifikation von Mutationen ist nach unterschiedlichen Gesichtspunkten möglich. In der heutigen Zytogenetik werden Mutationen anhand der Größe des betroffenen Bereichs der DNA in Genommutationen (Veränderung der Anzahl der Chromosomen), Chromosomenmutationen (mikroskopisch erkennbare Veränderungen der Chromosomenstruktur) und Genmutationen (mikroskopisch nicht erkennbare Veränderungen in einem Gen) unterteilt, die sich wiederum in diverse Subtypen untergliedern lassen und unterschiedliche biologische Auswirkungen zeigen (Graw, 2010).

Neben spontan auftretenden und biologisch z.B. durch Viren induzierten Mutationen sind bestimmte chemische Verbindungen oder physikalische Noxen dazu in der Lage, die DNA zu schädigen und auf diese Weise Mutationen auszulösen (Harris, 1991). Zu den häufigsten chemisch oder physikalisch induzierten DNA-Schäden zählen kovalent modifizierte DNA-

Basen, die Eliminierung von Purin- oder Pyrimidin-Basen, Einzelstrangbrüche am Ribosephosphat-Rückgrat der DNA, Doppelstrangbrüche, Quervernetzung von DNA-Basen sowie DNA-Protein Addukte (Eisenbrand et al., 2005). DNA-Schäden selbst stellen noch keine Mutation dar. Sie werden in der Regel durch ein komplexes DNA-Reparatursystem erkannt und beseitigt, wodurch die Manifestierung einer Mutation in der Zelle verhindert wird. Bleibt jedoch ein solcher Reparaturschritt vor der DNA-Replikation aus oder verläuft die DNA-Reparatur fehlerhaft, so kann hieraus eine Mutation entstehen. Exemplarisch ist in **Abbildung 1** die durch EMS, einem DNA-alkylierendem Mutagen, induzierte GC → AT Transition dargestellt.

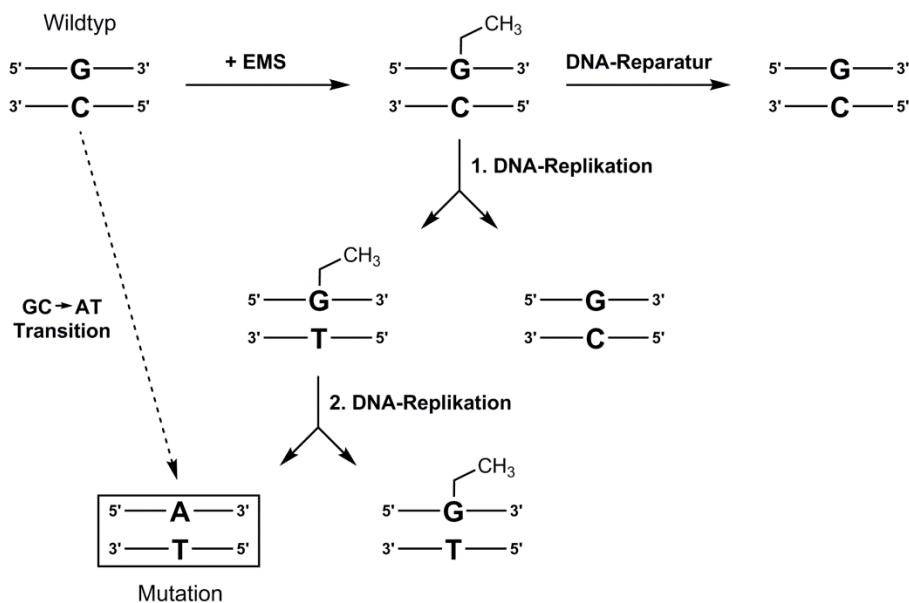


Abbildung 1: Manifestierung einer Mutation. Dargestellt ist die durch EMS induzierte GC → AT Transition. Wird die im ersten Schritt gebildete genotoxische Läsion (Ethylierung der DNA-Base Guanin an O⁶) nicht repariert, führt dies nach zwei DNA-Replikationsschritten zu einer manifesten Mutation in Form einer GC → AT Transition.

Die biologischen Folgen einer Mutation sind für die betroffene Zelle und den Organismus unterschiedlich und entscheidend vom Typ der betroffenen Zelle sowie der Lokalisation der Mutation in der DNA abhängig. Findet eine Mutation beispielsweise in einer Keimzelle statt, so kann diese zwar vererbt werden und sich unter Umständen in der Tochtergeneration auswirken, nicht jedoch in der initial betroffenen Person; hierzu sind lediglich somatische Mutationen in der Lage. Dass Krebs eine genetische Erkrankung somatischer Zellen ist, wurde bereits 1914 von Theodor Boveri postuliert (Boveri, 1914; Knudson, 2001). Finden

somatische Mutationen in einem Abschnitt der DNA statt, der nicht für ein Protein codiert und der keine transkriptionell regulatorische Funktion aufweist, so kann die Mutation als folgenlos erachtet werden. Ist jedoch ein Gen betroffen, welches essentiell für die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität oder der Zellhomöostase ist, indem es beispielsweise an der Zellzykluskontrolle, der DNA-Reparatur oder der Apoptose beteiligt ist, so kann sich hieraus Krebs entwickeln (Evan und Vousden, 2001; Kraemer et al., 1994; Weinstein, 1988). Unter Krebs wird ein maligner Tumor (Geschwulst) mit autonomem Wachstum bezeichnet, der bestimmte pathologische Charakteristika wie invasives Wachstum und häufig Metastasierung aufweist (Marquardt und Schäfer, 1994).

Die ersten Zusammenhänge zwischen Krebs und der Exposition gegenüber Xenobiotika wurden bereits im 18. Jahrhundert erkannt. So beschrieb der britische Arzt und Botaniker John Hill 1761 den Zusammenhang zwischen Schnupftabak-Konsum und dem Auftreten von Polypen und Krebs der Nasenschleimhaut. Der britische Chirurg Percival Pott führte 1775 das hohe Tumoraufreten an der Skrotumhaut bei Kaminfegern auf deren häufigen Kontakt mit Ruß zurück. Damit war Pott der erste, der eine chemische Krebsursache bei einer bestimmten Berufsgruppe beobachtete (Marquardt und Schäfer, 1994). Jedoch erst in den vergangenen Jahrzehnten konnten die mutagenen Substanzen aus Ruß (Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe) isoliert, charakterisiert und deren mutagenes Potential aufgezeigt werden, wodurch die Theorie von Pott bestätigt wurde. Darüber hinaus konnte in den letzten Jahrzehnten anhand epidemiologischer Studien und durch die Entwicklung verschiedener *in vitro* sowie *in vivo* Methoden das mutagene Potential einer Vielzahl weiterer chemischer Verbindungen aufgedeckt werden. Die Tageszeitung „Die Zeit“ titulierte im Jahre 1969:

„Jagd auf mutagene Stoffe (...). Mit der zunehmenden Zahl der alljährlich neu synthetisierten und auf den Markt kommenden Substanzen wächst die Gefahr: Genetisch aktive Stoffe sind heute allorts um uns. Als Zusatzstoffe sind sie in Lebensmitteln enthalten. In den Rückständen von Pestiziden, in Kosmetika und Pharmaka, als Verunreinigungen von Wasser und Luft bilden sie ein neues, noch fast völlig unerforschtes Umweltrisiko für den Menschen, wir tragen sie sogar in den Stoffen unserer Kleidung auf unserem Körper und gehen mit ihnen bei industriellen Fertigungsvorgängen um (...).“ (Löbsack, 1969).

Dieser Artikel mag gegebenenfalls in die damalige Zeit passen, heute ist unter anderem durch die am 1. Juli 2007 in Kraft getretene EU-Chemikalienverordnung REACH zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung von Chemikalien (VO (EG) Nr. 1907/2007) festgelegt, dass Neu- und Altsubstanzen, die in einem gewissen

Tonnenmaßstab produziert werden, eine gewisse genotoxikologische Testbatterie (siehe Abschnitt 2.2) durchlaufen müssen. Das Ziel von REACH und anderen einschlägigen Rechtsvorschriften ist die Generierung einer soliden Datenlage für die toxikologische Risikobewertung von Chemikalien, Pharmazeutika, Lebensmittel-Zusatzstoffen, kosmetischen Inhaltsstoffen, Bioziden sowie Pflanzenschutzmitteln, wobei ein hoher Gesundheitsschutz für den Menschen sowie ein hohes Schutzniveau für die Umwelt erzielt werden soll.

Das damalige „*noch fast völlig unerforschte Umweltrisiko für den Menschen*“ ist heutzutage wesentlich besser verstanden und der Beitrag verschiedener Faktoren zu den vermeidbaren Krebserkrankungen des Menschen wird folgendermaßen eingeschätzt: Ernährung (35%), Tabakkonsum (30%), Sexualverhalten (7%), Beruf (4%), Alkohol (2%), Luft- und Wasserverunreinigung (2%), UV-Strahlung (2%) und Medikamente (1%) (Eisenbrand et al., 2005). Es bleibt demnach festzuhalten, dass Krebs in vielen Fällen als vermeidbare Krankheit angesehen werden kann, deren Auftretungswahrscheinlichkeit mit der Lebensweise und der Exposition gegenüber kanzerogener Agentien korreliert (Weinstein, 1988). Diese Erkenntnis trägt die optimistische Botschaft, dass die Krebsinzidenz präventiv durch verminderte Exposition gegenüber kanzerogenen Agentien reduziert werden kann, sei es durch gesetzliche Regelungen am Arbeitsplatz oder durch eine Veränderung der Lebensweise. Es wird geschätzt, dass über 2,6 Millionen der 7,6 Millionen Krebs-Todesfälle im Jahre 2008 (USA) vermeidbar gewesen wären. Das entspricht 7300 potentiell vermeidbaren Krebs-Todesfällen pro Tag (Siegel et al., 2011). Für präventive Maßnahmen ist es eine zwingende Voraussetzung, das kanzerogene Potential eines Agens zu kennen, was die Bedeutsamkeit von Mutagenitäts-Studien hervorhebt.

Krebs war als Krankheit bereits in frühen Kulturen bekannt, als Todesursache jedoch unbedeutend. Erst durch den medizinischen Fortschritt und die daraus bedingte Zurückdrängung anderer Krankheiten und durch die gleichzeitig steigende Lebenserwartung stieg die Häufigkeit der Krebserkrankungen rapide an und stellt heute in den westlichen Industrienationen, nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen, die zweithäufigste Todesursache dar (Eisenbrand et al., 2005). In **Abbildung 2** ist exemplarisch für eine westliche Industrienation die Inzidenz der zehn häufigsten Krebs-Erkrankungen des Jahres 2011 in den USA dargestellt.

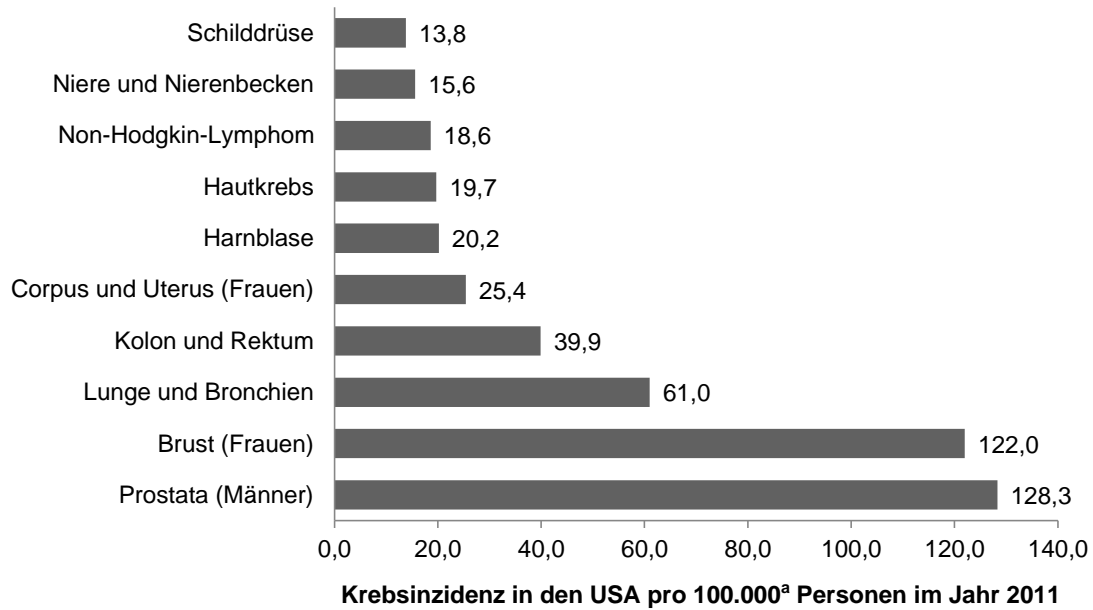


Abbildung 2: Auftreten von invasiven Krebs-Erkrankungen in den USA im Jahr 2011. Die Krebsinzidenz ist bezogen auf 100.000 Personen (modifiziert nach NPCR, 2015). ^a Normiert auf die US Standardbevölkerung

Zwischen der initialen Mutation und der Diagnose Krebs vergehen in der Regel Jahre bis Jahrzehnte. Diese lange Latenzzeit wird durch ein mehrstufiges Modell der Kanzerogenese und der *Multi-Hit* Theorie erklärt (Farber, 1984; Harris, 1991; Weinberg, 1989). Der Mehrstufen-Prozess einer Kanzerogenese besteht dabei mindestens aus den drei Phasen Initiation, Promotion und Progression, wobei die Entartung der Zellen von Phase zu Phase voranschreitet (**Abbildung 3**).

Unter Initiation wird die irreversible Konversion einer normalen Körperzelle in einen „prämaligen“ Zustand verstanden. Diese Konversion wird ausgelöst durch Mutationen in der DNA, die entweder die Aktivierung eines Proto-Onkogens oder die Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens zur Folge haben (Harris, 1991). Initiatoren sind demnach Chemikalien oder physikalische Noxen, die dazu in der Lage sind, Mutationen in der DNA zu induzieren. Proto-Onkogene wie *RAS*, *RAF* oder *MYC* sind zelluläre Gene, die an der Regulation der Zellproliferation und der Zelldifferenzierung beteiligt sind, indem sie beispielsweise für zytoplasmatische Proteinkinasen, Transkriptionsfaktoren oder Wachstumsfaktoren kodieren (Karp, 2005).

Kommt es durch eine Mutation zu einer Dauer-Aktivierung eines Proto-Onkogens, wird dieses als Onkogen bezeichnet. Ein Onkogen kann nachfolgend durch Fehlregulation der zellulären Proliferations- oder Differenzierungsvorgänge zu einer malignen Transformation führen; die betroffene Zelle wird als „initiierte“ Zelle bezeichnet (Marquardt und Schäfer, 1994).

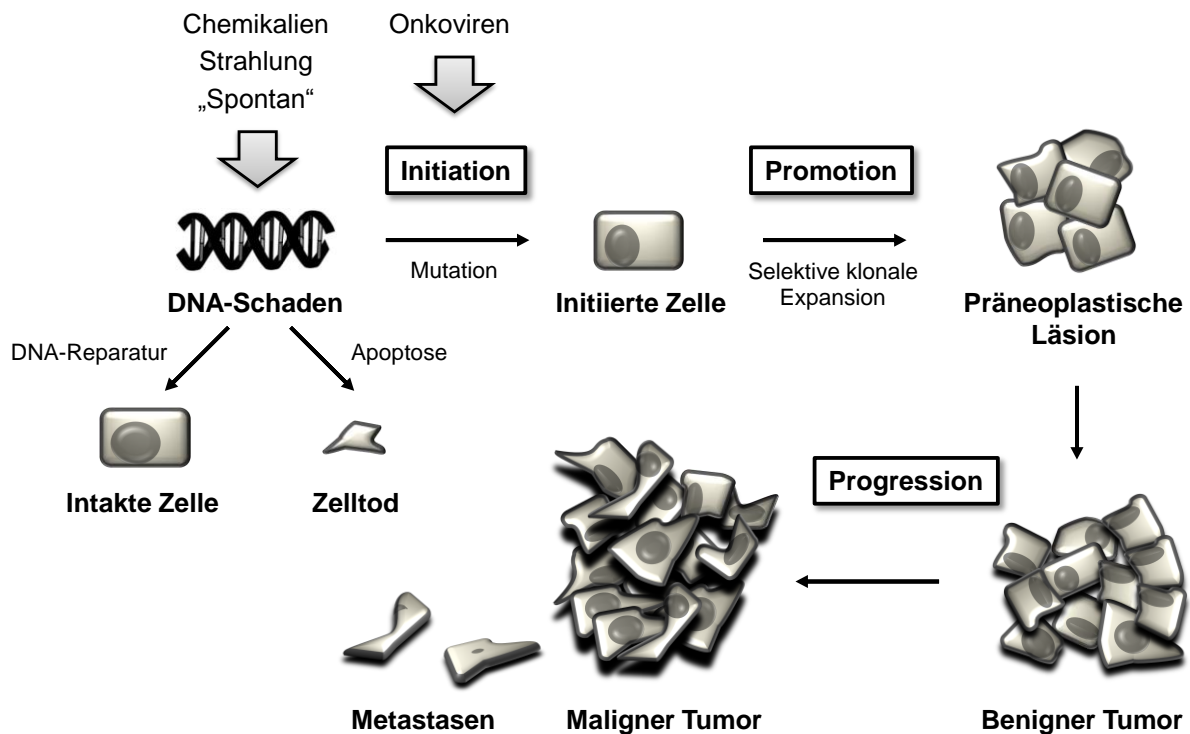


Abbildung 3: Mehrstufenmodell der Kanzerogenese. Dargestellt sind die Phasen der Initiation, der Promotion sowie der Progression, wobei der Malignitätsgrad von Phase zu Phase weiter voranschreitet. Am Ende einer Kanzerogenese kommt es zum Auftreten von malignen Tumoren mit Metastasierungspotential (zusammengefasst aus Harris, 1991; Marquardt und Schäfer, 1994).

Im Gegensatz zu den Proto-Onkogenen sind Tumorsuppressorgene wie *TP53*, *RB* oder *APC* in der Regel Negativregulatoren der Zellproliferation indem sie z.B. als Transkriptionsfaktoren fungieren, als Zellzyklus-Inhibitoren wirken oder an der Apoptose beteiligt sind (Karp, 2005). Dadurch tragen sie maßgeblich zur Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität bei. Am Beispiel von *TP53* äußert sich dies unter anderem durch eine Transaktivierung von p21 (WAF1/CIP1), das einen G1-Zellzyklusarrest vermittelt. Dadurch gewinnt die Zelle Zeit, bestehende DNA-Schäden zu reparieren oder bei Bedarf die Apoptose einzuleiten (zusammengefasst in Motoyama und Naka, 2004); beide Maßnahmen verhindern das Auftreten und Fortbestehen von Mutationen im Genom. DNA-Reparaturgene

werden ebenfalls zu den Tumorsuppressoren gezählt, da Defekte in diesen Genen zu einer Anhäufung von Mutationen im Genom führen und somit die genomische Stabilität ebenfalls nicht mehr gewährleistet ist (zusammengefasst in Zhang und Powell, 2005).

Als Promotion ist jener Prozess definiert, der nach erfolgter Initiation die Tumorentstehung beschleunigt oder verstärkt, indem die Zellproliferation stimuliert wird. Dabei handelt es sich um einen längerfristigen Zeitraum, der Wochen, Monate oder sogar Jahre andauern muss, um die Tumorentstehung zu unterstützen. Während dieser teilweise reversiblen Phase sind chronische Entzündungsreaktionen oder eine chronische Exposition gegenüber promovierend wirkender Substanzen wie z.B. Phenobarbital, Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT), Diethylstilbestrol, 2,3,7,8-Tetrachlordibenzodioxin (TCDD) (Marquardt und Schäfer, 1994), Ethanol (Jeannot et al., 2011) oder Microcystine (Nishiwaki-Matsushima et al., 1992) ausschlaggebend für einen Tumor-promovierenden Effekt, wobei eine Organspezifität als charakteristisch gilt (Diwan et al., 1985; Nishiwaki-Matsushima et al., 1992).

Die letzte Phase der Kanzerogenese bildet die Progressionsphase. Hier erfolgt eine Zunahme der Wachstumsautonomie der Tumorzellen vor allem durch Anhäufung weiterer Mutationen in Proto-Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen, wobei der Malignitätsgrad weiter zunimmt. Am Ende der Progressionsphase kommt es schließlich zum Auftreten von malignen Tumoren mit invasivem Wachstum und Metastasierungspotential (Eisenbrand et al., 2005; Marquardt und Schäfer, 1994). Im Einklang mit dem beschriebenen Mehrstufen-Modell der Kanzerogenese steht die *Multi-Hit* Theorie, da zum Durchlaufen der Mehrstufen-Kanzerogenese mehrere Mutationen in unterschiedlichen Proto-Onkogenen und / oder Tumorsuppressorgenen notwendig sind, wobei die Anzahl notwendiger Hits abhängig vom Tumor-Subtyp ist. So werden beispielsweise lediglich zwei Mutationen in beiden Allelen des *RB* Gens zur Ausbildung eines Retinoblastoms (ein maligner Tumor der Netzhaut des Auges) oder aber vier bis sechs Mutationen zur Ausbildung von Dickdarmkrebs benötigt, wobei die Inaktivierung beider *APC* Allele hierbei einen entscheidenden Faktor darstellt (zusammengefasst in Knudson, 2001).

Gemäß der Definition der *World Health Organization* (WHO), gelten Stoffe als kanzerogen, wenn sie im Tierversuch Tumore erzeugen, die Inzidenz Tumor-tragender Tiere erhöhen, die Anzahl an Tumoren pro Tier erhöhen oder die Latenzzeit bei der Tumorbildung verkürzen. Nach dieser Definition sind demnach sowohl Initiatoren sowie Promotoren als Kanzerogene zu bewerten. Substanzen, die sowohl initiierende als auch promovierende Eigenschaften aufweisen, werden als komplette Kanzerogene bezeichnet. Es erscheint jedoch fraglich, ob reine Initiatoren überhaupt existieren, da Initiatoren bei genügend hoher Dosierung ebenfalls

promovierend wirken, vermutlich aufgrund deren zytotoxischer Wirkung, die regenerative Zellproliferation induziert (Eisenbrand et al., 2005). Eine Klassifikation kanzerogener Stoffe in Initiatoren und Promotoren kann mittels eines sogenannten Initiations-Promotions-Experiment an der rasierten Mäusehaut, oder aber in anderen Organen wie Leber oder Niere erfolgen.

Neuere Disziplinen der Krebsforschung setzen sich mit verschiedensten Fragestellungen auseinander. Hierbei im Vordergrund stehen unter anderem Fragen zur Tumor-Mikroumgebung, zur Angiogenese (Gefäßneubildung), zur Immortalität von Tumorzellen, zu Wechselwirkungen von Tumorzellen und Immunzellen, zur Aktivierung des invasiven Wachstums des Tumors und zur Metastasierung mit dem Ziel, die molekularbiologischen Prozesse der Kanzerogenese besser zu verstehen, um leistungsfähigere und spezifische Krebs-Therapien entwickeln zu können (zusammengefasst in Hanahan und Weinberg, 2011). Im Rahmen der toxikologischen Risikobewertung ist vor allem die gegenwärtige Diskussion um mögliche Grenzwerte für genotoxische Kanzerogene von Relevanz, da die gängige Lehrbuchmeinung besagt, dass es aufgrund des Wirkmechanismus keine Grenzwerte für genotoxische Kanzerogene geben kann. Neuere Untersuchungen lassen jedoch genau diese Vermutung zumindest für einige genotoxische Kanzerogene wie beispielsweise Formaldehyd zu (Bailey et al., 2012; Bolt, 2003; Williams et al., 2009).

2.2 Genotoxizitäts- und Mutagenitäts-Tests

Als Genotoxizität wird allgemein die DNA-schädigende Wirkung von Stoffen oder physikalischer Noxen bezeichnet, die mittels Genotoxizitäts-Tests untersucht werden kann. Bei Überlebensfähigkeit der Zelle können DNA-Schäden als Mutationen unterschiedlicher Subtypen manifestiert werden. Diese wiederum werden unter dem Einsatz von Mutagenitäts-Tests untersucht, weswegen zwischen den Begrifflichkeiten Genotoxizität und Mutagenität differenziert werden muss.

Genotoxizitäts- und Mutagenitäts-Tests untergliedern sich in erster Linie in Tierversuch-Experimente (*in vivo* Studien), die in dem meisten Fällen mit transgenen oder nicht-transgenen Nagetieren durchgeführt werden sowie in Zellkultur-Experimente (*in vitro* Studien), die in permanenten oder primären Säugerzellen oder speziellen Bakterienstämmen durchgeführt werden. Sie dienen in erster Linie der toxikologischen Risikobewertung mit dem Ziel, gesundheitliche Risiken sowie Gefahren am Arbeitsplatz abschätzen zu können. Dies

betrifft vor allem die Prüfung und Bewertung von Chemikalien, Pharmazeutika, Lebensmittelzusatzstoffen und Inhaltsstoffen für Kosmetika.

Für die Risikobewertung werden von den Behörden sowohl *in vivo* als auch *in vitro* Studien für die Bewertung von Substanzen gefordert, wobei in der Regel *in vitro* Experimente vor *in vivo* Experimenten durchgeführt werden, um Versuchstiere einzusparen (3R Konzept). Gerade die kosmetische Industrie ist mehr denn je von *in vitro* Testsystemen abhängig, da im Rahmen der neuen EU Kosmetikverordnung VO(EG) Nr. 1223/2009 Tierversuche für kosmetische Mittel und deren Inhaltsstoffe verboten wurden. Des Weiteren sind Genotoxizitäts- sowie Mutagenitäts-Tests ein wichtiges Instrument der Grundlagenforschung, um beispielsweise komplexe Wirkmechanismen zu untersuchen. Die Herangehensweisen sind dabei sehr unterschiedlich und hängen entscheidend von der Fragestellung ab. Je mehr sinnvoll kombinierte Testsysteme eine Prüfsubstanz durchläuft (Testbatterie), desto klarer sollte demnach das genotoxische Profil der Prüfsubstanz werden, was entscheidend für eine angemessene Risikobewertung ist. Es bleibt jedoch anzumerken, dass es ebenfalls zu Widersprüchlichkeiten innerhalb einer Testbatterie oder zwischen *in vitro* und *in vivo* Experimenten kommen kann, was die Risikobewertung erschwert. In solchen Fällen wird eine sogenannte *weight of evidence* (Gewichtung der Beweise, WOE) Abschätzung vorgenommen.

2.2.1 In vivo Prüfung auf Genotoxizität und Mutagenität

Zu den bekanntesten *in vivo* Genotoxizitäts-Tests, die typischerweise an Nagern durchgeführt werden, zählt der Mikronukleus-Test (MNT), der mit Knochenmark-Erythroblasten durchgeführt wird und zur Untersuchung von klastogenen oder aneugenischen Effekten herangezogen wird (Kirkland und Speit, 2008), der Chromosomenabberations-Test (CAT) an Knochenmark-Zellen zur Untersuchung auf Chromosomenabberationen sowie der Comet-Assay, welcher primäre DNA-Schäden anzeigt. Der Comet-Assay hat mittlerweile die früher häufig eingesetzte Methodik der unplanmäßigen DNA-Synthese (*unscheduled DNA synthesis*, UDS), die in der Nager-Leber untersucht wurde, nahezu komplett verdrängt, da der Comet-Assay mit nahezu allen Geweben durchgeführt werden kann und eine Vielzahl unterschiedlicher DNA-Schäden detektiert. Die UDS weist hingegen DNA-Reparatur nach und wird als nicht sensitiv angesehen.

Während die *in vivo* Prüfung auf Genotoxizität durch den MNT, den Comet-Assay sowie den CAT gut abgedeckt ist, werden heute zur Testung auf Mutagenität *in vivo* fast ausschließlich Testsysteme mit transgenen Mäusestämmen (z.B. BigBlue[®] Maus) verwendet. Diese Tiere tragen in ihrem Genom ein bakterielles Reporter-gen inklusive Phagenvektor. Nach Behandlung der Tiere mit einer Prüfsubstanz werden diese getötet, um die DNA aus dem Zielgewebe wie Leber oder Darm isolieren zu können. Das bakterielle Reporter-gen lässt sich aufgrund des Phagenvektors in bestimmte Bakterienstämme einbringen, wo es sich in die bakterielle DNA integriert. Anschließend werden diese unter bestimmten selektiven Bedingungen kultiviert, unter denen nur diejenigen Bakterien überleben und eine Kolonie ausbilden können, die eine inaktivierende Mutation in dem bakteriellen Reporter-gen tragen. Durch Auszählen der Bakterienkolonien kann somit eine Mutationsfrequenz bestimmt werden (zusammengefasst in Lambert et al., 2005).

Zur Testung auf Mutagenität *in vivo* kann ebenfalls der HPRT Lymphozyten Assay angewendet werden, da dessen Test-Protokoll jedoch sehr zeitintensiv und arbeitsaufwändig ist (Lynch et al., 2011), wird dieser heutzutage kaum mehr eingesetzt. In diesem Kontext als sehr vielversprechend gilt der sich momentan in der Evaluierung befindende *in vivo* PIG-A Assay; das Korrespondent zu der vorliegenden *in vitro* Arbeit. Zur Testdurchführung wird den Versuchstieren (meistens Ratten) Blut aus der Schwanzvene entnommen. Nach der Probenaufarbeitung wird die GPI(-) Frequenz in bestimmten Blutzellen durchflusszytometrisch ermittelt. In den meisten bisher durchgeführten Experimenten wurden hierzu Erythrozyten oder Retikulozyten (unreife Erythrozyten) analysiert. Die Vorteile des *in vivo* PIG-A Assays sind dessen minimale Invasivität sowie die vergleichsweise schnelle und einfache Testdurchführung (Dobrovolsky et al., 2010; Peruzzi et al., 2010; Phonethepswath et al., 2010). Die minimale Invasivität und die geringe zur Testdurchführung benötigte Blutmenge erlauben zudem die Integration des PIG-A Assays in subchronische (28 oder 90 Tage) Toxizitäts-Studien, wodurch Versuchstiere eingespart werden können (3R Konzept). Darüber hinaus ist man bei der Durchführung des *in vivo* PIG-A Assays nicht auf spezielle Stämme angewiesen, wie es bei den transgenen Testsystemen der Fall ist (Gollapudi et al., 2014). In **Tabelle 1** sind die wichtigsten *in vivo* Genotoxizitäts- sowie Mutagenitäts-Tests aufgeführt.

Tabelle 1: Übersicht über die wichtigsten *in vivo* Genotoxizitäts- sowie Mutagenitäts-Tests. Aufgeführt sind deren toxikologischen Endpunkte sowie die entsprechenden OECD Guidelines.

System	Testname	Endpunkt(e)	OECD Guideline
<i>In vivo</i>	Mikronukleus-Test (MNT)	Klastogenität / Aneugenität	Nr. 474
	Chromosomenabberations-Test (CAT)	Chromosomenabberationen	Nr. 475
	Comet-Assay	DNA-Schäden	Nr. 489
	HPRT Lymphozyten-Test	Mutagenität	-
	Transgene Nager-Modelle	Mutagenität	Nr. 488
	PIG-A Assay	Mutagenität	-

2.2.2 In vitro Prüfung auf Genotoxizität und Mutagenität

Zu den verbreitetsten *in vitro* Genotoxizitäts-Assays gehören der CAT zur mikroskopischen Untersuchung von strukturellen Chromosomenabberationen, der MNT zur Untersuchung des klastogenen oder aneugenen Potentials einer Testsubstanz, sowie der Comet-Assay zur Prüfung auf DNA-Schäden.

Historisch gesehen stellt der von Bruce Ames 1971 beschriebene Ames-Test den ersten *in vitro* Mutagenitäts-Assay dar. Selbst heutzutage zählt dieser in einer weiterentwickelten Form zu den verbreitetsten Testsystemen dieser Art, was vor allem auf die schnelle und einfache Testdurchführung zurückzuführen ist. Der Ames-Test basiert auf speziell modifizierten *Salmonella typhimurium* oder *Escherichia coli* Bakterienstämmen, die durch eine Mutation die Fähigkeit verloren haben, die Aminosäuren Histidin (*S. typhimurium*) oder Tryptophan (*E. coli*) zu synthetisieren (Histidin- oder Tryptophan-Auxothrophie); sie sind auf exogen zugeführtes Histidin oder Tryptophan im Bakterien-Agar angewiesen. Erlangen diese Bateriaenstämme jedoch durch eine Rückwärts-Mutation die Fähigkeit zurück, Histidin oder Tryptophan zu synthetisieren, können diese Revertanten im Gegensatz zu den auxotrophen Bakterien auf einem Histidin- oder Tryptophan-freien Agar Bakterienkolonien bilden. Diese Kolonien können ausgezählt und zur Berechnung von Mutationsfrequenzen verwendet werden (Ames, 1971). Da er einen Rückwärts-Mutationstest mit einer definierten Mutation je Bakterienstamm darstellt, werden nur diejenigen Mutagene von dem jeweiligen Stamm erkannt, die eben jene bestehende Mutation durch eine weitere Mutation revertieren können (Parry und Parry, 2012). Aufgrund dessen wird in verschiedenen internationalen Guidelines die Verwendung von unterschiedlichen Stämmen in einer sinnvollen Kombination empfohlen

(ICH, 1996; OECD, 1997a), was die Testdurchführung komplexer gestaltet. Der Vorteil liegt jedoch darin, durch die Verwendung unterschiedlicher Stämme die Art der induzierten Mutationen erkennen zu können. Aufgrund der Tatsache, dass Bakterien für die Testdurchführung verwendet werden, werden Chromosomen-schädigende Agentien mit dem Ames-Test nicht erkannt (zusammengefasst in Elespuru et al., 2009).

Neben dem Einsatz von Bakterienstämmen wurden seit den 80er Jahren ebenfalls auf Säugerzellen basierte *in vitro* Testsysteme für die Mutagenitäts-Forschung etabliert. Bei den hierfür verwendeten Zellen handelt es sich in der Regel um permanente Krebszelllinien wie die humane B-lymphoblastoide TK6 Zelllinie sowie die V79 Lungenfibroblasten-Zelllinie aus dem chinesischen Hamster, die CHO Eierstock-Zelllinie aus dem chinesischen Hamster als auch die Maus-Lymphoma Zelllinie L5178Y, die für die Durchführung des MLA-Assays eingesetzt wird (zusammengefasst in Kirkland et al., 2007b; OECD, 1997b). Darüber hinaus kommen primäre humane Lymphozyten zum Einsatz (Swierenga et al., 1991), wobei diese aufgrund der aufwändigen Kultivierung sowie der begrenzten Verfügbarkeit in der Routineprüfung kaum Einzug gehalten haben. Die bedeutendsten *in vitro* Genmutations-Testsysteme auf Säugerzell-Basis stellen der HPRT- und der TK Assay dar. Sie basieren auf den namensgebenden Genen Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase 1 (*HPRT1*) und Thymidinkinase 1 (*TK1*) die am Purinstoffwechsel beteiligt sind. Das grundlegende Prinzip des HPRT und TK / MLA Assays ist die Überlebensfähigkeit (Resistenz) von *HPRT1* oder *TK1* mutierten Zellen unter selektiven Bedingungen, die für Wildtyp-Zellen toxisch sind und zum Zelltod führen. Zum Einsatz kommen hier Nukleotid-Analoga wie 6-Thioguanin zur Selektion von *HPRT1* Mutanten oder Trifluorthymidin zur Selektion von *TK1* Mutanten. Wird nun eine definierte Anzahl an Zellen in 96-Well Platten mit dem jeweiligen Selektions-Agens ausgestreut, weisen nur diejenigen Wells nach einer gewissen Proliferationszeit eine Zellkolonie auf, in denen sich Zellen mit mutiertem *HPRT1* oder *TK1* Gen befunden haben. Mit steigendem Anteil mutierter Zellen nimmt folglich die Anzahl an Wells mit Zellproliferation zu. Diese können ausgezählt und zur Berechnung der *HPRT1* oder *TK1* Mutantenfrequenz herangezogen werden. Hierfür ist ebenfalls die experimentelle Ermittlung einer Plattierungseffizienz erforderlich, was diese Testsysteme in der Summe recht aufwändig gestaltet.

Tabelle 2: Übersicht über die wichtigsten *in vitro* Genotoxizitäts- sowie Mutagenitäts-Tests. Aufgeführt sind deren toxikologischen Endpunkte sowie die entsprechenden OECD-Guidelines.

System	Testname	Endpunkt(e)	OECD Guideline
<i>In vitro</i>	Mikronukleus-Test (MNT)	Klastogenität / Aneugenität	Nr. 487
	Chromosomenabberations-Test (CAT)	Chromosomenabberationen	Nr. 473
	Comet-Assay	DNA-Schäden	-
	Ames-Test	Mutagenität	Nr. 471
	HPRT / TK Assay	Mutagenität	Nr. 476
	PIG-A Assay	Mutagenität	-

Obwohl auf Säugerzellen basierende *in vitro* Genotoxizitäts-Testsysteme von großer Bedeutung für die toxikologische Risikobewertung sind, werden gewisse Punkte von den Fachgremien kritisch diskutiert. Sowohl das Auftreten von positiven Testbefunden von Nicht-Kanzerogenen in Nagern („irrelevant“ positive Testbefunde, Spezifität), als auch die Möglichkeit, dass metabolisch zu aktivierende Präkanzerogene von *in vitro* Testsystemen nicht als solche erkannt werden, stellen Kritikpunkte dar (zusammengefasst in Kirkland et al., 2007b). Eine mögliche Ursache für die schlechte Spezifität, die bezüglich dem MLA, dem CAT sowie dem MNT jeweils unter 45 % liegt (Kirkland et al., 2005) stellt eine Testung unter zu ausgeprägter Zytotoxizität oder zu hoher Konzentration der Testsubstanz dar, wobei indirekte Mechanismen wie beispielsweise Klastogenität aufgrund osmotischer Effekte (Scott et al., 1991), erniedrigtem pH-Wert (Morita et al., 1992) sowie Störung der zellulären Homöostase (Scott et al., 1991) zu irrelevant-positiven Testbefunden führen können. Solch hohen Dosen werden in der Regel für ein *in vivo* Experiment nicht verwendet und stellen ebenfalls kein realistisches Expositionsszenario für den Menschen dar, was zu der genannten Diskrepanz führen kann. Hier könnte eine Testung unter Einsatz geringerer Dosen die schlechte Spezifität der Testsysteme möglicherweise verbessern, wobei von den Fachgremien befürchtet wird, dass in diesem Falle schwache Genotoxine gegebenenfalls *in vitro* nicht mehr als solche erkannt werden und somit die Sensitivität der Testsysteme sinkt (zusammengefasst in Elespuru et al., 2009). Eine Absenkung der höchsten *in vitro* Test-Dosis von momentan 10 mM auf 1 mM, wie es bereits für Pharmazeutika Standard ist (ICH, 2008) wurde kontrovers diskutiert. Elespuru und Kollegen führten diesbezüglich an, dass durch die Absenkung der Top-Dosis auf 1 mM bekannte Genotoxine wie Malondialdehyd Natriumsalz (5,6 mM), Toluol (2,4 mM) oder Glycidamid (2,0 mM) *in vitro* nicht mehr detektiert werden würden (zusammengefasst in Elespuru et al., 2009).

Ein weiterer Kritikpunkt bezüglich *in vitro* Genotoxizitäts-Tests ist die genomische Instabilität der verwendeten Krebszelllinien. Aufgrund des daraus resultierenden „Drifts“ der Zelllinien wird zum einen die Interlabor-Vergleichbarkeit erschwert, zum anderen konnte gezeigt werden, dass daraus ebenfalls Sensitivitäts-Unterschiede entstehen können. Hiervon sind besonders die aus Nagern etablierten Krebszelllinien wie V79, CHO oder L5178Y betroffen. Im Vergleich dazu scheinen humane TK6 Zellen keine stark ausgeprägte genomische Instabilität aufzuweisen, was von den Fachgremien positiv bewertet wird. Als mögliche Ursache hierfür ist die p53-Profizienz der TK6 Zelllinie im Vergleich zu den Nagetier-Zelllinien zu sehen (zusammengefasst in Kirkland et al., 2007b).

Aufgrund des Bedarfs an praktikablen, kostengünstigen sowie verlässlichen *in vitro* Alternativen zur *in vivo* Prüfung wird die Entwicklung neuer *in vitro* Tests vorangetrieben sowie bestehende *in vitro* Methoden an neuste Erkenntnisse angepasst mit dem Ziel, den Stellenwert von Alternativmethoden zum Tierversuch weiter zu steigern (Benigni und Bossa, 2011; Pfuhler et al., 2011).

2.3 Der GPI-Anker und das *PIG-A* Gen: Molekularbiologische Grundlagen, Pathophysiologie und Indikation mutagener Effekte

Bereits in den 1970er Jahren war bekannt, dass eine Vielzahl von Membran-Proteinen an unterschiedliche Lipid- oder Lipid-haltige Moleküle gebunden sind. 1976 berichteten Hiroh Ikezawa und Kollegen von der Aufreinigung des Enzyms Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (PI-PLC) aus dem Bakterium *Bacillus cereus* und sie entdeckten, dass dieses Enzym dazu in der Lage war, das Protein „Alkalische Phosphatase“ aus Gewebeschnitten der Ratten-Niere herauszulösen. Es folgten weitere Experimente dieser Art, wobei immer mehr unterschiedliche Proteine gefunden wurden, die auf diese Weise freigesetzt, isoliert und identifiziert werden konnten (zusammengefasst in Ikezawa, 2002). Basierend auf dieser Erkenntnis wurde angenommen, dass die entsprechenden Proteine über ein bestimmtes Molekül kovalent an die Zellmembran gebunden sind. Aufgrund weiterer molekularbiologischer Forschung sowie Strukturaufklärung ist heute bekannt, dass es sich dabei um GPI-verankerte Proteine handelt, deren Freisetzung auf die PI-PLC bedingte enzymatische Spaltung von GPI zurückzuführen ist (**Abbildung 4**), wobei 1,2-Diacylglycerol in der Zellmembran verbleibt (Müller et al., 2012).

Bisher wurden mehr als 250 GPI-verankerte Proteine in den unterschiedlichsten Eukaryonten identifiziert, von Protozoen über Pilze, Pflanzen, Insekten bis hin zu den Säugetieren (Paulick und Bertozzi, 2008). Die GPI-verankerten Proteine weisen dabei ein großes Funktionalitäts-Spektrum auf; so gehören unter anderem hydrolytisch wirksame Enzyme, Adhäsions-, Rezeptor- sowie Komplement-regulatorische Proteine zu dieser Familie (zusammengefasst in Ferguson et al., 2009). Schätzungen zufolge sind durchschnittlich 0,5 % aller eukaryotischen Proteine GPI-verankert (Eisenhaber et al., 2001). Eine Auswahl verschiedener GPI-verankerter Proteine ist in **Tabelle 3** dargestellt.

Tabelle 3: GPI-verankerte Proteine und deren Funktion (zusammengefasst aus Ikezawa, 2002; Paulick und Bertozzi, 2008; Shen et al., 1994).

Biologische Funktion	GPI-verankertes Protein
Enzym	Alkalische Phosphatase
	Acetylcholinesterase
	5'-Nukleotidase
	ADP-Ribosyltransferase
Zell-Zell Interaktion	CD58 (lymphocyte function-associated antigen, LFA-3)
	Neutral cell adhesion molecule (NCAM)
Komplement Regulatoren	CD55^a (complement decay-accelerating factor, DAF) CD59^a
Antigene	Thy-1
	CD14
	CD52
	VSG
Rezeptor	CD14
	CD16
	Humaner α -, β -Folat-Rezeptor

^a CD55 und CD59 wurden im Rahmen dieser Arbeit zur Bestimmung des GPI-Status mittels Antikörperfärbung und Durchflusszytometrie ausgewählt.

Das Konzept der Protein-Verankerung kann, im Vergleich zur Protein-Integration in die Zellmembran, durchaus von Vorteil sein oder die Protein-Integration sinnvoll ergänzen. Zunächst einmal mag es paradox erscheinen, dass Proteine ohne zytoplasmatische Domäne an Prozessen wie der Signaltransduktion beteiligt sind. Möglicherweise kommt es in diesem Fall zu Wechselwirkungen zwischen dem GPI-verankerten Rezeptor (oder GPI selbst) und einem Transmembran-Protein des Signaltransduktionswegs in strukturierten Mikrodomänen

der Zellmembran, die als *lipid rafts* bezeichnet werden (zusammengefasst in Jones und Varela-Nieto, 1998; Simons und Toomre, 2000).

Die Berechtigung einer Protein-Verankerung ist jedoch vor allem in der höheren Mobilität der Proteine in der Zellmembran sowie einer möglichen enzymatischen Abspaltung der GPI-verankerten Proteine zu sehen. Es wurde postuliert, dass die erhöhte Mobilität Zell-Zell-Interaktion sowie Kommunikation erleichtert. Eine mögliche enzymatische Abspaltung des GPI-verankerten Proteins z.B. mittels GPI-PLC (dem Eukaryoten-Äquivalent zur prokaryotischen PI-PLC) oder der GPI-spezifischen Phospholipase D (GPI-PLD) wurde als möglicher Regulationsweg für GPI-verankerte Proteine vorgeschlagen (zusammengefasst in Jones und Varela-Nieto, 1998). Die enzymatische Spaltung verläuft schnell und ermöglicht die selektive Sekretion GPI-verankerter Proteine. Ein Beispiel hierfür ist die Reduktion der Zell-Zell-Interaktion durch Abspaltung spezifischer, GPI-verankerter Adhäsionsmoleküle.

GPI selbst ist ein komplexes Glycolipid (**Abbildung 4**). Es existieren, sowohl in Abhängigkeit von der betrachteten Spezies als auch von dem GPI-verankerten Protein selbst, verschiedene Isoformen von GPI. Die Grundstruktur von GPI ist jedoch in allen Eukaryoten hoch konserviert und besteht aus Phosphoethanolamin, einem Zucker-Hauptteil sowie einem Phosphatidylinositol-Rest (zusammengefasst in Ikezawa, 2002). Neben dieser konservierten Grundstruktur variiert die Struktur von GPI durch optionale Zucker-Seitenketten sowie optionalem Phosphoethanolamin. Die zur Verankerung in der Membran dienenden, über Phosphat gebundenen Acetyl- oder Acyl-Lipide sind variable, gesättigte sowie ungesättigte Fettsäuren, wobei Stearinsäure dominiert (zusammengefasst in Ferguson und Williams, 1988).

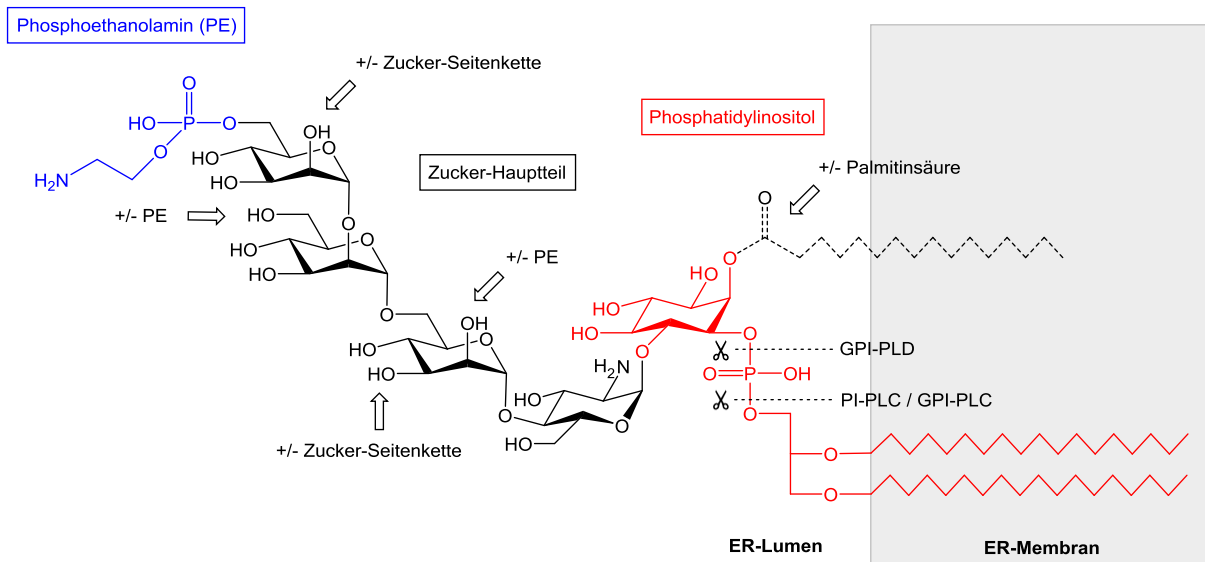


Abbildung 4: Chemische Struktur des GPI-Ankers. GPI besteht in seiner Grundstruktur aus Phosphoethanolamin (blau, hierüber wird das Protein kovalent gebunden), einem Zucker Hauptteil (schwarz, bestehend aus drei Mannose-Einheiten und einer Glucosamin-Einheit) sowie einem membrangebundenen Phosphatidylinositol-Rest (rot). Die Spaltungs-Position der eukaryotischen GPI-PLD und GPI-PLC sowie der prokaryotischen PI-PLC sind ebenfalls dargestellt (modifiziert nach Paulick und Bertozzi, 2008; Yu et al., 2013). PE=Phosphoethanolamin

GPI wird am endoplasmatischen Retikulum (ER) durch einen mehrstufigen enzymatischen Prozess biosynthetisiert (zusammengefasst in Yu et al., 2013). Nach der Biosynthese verbleibt GPI in der ER-Membran. Ein Protein muss, um an GPI gekoppelt zu werden, sowohl eine ER-Signalsequenz am N-Terminus sowie ein hydrophobes Peptid am C-Terminus aufweisen, welches als GPI-Kopplungs-Signal dient (Amthauer et al., 1993). Mittels Phosphoethanolamin wird GPI im Lumen des ER als posttranslationale Modifikation an den C-Terminus des entsprechenden Proteins kovalent gebunden, wobei das GPI-Kopplungs-Signal abgespalten wird (**Abbildung 5**). Diese Reaktion wird durch die ebenfalls am ER lokalisierte GPI-Transamidase (GPI-T) katalysiert (zusammengefasst in Yu et al., 2013).

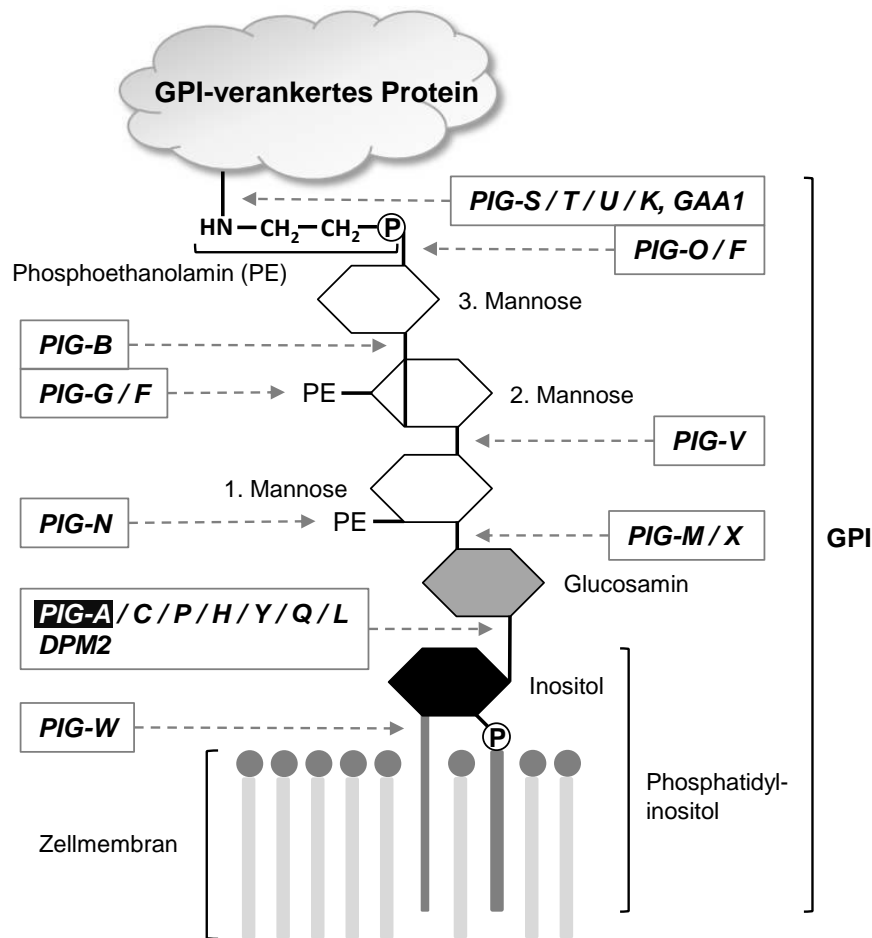


Abbildung 6: GPI-relevante Gene. An der GPI-Biosynthese sind mindestens 22 Gene beteiligt, wovon lediglich das *PIG-A* Gen (schwarz hervorgehoben) X-chromosomal lokalisiert ist (modifiziert nach Nakamura et al., 2012).

Das *PIG-A* Gen codiert für eine Untereinheit der GPI-N-Acetylglucosaminyltransferase, die den ersten Schritt der GPI-Biosynthese katalysiert (Hillmen et al., 1993). Dieser Multienzym-Komplex besteht aus PIG-A, PIG-C, PIG-P, PIG-H, PIG-Y, PIG-Q und DPM2 (Kinoshita et al., 2014). Das in **Abbildung 6** mit diesen Genen assoziierte *PIG-L* Gen codiert für eine De-N-Acetylase, die den zweiten Schritt der GPI-Biosynthese katalysiert. Dieser besteht in der Entfernung der N-Acetylgruppe vom N-Acetylglucosaminylphosphatidylinositol, woraufhin der in der ER-Membran verankerte GPI-Präkursor von außen in das Innere des ER flippt, wodurch die GPI-Synthese fortgesetzt werden kann (zusammengefasst in Ferguson et al., 2009).

Es konnte bereits durch Forschung über die selten auftretende, genetisch bedingte hämatopoetische Krankheit „Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie“ (PNH), die durch eine dysfunktionale GPI-Biosynthese und somit durch eine partielle oder vollständige Abwesenheit GPI-verankerter Proteine ausgelöst wird, gezeigt werden, dass hauptsächlich inaktivierende Mutationen im *PIG-A* Gen zu einer GPI-Defizienz und so zum Krankheitsbild einer PNH führen (Miyata et al., 1993; Miyata et al., 1994; Takeda et al., 1993). Es ist davon auszugehen, dass diese Mutationen in frühen hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark auftreten, da Blutzellen unterschiedlicher Subtypen den korrespondierenden GPI(-) Phänotyp zeigen (zusammengefasst in Rosse und Ware, 1995). Zu den klinischen Symptomen einer PNH gehören u.a. eine chronische intravaskuläre hämolytische Anämie mit Folge einer Hämoglobinurie, Knochenmark-Störungen variabler Ausprägung, Thrombosen sowie eine verstärkte Inzidenz einer akuten myeloischen Leukämie (AML) (zusammengefasst in Rotoli und Luzzatto, 1989). Die für eine PNH typische hämolytische Anämie geht auf die Abwesenheit der GPI-verankerten Proteine CD55 (DAF) und CD59 auf den Erythrozyten zurück, die als Inhibitoren gegen die durch das Komplement-System bedingte Zell-Lyse dienen (zusammengefasst in Parker, 2007). Die Beobachtung, dass hauptsächlich inaktivierende Mutationen im *PIG-A* Gen zu einem GPI(-) Phänotyp führen, ist konsistent mit der X-chromosomalen Lokalisation des *PIG-A* Gens, da in diesem Falle bereits eine inaktivierende Mutation ausreicht, um einen GPI(-) Phänotyp zu induzieren (**Abbildung 7**). Diese humanen Befunde wurden auf Basis von Nager-Experimenten untermauert. So untersuchten Miura und Kollegen sechs GPI(-) T-Zell Klone aus der Ratten-Milz, wobei alle Klone eine Mutation im *Pig-a* Gen aufwiesen (Miura et al., 2008). In einem umfassenderen Folge-Experiment untersuchten sie GPI(-) T-Zell Klone aus der Ratten-Milz von Tieren, die mit N-Ethyl-N-nitrosoharnstoff (ENU) behandelt wurden, wobei die Wissenschaftler insgesamt 55 unabhängige, ENU-typische Mutationen im *Pig-a* Gen identifizieren konnten (Miura et al., 2011).

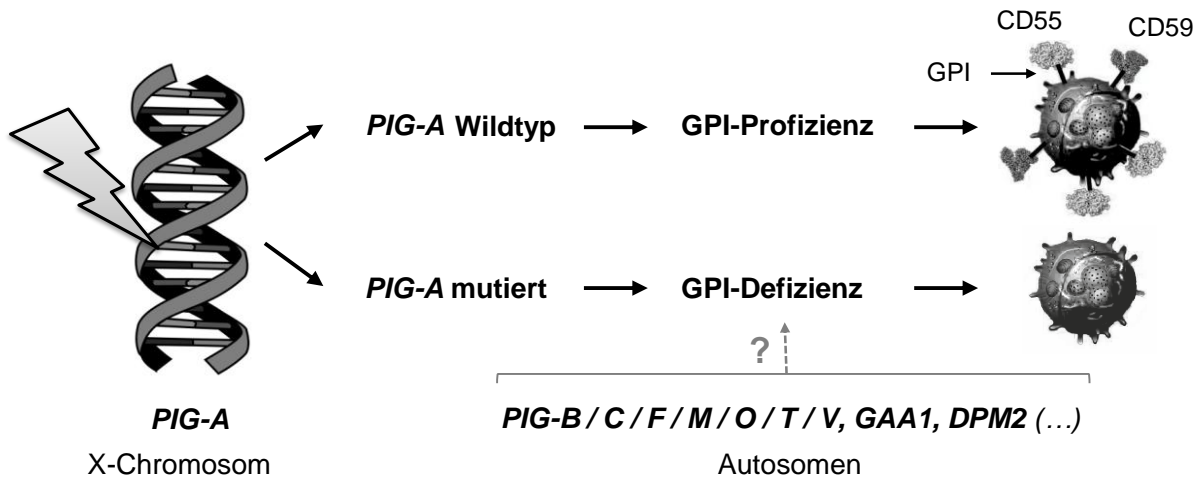


Abbildung 7: GPI abhängiges Genotyp- zu Phänotyp-Verhältnis. Aufgrund der X-chromosmalen Lokalisation des *PIG-A* Gens sind hauptsächlich inaktivierende Mutationen im *PIG-A* Gen für einen GPI(-) Phänotyp verantwortlich. Dargestellt ist der Verlust GPI-verankerter Proteine anhand von CD55 und CD59, die im Rahmen dieser Arbeit zur durchflusszytometrischen Analyse des GPI-Status herangezogen wurden (modifiziert nach Krüger et al., 2014).

Dennoch ist nicht gänzlich auszuschließen, dass ebenfalls autosomal lokalisierte, GPI-relevante Gene zu einem GPI(-) Phänotyp führen. In diesem Falle sind jedoch zwei inaktivierende Mutationen notwendig, da autosomale Gene jeweils zwei Allele aufweisen. Die Wahrscheinlichkeit, dass beide Allele eines Gens durch Mutationen inaktiviert werden, ist jedoch äußerst gering. Diese Situation ändert sich jedoch, wenn bereits ein autosomales Gen lediglich ein funktionelles Allel aufweist. In diesem Falle würde dieses heterozygote Gen durch eine weitere inaktivierende Mutation in dem funktionellen Allel ebenfalls zu einem GPI(-) Phänotyp führen. So wurde bereits ein Fall einer PNH beschrieben, die nicht auf das *PIG-A* Gen, sondern auf das autosomale *PIG-T* Gen zurückgeführt werden konnte. Dieser PNH Patient wies zwei mutierte *PIG-T* Allele auf, eine bereits vorhandene Keimbahnmutation sowie eine somatisch erworbene (Krawitz et al., 2013; Luzzatto, 2013).

Der GPI-Status ist neben der Forschung über PNH sowie Aspekte der Grundlagenforschung über GPI und GPI-verankerte Proteine aufgrund des leicht zu analysierenden Phänotyps für die *in vitro* sowie *in vivo* Mutagenitäts-Forschung von Interesse, da Mutanten-Zellen mit einem GPI(-) Phänotyp nach Antikörper-Färbung von GPI-verankerten Proteinen durchflusszytometrisch quantifiziert werden können. In den letzten Jahren wurde intensiv an einem *in vivo* Mutagenitäts-Testsystem basierend auf dem GPI-Status geforscht (siehe 2.2.1). Die vorliegende Arbeit beschreibt eine mögliche *in vitro* Variante zum *in vivo* PIG-A Assay unter Verwendung der permanenten Suspensionszelllinie TK6. Neben dem Einsatz in

Mutagenitäts-Tests stellt der GPI-Status von Blutzellen ebenfalls einen vielversprechenden Biomarker für genotoxische Einflüsse im Menschen dar. Aufgrund der minimal invasiven Probennahme von wenigen Tropfen Blut wäre ein humaner PIG-A Assay z.B. für epidemiologische Untersuchungen sowie für Untersuchungen begleitend zu chemotherapeutischen Behandlungen geeignet (zusammengefasst in Gollapudi et al., 2014). Des Weiteren stellt GPI den Angriffspunkt für Proaerolysin, den Virulenz-Faktor des Bakteriums *Aeromonas hydrophila* dar.

2.4 Proaerolysin

Proaerolysin wurde in dieser Arbeit sowohl für die Erzeugung einer GPI(-) Zellpopulation als auch für die Proaerolysin-basierte Selektion zur Quantifizierung von GPI(-) TK6 Zellen in 96-Well Platten eingesetzt.

Proaerolysin ist ein 52 kDa schweres bakterielles Protoxin, welches erstmals aus dem Bakterium *Aeromonas hydrophila* isoliert wurde (Bernheimer und Avigad, 1974) und maßgeblich für dessen Virulenz verantwortlich ist (Chakraborty et al., 1987). Proaerolysin bindet mit hoher Affinität GPI (zusammengefasst in Abrami et al., 2000), wobei der Zucker-Hauptteil von GPI für die Bindung verantwortlich zu sein scheint (Diep et al., 1998). Inwieweit das GPI-verankerte Protein die Bindung von Proaerolysin an GPI beeinflusst, ist nicht vollständig geklärt. Nachdem Proaerolysin GPI auf der Zelloberfläche gebunden hat, wird Proaerolysin hauptsächlich durch die Transmembran-Endoprotease Furin enzymatisch gespalten und auf diese Weise in das aktive Toxin Aerolysin überführt (Abrami et al., 1998).

Durch die Bindung an GPI ist Aerolysin bereits nahe an der Zellmembran und kann sich dort aufgrund der Mobilität von GPI bewegen. Es wird angenommen, dass diese Mobilität die Aufkonzentrierung von Aerolysin in Cholesterol-reichen *lipid rafts* der Zellmembran ermöglicht (Abrami et al., 2000). Diese lokale Toxin-Aufkonzentrierung bedingt die Oligomerisierung des Toxins zu einem Heptamer (**Abbildung 8**). Es wird angenommen, dass sich das Heptamer anschließend aufgrund seiner Hydrophobie spontan in die Zellmembran integriert und auf diesem Weg eine Pore bildet (Lesieur et al., 1997). Dieser toxische Wirkmechanismus führt letztlich zu einer Permeabilisierung der Zellmembran für Ionen wie Ca^{2+} oder K^+ , wodurch die zelluläre Homöostase gestört wird, was letztlich zur Einleitung der Apoptose führt (Abrami et al., 2000).

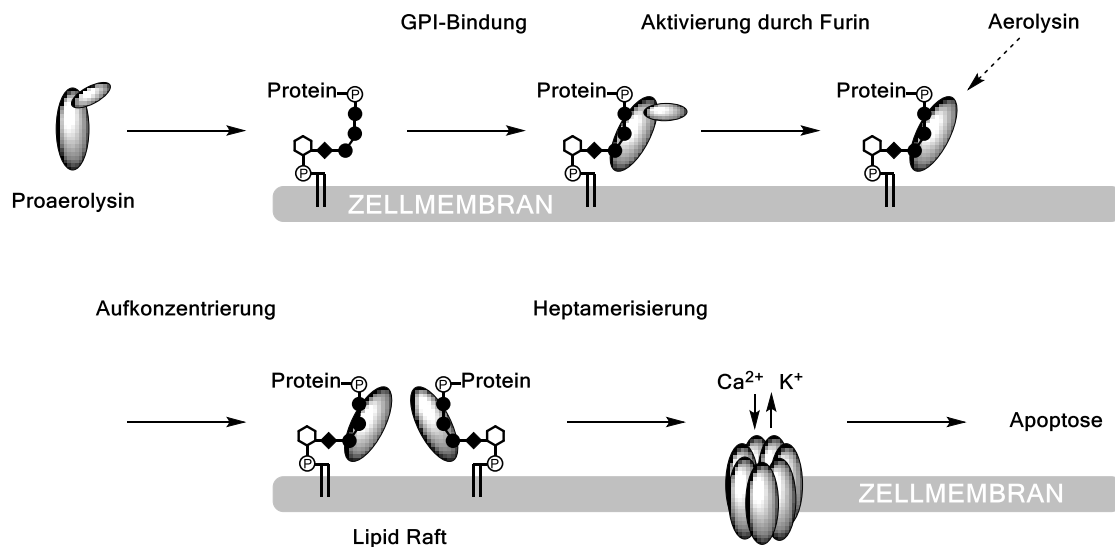


Abbildung 8: Schematische Darstellung des toxischen Wirkmechanismus von Proaerolysin. Der Wirkmechanismus basiert auf der Bildung einer Pore in der Zellmembran, wodurch es zum Zelluntergang durch Apoptose kommt (modifiziert nach Abrami et al., 2000).

2.5 Zelllinien: TK6 und WI-L2-NS

Die B-lymphoblastoiden Suspensions-Zelllinien TK6 und WI-L2-NS werden häufig für *in vitro* Untersuchungen eingesetzt, in einigen Arbeiten sogar parallel (Amundson et al., 1993; Zhen et al., 1995). TK6 und WI-L2-NS entstammen demselben, nicht-klonalen Zell-Isolat WI-L2, das aus der Milz eines 5 Jahre alten, kaukasischen Jungen mit erblich bedingter Sphärocytose etabliert wurde (Levy et al., 1968). Diese nicht-malignen Zellen wurden in der damaligen Zeit weit verbreitet. Ein Grund für die Verbreitung bestand darin, einen neuen *in vitro* Mutagenitäts-Test auf Grundlage des autosomalen *TK1* Gens von humanen Zellen zu entwickeln. Hierzu mussten verschiedene Klonierungs-Schritte durchgeführt werden, um einen Zellklon mit heterozygotem *TK1* Gen ($tk^{+/-}$) zu etablieren.

Aus den WI-L2 Lymphoblasten wurden durch Klonierung die WI-L2-NS sowie die HH4 Zelllinie gewonnen, wobei an dieser Stelle der Verlauf nicht explizit dokumentiert wurde (Amundson et al., 1993). Aus ICR-191 behandelten HH4 Zellen konnte schließlich die TK6 Zelllinie isoliert werden. ICR-191 ist ein Frameshift-induzierendes Mutagen, wobei eine zweite Behandlung mit ICR-191 teilweise reversible Wirkung zeigt. Es wurde zunächst aus ICR-191 behandelten HH4 Zellen ein $tk^{-/-}$ Klon isoliert. Dieser wurde im Anschluss erneut mit ICR-191 behandelt, wonach durch Rückmutation ein $tk^{+/-}$ Klon isoliert werden konnte, aus dem die heute TK6 Zelllinie entstammt (**Abbildung 9**).

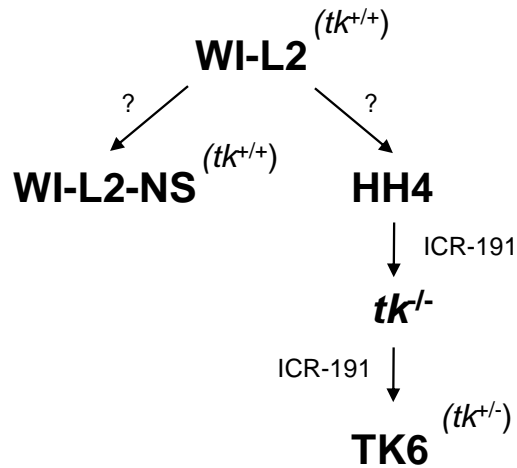


Abbildung 9: Etablierung der TK6 und der WI-L2-NS Zelllinie. Jeder Pfeil repräsentiert einen separaten Klonierungs-Schritt. WI-L2-NS und HH4 wurden durch eine unbekannt Anzahl an Klonierungen aus der ursprünglich durch Levy etablierten WI-L2 Zellen (Levy et al., 1968) gewonnen. Die HH4 Zelllinie wurde anschließend für die Etablierung der TK6 Zelllinie verwendet (modifiziert nach Amundson et al., 1993).

Sowohl TK6 als auch WI-L2-NS besitzen den diploiden Karyotyp 47, XY, 13+ mit Trisomie 13. Sie zeigen jedoch Unterschiede im Ausmaß an Heterozygotie im q-Arm des Chromosom 17, was durch Restriktionslängenpolimorphismus Analyse (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, RFLP) anhand der Marker D17S5 und D17S34 untersucht wurde. Diese waren homozygot in WI-L2-NS und heterozygot in TK6 Zellen (Amundson et al., 1993). Im p53 Status unterscheiden sich die sonst sehr ähnlichen Zelllinien ebenfalls voneinander. Während die TK6 Zelllinie funktionelles p53-Protein aufweist, überexprimieren WI-L2-NS Zellen mutiertes, nicht-funktionelles p53-Protein, was auf eine GC → AT Transition im Codon 237 des *TP53* Gen zurückzuführen ist (Zhen et al., 1995) Aufgrund dessen zeigte die Behandlung mit Gammastrahlung in TK6 Zellen eine stärkere zytotoxische und somit radioprotektive Wirkung, da eine zelluläre Antwort auf hochenergetische Gammastrahlung in der p53-vermittelten Apoptose-Induktion besteht (Zhen et al., 1995). Generell wird die TK6 Zelllinie als genetisch stabil betrachtet, weswegen sie für die Verwendung in Genmutations-Tests empfohlen wird (zusammengefasst in Kirkland et al., 2007b; Pfuhrer et al., 2011; Schwartz et al., 2004). Die Verwendung von Suspensionszellen weist im Rahmen des zu entwickelten Testsystems den Vorteil auf, dass die Zellen ohne vorangegangenen Trypsinierungs-Schritt analysiert werden können. Der Einsatz von Trypsin zum Ablösen von adhären Zellen kann aufgrund der Protease-Aktivität von Trypsin wegen des zugrundeliegenden Endpunktes im *in vitro* PIG-A Assay (Vorhandensein oder Anwesenheit der Zelloberflächenproteine CD55 und CD59) zu falschen Testresultaten führen.

3 FRAGESTELLUNG

Die Prüfung auf Mutagenität von Stoffen ist ein wesentlicher Bestandteil der toxikologischen Risikobewertung und stellt somit eine Grundvoraussetzung für Neuzulassungen sowie für die Bewertung von Altsubstanzen dar. Obwohl Tierversuchsstudien zur Untersuchung auf Mutagenität oder Kanzerogenität nach wie vor ein notwendiges Übel darstellen, geht der allgemeine Trend hin zu tierversuchsfreien *in vitro* Untersuchungen, was nicht zuletzt europaweit durch das Verbot tierexperimenteller Studien für kosmetische Mittel und deren Inhaltsstoffe unterstrichen wurde. Darüber hinaus sind *in vitro* Genmutations-Assays ein unverzichtbarer Bestandteil der Grundlagenforschung an Universitäten und anderen Institutionen. Anhand der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob der GPI-Phänotyp der permanenten Suspensionszelllinien TK6 sowie WI-L2-NS zur Indikation mutagener Effekte der Positiv-Kontrollen EMS, UV-C Strahlung sowie NQO geeignet ist, wobei mittels der nicht-mutagenen Negativ-Kontrollen Pyridin sowie Cycloheximid die Spezifität dieses neuartigen Endpunktes untersucht werden sollte. Neben der klassischen selektiven Methodik zur Quantifizierung mutierter Zellen konnte dies ebenfalls mittels durchflusszytometrischer Analyse realisiert werden. Da in diesem Fall keine Selektionierung von GPI(-) Zellen erfolgt, bestand eine Herausforderung in der sensitiven sowie reproduzierbaren Quantifizierung von sehr geringen Mengen an GPI(-) Mutanten-Zellen in einem Überschuss an GPI(+) Wildtyp-Zellen. Aufgrund dessen sollte ein verlässliches Färbeprotokoll für die durchflusszytometrische Analyse entwickelt werden. Durch die Auswahl der eng verwandten, sich jedoch im p53-Status unterscheidenden Zelllinien sollten zudem Informationen über den Einfluss von p53 auf das Testsystem gewonnen werden. Neben der Validierung der durchflusszytometrischen Methodik zur Bestimmung der GPI(-) Frequenz und der Auswahl einer für das Testsystem geeigneten Zelllinie sollte auf genetischer Ebene die GPI-betreffende Genotyp- zu Phänotyp-Beziehung untersucht werden.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Zellkultur

4.1.1 Allgemeines

Für die Zellkultur benötigte Medien, Lösungen, Puffer und alle Verbrauchsmaterialien wurden vor Verwendung hitzeautoklaviert, Heißluft sterilisiert oder sterilfiltriert.

TK6 und WI-L2-NS Zellen wurden in RPMI 1640 Medium mit 0,3 g/L L-Glutamin und 2 g/L Natriumhydrogencarbonat mit 10% (v/v) fötalem Kälberserum (FKS) und 100 U/mL Penicillin/Streptomycin kultiviert. Die Zellen wurden zwischen $0,08 - 1,00 \times 10^6$ Zellen / mL RPMI 1640 Medium kultiviert. Kultivierungsbedingungen waren 5% CO₂ und 37 °C in einem Brutschrank mit 100 % Luftfeuchtigkeit. Die Zellen wurden bis maximal Passage 25 kultiviert.

4.1.2 Kryokonservierung

Zellaliquots wurden unter Flüssigstickstoff gelagert mit $3 - 5 \times 10^6$ Zellen / Aliquot in 1 mL FKS mit 10% DMSO (v/v). Die Zellaliquots wurden mittels Cryo 1 °C Cooler (VWR) eingefroren.

4.1.3 Inkulturnahme

Für die Inkulturnahme wurde das 2 mL Kryoröhrchen bis zum vollständigen Auftauen der Zellsuspension in ein Wasserbad mit 37 °C gehalten. Sofort im Anschluss wurde die Zellsuspension in 10 mL auf 37 °C vorgewärmtes RPMI-1640 Medium pipettiert (15 mL Plastikröhrchen), zwei Mal invertiert und anschließend für 5 min bei 22 °C und 250 g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 20 mL RPMI-1640 Medium aufgenommen und in einer 75 cm² Zellkulturflasche (liegend) im Brutschrank gelagert. Die Zellen wurden erstmals zwei Tage nach Inkulturnahme für Experimente verwendet.

Für Mutagenitäts-Untersuchungen wurden die Zellen in Kultur genommen und höchstens bis Tag vier nach Inkulturnahme für Behandlungen verwendet.

4.2 Bestimmung der GPI(-) Frequenz in Suspensionszellen mittels Multicolor Durchflusszytometrie

Die GPI(-) Frequenz kann mittels Antikörper-Färbung und durchflusszytometrischer Analyse bestimmt werden. Für eine Bestimmung wurden 2×10^6 Zellen aufgearbeitet, wovon exakt 1×10^6 GPI(+) Zellen am Durchflusszytometer analysiert wurden. Die dabei ermittelte Anzahl an GPI(-) Zellen entsprach direkt der GPI(-) Frequenz.

Teil A: Vorbereitung der Zellen

Für eine Dreifach-Bestimmung der GPI(-) Frequenz einer Probe wurden 8×10^6 Zellen in ein 15 mL Plastikröhrchen überführt und anschließend 5 min bei 250 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen wurden in 3 mL Färbepuffer aufgenommen. Nach einer Zellzahlbestimmung am Z2 Zellzählgerät (Beckman & Coulter) wurden drei Aliquots von je 2×10^6 Zellen in 2 mL Mikroreaktionsgefäße (mit Rundboden) pipettiert und 5 min bei 250 g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgegossen und die Mikroreaktionsgefäße wurden vorsichtig auf ein saugfähiges Papier getupft, um Flüssigkeitsreste zu entfernen.

Teil B: Färbe-Protokoll

Nach Zugabe von je 150 µL Färbepuffer auf die Zellpellets wurden die Mikroreaktionsgefäße 20 sek bei 250 g und 4°C zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der zuvor gepoolten Antikörper. Das Volumen richtete sich dabei nach den Proteingehalten der käuflich erworbenen Antikörper-Chargen. Pro Färbung wurden 0,175 µg Maus anti-human CD19-APC, 0,6 µg Maus anti-human CD55-PE und 2,4 µg Maus anti-human CD59-PE eingesetzt. Ab der Verwendung der Fluoreszenz-markierten Antikörper wurde intensive Lichtexposition vermieden. Die Resuspendierung erfolgte mittels Vortex Genie mit Aufsatz für 60 Mikroreaktionsgefäße auf mittlerer Stufe für 20 sek. Anschließend erfolgte die Antikörper-Inkubation für 30 min im Dunkeln auf Eis. Nach den ersten 15 min wurde ein zusätzlicher Zentrifugations- (30 sek bei 250 g und 4°C) und Resuspendierungsschritt (Vortex Genie mit Aufsatz, mittlere Stufe, 20 sek) durchgeführt, um den Kontakt aller Zellen mit den Antikörpern zu gewährleisten. Nach der Antikörper-Inkubation wurden die Zellen gewaschen. Hierzu erfolgte eine Zugabe von 1 mL Färbepuffer pro Inkubationsansatz und eine gründliche Durchmischung mittels Vortex Genie mit Aufsatz für 40 sek auf mittlerer Stufe. Danach wurden die Zellen für 5 min bei 250 g und 4 °C zentrifugiert. Nach Abkippen des Überstands wurde die Waschprozedur wiederholt. Anschließend erfolgte eine 7-AAD Färbung zum Ausschluss toter Zellen während der durchflusszytometrischen Analyse.

Hierzu wurde das Zellpellet in 500 μL 7-AAD haltigen Färbepuffer (0,7 μg 7-AAD / mL Färbepuffer) aufgenommen und mittels Vortex Genie mit Aufsatz für 20 sek auf mittlerer Stufe resuspendiert. Es folgte eine Inkubation im Dunkeln auf Eis für 7 min. Anschließend wurden die Mikroreaktionsgefäße zentrifugiert (5 min bei 250 g und 4°C), der Überstand wurde abgegossen und die Zellen sofort mit 200 μL Fixierungs-Puffer (PBS mit 1 % (v/v) Formaldehyd und 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Actinomycin D) versetzt, 3 sek auf mittlerer Stufe gevortext und anschließend bis zur Messung auf Eis (dunkel) gelagert. Je Ansatz wurden am Durchflusszytometer (LSR Fortessa, Becton Dickinson) bei einer Messgeschwindigkeit von ca. 8000 Events / sek exakt 1×10^6 GPI(+) Zellen im Gate Q2 gesammelt. Die Anzahl der dabei registrierten GPI(-) Zellen im Gate Q4 (siehe **Abbildung 11**) entsprach direkt der GPI(-) Frequenz ($\times 10^{-6}$). Als Anregungswellenlängen und für die Emissions-Detektion der Fluoreszenz-Farbstoffe wurden verwendet: PE(488 – 575/26 nm), 7-AAD (488 – 695/40 nm) und APC (640 – 670/14 nm).

4.3 Bestimmung der GPI(-) Frequenz in Suspensionszellen mittels Proaerolysin-Selektion in 96-Well Platten

Die GPI(-) Frequenz kann neben der durchflusszytometrischen Analyse ebenfalls mittels Proaerolysin-Selektion in 96-Well Platten bestimmt werden. Dieser Ansatz ist methodisch mit den *in vitro* HPRT oder TK Assay unter Verwendung von Suspensionszelllinien zu vergleichen und basiert auf einer Methodik, die von Furth und Kollegen beschrieben wurde (Furth et al., 1981).

Für die Bestimmungen der GPI(-) Frequenz wurden für ein Experiment vier 96-Well Platten für die Bestimmung der Plattierungseffizienz unter nicht-selektiven Bedingungen mit 1,6 Zellen pro Well in 100 μL RPMI-1640 Medium sowie vier 96-Well Platten unter selektiven Bedingungen mit je 1×10^4 Zellen pro Well in 100 μL RPMI Medium und 5 nM Proaerolysin (Selektions-Agens) für die Bestimmung der GPI(-) Frequenz angesetzt. Dabei wurden die äußeren Wells der Platten mit bidestilliertem Wasser befüllt, um die Zellen-enhaltenden inneren Wells vor Verdunstung zu schützen. Die Anzahl auswertbarer Wells reduzierte sich dadurch von 96 auf 60 pro Platte. Die Platten wurden nach dem Aussähen der Zellen 10 Tage bei 37 °C und 5% CO_2 in einem Brutschrank kultiviert. Anschließend wurden die Wells mittels Konfokalmikroskop auf die Bildung von Zellklonen hin untersucht. Gezählt wurde die Anzahl an Wells pro Platte mit ausbleibender Koloniebildung. Im Anschluss daran konnte die

GPI(-) Frequenz mittels der folgenden, auf einer Poisson-Verteilung basierenden mathematischen Gleichung berechnet werden:

$$\text{GPI(-) Frequenz (x10}^{-6}\text{)} = [-\ln (X_s / N_s) / -\ln (X_o / N_o)] \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

$$\text{Verdünnungsfaktor} = \frac{\text{Anzahl Wells pro Well (nicht selektive Bedingungen)}}{\text{Anzahl Wells pro Well (selektive Bedingungen)}}$$

Mit X_s : Anzahl Wells ohne Kolonien unter selektiven Bedingungen

X_o : Anzahl Wells ohne Kolonien unter nicht-selektiven Bedingungen

N_s : Gesamtanzahl verwendeter Wells unter selektiven Bedingungen

N_o : Gesamtanzahl verwendeter Wells unter nicht-selektiven Bedingungen

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente ergab sich unter Verwendung der Assay-Konditionen die folgende Gleichung zur Berechnung der GPI(-) Frequenz:

$$\text{GPI(-) Frequenz (x10}^{-6}\text{)} = [-\ln (X_s / 60) / -\ln (X_o / 60)] \times (1,6 / 60)$$

4.4 Abreicherung von GPI(-) Zellen

Für eine Durchführung wurde eine Cellstar Zellkulturschale (ZKS) Ø 35 mm (Greiner bio one) mit 1 mL Ziege anti-Maus IgG Lösung (10 mg Antikörper in PBS) über Nacht im Kühlschrank gelagert, wobei die Antikörper an die ZKS gebunden wurden. Am nächsten Tag wurde die Lösung abgesaugt und die ZKS mit 1 mL BSA-Lösung (2 % BSA m/v in PBS) für 1 h bei RT inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurde die BSA-Lösung abgesaugt und die ZKS mit 1 mL Maus anti-human CD59 Lösung (5 mg Antikörper in PBS) für 1 h auf einer Schwenkplatte inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Lösung abgesaugt und die ZKS mit 1 mL PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1×10^6 Zellen in 1 mL RPMI-1640. Die Zellen wurden für 1 h im Brutschrank inkubiert, wobei die Bindung von GPI(+) Zellen via CD59 an den Antikörper erfolgte. Nach der Inkubation wurde der Überstand abgesaugt und der Antikörper-fixierte Zelllayer mit 1 mL RPMI-1640 vorsichtig gewaschen, wobei die ZKS leicht geschwenkt wurde. Diese Wasch-Prozedur wurde viermal wiederholt, um eine nahezu quantitative Abreicherung der GPI(-) Zellen zu erzielen.

Abschließend wurde der Zelllayer gründlich mit 1 mL RPMI-1640 resuspendiert (wobei die Zellen von der ZKS abgelöst wurden) und in einem Endvolumen von 10 mL RPMI-1640 aufgenommen.

Nachdem ausreichend Mutanten-abgereicherte Zellen zur Verfügung standen, wurden diese mit 3 - 5 x 10⁶ Zellen / Aliquot in 1 mL FKS mit 10% DMSO (v/v) kryokonserviert.

4.5 Zytotoxizität von Proaerolysin

TK6 Zellen wurden mit einer Zelldichte von 0,2 x 10⁶ / mL in RPMI-1640 ausgestreut und mit Proaerolysin in Konzentrationen von 1 – 6 nM für 72 h inkubiert. Anschließend wurde die Zellzahl mittels Z2 Zellzahlgerät (Beckman & Coulter) bestimmt. Aufgrund dieser langen Proliferationszeit waren die Kontrollansätze zwar bereits über die empfohlene maximale Zelldichte von 1 x 10⁶ Zellen / mL proliferiert, dennoch wurde diese lange Proliferationszeit gewählt, um eventuelle Proliferationsunterschiede in den mit hohen Konzentrationen inkubierten Ansätzen (4 nM und 6 nM Proaerolysin) besser erkennen zu können.

4.6 Generierung einer GPI(-) TK6 Zellpopulation mittels Proaerolysin

Zur Generierung einer GPI(-) TK6 Zellpopulation wurden 2 x 10⁶ Zellen (originaler TK6 Zell-Batch, nicht Mutanten-abgereichert) in 20 mL RPMI-1640 mit 5 nM Proaerolysin im Brutschrank ohne Mediumwechsel inkubiert. Diese Behandlung überleben nur GPI(-) Zellen, die in Proaerolysin-haltigem RPMI-1640 proliferieren können. Nach 10 Tagen wurden die Zellen aufgrund eingesetzter Zellproliferation standardmäßig subkultiviert, wobei keine weitere Proaerolysin-Zugabe erfolgte. Im Falle der WI-L2-NS Zelllinie wurden 3 x 10⁶ Zellen (originaler WI-L2-NS Zell-Batch, nicht Mutanten-abgereichert) in 30 mL RPMI-1640 mit 5 nM Proaerolysin im Brutschrank ohne Mediumwechsel inkubiert.

Nachdem ausreichend GPI(-) Zellen zur Verfügung standen, wurden diese mit 3 - 5 x 10⁶ Zellen / Aliquot in 1 mL FKS mit 10% DMSO kryokonserviert.

4.7 Behandlung von WI-L2-NS Zellen mit PI-PLC

WI-L2-NS Zellen wurden im Rahmen dieser Arbeit mit PI-PLC behandelt um zu untersuchen, ob die nach Proaerolysin-Behandlung aufgetretene GPI(/) Zellpopulation auf unspezifische Antikörperbindung zurückzuführen war (siehe 5.2).

2×10^6 Zellen wurden hierfür in einem 2 mL Mikroreaktionsgefäß in 500 μ L PBS resuspendiert. Es wurden 5 μ L PI-PLC hinzugegeben (0,25 μ g Enzym) und bei RT auf einem Heizschüttler für 30 min inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen bei 250 g und 22 °C zentrifugiert, mit 1 mL PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und anschließend der Färbe-Prozedur (siehe 4.2, Teil B) unterzogen.

4.8 Methodvalidierung

4.8.1 Wiederfindungsanalyse mittels Durchflusszytometrie

Die Überprüfung der durchflusszytometrischen Methodik zur Quantifizierung von GPI(-) Zellen erfolgte unter Verwendung von Zellproben, die unterschiedliche Gehalte an GPI(-) Zellen aufwiesen. Für Experiment 1 wurden Triplikate von 50, 100 oder 200 GPI(-) Zellen in je 2×10^6 und für Experiment 2 Triplikate von 50, 100 oder 150 GPI(-) Zellen in je 2×10^6 Mutanten-abgereicherte TK6 Zellen hergestellt.

4.8.2 Durchflusszytometrie vs. Proaerolysin-basierter Selektion

Der Vergleich beider Methoden zur Quantifizierung von GPI(-) Frequenzen wurde anhand von Zellproben durchgeführt, die unterschiedliche Gehalte an GPI(-) Zellen aufwiesen. Für ein Experiment wurden Triplikate von 650, 1300 und 1950 GPI(-) Zellen in je $13,0 \times 10^6$ Mutanten-abgereicherten TK6 Zellen hergestellt. Von den 13×10^6 Zellen wurden $8,0 \times 10^6$ Zellen für die durchflusszytometrische Analyse und $2,6 \times 10^6$ Zellen für die Proaerolysin-Selektion verwendet.

Diese Untersuchung wurde unterstützt von Frau Mareike Hofmann im Rahmen ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeit.

4.8.3 Bestimmung der Populationsverdopplungszeit von TK6 und WI-L2-NS Zellen

Zur Bestimmung der Populationsverdopplungszeit von TK6 und WI-L2-NS Zellen wurden drei Replikate mit je $0,1 \times 10^6$ Zellen in 2 mL RPMI Medium in 6-Well Platten ausgestreut. Das Proliferationsverhalten der Zellen wurde über 48 h via Zellzahlbestimmung am Z2 Zellzählgerät (Beckman & Coulter) untersucht. Über diesen Zeitraum wurde in passenden Zeitabständen die Zellzahl an 5 unterschiedlichen Zeitpunkten ermittelt. Anschließend konnte nach logarithmischer Auftragung der Zellzahl über die Proliferationsdauer die lineare Geradengleichung mittels der Datenanalysesoftware Origin (Version 9.1) ermittelt und daraus die Verdopplungszeit berechnet werden.

4.9 Bestimmung der Phänotyp-Expressionszeit

Die Phänotyp-Expressionszeit wurde unter Verwendung von Mutanten-abgereicherten TK6 sowie WI-L2-NS Zellen untersucht. Es wurden in Abhängigkeit von der Zelllinie sowie der Inkubationsdauer unterschiedliche Experimente durchgeführt.

Bezüglich der TK6 Zelllinie wurden die Zellen 4 h mit 200 μM und 800 μM EMS jeweils in einem unabhängigen Duplikat behandelt. Für die 24 h Inkubation wurden TK6 Zellen sowohl mit 200 μM (Einzelexperiment) als auch mit 150 μM EMS (Duplikat) behandelt. Bezüglich der WI-L2-NS Zelllinie wurden die Zellen 4 h mit 800 μM EMS (Duplikat) behandelt. Die Behandlungsbedingungen sind dem Abschnitt 4.11 zu entnehmen. Zur Bestimmung der Phänotyp-Expressionszeit wurden die Zellen nach der entsprechenden EMS-Behandlung bis 15 Tage subkultiviert, wobei alle vier Tage die GPI(-) Frequenz durchflusszytometrisch ermittelt wurde (siehe 4.2).

4.10 Toxizitäts-Bestimmung

4.10.1 Relative Zellzahl-Zunahme (RICC)

Ermittlung von RICC zur Festlegung der Top-Dosis

Zur Ermittlung von RICC wurden die Zellen nach der Behandlung in 24-Well Platten mit einer Dichte von $0,1 \times 10^6$ / mL in RPMI-1640 ausgestreut und für 48 h im Brutschrank gelagert. Anschließend wurde die Zellzahl am Z2 Zellzählgerät (Beckman & Coulter) bestimmt. Anschließend konnte RICC mittels der folgenden Gleichung berechnet werden:

$$\text{RICC (\% der Kontrolle)} = [(Zellzahl^*_{\text{Behandlung}} - 0,1 \times 10^6) / (Zellzahl^*_{\text{Kontrolle}} - 0,1 \times 10^6)] \times 100$$

*Zellzahl in Zellen / mL

Für eine Durchführung wurde jeder Inkubationsansatz sowie die Kontrolle je in einem Triplikat ausgestreut.

Ermittlung von RICC im Rahmen der Zytotoxizitäts-Kinetik

Für die Ermittlung der Zytotoxizitäts-Kinetik (siehe 0) wurden EMS behandelte TK6 Zellen über 10 Tage subkultiviert, wofür alle zwei Tage die Zellzahl am Z2 Zellzählgerät (Beckman & Coulter) bestimmt wurde. Diese Daten wurden zur Ermittlung der jeweiligen RICC Werte nach oben genannter Gleichung herangezogen.

4.10.2 Relative Zellzahl (RCC)

Die relative Zellzahl wurde als Zytotoxizitäts-Parameter zur Ermittlung der Proaerolysin-Konzentration (siehe 5.2) sowie im Rahmen der EMS Zytotoxizitäts-Kinetik (siehe 0) eingesetzt und wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{RCC (\% der Kontrolle)} = (Zellzahl^*_{\text{Behandlung}} / Zellzahl^*_{\text{Kontrolle}}) \times 100$$

*Zellzahl in Zellen / mL RPMI-1640

4.10.3 7-AAD Färbung

Diese Methodik beschreibt die Einzelfärbung mittels 7-AAD im Rahmen der EMS Zytotoxizitäts-Kinetik (siehe 5.5.1).

Hierzu wurden 1×10^6 Zellen in 500 μL Färbepuffer mit 5 μL 7-AAD Lösung (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Biologend) versetzt und auf Eis auf einer Schwenkplatte unter Lichtausschluss 10 min inkubiert. Die Zellen wurden direkt im Anschluss durchflusszytometrisch analysiert.

4.11 Behandlungen

Es wurden ausschließlich frisch in Kultur genommene, Mutanten-abgereicherte Zellen eingesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl 4 h als auch 24 h Inkubationen sowie Behandlungen mit UV-C Bestrahlung durchgeführt. Bezüglich 4 h Inkubationen (200 – 800 μM EMS, 50 – 200 nM NQO, 1 – 10 mM Pyridin oder 1 – 10 mM Cycloheximid) wurden 5×10^6 Zellen in 10 mL RPMI-1640 mit der Testsubstanz oder dem entsprechenden Lösemittel (Lösemittel-Kontrolle) versetzt und im Brutschrank inkubiert. Bezüglich 24 h Behandlungen (100 – 200 μM EMS) wurden 3×10^6 Zellen in 10 mL RPMI-1640 mit der Testsubstanz oder dem Lösemittel inkubiert. Die Stammlösungen wurden in DMSO (EMS, NQO oder Cycloheximid) oder in bidestilliertem Wasser (Pyridin) hergestellt, wobei die Lösemittel in einer Endkonzentration von 0,5 % (v/v) in RPMI-1640 eingesetzt wurden.

Für UV-C Behandlung wurden 3×10^6 Zellen in 3 mL PBS in \varnothing 60 mm ZKS ohne Deckel mit 0,5 W/s für 4, 10 und 16 sek bestrahlt, was einer Dosis von 2, 5 und 8 J/m^2 entsprach. Strahlungsquelle war eine UV-C Lampe (VL-6C 254 nm, Eberhardzell).

Nach erfolgter Inkubation oder Bestrahlung wurden die Zellen bei 250 g für 5 min bei 22 °C zentrifugiert, das Inkubationsmedium wurde abgesaugt und die Zellen wurden mit je 4 mL PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde die PBS-Lösung abgesaugt und die Zellen wurden in 4 mL RPMI-1640 aufgenommen. Es erfolgte eine Zellzahl-Bestimmung am Z2 Zellzählgerät (Beckman & Coulter) und 2×10^6 Zellen wurden in 25 mL RPMI-1640 ausgestreut. Die Zellen wurden für die Phänotyp-Expression alle 48 h subkultiviert, wobei 2×10^6 Zellen in 25 mL RPMI-1640 weitergesetzt wurden. Als optimale Phänotyp-Expressionszeit wurden 10 Tage nach 4 h Inkubationen und 11 Tage nach 24 h Inkubationen sowie UV-C Bestrahlung gewählt. Nach der Phänotyp-Expressionszeit erfolgte die durchflusszytometrische Bestimmung der GPI(-) Frequenz (siehe 4.2).

4.12 Bestimmung der spontanen GPI(-) Rate

Für die Bestimmung der spontanen GPI(-) Rate wurden je 2×10^6 Mutanten-abgereicherte Zellen in 25 mL RPMI-1640 über einen Zeitraum von 20 Tagen subkultiviert. Dabei wurde die GPI(-) Frequenz an jedem vierten Tag durchflusszytometrisch ermittelt (siehe 4.2). Anschließend wurden die GPI(-) Frequenzen über die jeweilige Anzahl an Populationsverdopplungen aufgetragen und linear ohne Gewichtung mittels der Datenanalysesoftware Origin (Version 9.1) interpoliert, wobei die Steigung der Geraden direkt der spontanen GPI(-) Rate entsprach. Für die Berechnung der Populationsverdopplungen wurde eine PVZ von 13,55 h für TK6 und 13,07 h für WI-L2-NS zugrunde gelegt (siehe 5.4.3).

4.13 Isolierung einzelner TK6-Zellklone mit unterschiedlichem GPI-Status

Für die Isolierung einzelner GPI(+) TK6 Zellklone wurden unbehandelte TK6 Zellen mit einer Zelldichte von 0,3 Zellen in 100 μ L RPMI-1640 pro Well in vier 96-Well Platten ausgestreut. Abhängig vom Proliferations-Verhalten der einzelnen Zellklone wurden diese bei ausreichender Größe je in ein Well einer 6-Well Platte und anschließend in 20 mL RPMI-1640 in Zellkulturflaschen überführt. Bei einer ungefähren Zelldichte von 1×10^6 Zellen/mL wurde der GPI-Status der einzelnen Zellklone durchflusszytometrisch untersucht (siehe 4.2, Teil B) sowie Zellpellets mit 4×10^6 Zellen für die DNA-Sequenzierungen hergestellt.

Die Isolierung einzelner GPI(-) TK6-Zellklone erfolgte nach vergleichbarem Schema, wobei pro Well 5000 Zellen in 100 μ L RPMI-1640 mit 5 nM Proaerolysin pro Well ausgestreut wurden.

4.14 PCR und Sanger DNA-Sequenzierung

4.14.1 RNA-Isolierung

Für die RNA-Isolierung aus TK6 Zellen wurde das RNA-Isolierungs Kit NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel) verwendet.

Es wurde auf Eis gearbeitet. Das Zellpellet von 4×10^6 Zellen (siehe 4.13) wurde mit 100 μL PBS (steril) resuspendiert. Nach Zugabe von 350 μL RA1 Puffer und 3,5 μL Mercaptoethanol wurde der Ansatz gründlich gevortext. Anschließend wurde der Ansatz fünf Mal durch eine 0,9 mm Nadel in eine Spritze aufgesogen, um eine vollständige Zellyse zu gewährleisten. Nach Zugabe von 350 μL Ethanol (70%, nicht vergällt) wurde der Ansatz erneut gevortext. Der Ansatz wurde auf eine RNA-bindende Säule in einem 2 mL Reaktionsgefäß pipettiert und 30 sek bei 9000 rpm und RT zentrifugiert. Nach Zugabe von 350 μL MDB-Puffer wurde die Säule 1 min bei 11000 rpm zentrifugiert. Im Anschluss daran wurden 95 μL DNase-Lösung auf die Säule aufgegeben und 15 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 μL RA2 Puffer wurde 30 sek bei 9000 rpm und RT zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule nach Zugabe von RA3 Puffer 30 sek bei 9000 rpm und RT zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit 250 μL RA3 Puffer wiederholt. Im Anschluss daran wurden 40 μL RNase freies Wasser auf die Säule gegeben und 2 min bei 13000 rpm und RT zentrifugiert, wobei die gebundene RNA eluiert wurde. Dieser Schritt wurde mit 40 μL RNase freies Wasser wiederholt, die Eluate wurden gepoolt und bei -80°C im Biofreezer für höchstens eine Woche gelagert.

Im RNA-Isolierungs Kit waren enthalten: Säulen, DNase, RA1 Puffer, MDB Puffer, RA2 Puffer, RA3 Puffer, RNase freies Wasser.

4.14.2 Umschreibung in cDNA

Die cDNA Synthese wurde unter Verwendung des qScript cDNA Synthesis Kit (Quanta BioScience) durchgeführt.

Es wurde auf Eis gearbeitet. Zunächst wurde die RNA-Konzentration des Eluats am Plattenlesegerät Infinite M200PRO (Tecan) bestimmt. Hierfür wurden 2 μL RNA-Eluat eingesetzt; die Absorption wurde bei 260 nm gemessen. Es wurde das Volumen entsprechend zu 1 μg RNA mit RNA freiem Wasser auf insgesamt 15 μL ergänzt. Anschließend wurden 4 μL Reaction Mix Lösung (5x konzentriert) und 1 μL Reverse Transkriptase zugesetzt. Die Ansätze wurden durchmischt, 5 sek zentrifugiert und anschließend im Thermocycler (BioRad) dem folgenden Temperaturprogramm unterzogen:

5 min bei 25 °C, 30 min bei 42 °C und abschließend 5 min bei 85 °C. Die Ansätze wurden bei -20°C für maximal eine Woche gelagert.

Im qScript cDNA Synthese Kit waren enthalten: Reaction Mix Lösung (5x konzentriert), Reverse Transkriptase, RNase freies Wasser.

4.14.3 PCR Amplifikation

Die PCR Reaktion wurde mittels Taq PCR Core Kit (Quiagen) durchgeführt.

Es wurde auf Eis gearbeitet. Für die PCR Reaktion wurden 2 µL der cDNA Lösung eingesetzt. Die Primer wurden in einer Endkonzentration von 0,5 µM eingesetzt. Die Reaktion wurde in PCR-Streifen durchgeführt.

Zunächst wurde der Reaktions-Mix für die PCR Reaktion folgendermaßen hergestellt: Pro Reaktion wurden 2 µL cDNA-Lösung, 2,5 µL Reaktion Mix (10x konzentriert), 0,5 µL dNTP Mix, 2,5 µL Primer-Lösung (5 µM), 0,125 µL Taq Polymerase und 17,37 µL RNase freies Wasser in eine Kavität Pipettiert. Dies entsprach einem Gesamtansatz mit einem Volumen von 25 µL.

Die Ansätze wurden dem folgenden PCR Temperaturprogramm unterzogen: 1. 94 °C für 3 min, 2. 94 °C für 1 min, 3. 48 °C für 1 min, 4. 72 °C für 1 min (30 Zyklen von Schritt 2 bis 4), 5. 72 °C für 10 min. Die Proben wurden über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank gelagert und am Folgetag für die Sequenzierung bei RT versandt.

4.14.4 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Überprüfung der PCR Produkte (Amplikons) wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Hierzu wurden 1,2 g Agarose als Trägermedium in 80 mL TAE Puffer in der Mikrowelle gelöst. Die klare Lösung wurde mit 8 µL Gelred (10.000x konzentriert) versetzt, geschwenkt und anschließend in die Elektrophorese Apparatur gegossen. Nach 30 min hatte sich der Gelverbund ausgebildet und die PCR-Proben konnten aufgetragen werden. Hierzu wurden zunächst 2 µL PCR-Probe mit 1 µL Ladepuffer versetzt und anschließend in die Geltasche pipettiert. Folgendes Programm wurde für die Gelelektrophoretische Trennung eingesetzt: 110 V bei maximaler Stromstärke für 2 h. Im Anschluss wurde das Gel mit dem Bildanalysator LAS-3000 (Fuji) ausgewertet. Die Aufnahme der Bilder wurden die folgenden

Einstellungen gewählt: Exposure Type: Precision, Exposure Time: Auto, Sensitivity: High, Fluoreszenz-Anregung bei 312 nm.

4.14.5 Sanger-Sequenzierung

Die Sanger-Sequenzierung der *PIG-A* cDNA Amplifikate wurde von der Firma Microsynth AG in Balgach (Schweiz) durchgeführt. Als Sequenzierungs-Primer wurden die Primer der PCR-Amplifikation (**Tabelle 8**) eingesetzt.

4.15 Next-generation sequencing

DNA-Isolierung für das next-generation sequencing

Für die DNA-Isolierung wurde das G-spin Total DNA Extraction Kit (Intron Biotechnology) verwendet.

Es wurde auf Eis gearbeitet. Das Zellpellet (siehe 4.13) wurde mit 200 µL CL Puffer gründlich resuspendiert, mit 20 µL Proteinase K und 5 µL RNase A versetzt und bei 56 °C in einem Heizschüttler für 15 min inkubiert. Nach Zugabe von 200 µL BL Puffer wurde der Ansatz vorsichtig resuspendiert und für weitere 5 min bei 70 °C in einem Heizschüttler inkubiert. Es wurden 700 µL Ethanol (absolut) hinzugegeben, die Proben wurden sechs Mal invertiert und anschließend auf eine Säule pipettiert. Diese wurde (in einem Sammel-Tube) bei 13.000 rpm für 1 min bei RT zentrifugiert. Der Durchsatz wurde verworfen. Anschließend wurden 700 µL WA Puffer auf die Säule gegeben. Es wurde bei 13.000 rpm für 1 min bei RT zentrifugiert. Der Durchsatz wurde verworfen. Diese Prozedur wurde mit 700 µL WB Puffer wiederholt. Anschließend wurde die Säule in einem neuen Sammel-Tube zum Trocknen bei 13.000 rpm für 1 min bei RT zentrifugiert. Danach wurden 30 µL CE Puffer auf die Säule gegeben. Diese wurde in einem sterilen 1,5 mL Mikroreaktionsgefäß bei 13.000 rpm für 1 min bei RT zentrifugiert, wobei die gebundene DNA eluiert wurde. Im Anschluss daran wurden die 30 µL Eluat erneut auf die Säule pipettiert. Diese wurde unter den gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert. Das Eluat wurde über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank gelagert und am Folgetag auf Eis zum Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Campus Nord, Institut für Toxikologie und Genetik, transportiert.

Im G-spin Total DNA Extraction Kit waren enthalten: Säulen, Proteinase K, RNase A, BL Puffer, WA Puffer, WB Puffer, CE Puffer.

Next-generation sequencing

Das *next-generation sequencing* sowie die Datenanalyse wurden am KIT, Campus Nord, Institut für Toxikologie und Genetik von Dr. Olivier Armant durchgeführt. Dieser stellte den folgenden Methodenteil zur Verfügung:

Bibliotheken-Präparation und Sequenzierung:

1 µg genomische DNA wurde mittels einem S220 (Covaris, Einstellungen: Peak Incidence Power 175W, Duty Factor 10 %, Cycle Per Burst 200, 360 sek Behandlung) in 380 bp Fragmente gespalten. Für die Sequenzierungs-Bibliotheken wurden 1 µg fragmentierte DNA nach TruSeq PCR Free DNA Protokoll (Illumina) präpariert. Die Größe sowie die Konzentration der Sequenzierungs-Bibliotheken wurden auf einem DNA-Chip 1000 (Bioanalyser 2100, Agilent) überprüft. Die Proben wurden vereinigt (7 pM) und sequenziert (2x 100bp paired end reads an einem Hiseq1500 mit TruSeq SBS Rapid Kits von Illumina). Die Detektion von Clustern und base calling wurden an einem RTAv1.17.21.3 (Illumina) durchgeführt. Mindestens 9×10^9 Nukleotide wurden von jeder Probe mit hoher Qualität (Phred score > 30) produziert. Die Auslesungen wurden mit dem humanen Referenzgenom GRCh37 abgeglichen (Algorithmus BWA Version 0.7.10). Die abgeglichenen Daten wurden mit Picard-Tools (Version 1.43) verarbeitet um Read Groups hinzuzufügen und Duplikate zu entfernen. Die Visualisierung der Abgleichungen mit dem humanen Referenzgenom erfolgte mittels Genom Browser IGV (Broad Institute).

4.16 Sequenzhomologie auf Protein-Level

Es wurden Untersuchungen auf Sequenzhomologie zum PIG-A Protein durchgeführt. Hierfür wurden das „Bioinformatics Toolkit“ des Max-Planck Instituts für Entwicklungsbiologie sowie der HHpred Algorithmus für die Sequenz-Vergleiche herangezogen. Das Bioinformatic Toolkit ist online unter <http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred/> verfügbar. Für die Generierung der **Abbildung 39** wurde das Programm PyMOL von Schrödinger (Version 1.3) verwendet. Die Untersuchung wurde von Volker Morath, Lehrstuhl für Biologische Chemie, Technische Universität München, unterstützt.

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

5.1 Entwicklung der durchflusszytometrischen Methode zur Bestimmung des GPI(-) Status von Zellen und der GPI(-) Frequenz

Die Herausforderung an die durchflusszytometrische Methodik bestand in der sensitiven sowie reproduzierbaren Quantifizierung eines sehr geringen Anteils mutierter GPI(-) Zellen in einem Überschuss an GPI(+) Wildtyp-Zellen. Zur Ermittlung des GPI-Status wurden die GPI-verankerten Oberflächenproteine CD55 und CD59 mit Phycoerythrin (PE) konjugierten, monoklonalen Maus anti-human Antikörpern gefärbt. Folglich konnten Zellen, die während der durchflusszytometrischen Analyse ein starkes PE-Fluoreszenzsignal aufwiesen, als GPI(+) und Zellen ohne PE-Signal als GPI(-) angesehen werden. Die auf Fluoreszenz-Emission basierende Trennung der beiden Zellpopulationen ist in **Abbildung 10** dargestellt.

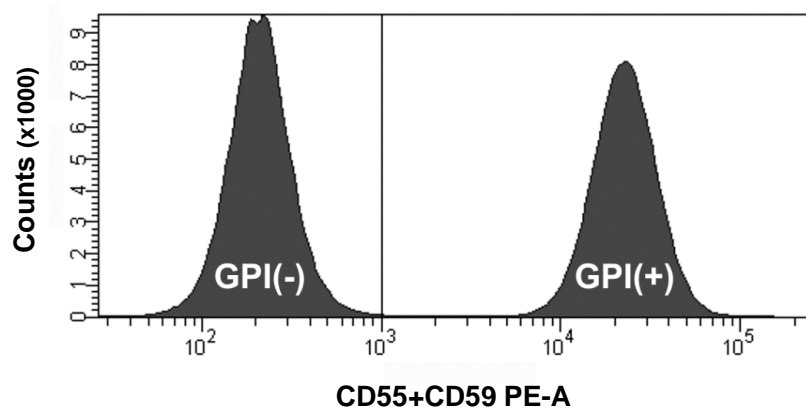


Abbildung 10: Fluoreszenz-basierte Trennung von GPI(-) und GPI(+) TK6 Zellen mittels Durchflusszytometrie. Die beiden Zellpopulationen wurden gepoolt und einer Antikörper-Färbung der Oberflächenproteine CD55 und CD59 unterzogen. Anschließend wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Die vertikale Linie bei 10³ PE-Fluoreszenzintensität repräsentiert die Lage des Gates zur Differenzierung zwischen GPI(-) und GPI(+) Zellen (Krüger et al., 2014).

Die Färbung GPI-verankerter Proteine war bezüglich der Differenzierung zwischen GPI(-) und GPI(+) Zellen leistungsfähiger im Vergleich zu der Färbung mit *fluorescein labeled proaerolysin variant* (FLAER), dem inaktivierten und mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) konjugierten bakteriellen Toxin Proaerolysin, welches GPI direkt bindet (Daten nicht dargestellt). Vermutlich lag dies an dem größeren Helligkeits-Index (HI) des Fluoreszenz-

Farbstoffs PE (HI 5) im Vergleich zu FITC (HI 3). Aufgrund dieses Befundes wurde die Bestimmung des GPI-Status via GPI-verankerter Proteine der FLAER-Färbung bevorzugt. Die Gating-Prozedur der durchflusszytometrischen Analyse ist in **Abbildung 11** dargestellt.

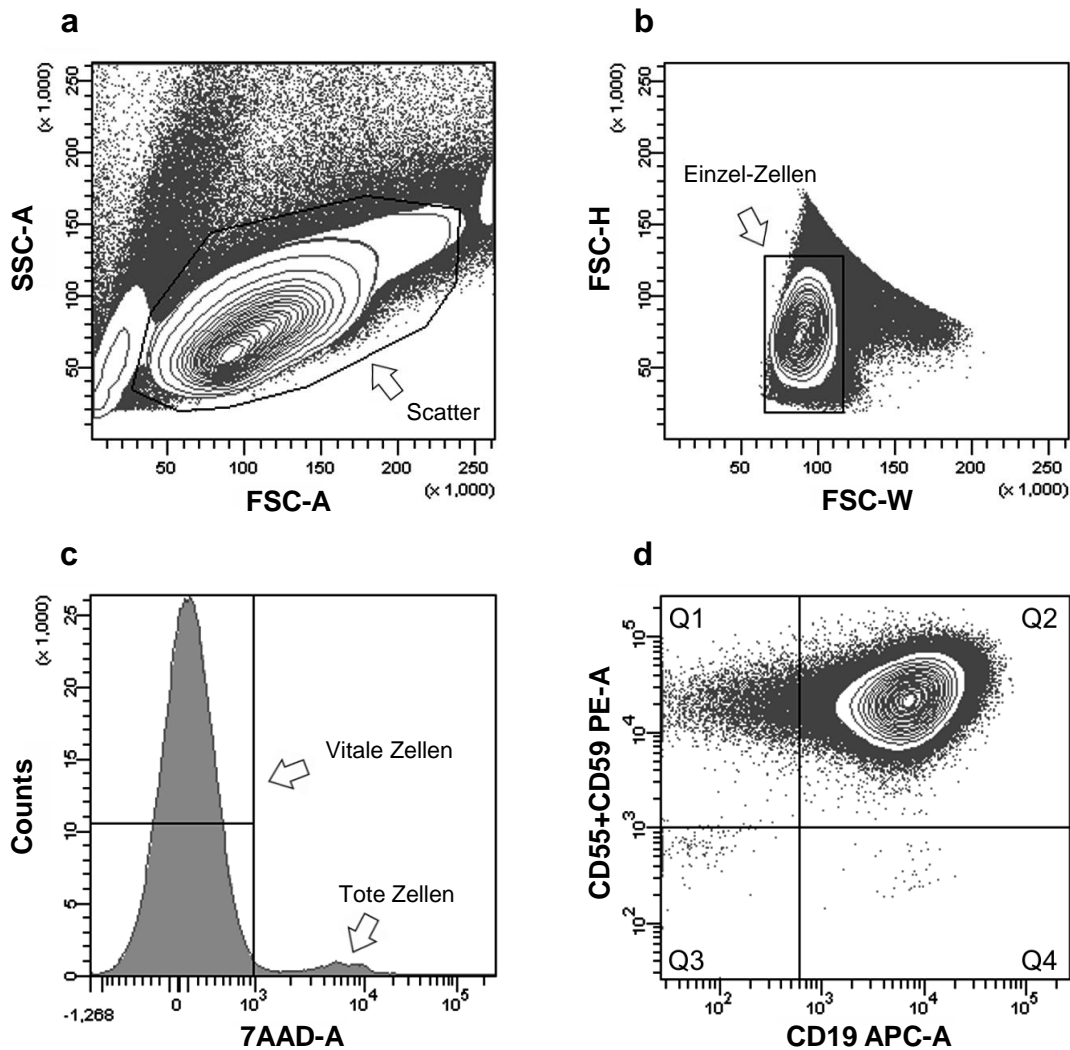


Abbildung 11: Durchflusszytometrische Gating-Prozedur zur Bestimmung der GPI(-) Frequenz. **a** Zellen wurden gesammelt, **b** Zell-Agglomerate wurden diskriminiert, **c** tote Zellen wurden diskriminiert und **d** der GPI-Status der Zellen wurde durch Antikörper-Färbung gegen die Proteine CD55, CD59 und CD19 bestimmt. GPI(+) Wildtyp-Zellen befanden sich im Quadranten-Gate Q2 und GPI(-) Mutanten-Zellen in Q4 (Krüger et al., 2014).

Im ersten Schritt (Abb. 11, a) wurden die (hauptsächlich vitalen) Zellen in einem *side scatter* (SSC) / *forward scatter* (FSC) Dotplot-Diagramm gesammelt (Gate *Scatter*). Anschließend wurden Zell-Agglomerate ausgeschlossen (Abb. 11, b) und lediglich Einzel-Zellen für die weitere Analyse berücksichtigt (Gate *Einzel-Zellen*). Es folgte eine lebend-tot Diskriminierung

mittels des DNA-Farbstoffs 7-AAD, wobei 7-AAD lediglich die Zellmembran toter Zellen passieren kann und dort in die DNA interkaliert. Dadurch wiesen tote Zellen eine 7-AAD charakteristische Fluoreszenz auf und konnten von der Analyse ausgeschlossen werden, da lediglich Zellen im Gate *Vitale Zellen* (Abb. 11, c) für die Bestimmung der GPI(-) Frequenz (Abb. 11, d) berücksichtigt wurden. GPI(+) Wildtyp-Zellen waren im Quadrant Q2 und GPI(-) Mutanten-Zellen aufgrund der Abwesenheit des PE Fluoreszenz-Signals im Quadrant Q4 lokalisiert.

Anfangs wurden lediglich die Oberflächenproteine CD55 und CD59 gefärbt, wobei es zu beträchtlichen Schwankungen der ermittelten GPI(-) Frequenzen kam, da während der Analyse unspezifische Events die Gating-Prozedur a – c (**Abbildung 11**) passierten und folglich, aufgrund der Abwesenheit des PE-Fluoreszenzsignals, als GPI(-) Zellen gewertet wurden (Pseudo-Mutanten). Aufgrund dessen wurde zusätzlich das GPI-unabhängige Transmembran-Protein CD19 mittels Allophycocerythrin (APC) konjugiertem Maus anti-human CD19 Antikörper gefärbt, wodurch eine Unterscheidung zwischen Pseudo-Mutanten (Abb. 11, d, Q3) und GPI(-) Zellen (Abb. 11, d, Q4) möglich wurde. Für die Ermittlung der GPI(-) Frequenz wurden exakt 1×10^6 GPI(+) Zellen im Gate Q2 analysiert, wodurch die Anzahl der in Q4 lokalisierten GPI(-) Zellen direkt der GPI(-) Frequenz entsprach. Die Lage der Quadranten-Gates zur Differenzierung zwischen GPI(+) und GPI(-) Zellen wurde unter Verwendung einer GPI(-) TK6 Zellpopulation (siehe 5.2) durchgeführt.

Bei der simultanen Aufarbeitung von mehreren Zell-Proben, wie es bei der Untersuchung einer Konzentrationsreihe der Prüfsubstanz mit Kontrollansätzen üblich ist, wurde festgestellt, dass die PE Fluoreszenz-Intensität der GPI(+) Zellen von Messung zu Messung kontinuierlich abgenommen hat. Aufgrund dessen wurde entschieden, einen auf Formaldehyd basierenden Fixierungsschritt in das Test-Protokoll einzubauen, um der Fluoreszenz-Abnahme entgegenzuwirken. Dem Fixierungspuffer wurde Actinomycin D (AD) zugesetzt, um ein Austreten von 7-AAD aus toten Zellen nach Entfernung von 7-AAD zu verhindern, was bereits von Fetterhoff und Kollegen beschrieben wurde (Fetterhoff et al., 1993).

Es wurde angenommen, dass die Wasch-Schritte der Zellen nach erfolgter Antikörper-Färbung einen sensiblen Punkt bei der Durchführung des Assays darstellen. Waschprozeduren dieser Art werden in der Regel nach jeder Antikörper-Färbung empfohlen, um unspezifisch gebundene Antikörper auf der Zelloberfläche zu entfernen und auf diese Weise die Fluoreszenz-basierte Trennung am Durchflusszytometer zu verbessern. Es sollte geklärt werden, ob die Wasch-Prozeduren bei der Aufarbeitung der Zellen möglicherweise

die Testresultate beeinflussen können, beispielsweise durch Unterschiede in der Wasch-Dauer. Um die Robustheit der Wasch-Schritte im Testprotokoll zu untersuchen, wurden Antikörper-gefärbte TK6 Zellen sowohl für 40 Sekunden (Standard im Testprotokoll) als auch für 80 Sekunden in der Waschlösung resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert, um die GPI(-) Frequenz zu bestimmen.

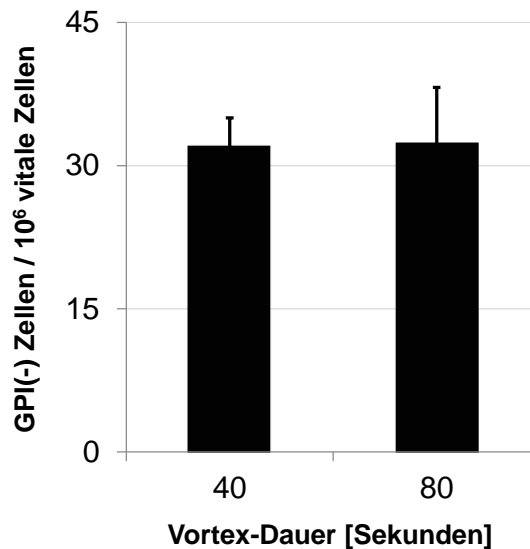


Abbildung 12: Einfluss der Wasch-Schritte auf die ermittelte GPI(-) Frequenz. Im Testprotokoll sind zwei Wasch-Schritte mittels Vortex Genie (mit Aufsatz) enthalten. Unter Verwendung von Antikörper-gefärbten TK6 Zellen wurde der Einfluss der Wasch-Schritte auf die durchflusszytometrisch ermittelte GPI(-) Frequenz untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus jeweils drei Bestimmungen.

Eine Verdopplung der Wasch-Zeit von 40 auf 80 Sekunden zeigte keinen Einfluss auf die GPI(-) Frequenzen, was die Robustheit der Wasch-Prozedur, einem vermeintlich sensiblen Schritt bei der Zellaufarbeitung, demonstrierte.

5.2 Generierung einer GPI(-) TK6 Zellpopulation mittels Proaerolysin

Die Verfügbarkeit einer GPI(-) Zellpopulation war für die Assay-Entwicklung von großer Bedeutung. Anhand von GPI(-) TK6 Zellen wurden Gate-Settings für die durchflusszytometrischen Analyse vorgenommen (siehe 5.1) und Experimente zur Methodvalidierung (siehe 5.4) durchgeführt.

Proaerolysin ist ein selektiv auf GPI(+) Zellen wirkendes, bakterielles Toxin (siehe 2.4). Zunächst wurde die Zytotoxizität von Proaerolysin auf TK6 Zellen mittels relativer Zellzahl (RCC) untersucht (siehe 4.5), um den Konzentrationsbereich des Toxins herauszufinden, ab welchem selektiv alle GPI(+) Zellen abgetötet werden (**Abbildung 13**).

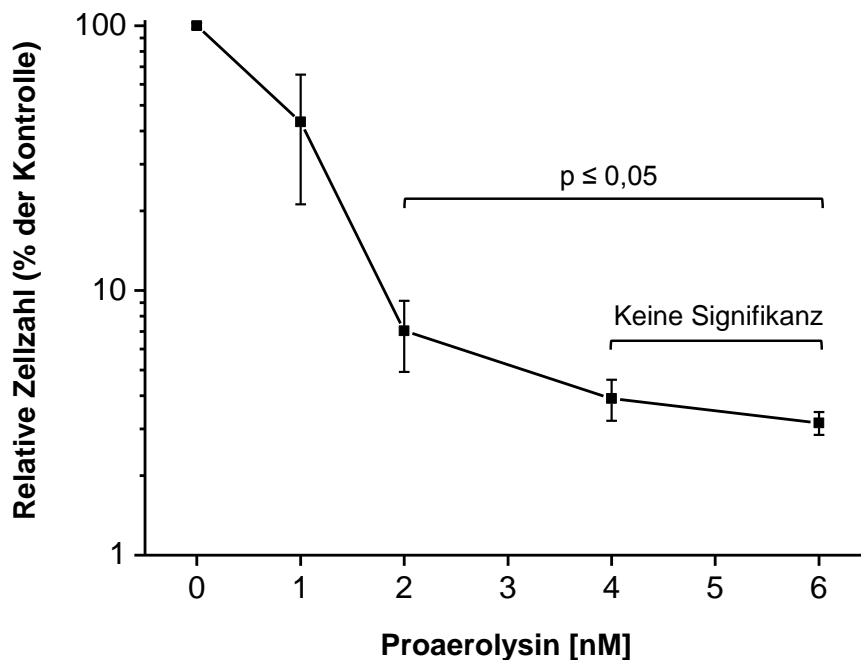


Abbildung 13: Zytotoxizität von Proaerolysin in TK6 Zellen ermittelt via relativer Zellzahl. Dargestellt sind Mittelwerte aus sechs Bestimmungen aus zwei unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde mittels ANOVA und Dunnett's T3 Posthoc Test ermittelt.

Es zeigte sich eine zunehmend zytotoxische Wirkung von Proaerolysin bis 4 nM. Aufgrund dessen wurde, unter Berücksichtigung eines zusätzlichen Sicherheitsabstandes von 1 nM, eine Proaerolysin-Konzentration von 5 nM zur Selektion von GPI(-) Zellen festgelegt. Im Falle der TK6 Zelllinie konnte auf diese Weise eine komplett GPI(-) Zellpopulation generiert werden (**Abbildung 14**).

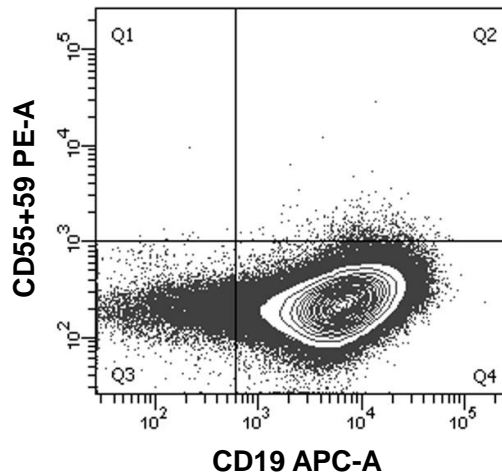


Abbildung 14: Durchflusszytometrische Analyse von Proaerolysin-behandelten TK6 Zellen. Nach Antikörper-Färbung von CD55, CD59 und CD19 wurden 1×10^6 Zellen aufgrund der Abwesenheit der GPI-verankerten Proteine CD55 und CD59 im Gate Q4 analysiert. Die Zellen wiesen jedoch das CD19 bedingte APC-Fluoreszenzsignal auf, da CD19 ein GPI unabhängiges Transmembran-Protein darstellt (Krüger et al., 2014).

Im Falle der WI-L2-NS Zelllinie ist die Generierung einer komplett GPI(-) Zellpopulation nicht gelungen. Neben GPI(-) WI-L2-NS Zellen ist es hier zum Auftreten einer Population mit geringer PE-Fluoreszenzintensität (GPI(/) Population) gekommen (**Abbildung 15**), was durch eine Erhöhung der Proaerolysin-Konzentration von 5 nM auf 10 nM in einem Folgeexperiment nicht unterbunden werden konnte.

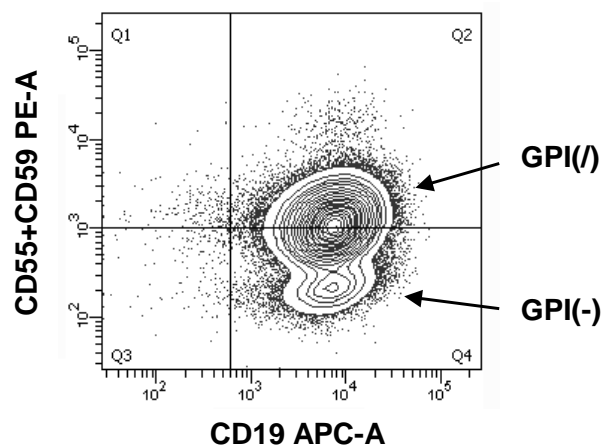


Abbildung 15: Durchflusszytometrische Analyse von Proaerolysin-behandelten WI-L2-NS Zellen. Neben GPI(-) Zellen ist es zum Auftreten einer GPI(/) Zellpopulation mit geringer PE-Fluoreszenzintensität gekommen.

Experimentell konnte die GPI(/) WI-L2-NS Population auf geringe Restbestände an GPI-verankertem CD55 sowie CD59 zurückgeführt werden. Für dieses Experiment wurden Proaerolysin-behandelte WI-L2-NS Zellen mit PI-PLC inkubiert (siehe 4.7), wobei eine Abnahme der GPI(/) und eine Zunahme der GPI(-) WI-L2-NS Zellpopulation festgestellt werden konnte (**Abbildung 16**).

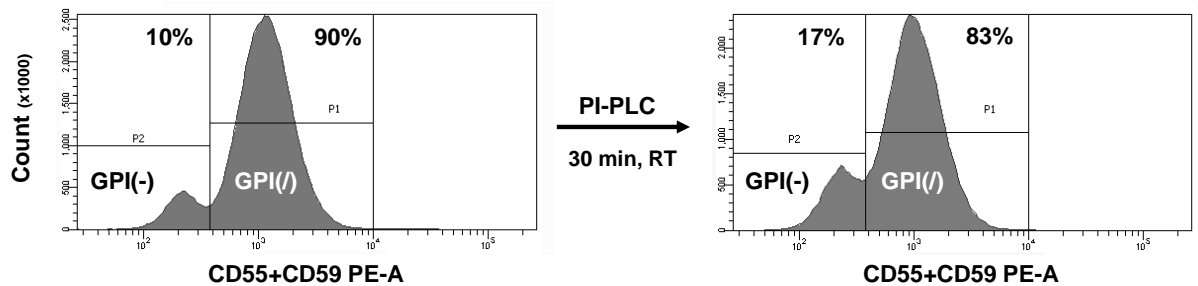


Abbildung 16: Behandlung der Proaerolysin-inkubierten WI-L2-NS Zellen mit PI-PLC. Dieses Enzym katalysiert die Spaltung von GPI, wobei GPI-gebundene Proteine freigesetzt werden. Durch die PI-PLC Behandlung konnte eine Abnahme von GPI(/) WI-L2-NS Zellen und eine gleichzeitige Zunahme von GPI(-) Zellen im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle beobachtet werden. Die Daten basieren auf einer Doppelbestimmung aus einer Zellpopulation.

Dies sprach dafür, dass eine enzymatische, durch PI-PLC katalysierte Spaltung von GPI auf der Oberfläche von GPI(/) Zellen erfolgte, weshalb auf die Anwesenheit geringer Mengen an GPI auf der Oberfläche von GPI(/) Zellen geschlossen werden konnte. Ebenso konnte eine unspezifische Bindung der anti-human CD55-PE und anti-human CD59-PE Antikörper an GPI(/) WI-L2-NS Zellen ausgeschlossen werden. Unspezifische Antikörper-Bindung wird hauptsächlich durch Fc-Rezeptoren auf den Zellen verursacht, die unspezifisch den Fc-Teil von Antikörpern der gleichen Spezies binden. Aufgrund dessen wurden die Proaerolysin-inkubierten WI-L2-NS Zellen vor der Antikörper-Färbung mit Fc-Rezeptor Block-Lösung versetzt, wodurch jedoch keine Abnahme der GPI(/) Zellen erzielt werden konnte. Zusammenfassend konnte somit das Auftreten der GPI(/) Teilpopulation auf geringe Restbestände an GPI-verankertem CD55 sowie CD59 und nicht auf unspezifische Antikörper-Bindung zurückgeführt werden.

Eine definitive Erklärung für das Auftreten der GPI(/) WI-L2-NS Teilpopulation nach Behandlung der Zellen mit Proaerolysin kann nicht gegeben werden. Möglicherweise wies die WI-L2-NS Zelllinie bereits Zellen mit geringen GPI-Residuen auf der Zelloberfläche auf, die vergleichbar zu GPI(-) Zellen resistent gegenüber Proaerolysin waren und damit ebenfalls mittels Proaerolysin-Behandlung selektioniert wurden und nachfolgend die GPI(/) Zellpopulation ausbildeten.

5.3 Abreicherung von GPI(-) Zellen und Inkulturnahme von GPI(-) abgereicherten Zellen

Die Sensitivität eines Mutagenitäts-Tests ist entscheidend vom Anteil bereits vorhandener Mutanten-Zellen (in dieser Arbeit GPI(-) Zellen) abhängig. Mit einem sinkenden Anteil an GPI(-) Zellen in unbehandelten Kontrollansätzen nimmt die Sensitivität der Untersuchung zu, da mutagene Effekte (die Zunahme an GPI(-) Zellen bedingt durch die Behandlung der Zellen mit einem mutagenen Agens) eindeutiger im Vergleich zu niedrigen Kontrollwerten erkennbar sind. Die durchflusszytometrische Analyse der käuflich erworbenen TK6 Zelllinie wies ~3000 GPI(-) Zellen in 10^6 Zellen, die WI-L2-NS Zelllinie ~50 in 10^6 Zellen auf. Aufgrund dessen war die Entwicklung einer Abreicherung-Methodik zur Depletion vorhandener GPI(-) Zellen vor allem für die TK6 Zelllinie eine zwingende Voraussetzung.

Die entwickelte Abreicherungs-Methodik basierte auf der Bindung des GPI-verankerten Membranproteins CD59 an anti-human CD59 Antikörper, die hierzu auf spezielle Zellkulturschalen gebunden wurden (siehe 4.4). Nach einstündiger Inkubationszeit bildeten die CD59-präsentierenden GPI(+) TK6 Zellen einen fixen Zelloberlayer durch die Bindung an den Antikörper aus. Dieser Zelloberlayer konnte anschließend mehrmals mit RPMI-1640 Medium gewaschen werden, wobei ungebundene GPI(-) Zellen nahezu quantitativ entfernt wurden. Die über CD59 Antikörper gebundenen GPI(+) Zellen konnten anschließend durch Resuspendieren wieder in Kultur genommen werden. Durch die Durchführung einer Abreicherung konnte die Anzahl an GPI(-) TK6 Zellen von ~3000 auf 75 in 10^6 reduziert werden, weswegen die bereits abgereicherten Zellen einer weiteren Abreicherung unterzogen wurden, wodurch die Anzahl an GPI(-) Zellen weiter gesenkt werden konnte. In **Abbildung 17** ist die mittels einer zweifachen Abreicherung erzielte Reduktion der GPI(-) TK6 Zellen dargestellt.

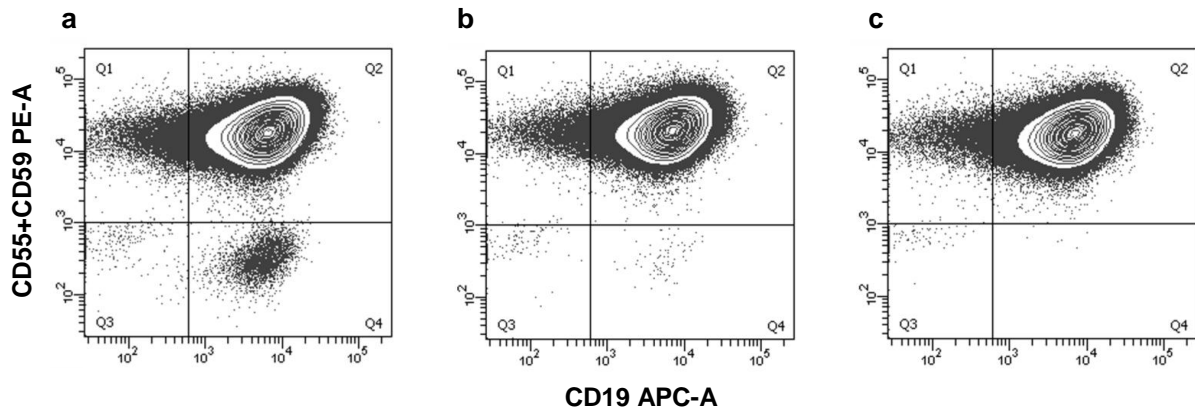


Abbildung 17: Abreicherung von GPI(-) TK6 Zellen durch Antikörper-bindende Zellkulturschalen. GPI(+) Zellen waren im Gate Q2 lokalisiert und GPI(-) TK6 Zellen aufgrund der Abwesenheit von CD55 und CD59 im Gate Q4. **a** TK6 Zellen ohne Abreicherung, **b** nach einem Abreicherungsschritt von GPI(-) Zellen und **c** nach dem zweiten Abreicherungsschritt (modifiziert nach Krüger et al., 2014).

Experimentell wurde darüber hinaus die Reproduzierbarkeit der entwickelten Abreicherungsmethodik sowie der Inkulturnahme von GPI(-) abgereicherten TK6 Zellen durchflusszytometrisch bestätigt (**Abbildung 18**).

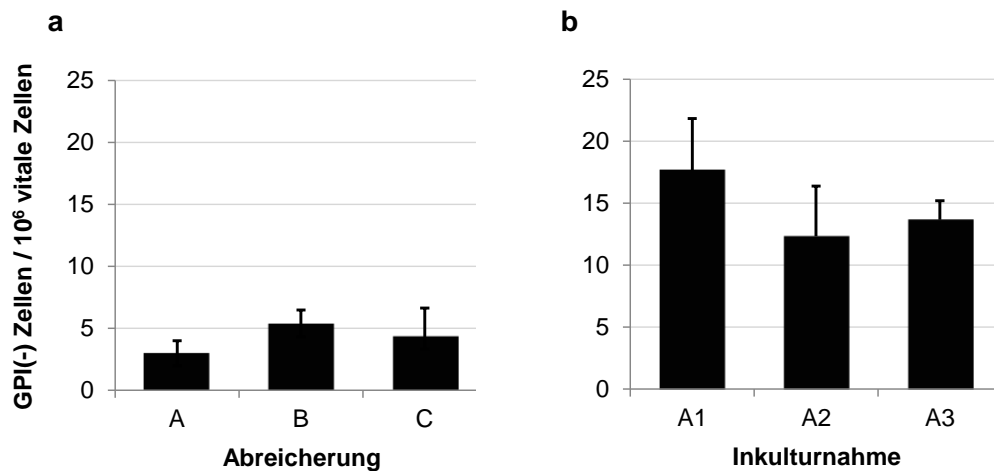


Abbildung 18: Abreicherung und Inkulturnahme von GPI(-) abgereicherten TK6 Zellen. **a** Die Abreicherungs-Prozedur wurde in drei unabhängigen Experimenten (A, B und C) auf deren Reproduzierbarkeit untersucht. Gezeigt ist die GPI(-) Frequenz sechs Tage nach erfolgter Abreicherung, nachdem genügend Zellen für eine Kryokonservierung zur Verfügung standen. **b** Anschließend wurden von Abreicherung A drei kryokonservierte Aliquots (A1, A2 und A3) in Kultur genommen. Gezeigt ist die GPI(-) Frequenz zwei Tage nach Inkulturnahme. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus drei Bestimmungen.

Durch die Inkulturnahme ist es bei allen drei Durchführungen zu einer Erhöhung der GPI(-) Frequenz von ~5 auf ~15 in 10^6 Zellen gekommen. Eine Erklärung hierfür könnte ein schwach ausgeprägter Selektionsvorteil von GPI(-) Zellen beim Auftau-Prozess sein. Dennoch stellte dieser Wert eine geeignete Ausgangsbedingung dar, um sensitiv auf Mutagenität prüfen zu können.

Bezüglich der WI-L2-NS Zelllinie zeigte sich eine einfache Abreicherung als ausreichend, da die käuflich erworbenen WI-L2-NS Zellen mit ~50 in 10^6 einen wesentlich niedrigeren Gehalt an GPI(-) Zellen im Vergleich zur TK6 Zelllinie aufwies.

Für Mutagenitäts-Untersuchungen wurden stets abgereicherte Zellen frisch in Kultur genommen und bis maximal Tag vier nach Inkulturnahme für Behandlungen eingesetzt. Der Grund hierfür war, dass bedingt durch die spontane Entstehung von GPI(-) Zellen diese langsam in der Zellkultur akkumulierten, wodurch die Sensitivität der Untersuchung sank. Das Ausmaß des spontanen Auftretens von GPI(-) Zellen wird durch die spontane GPI(-) Rate beschrieben, welche experimentell bestimmt wurde (siehe 5.6).

5.4 Methodvalidierung

5.4.1 Wiederfindungsanalyse mittels TK6 Zellen und Durchflusszytometrie

Um die Funktionalität der zuvor entwickelten Färbestrategie (siehe 5.1) zu untersuchen, wurden Wiederfindungsanalysen mittels GPI(-) TK6 Zellen durchgeführt. Hierzu wurden Zellproben mit unterschiedlichen GPI(-) Frequenzen hergestellt (siehe 4.8.1). Größenordnungsmäßig handelte es sich dabei um Zusätze von bis zu 100 GPI(-) Zellen in 10^6 Mutanten-abgereicherte TK6 Zellen. Anschließend wurden die Zellproben durchflusszytometrisch analysiert, um zu untersuchen, ob die zugesetzten GPI(-) Zellen quantitativ mittels Antikörperfärbung und Durchflusszytometrie detektiert werden. **Abbildung 19** zeigt die Korrelation zwischen detektierten und zugesetzten GPI(-) Zellen, wobei der mittlere Steigungswert von zwei unabhängigen Experimenten bei 1,09 (1,18 und 1,00) lag, was die Funktionalität der Färbestrategie demonstrierte.

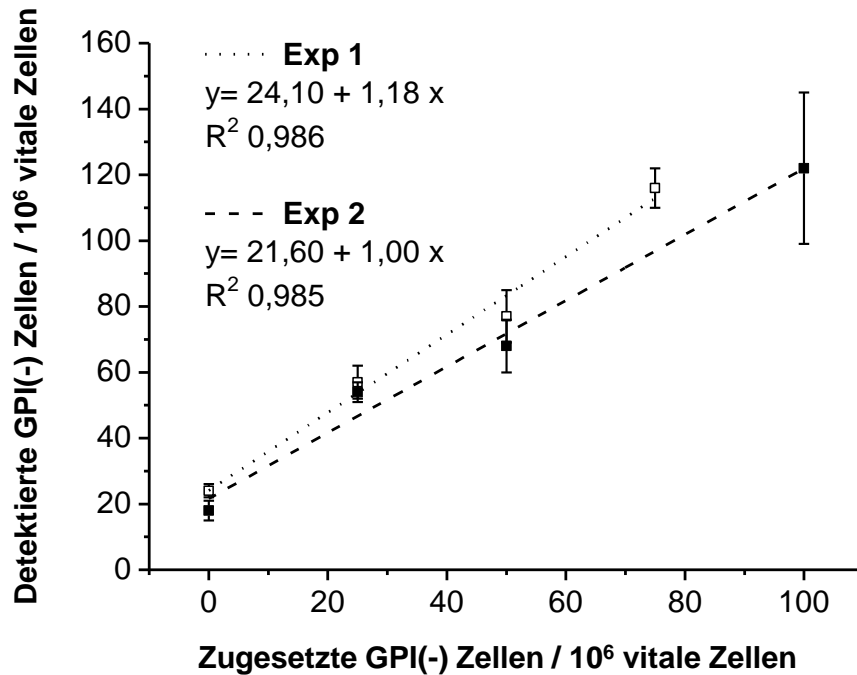


Abbildung 19: Wiederfindung zugesetzter GPI(-) TK6 Zellen mittels Durchflusszytometrie. 1×10^6 GPI(+) Zellen wurden von jeder Probe zur Bestimmung der GPI(-) Frequenz analysiert. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte \pm SD aus drei Bestimmungen sowie Daten aus einem zweiten, unabhängigen Experiment (Krüger et al., 2014).

5.4.2 Durchflusszytometrie vs. Proaerolysin-Selektion

Die Durchflusszytometrie stellt eine neuartige Methodik für die *in vitro* Mutagenitäts-Prüfung dar, die einer Evaluation bedurfte. Die klassischen *in vitro* Mutagenitäts-Testsysteme wie der HPRT oder TK Assay basieren auf bestimmten Selektionsprozeduren. Unter Verwendung von Suspensionszellen wie TK6 werden die zuvor behandelten Zellen nach der Phänotyp-Expressionszeit sowohl unter selektiven, als auch unter nicht-selektiven Bedingungen in 96-Well Platten ausgestreut (siehe 2.2.2). Diese klassische Herangehensweise lässt sich ebenfalls zur Bestimmung der GPI(-) Frequenz anwenden, wobei Proaerolysin als Selektions-Agens dient. Daher sollte diese klassische Methodik basierend auf einer Proaerolysin-Selektion mit dem durchflusszytometrischen Ansatz unter Verwendung von TK6 Zellen verglichen werden. Hierzu wurden TK6 Zellproben mit unterschiedlichem Gehalt an GPI(-) Zellen hergestellt (siehe 4.8.2) und simultan via Proaerolysin-Selektion und via Durchflusszytometrie analysiert. Anschließend wurden die Ergebnisse beider Methoden korreliert. Dabei zeigte sich eine lineare Korrelation mit einem mittleren Steigungswert von 1,00 (0,83 und 1,17), was die Vergleichbarkeit der beiden Methoden zur Quantifizierung der GPI(-) Frequenz demonstrierte (**Abbildung 20**).

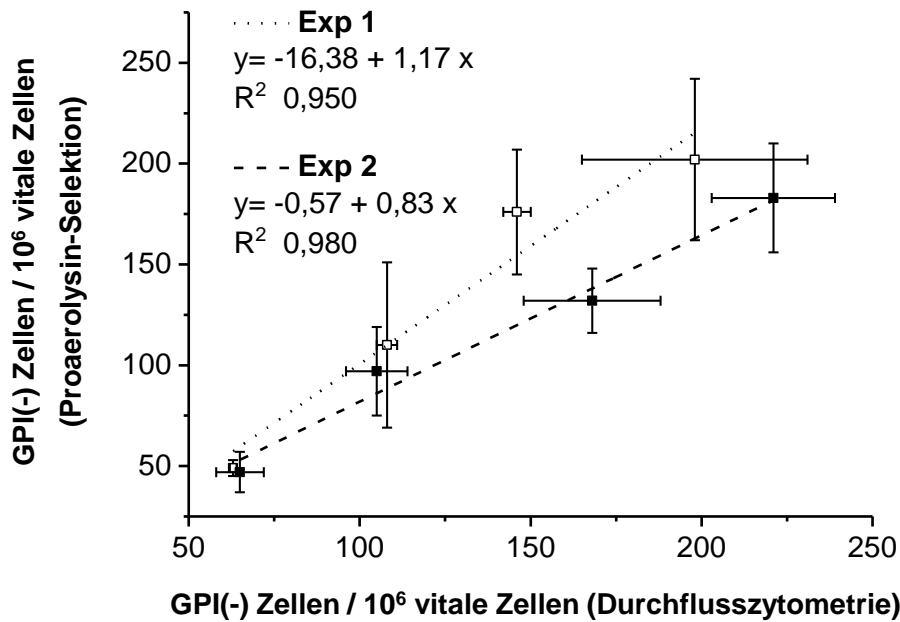


Abbildung 20: Korrelation der durchflusszytometrischen und der Proaerolysin-basierten Methodik zur Bestimmung der GPI(-) Frequenz. Die Zell-Proben wurden simultan mittels beider Methoden untersucht und die jeweils ermittelten GPI(-) Frequenzen wurden korreliert. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte \pm SD von drei Bestimmungen sowie Daten aus einem zweiten, unabhängigen Experiment (Krüger et al., 2014).

5.4.3 Populationsverdopplungszeit von TK6 und WI-L2-NS Zellen in Abhängigkeit des GPI-Status

Unter der PVZ wird das Zeitintervall verstanden, welches für die Verdopplung der Zellzahl in einer Kultur benötigt wird. Für einen Mutagenitäts-Test ist es von entscheidender Bedeutung, dass Mutanten- und Wildtyp-Zellen keinen signifikanten Unterschied in der PVZ aufweisen, da es anderweitig zu artifiziellen Testresultaten kommt. Aufgrund dessen war die Ermittlung der PVZ in Abhängigkeit des GPI-Status im Rahmen dieser Arbeit von Interesse. Des Weiteren wurde die PVZ für die Berechnung der spontanen GPI(-) Rate von TK6 und WI-L2-NS Zellen eingesetzt (siehe 5.6). Zur Bestimmung der PVZ von GPI(+) und GPI(-) TK6 sowie von GPI(+) WI-L2-NS Zellen wurden diese in 6-Well Platten ausgestreut und die Zellzahl in regelmäßigen Abständen bestimmt (siehe 4.8.3).

Auf diese Weise konnte für die TK6 Zelllinie eine PVZ von $13,4 \pm 0,6$ für GPI(+) und von $13,7 \pm 0,1$ für GPI(-) Zellen ermittelt werden. Demnach war kein signifikanter Proliferations-Unterschied der TK6 Zellen in Abhängigkeit des GPI-Status erkennbar. Die TK6 Zellen wiesen somit eine mittlere PVZ von $13,55 \pm 0,43$ h auf. Die PVZ von WI-L2-NS Zellen betrug $13,07 \pm 0,38$ h.

5.5 Untersuchung von Positiv- und Negativ-Kontrollen

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Untersuchung von mutagenen Positiv- sowie von nicht-mutagenen Negativ-Kontrollen dargestellt. Vor den eigentlichen Mutagenitäts-Experimenten mussten jedoch passende Rahmenbedingungen geschaffen werden. Hierzu zählten ein einheitliches Verfahren zur Festlegung der höchsten Behandlungsdosis basierend auf der Zytotoxizität der Behandlung, sowie die Festlegung einer optimalen GPI(-) Phänotyp-Expressionszeit.

5.5.1 Relative Zellzahl-Zunahme (RICC) zur Festlegung der Top-Dosis

Um einheitliche Bedingungen für die Behandlungen zu schaffen, wurde zur Festlegung der höchsten Behandlungs-Dosis der empfindliche, auf Zellproliferation basierende Parameter „relative Zellzahl-Zunahme“ (*relative increase in cell counts*, RICC) herangezogen, wobei die höchste Dosis einen RICC-Wert von 10 – 20% im Vergleich zur Kontrolle aufzeigen sollte. Falls die untersuchte Testsubstanz bis zu einer Konzentration von 10 mM nicht zu einem RICC-Wert zwischen 10 – 20 % bezogen auf die Kontrolle führte, wurden 10 mM als höchste Behandlungskonzentration festgelegt. Für die Ermittlung von RICC zur Festlegung der Top-Dosis wurden die Zellen nach der Behandlung in 24-Well Platten ausgestreut und ihr Proliferations-Verhalten untersucht (siehe 4.10.1, Ermittlung von RICC zur Festlegung der Top-Dosis).

Um RICC als Parameter zur Bestimmung zytotoxischer Effekte besser beurteilen zu können, wurden TK6 Zellen mit der höchsten EMS-Dosis (800 µM für 4 h) inkubiert, wodurch unterschiedliche Zytotoxizitäts-Parameter anhand einer Zytotoxizitäts-Kinetik über 10 Tage untersucht und verglichen wurden. Neben RICC wurden dazu die „Relative Zellzahl“ (*relative cell counts*, RCC) sowie die Membran-Integrität der Zellen mittels 7-AAD experimentell bestimmt.

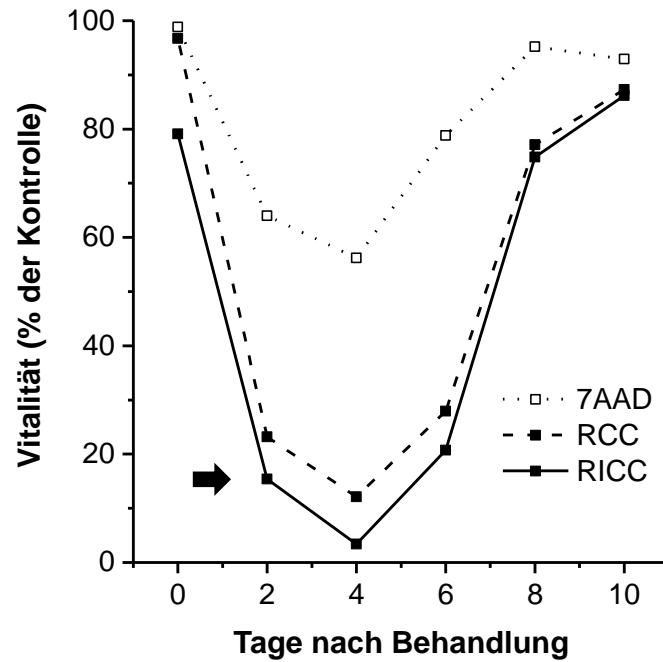


Abbildung 21: EMS-induzierte Zytotoxizität in TK6 Zellen. Die Zellen wurden mit der höchsten EMS-Dosis (800 μ M) behandelt. Nach 4-stündiger Inkubation wurde EMS aus dem Medium entfernt. Die Zellen wurden jeden zweiten Tag über 10 Tage subkultiviert, wobei die Vitalität der Zellen mittels 7-AAD Färbung, RCC sowie RICC ermittelt wurde. Der markierte RICC-Wert wurde zur Festlegung der höchsten Behandlungs-Dosis (10 – 20 % Vitalität bezogen auf die Kontrolle, 48 h nach erfolgter Behandlung) herangezogen. Dargestellt sind Mittelwerte von vier Bestimmungen aus zwei unabhängigen Experimenten (Krüger et al., 2014).

Anhand **Abbildung 21** lässt sich erkennen, dass es sich bei RICC um den empfindlichsten und bei der 7-AAD Färbung um den unempfindlichsten der untersuchten Parameter zur Untersuchung zytotoxischer Effekte handelte. Der Grund hierfür war, dass RICC bereits einen transienten Zellzyklus-Arrest ohne akut toxischen Effekt anzeigt, wohingegen die Vitalität der Zellen gemessen anhand der 7-AAD Färbung erst beeinträchtigt wird, wenn die Integrität der Zellmembran durch akut toxische Effekte nicht mehr gewährleistet ist. RCC basiert, vergleichbar zu RICC, auf Zellzahl-Messungen, wobei bei der Berechnung von RCC die ermittelte Zellzahl und nicht, wie bei RICC, die Zellzahl-Zunahme für die Berechnung herangezogen wird. Aufgrund dessen war die RICC-ermittelte Zytotoxizität der Zellen im Vergleich zu RCC stets etwas stärker ausgeprägt.

Die Zytotoxizitäts-Kinetik demonstrierte eine zunehmende Zytotoxizität der EMS-Behandlung bis Tag 4 nach der Behandlung. Am Tag 4 stellte sich dabei ein nahezu kompletter Wachstums-Arrest ein (RICC = 3,4 %), wobei der Anteil toter Zellen 56,2 % betrug. Ab Tag 4

kam es zu einer Zunahme der Zell-Vitalität und am Tag 10 erreichte die Zell-Vitalität der EMS behandelten Zellen wieder nahezu das Niveau von unbehandelten Kontroll-Zellen.

Demnach war davon auszugehen, dass durch die Wahl von RICC zur Ermittlung der höchsten Behandlungs-Dosis keine zu ausgeprägte Zytotoxizität vorlag und zum Zeitpunkt der durchflusszytometrischen Analyse (10-11 Tage nach Behandlung) ausreichend vitale Zellen zur Ermittlung der GPI(-) Frequenz zur Verfügung standen.

5.5.2 GPI(-) Phänotyp-Expressionszeit

Mutagene Effekte lassen sich nach erfolgter Behandlung erst nach einer bestimmten Nachinkubations-Zeit, der sogenannten „Phänotyp-Expressionszeit“ ermitteln. Diese Zeitspanne wird zum einen dafür benötigt, die durch eine mutagene Behandlung induzierten genotoxischen Läsionen als Mutationen zu fixieren (siehe 2.1), zum anderen benötigt ein veränderter Genotyp eine bestimmte Zeit, um phänotypisch sichtbar zu werden, da bestehende mRNA und vorhandene Proteine erst degradiert oder durch Zellproliferation verdünnt werden müssen. Im Falle einer dysfunktionalen GPI-Biosynthese entspricht die phänotypische Veränderung dem Verlust GPI-verankerter Proteine wie CD55 und CD59.

Zur Ermittlung der GPI(-) Phänotyp-Expressionszeit wurden TK6 Zellen in einem Vorversuch mit 150 µM EMS für 24 h behandelt und anschließend bis Tag 4 nach der Behandlung subkultiviert. Am Tag 4 sollte die GPI(-) Frequenz durchflusszytometrisch analysiert werden, wobei auffiel, dass die Zellwolken der GPI(+) Wildtyp-Zellen sowohl im Scatter-Profil wie auch im CD55/59-PE – CD19-APC Dotplot am Tag 4 nach EMS Behandlung im Vergleich zu den Zellwolken unbehandelter Kontrollen vergrößert waren. Dies konnte ebenfalls für zytotoxische UV-C Behandlungen festgestellt werden (Daten nicht dargestellt). Dieser Sachverhalt sollte experimentell weiter untersucht werden, da eine vergleichbare Form der Zellwolken von Behandlungs- und Kontrollansätzen eine zwingende Voraussetzung für eine valide durchflusszytometrische Auswertung ist. Hierzu wurden GPI(+) und GPI(-) TK6 Zellen im Verhältnis 1:1 gepoolt und erneut mit 150 µM EMS für 24 h behandelt. Es konnte beobachtet werden, dass sowohl die Zellwolke von GPI(+) Zellen, als auch die Zellwolke von GPI(-) Zellen am Tag 4 nach der Behandlung vergrößert waren (**Abbildung 22**).

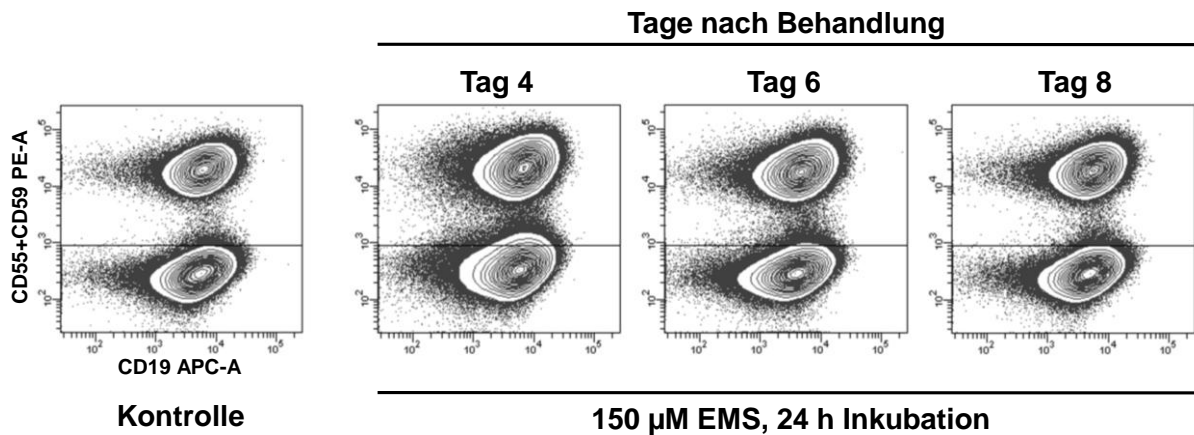


Abbildung 22: Vergrößerung der Zellwolken im CD55/59-PE – CD19-APC Dotplot nach EMS Behandlung. Ein gepoolter Ansatz aus GPI(+) und GPI(-) Zellen wurde mit EMS (150 µM, 24 h) behandelt und anschließend bis Tag 8 nach Behandlung subkultiviert, wobei die Zellen an Tag 4, 6 und 8 nach der Behandlung durchflusszytometrisch analysiert wurden.

Die Vergrößerung der Zellwolken nach EMS-Behandlung stellte sich als reversibel heraus, weswegen Zytotoxizität als mögliche Ursache zu sehen war. Ab Tag 8 nach der Behandlung waren die Zellwolken von GPI(+) und GPI(-) TK6 Zellen wieder mit den Zellwolken unbehandelter Kontroll-Zellen vergleichbar, weswegen Tag 8 als frühestmöglicher Zeitpunkt zur Ermittlung der GPI(-) Frequenz mittels Durchflusszytometrie festgelegt wurde. Nachfolgend konnten die Phänotyp-Expressionszeiten für die Zelllinien TK6 sowie WI-L2-NS ermittelt werden.

Phänotyp-Expressionszeit der TK6 Zelllinie

Um die optimale Phänotyp-Expressionszeit für die TK6 Zelllinie zu ermitteln, wurden die Zellen mit 200 µM und 800 µM EMS für 4 h behandelt. Dieser Ansatz wurde gewählt, um sicherzustellen, dass die ermittelte Phänotyp-Expressionszeit sowohl für zytotoxische, als auch für nicht-zytotoxische Behandlungen geeignet ist. Wie in **Abbildung 23** gezeigt, stellte sich 10 Tage nach der Behandlung sowohl für die mit 200 µM als auch für die mit 800 µM EMS inkubierten TK6 Zellen ein Plateau der GPI(-) Frequenzen ein. Aufgrund dessen wurde eine Phänotyp-Expressionszeit von 10 Tagen für 4 h Inkubationen festgelegt.

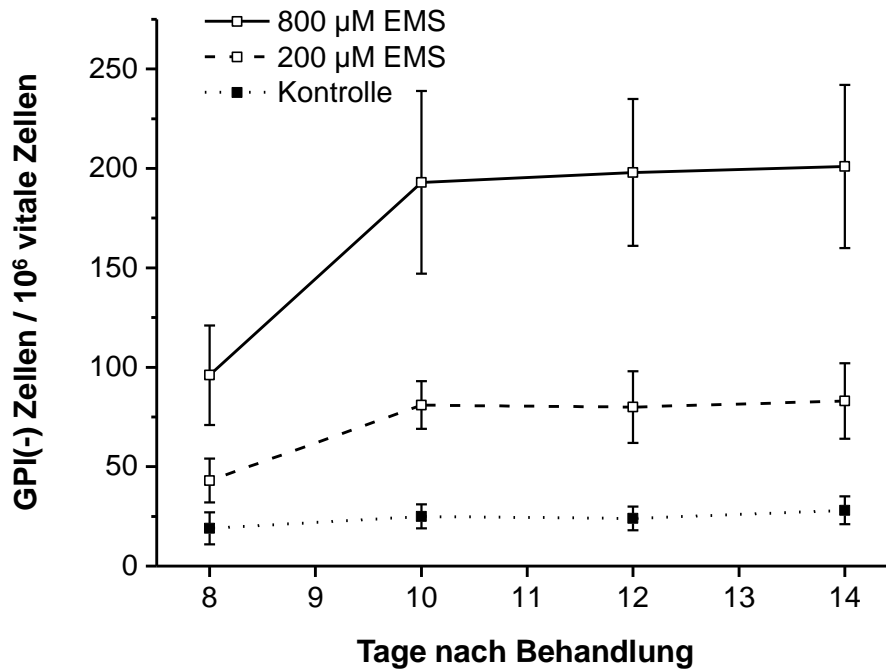


Abbildung 23: GPI(-) Phänotyp-Expressionszeit nach 4 h Inkubationen (TK6). Die Zellen wurden mit 200 µM und 800 µM EMS für 4 h inkubiert. Die GPI(-) Frequenz wurde am Tag 8, 10, 12 und 14 nach EMS-Behandlung durchflusszytometrisch bestimmt. Der GPI(-) Phänotyp war am Tag 10 nach der Behandlung vollständig exprimiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD von sechs Bestimmungen aus zwei unabhängigen Experimenten (Krüger et al., 2014).

Für die Untersuchung der Phänotyp-Expressionszeit nach 24 h Inkubationen wurden TK6 Zellen mit 150 µM EMS behandelt und die GPI(-) Frequenz wurde am Tag 8, 10, 12 und 14 nach der Behandlung ermittelt (Experiment 1, **Abbildung 24**). Dabei zeigte sich ein kontinuierlicher Anstieg der GPI(-) Frequenz von Tag 8 bis Tag 14 nach Behandlung. Für ein darauffolgendes Experiment wurden die Zellen mit 150 µM sowie 200 µM EMS inkubiert und die GPI(-) Frequenz wurde am Tag 11, 13 und 15 nach Behandlung bestimmt, wobei von Tag 11 bis Tag 15 sowohl für die 150 µM als auch die 200 µM EMS Inkubation kein signifikanter Anstieg der GPI(-) Frequenz festgestellt werden konnte (Experiment 2, **Abbildung 24**). Aufgrund dessen wurden 11 Tage als Phänotyp-Expressionszeit für 24 h Inkubationen festgelegt.

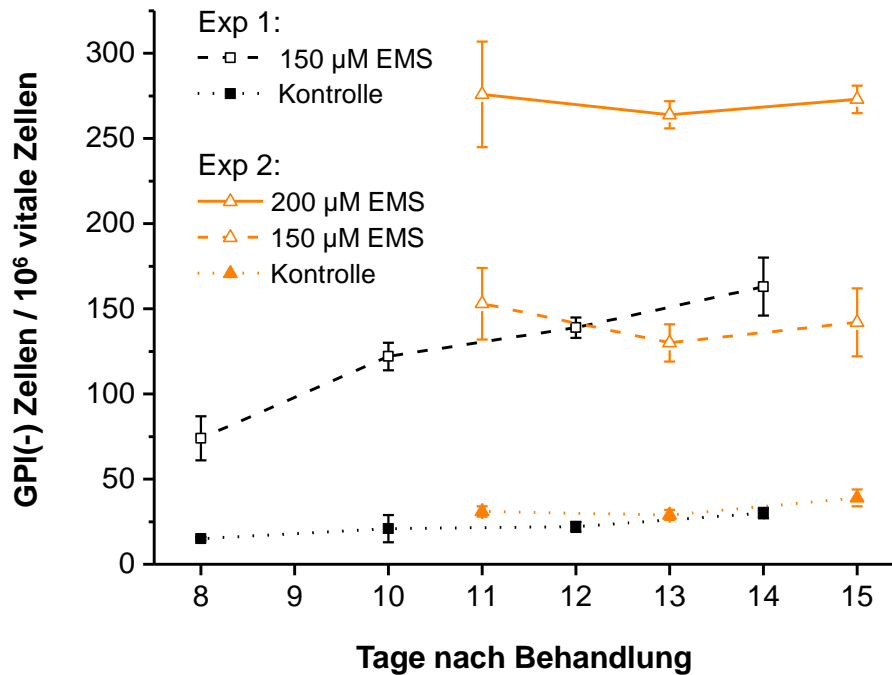


Abbildung 24: GPI(-) Phänotyp-Expressionszeit nach 24 h Inkubationen (TK6). Die Zellen wurden im Experiment 1 mit 150 μM und im Experiment 2 mit 150 μM sowie 200 μM EMS für 24 h inkubiert. Die GPI(-) Frequenz wurde im Experiment 1 am Tag 8, 10, 12 und 14 und im Experiment 2 am Tag 11, 13 und 15 nach EMS-Behandlung durchflusszytometrisch analysiert. Der GPI(-) Phänotyp war am Tag 11 nach der Behandlung vollständig exprimiert. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD von drei Bestimmungen.

Phänotyp-Expressionszeit der WI-L2-NS Zelllinie

Um die Phänotyp-Expressionszeit der WI-L2-NS Zelllinie zu ermitteln, wurden die Zellen mit 800 μM EMS für 4 h behandelt. Vergleichbar zur TK6 Zelllinie stellte sich unter Verwendung der WI-L2-NS Zelllinie ein Plateau der GPI(-) Frequenz 10 Tage nach der Behandlung ein (**Abbildung 25**). Aufgrund dessen wurde für die WI-L2-NS Zelllinie ebenfalls eine Phänotyp-Expressionszeit von 10 Tagen für 4 h Inkubationen festgelegt. Im Vergleich zur TK6 Zelllinie (**Abbildung 23**) war bei der WI-L2-NS Zelllinie der Gehalt an induzierten GPI(-) Zellen deutlich geringer ausgeprägt, was sich durch Substanzuntersuchungen (siehe 5.5.4) bestätigte.

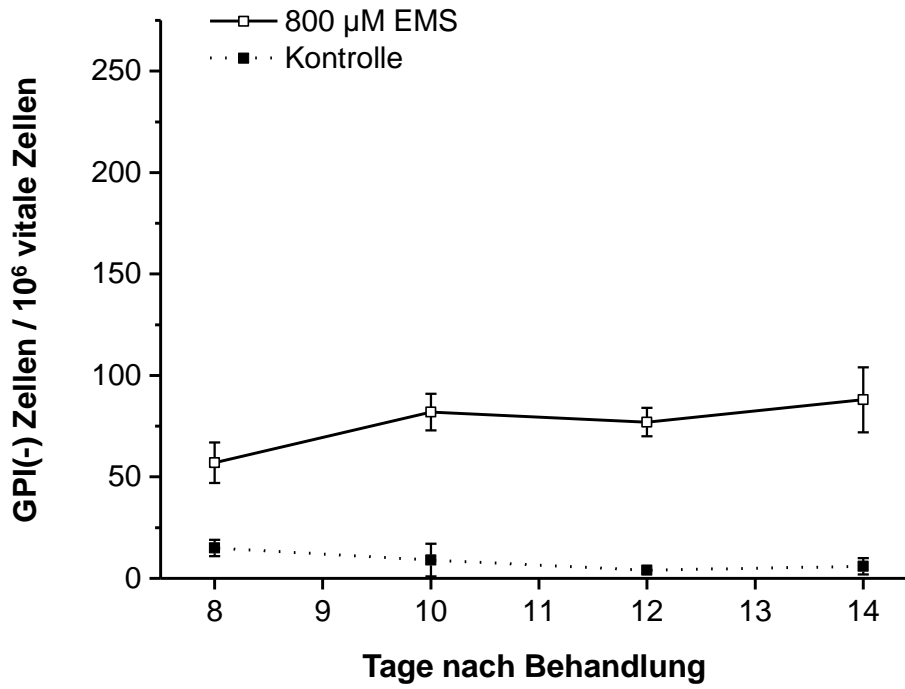


Abbildung 25 GPI(-) Phänotyp-Expressionszeit nach 4 h Inkubationen (WI-L2-NS). Die Zellen wurden mit 800 µM EMS für 4 h inkubiert. Die GPI(-) Frequenz wurde am Tag 8, 10, 12 und 14 nach EMS-Behandlung durchflusszytometrisch bestimmt. Der GPI(-) Phänotyp war am Tag 10 nach der Behandlung vollständig exprimiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD von sechs Bestimmungen aus zwei unabhängigen Experimenten.

5.5.3 Zusammenfassende Beschreibung der Testdurchführung

Nachdem RICC zur Festlegung der höchsten Behandlung-Dosis und die optimale Phänotyp-Expressionszeit für 4 h sowie 24 h Behandlungen eruiert waren, kann die gesamte Test-Durchführung folgendermaßen zusammengefasst werden (**Abbildung 26**):

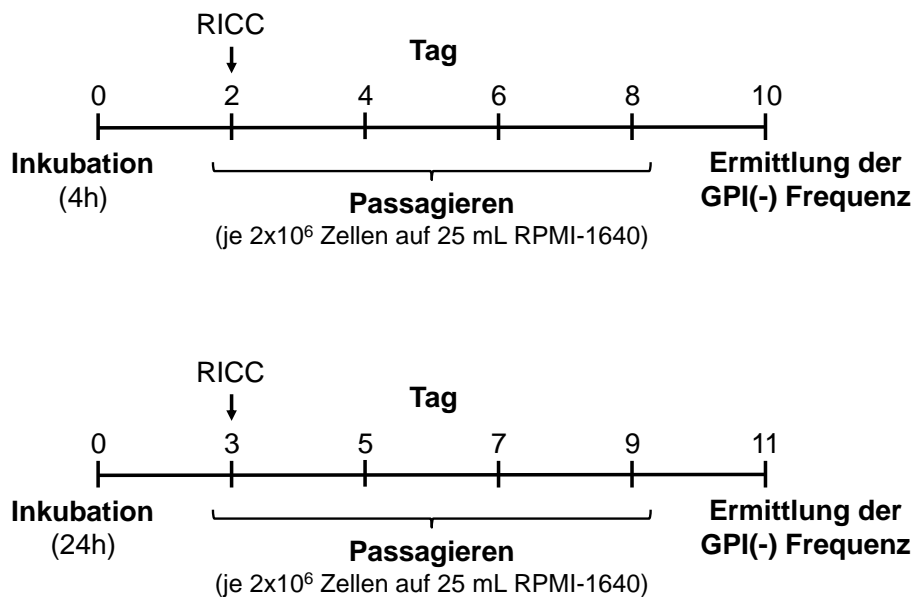


Abbildung 26: Schematische Durchführung des *in vitro* PIG-A Assays, wie er im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde. Nach Behandlung der Zellen mit der Testsubstanz wurden die Zellen gewaschen, in frisches Medium ausgestreut und über die Phänotyp-Expressionszeit nach dem dargestellten Schema bis zur Ermittlung der GPI(-) Frequenz alle zwei Tage subkultiviert. Prinzipiell sind ebenfalls andere Passagier-Schemata möglich (siehe 8.6.1).

Die Verschiebung der Tage, an denen die Zellen subkultiviert wurden sowie des Tages zur Ermittlung der GPI(-) Frequenz lag in den unterschiedlichen Inkubationszeiten begründet. Die 24 h Inkubationen wurden erst am Tag 1 nach Behandlungsbeginn gestoppt und die Zellen wurden am Tag 3 passagiert. Daher verschob sich ebenfalls der Tag zur Ermittlung von RICC von Tag 2 (4 h Inkubationen) auf Tag 3 (24 h Inkubationen).

5.5.4 Untersuchung von Positiv- und Negativ-Kontrollen auf Mutagenität

Die Funktionalität des *in vitro* PIG-A Assays wurde unter Verwendung von Positiv- sowie Negativ-Kontrollen untersucht. Als Positiv-Kontrollen wurden die Mutagene EMS, NQO und UV-C Bestrahlung eingesetzt, als Negativ-Kontrollen dienten Pyridin und der Proteinbiosynthese-Hemmstoff Cycloheximid (**Abbildung 27**).

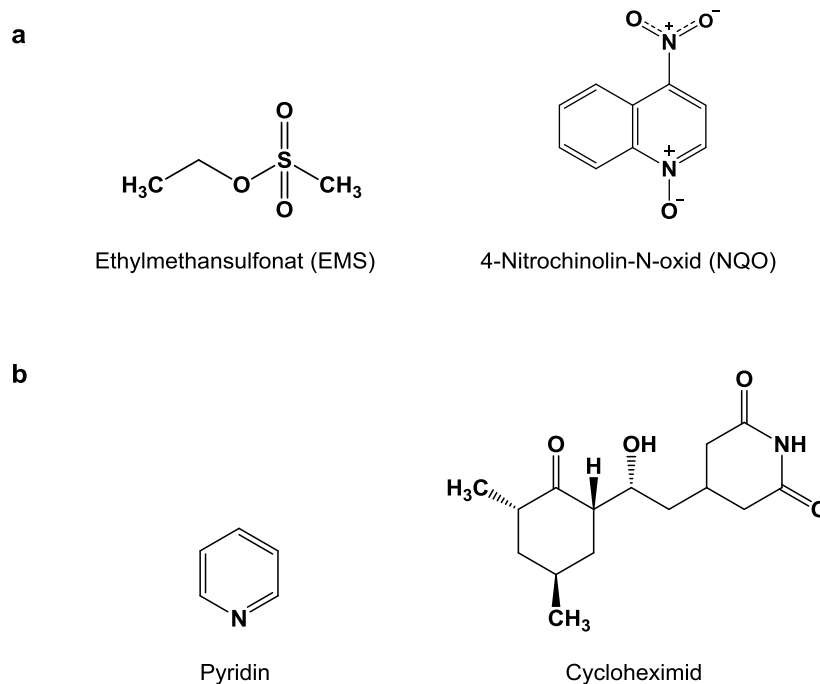


Abbildung 27: Chemische Strukturen der verwendeten **a** Positiv- und **b** Negativ-Kontrollen.

EMS ist eine DNA alkylierende Verbindung, wobei 2,1 – 3,1 % der Total-Alkylierung *in vitro* die mutagene O⁶-Position der DNA-Base Guanin betrifft (zusammengefasst in Beranek, 1990), was zu GC → AT Transitionen führen kann (**Abbildung 1**). Die Ausbildung des O⁶-Ethyl-Addukts ist in **Abbildung 28** dargestellt. Dabei handelt es sich um eine nukleophile Substitution, die sowohl nach S_N1, als auch nach S_N2 Mechanismus ablaufen kann (zusammengefasst in Beranek, 1990). DNA-Schäden in Form von alkylierten DNA-Basen können in Abhängigkeit der betroffenen Base sowie der Alkylierungs-Position von unterschiedlichen DNA-Reparaturenzymen entfernt werden. Während die Ethylgruppe von O⁶-Ethylguanin beispielsweise von der O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) entfernt wird (Jacinto und Esteller, 2007), ist die Basenexzisionsreparatur (BER) für die Reparatur von alkyliertem N³-Adenin verantwortlich (Sedgwick et al., 2007).

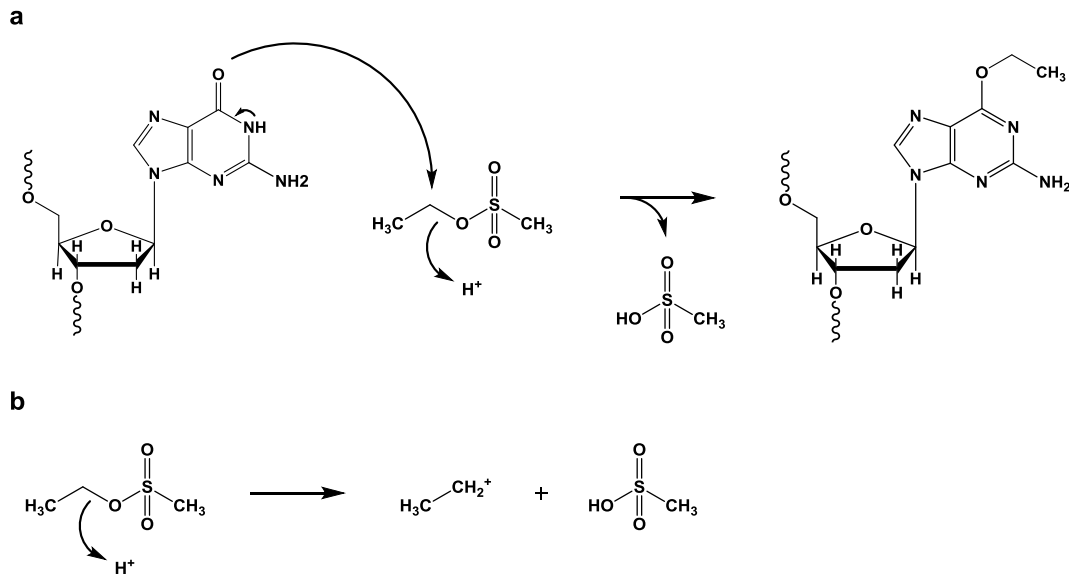


Abbildung 28: Mechanistische Darstellung der O⁶-Ethylierung von Guanosen durch EMS. Dabei handelt es sich um eine nukleophile Substitution, die sowohl nach **a** S_N2 als auch nach **b** S_N1 Mechanismus verlaufen kann. Im Falle eines S_N1 Mechanismus wird das Carbokation durch das freie Elektronenpaar von O⁶ angegriffen.

UV-C Strahlung (200 – 280 nm) mit einer Wellenlänge von 254 nm induziert prämutagene Cyclobutan Pyrimidin Dimere (CPDs) sowie 6-4 Photoprodukte in der DNA (**Abbildung 29**), welche letztlich zu C → T oder CC → TT Transitionen führen können. Es wird davon ausgegangen, dass CPDs im Vergleich zu den 6-4 Photoprodukten einen größeren Anteil zur Kanzerogenität von UV-Licht beitragen, da diese häufiger ausgebildet und schlechter repariert werden als 6-4 Photoprodukte (zusammengefasst in Jhappan et al., 2003). Die UV-induzierten DNA-Schäden werden mittels Nukleotidexzisionsreparatur (NER) repariert, wodurch sich sowohl der DNA-Reparaturpfad als auch das Mutations-Spektrum der UV-C Behandlung von der EMS Behandlung abgrenzte. NQO ist ein DNA-reaktives Chinolin-Derivat und bildet ebenfalls DNA-Addukte an Guanosen sowie Adenosin aus, die hauptsächlich durch die NER beseitigt werden (Ikenaga et al., 1977). Bleibt eine DNA-Reparatur aus, können Mutationen unterschiedlicher Subtypen entstehen, vor allem aber GC → TA Transversionen. Es wurden jedoch ebenfalls Transversionen anderen Subtyps sowie Transitionen und Einzelnukleotid-Deletionen beschrieben (Ryu et al., 1999). Möglicherweise geht das breite Mutations-Spektrum von NQO auf die zusätzliche Bildung von reaktiven Sauerstoff-Spezies durch Redox-Cycling von NQO zurück (Nunoshiba und Demple, 1993).

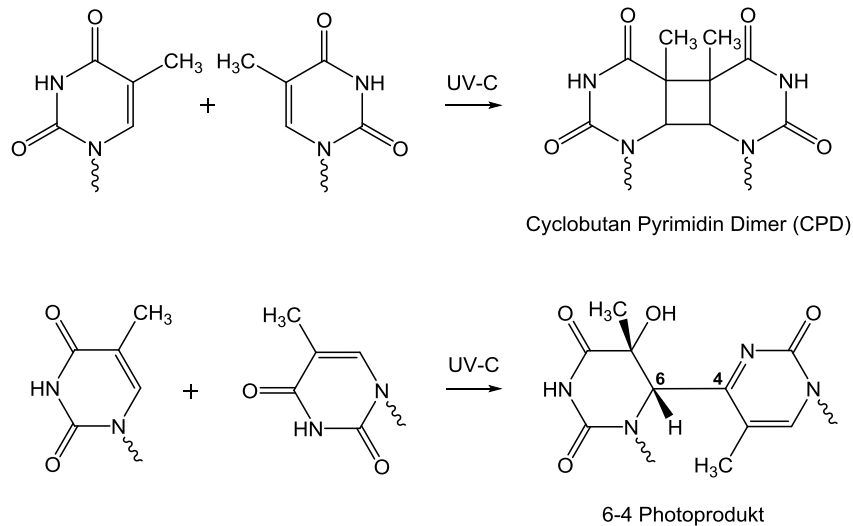


Abbildung 29: Darstellung der UV-C induzierten DNA-Schäden. **a** Ausbildung des Cyclobutan Pyrimidin Dimers durch die Cyclisierung von zwei benachbarten Thymidin-Basen. Ebenfalls möglich ist eine Cyclisierung von Thymidin mit Cytosin (nicht dargestellt). **b** Ausbildung des 6-4 Photoprodukts durch die Reaktion von zwei benachbarten Thymidin-Basen. Ebenfalls möglich ist eine Reaktion von Thymidin mit Cytosin oder von Cytosin mit Cytosin (nicht dargestellt) (modifiziert nach Sinha und Häder, 2002).

Pyridin gehört zu der Klasse der Heteroaromaten und ist nicht DNA-reaktiv. Pyridin führte zu keiner Erhöhung der Revertanten im Ames-Test, führte *in vivo* zu keiner Erhöhung der Mikronukleus-Frequenz und wurde negativ im *in vitro* MLA sowie im *in vitro* CAT getestet (zusammengefasst in Kirkland et al., 2008). Aufgrund dessen wurde Pyridin als Negativ-Kontrolle eingesetzt. Cycloheximid ist ein nicht-genotoxischer Inhibitor der Protein-Biosynthese, indem Cycloheximid an die 60S-Unterheit eukaryotischer Ribosomen bindet und auf diese Weise die Elongation verhindert. Cycloheximid wurde als Negativ-Kontrolle ausgewählt, da der analysierte Endpunkt des PIG-A Assays auf dem Vorhandensein oder der Abwesenheit GPI-verankerter Proteine basiert. Daher sollte ausgeschlossen werden, dass Substanzen mit inhibierender Wirkung auf die Protein-Biosynthese ohne genotoxischen Wirkmechanismus zu einer Erhöhung der GPI(-) Frequenz führen, wodurch „falsch-positiv“ auf eine mutagene Wirkung dieser Substanzen geschlossen werden würde.

Als mutagen wurden diejenigen Behandlungen bewertet, die eine konzentrationsabhängige, in mindestens einem Behandlungsansatz statistisch signifikante Zunahme an GPI(-) Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen aufwiesen. Die statistische Signifikanz wurde mittels ANOVA und Dunnett's T3-Posthoc Test ermittelt. Die Ergebnisse werden im Folgenden in Abhängigkeit der verwendeten Zelllinie dargestellt.

Test-Resultate der TK6 Zelllinie:

Die Mutagenität von EMS konnte dosisabhängig und für alle Behandlungen statistisch signifikant nachgewiesen werden (**Abbildung 30**, a, b). Bezüglich der 4 h Inkubation wurde für die niedrigste Dosis (200 μM) eine Zunahme der GPI(-) Frequenz um den Faktor 2,0 ($p \leq 0,001$) und für die höchste Dosis (800 μM) um den Faktor 5,6 ($p \leq 0,001$) im Vergleich zur Kontrolle ermittelt. Bezüglich der 24 h Inkubation wurde die GPI(-) Frequenz durch die niedrigste Dosis (100 μM) um den Faktor 3,3 ($p \leq 0,01$) und durch die höchste Dosis (200 μM) um den Faktor 7,5 ($p \leq 0,001$) im Vergleich zur Kontrolle erhöht.

Ebenfalls konnte die Mutagenität von UV-C Strahlung dosisabhängig und für alle Behandlungen statistisch signifikant nachgewiesen werden (**Abbildung 30**, c). Dabei erhöhte die niedrigste Dosis von 2 J/m^2 die GPI(-) Frequenz um den Faktor 3,9 ($p \leq 0,001$) und die höchste Dosis von 8 J/m^2 um den Faktor 7,3 ($p \leq 0,001$) im Vergleich zur Kontrolle.

Als letzte Positiv-Kontrolle wurde NQO eingesetzt, dessen Mutagenität nach einer 4 h Inkubation dosisabhängig und für alle Behandlungen statistisch signifikant nachgewiesen werden konnte (**Abbildung 30**, d). Dabei führte die niedrigste Dosis von 50 nM zu einer 3,2-fachen ($p \leq 0,001$) und die höchste Dosis von 200 nM zu einer 5,0-fachen ($p \leq 0,001$) Erhöhung der GPI(-) Frequenz im Vergleich zur Kontrolle.

Gemäß den gesetzten statistischen Kriterien wurden folglich alle drei Positiv-Kontrollen als Mutagene korrekt identifiziert. In **Abbildung 31** sind exemplarisch die durchflusszytometrischen Dotplots von unbehandelten sowie von EMS-behandelten TK6 Zellen dargestellt.

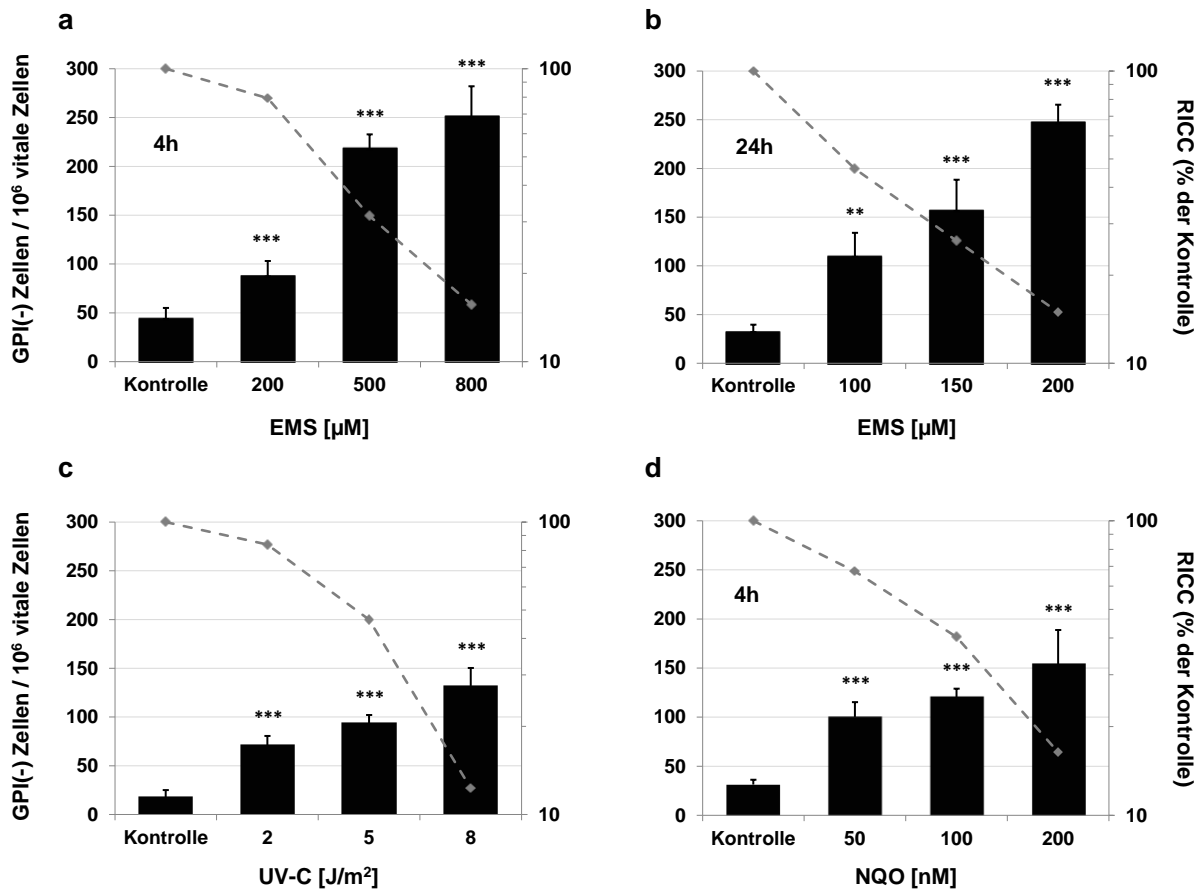


Abbildung 30: Positiv-Kontrollen (TK6). GPI(-) Frequenzen nach **a**, **b** EMS, **c** UV-C und **d** NQO Behandlung. Die schwarzen Balken repräsentieren die GPI(-) Frequenz ($\times 10^{-6}$) und die grauen Linien RICC. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD von sechs Bestimmungen aus zwei unabhängigen Experimenten (Krüger et al., 2014). Die statistische Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle wurde via ANOVA und Dunnett's T3 Posthoc Test ermittelt: ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

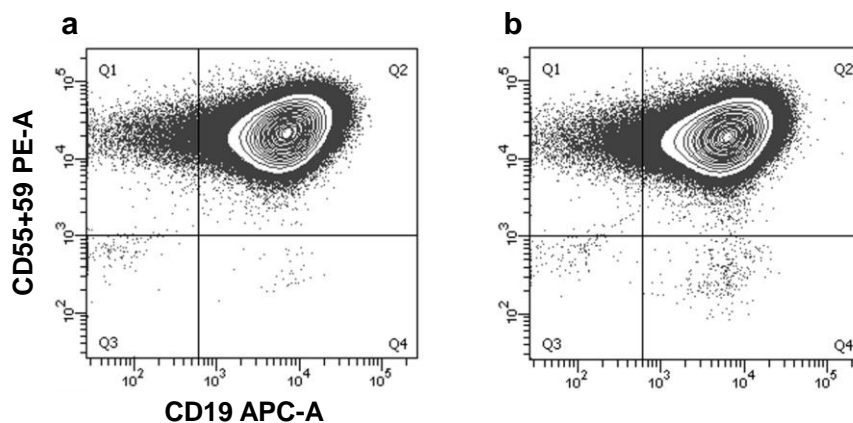


Abbildung 31: Repräsentative Dotplots von TK6 Zellen: **a** Kontroll-Zellen (0,5 % v/v DMSO für 24 h) und **b** 200 μM (24 h) EMS inkubierte Zellen nach Phänotyp-Expression. 1 $\times 10^6$ GPI(+) Zellen wurden im Gate Q2 für die Bestimmung der GPI(-) Frequenz analysiert (Krüger et al., 2014).

Wie in **Tabelle 4** gezeigt, befanden sich die durch EMS induzierten GPI(-) Frequenzen im Größenordnungsbereich von induzierten Mutationsfrequenzen ermittelt durch den HPRT- oder den TK-Assay. Bezüglich UV-C Strahlung scheint der *in vitro* PIG-A Assay aufgrund einer höheren Anzahl induzierter GPI(-) Mutanten sensitiver zu sein als der HPRT-Assay.

Tabelle 4: Induzierte GPI(-) Frequenzen in TK6 Zellen (diese Arbeit) im Vergleich zu publizierten HPRT oder TK/MLA Mutationsfrequenzen nach EMS und UV-C Behandlung von verschiedenen Zelllinien (Krüger et al., 2014).

Mutagen	Dosis (Inkubationszeit)	Induzierte GPI(-) Frequenz ($\times 10^{-6}$) (TK6)	Induzierte MF ¹ (Assay, Zelllinie)	Referenz für HPRT / TK Daten
EMS	200 μ M (24 h)	214	220 (HPRT, TK6)	Steen et al., 1997a
	200 μ M (4 h)	43	~30 (HPRT, TK6)	Amundson und Liber, 1991
		43	~42 (TK, TK6)	Amundson und Liber, 1991
UV-C	2 J/m ²	53	~26 (HPRT, VH-25)	Enninga et al., 1986
	5 J/m ²	76	~68 (HPRT, VH-25)	Enninga et al., 1986
	8 J/m ²	114	~22 (HPRT, V79)	Zölzer und Kiefer, 1984
		114	~100 (TK, L5178Y)	Jacobson et al., 1981

¹MF = Mutationsfrequenz ($\times 10^{-6}$)

Als Negativ-Kontrollen wurden Pyridin sowie Cycloheximid eingesetzt. Die 4-stündige Behandlung mit Pyridin oder Cycloheximid führten bis zur eingesetzten Maximaldosis von je 10 mM zu keiner signifikanten Erhöhung der GPI(-) Frequenz. Folglich wurden die Negativ-Kontrollen als nicht-Mutagene korrekt identifiziert (**Abbildung 32**).

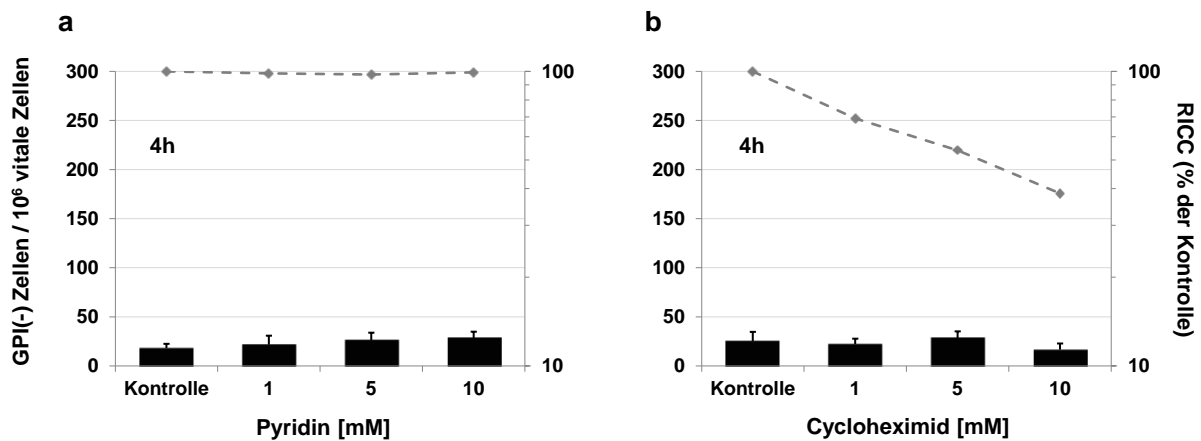


Abbildung 32: Negativ-Kontrollen (TK6). GPI(-) Frequenzen nach **a** Pyridin und **b** Cycloheximid Behandlung. Die schwarzen Balken repräsentieren die GPI(-) Frequenz ($\times 10^6$) und die grauen Linien RICC. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD von sechs Bestimmungen aus zwei unabhängigen Experimenten (Krüger et al., 2014). Die statistische Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle wurde via ANOVA und Dunnett's T3 Posthoc Test untersucht.

Bezüglich der Behandlung mit Cycloheximid wurde zusätzlich zur Bestimmung der GPI(-) Frequenz der inhibierende Effekt von Cycloheximid auf die Protein-Biosynthese untersucht. Hierzu wurden die Zellen der 10 mM Cycloheximid-Behandlungen sowie Kontroll-Zellen am Tag 2, 4 und 6 nach der Behandlung auf die Expression von CD55 und CD59 auf der Zelloberfläche mittels Antikörperfärbung und Durchflusszytometrie untersucht. Dabei konnte eine verringerte Protein-Expression am Tag 2 und 4 nach der Behandlung festgestellt werden. Diese war jedoch reversibel und prägte sich bereits ab Tag 6 nach der Behandlung nicht weiter aus (**Abbildung 33**).

Die mittlere GPI(-) Frequenz von unbehandelten Kontrollen lag unter Verwendung von TK6 Zellen bei 28 ± 12 in 10^6 .

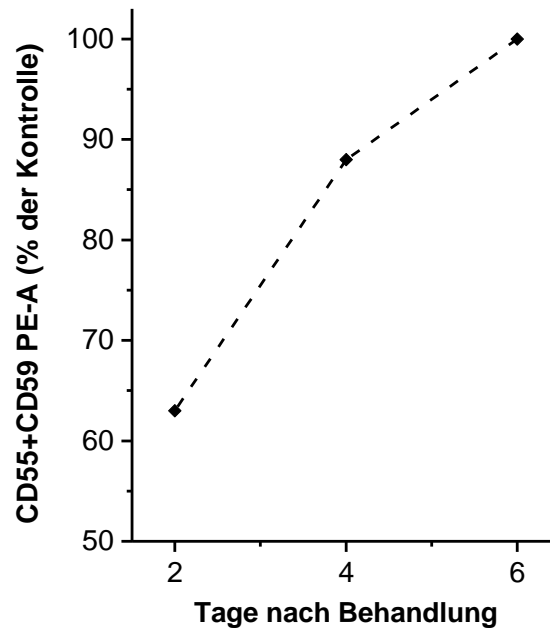


Abbildung 33: Cycloheximid induzierte Inhibition der Protein-Biosynthese. TK6 Zellen wurden mit 10 mM Cycloheximid für 4 h inkubiert. Die Zellen wurden mit PE konjugierten Antikörpern gegen CD55 und CD59 inkubiert. Gezeigt ist die PE-Fluoreszenzintensität 2, 4 und 6 Tage nach Cycloheximid-Behandlung. Dargestellt sind Mittelwerte von zwei Bestimmungen aus zwei unabhängigen Experimenten.

Test-Resultate der WI-L2-NS Zelllinie:

Mittels WI-L2-NS Zellen wurde EMS untersucht, wobei ein mutagener Effekt nach 4 h Inkubationen nachgewiesen werden konnte (**Abbildung 34**). Dieser war jedoch unter Betrachtung der durch EMS induzierten GPI(-) Zellen sowie der statistischen Signifikanz wesentlich schwächer ausgeprägt im Vergleich zur TK6 Zelllinie unter gleichen Inkubationsbedingungen. So war die TK6 GPI(-) Frequenz nach Behandlung der Zellen mit 200 μ M EMS (4 h) im Vergleich zur Kontrolle bereits signifikant ($p \leq 0,001$) erhöht. Bei der WI-L2-NS Zelllinie war bei dieser EMS Konzentration noch keine Signifikanz festzustellen; erst die mittlere Konzentration von 500 μ M EMS führte hier zu einer signifikanten ($p \leq 0,01$), 6,4-fachen Erhöhung der GPI(-) Frequenz im Vergleich zur Kontrolle. Die höchste Konzentration von 800 μ M führte bei WI-L2-NS Zellen aufgrund der niedrigen Kontroll-GPI(-) Frequenz zu einer 8,4-fachen Erhöhung der GPI(-) Frequenz, aufgrund der hohen Standardabweichung jedoch lediglich auf einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$.

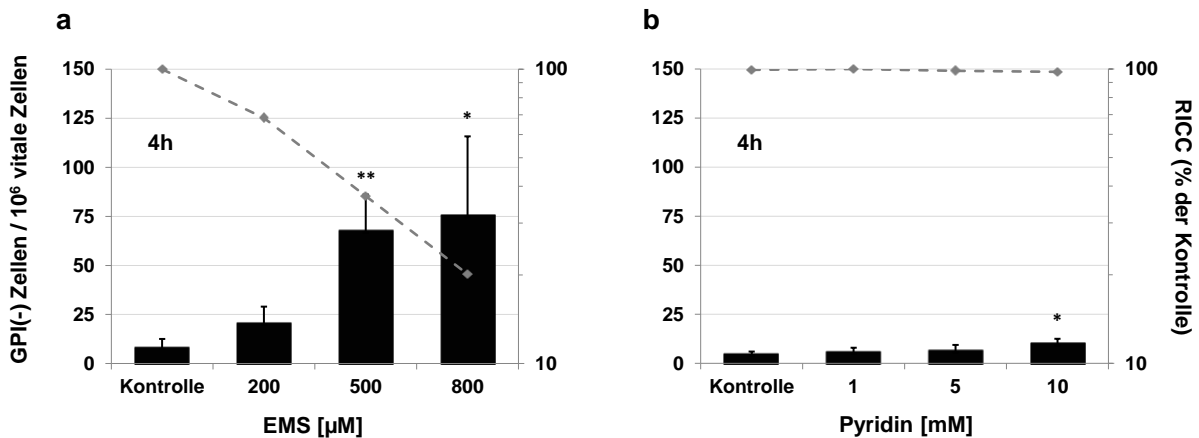


Abbildung 34: Positiv- und Negativ-Kontrolle (WI-L2-NS). GPI(-) Frequenzen nach Behandlung mit **a** EMS als Positiv-Kontrolle und **b** Pyridin als Negativ-Kontrolle. Die schwarzen Balken repräsentieren die GPI(-) Frequenz ($\times 10^{-6}$) und die grauen Linien RICC. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD von sechs Bestimmungen aus zwei unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle wurde via ANOVA und Dunnett's T3 Posthoc Test ermittelt.

Als Negativ-Kontrolle wurde Pyridin untersucht. Hierbei zeigte sich eine schwach ausgeprägte, konzentrationsabhängige und in der höchsten Behandlungskonzentration von 10 mM statistisch signifikante ($p \leq 0,05$) Zunahme an GPI(-) WI-L2-NS Zellen, wodurch „falsch-positiv“ auf eine mutagene Wirkung getestet wurde.

Aufgrund dieses Befundes sowie der geringeren Empfindlichkeit gegenüber der mutagenen Wirkung von EMS wurde die WI-L2-NS Zelllinie für die Verwendung im *in vitro* PIG-A Assay als nachteilig gegenüber der TK6 Zelllinie bewertet und von weiteren Substanz-Untersuchungen ausgeschlossen.

Die mittlere GPI(-) Frequenz von unbehandelten Kontrollen lag unter Verwendung von WI-L2-NS Zellen bei 7 ± 3 in 10^6 .

5.6 Spontane GPI(-) Rate von TK6 und WI-L2-NS Zellen

Die spontane GPI(-) Rate entspricht der Anzahl neu auftretender GPI(-) Zellen in einer Zellpopulation bedingt durch Fehler bei der DNA-Replikationen oder durch spontane Mutationen. Die spontane GPI(-) Rate wurde für die TK6 sowie die WI-L2-NS Zelllinie experimentell bestimmt. Hierfür wurden die abgereicherten Zellen über jeweils über 20 Tage kultiviert (TK6: 35, WI-L2-NS: 36 Populationsverdopplungen), wobei die GPI(-) Frequenzen im 4-tägigem Rhythmus durchflusszytometrisch ermittelt wurden. Anschließend konnten die

GPI(-) Frequenzen über die Populationsverdopplungen aufgetragen werden. Die resultierende Geradensteigung entsprach dabei direkt der spontanen GPI(-) Rate ($\times 10^{-6}$) (Abbildung 35).

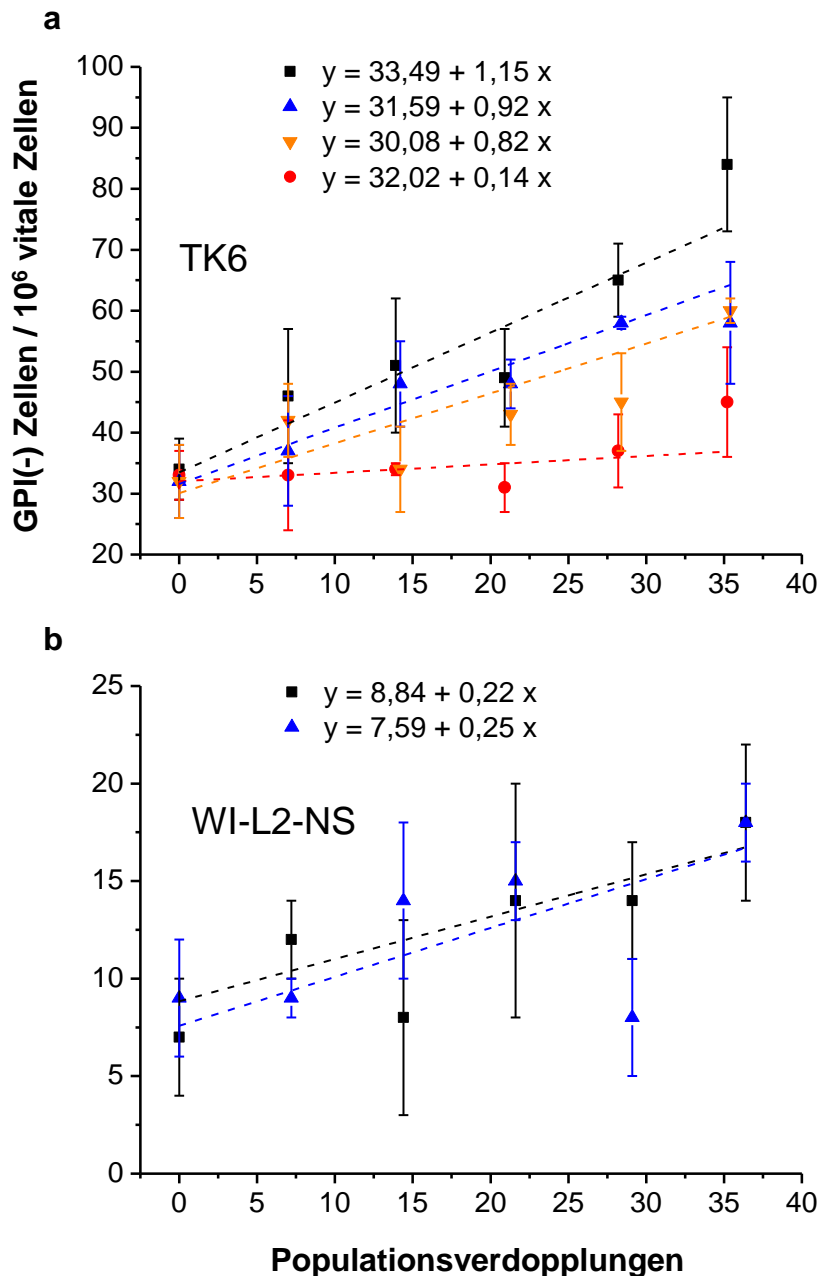


Abbildung 35: Bestimmung der spontanen GPI(-) Rate der TK6 und WI-L2-NS Zelllinie. **a** Die spontane GPI(-) Rate der TK6 Zelllinie wurde durch vier unabhängige Experimente bestimmt und **b** die spontane GPI(-) Rate der WI-L2-NS Zelllinie wurde durch zwei unabhängige Experimente bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus drei Bestimmungen.

Im Rahmen der durchgeführten Experimente konnte eine spontane GPI(-) Rate von $0,76 \pm 0,43 (x10^{-6})$ pro Zelle und Zellteilung für die TK6 und von $0,235 \pm 0,021 (x10^{-6})$ pro Zelle und Zellteilung für die WI-L2-NS Zelllinie ermittelt werden. In Worten bedeutet dies, dass es bei der Zellteilung von 10^6 Zellen im Durchschnitt zum Neuauftreten von 0,76 GPI(-) TK6 Zellen, jedoch von nur 0,235 GPI(-) WI-L2-NS Zellen kam. Auffällig dabei war die Streuung der ermittelten TK6 GPI(-) Raten, was durch eine Heterogenität innerhalb der TK6 Zelllinie bedingt sein konnte. Es sollte daher untersucht werden, ob eine Subpopulation oder die gesamte TK6 Zelllinie eine im Vergleich zu WI-L2-NS erhöhte spontane GPI(-) Rate aufweist. Dazu wurden 15 unabhängige GPI(+) TK6 Zellklone isoliert. Nachdem ausreichend Zellen von jedem Klon zur Verfügung standen, wurde jeweils die GPI(-) Frequenz durchflusszytometrisch ermittelt. Die einzelnen TK6 Zellklone wiesen dabei GPI(-) Frequenzen zwischen 1 und 427 ($x10^{-6}$) auf. Genauer wiesen 9 Klone eine GPI(-) Frequenz von $<10 (x10^{-6})$, 4 Klone zwischen $10 - 100 (x10^{-6})$ und 2 Klone von $>100 (x10^{-6})$ auf. Diese Abweichungen in der GPI(-) Frequenz haben zunächst die Hypothese einer Subpopulation mit erhöhter GPI(-) Rate innerhalb der TK6 Zelllinie unterstützt. Weitere Untersuchungen an drei der 15 TK6 Zellklone aus der Gruppe mit geringer GPI(-) Frequenz ($< 10 x 10^{-6}$) zeigten jedoch, dass diese keine verminderte spontane GPI(-) Rate im Vergleich zur gesamten TK6 Zelllinie aufwiesen (**Abbildung 36**), weswegen weiterhin die Mutanten-abgereicherte TK6 Zelllinie und kein TK6 Zellklon für den *in vitro* PIG-A Assay verwendet wurde.

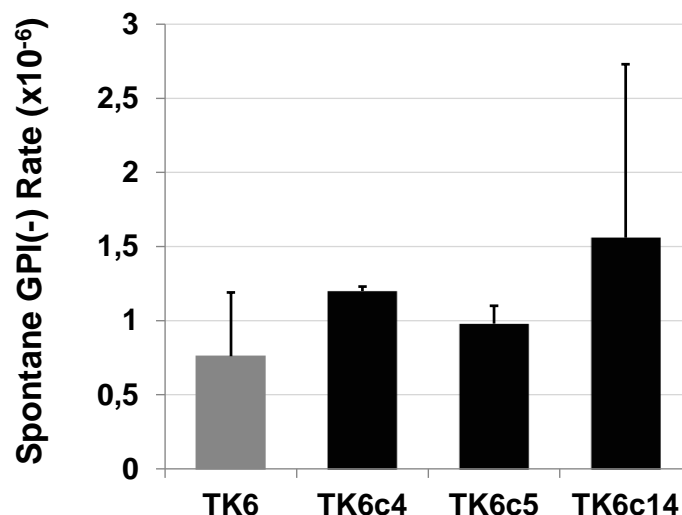


Abbildung 36: Spontane GPI(-) Rate der TK6 Zelllinie sowie der drei GPI(+) TK6-Zellklone TK6c4, TK6c5 und TK6c14. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus zwei unabhängigen Experimenten.

Es ist daher anzunehmen, dass der Unterschied in der GPI(-) Frequenz zufälliger Natur war und auf das frühe Auftreten oder Ausbleiben spontaner Mutationen während der Proliferation der Zellklone zurückzuführen war und nicht durch Unterschiede in der spontanen GPI(-) Rate bedingt wurde. Aufgrund dessen war das Vorhandensein einer Subpopulation mit erhöhter GPI(-) Rate innerhalb der TK6 Zelllinie weitestgehend auszuschließen. Wie in **Tabelle 5** gezeigt, war die ermittelte spontane GPI(-) Rate von TK6 Zellen im Vergleich zu veröffentlichten Daten von primären humanen B-Lymphoblasten sogar verringert.

Tabelle 5: Spontane *in vitro* sowie *ex vivo* GPI(-) Raten im Vergleich zu publizierten *HPRT1* und *TK1* Mutationsraten unterschiedlicher Zelltypen (modifiziert nach Krüger et al., 2014).

Experiment	Zelltyp / Zelllinie	Endpunkt / Gen	Rate ($\times 10^{-6}$)	Referenz
<i>In vitro</i>	TK6	GPI(-)	0,76 \pm 0,43	-
<i>Ex vivo</i>	B-Lymphoblasten	GPI(-)	1,70	Araten et al., 2010
			1,06	Araten et al., 2005
			2,46	Araten et al., 2013
			0,91	Araten et al., 2013
<i>In vitro</i>	V79	<i>HPRT1</i>	0,50	Fuscoe et al., 1986
			0,48 \pm 0,90	Van Zeeland und Simons, 1976
<i>In vitro</i>	SW480	<i>HPRT1</i>	<0,02	Glaab und Tindall, 1997
<i>Ex vivo</i>	T-Lymphozyten	<i>HPRT1</i>	0,50	Green et al., 1995
<i>In vitro</i>	L5178Y	<i>TK1</i>	5,80	Fellows et al., 2014

5.7 GPI: Genotyp- zu Phänotyp-Beziehung

Die Untersuchung der Genotyp- zu Phänotyp-Beziehung war vor allem aufgrund des komplexen Biosynthesewegs von GPI von Interesse. Die hier ausgenutzte, mutationsbedingte phänotypische Veränderung (das Vorhandensein oder die Abwesenheit von funktionellem GPI und somit von GPI-verankerten Proteinen) hängt im Gegensatz zum HPRT oder TK/MLA Assay von dem Zusammenspiel einer Vielzahl unterschiedlicher Gene ab, wovon lediglich das *PIG-A* Gen X-chromosomal lokalisiert ist. Aus genetischer Sicht ist es demnach wahrscheinlich, dass vor allem inaktivierende Mutationen im *PIG-A* Gen zu einem GPI(-) Phänotyp führen. Diese Hypothese sollte anhand von DNA Sequenzierung von TK6 Zellklonen mit unterschiedlichem GPI-Status untersucht werden.

Die Sanger DNA-Sequenzierung wurde auf mRNA-Ebene untersucht, um zwischen einer Mutation im *PIG-A* Gen und *PIG-A* mRNA-Abwesenheit unterscheiden zu können. Hierfür wurde zunächst die mRNA aus den Zellen extrahiert und anschließend einer reversen Transkription unterzogen. Danach wurde die *PIG-A* cDNA in drei sich überlappenden Teilbereichen amplifiziert, um eine optimal Grundvoraussetzung für die Sanger-Sequenzierung zu schaffen. Die cDNA-Sequenzierung wurde bidirektional durchgeführt, d.h. es wurde sowohl der Sense als auch der Antisense Strang sequenziert. Dieses Vorgehen wurde gewählt, um Abweichungen in der Nukleotidsequenz bedingt durch einen methodischen Fehler ausschließen zu können. Die Herangehensweise ist schematisch in **Abbildung 37** dargestellt.

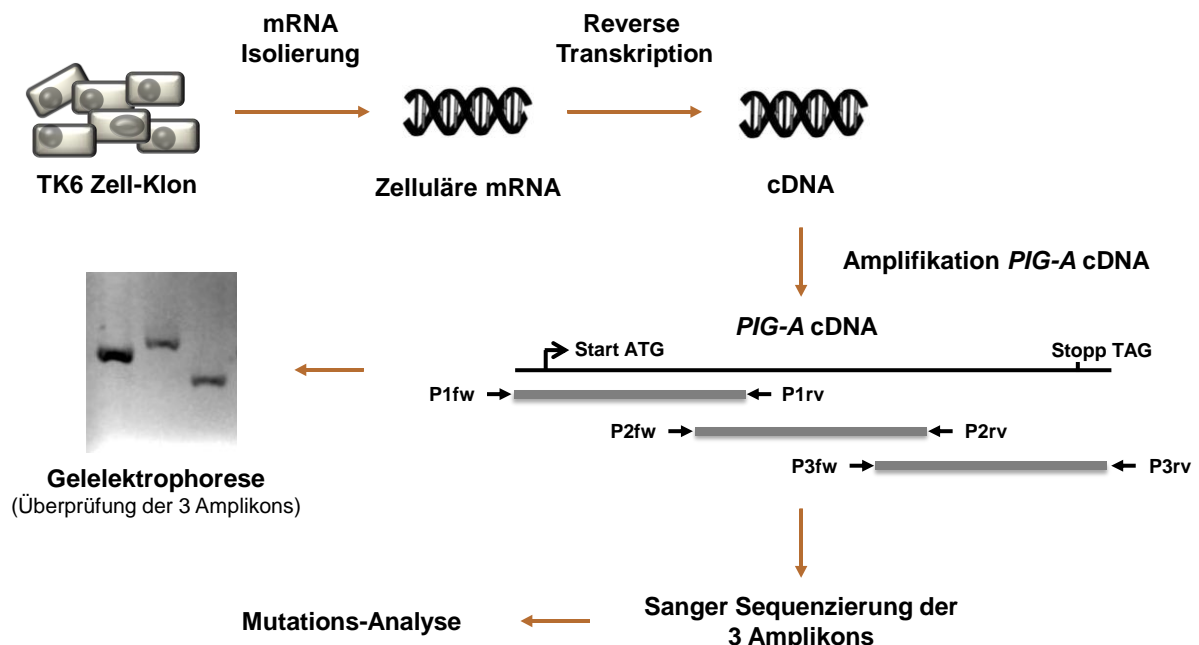
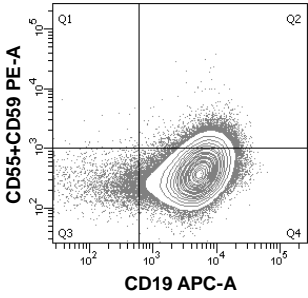
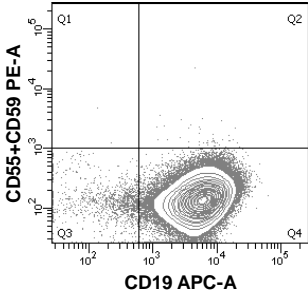
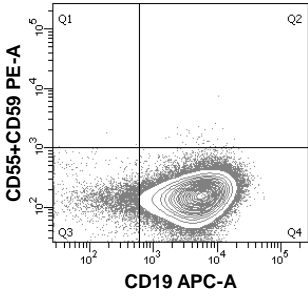


Abbildung 37: Probenaufarbeitung für die *PIG-A* Sanger-Sequenzierung auf mRNA Ebene. Die *PIG-A* cDNA wurde in drei separaten Teilabschnitten mittels PCR amplifiziert. Die PCR Ansätze wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese untersucht. fw = forward, rv = reverse

Im ersten Schritt wurde die *PIG-A* cDNA Sequenz von zwei unabhängigen GPI(+) TK6 Zellklonen bestimmt, wobei die auf NCBI publizierte, humane Wildtyp *PIG-A* Sequenz (NM_002641.3) für TK6 Zellen bestätigt werden konnte (NCBI, 2014). Anschließend wurde die *PIG-A* cDNA von sechs spontan aufgetretenen GPI(-) Klonen sequenziert, wobei überraschenderweise kein Klon eine Mutation im *PIG-A* Gen aufwies.

Die Sequenzierung von 13 EMS-induzierten GPI(-) Klonen ergab folgendes Ergebnis: zwei Klone wiesen keine *PIG-A* mRNA auf, sieben Klone zeigten eine für EMS charakteristische GC → AT Transition des Nukleotids 903 (Gly → Arg) und 4 Klone waren *PIG-A* wildtyp. Diese Ergebnisse sind in **Tabelle 6** zusammengefasst.

Tabelle 6: Zusammenfassung der *PIG-A* Sanger-Sequenzierung von EMS-induzierten GPI(-) Zellklonen.

GPI-Status ¹	<i>PIG-A</i> Status	Anzahl Klone
	GC → AT Transition	7 / 13
	mRNA-Abwesenheit	2 / 13
	Wildtyp	4 / 13

¹ Die dargestellten Dotplots sind exemplarisch für den jeweiligen Subtyp (Transition, mRNA-Abwesenheit und *PIG-A* Wildtyp). Alle untersuchten Klone des entsprechenden Subtyps wiesen eine vergleichbare Lage der Zellwolke auf.

Auffällig war die Lage der Zellwolken von Klonen mit *PIG-A* GC → AT Transition. Diese wies im Vergleich zu den Zellwolken der Klone mit mRNA-Abwesenheit oder der Klone mit *PIG-A* Wildtyp-Sequenz eine geringe PE-Fluoreszenzintensität auf. Dies lässt sich vermutlich auf eine Restaktivität des mutierten *PIG-A* Proteins zurückführen. Dennoch befand sich der Hauptanteil (~90%) der Zellwolke bei allen Klonen mit *PIG-A* Mutation im Mutanten-Gate Q4,

wodurch die ursprünglich isolierten GPI(-) Einzel-Zellen (auf welche die Zellwolken zurückzuführen sind) durchflusszytometrisch korrekt als solche identifiziert werden sollten. Dieser Befund stellt demnach kein Problem für die Validität des Assays dar.

Um den Einfluss der EMS-induzierten Transition im *PIG-A* Gen und den daraus resultierenden Aminosäure-Austausch von Glycin zu Arginin auf die strukturelle Veränderung des PIG-A Proteins besser abschätzen zu können, wurde über die Aminosäure-Sequenz nach Sequenzhomologie bereits strukturaufgeklärter Proteine gesucht, da das PIG-A Protein noch nicht beschrieben wurde. Die Primärsequenz des PIG-A Proteins sowie die Position des Aminosäure-Austausches ist in **Abbildung 38** dargestellt.

```

1 MACRGGAGNGHRASATLSRVSPGSLYTCRTRTHNICMVSDFFYPNMGGVESHIYQLSQCLIERGHKV
IIVTHAYGNRKGIRYLTSGLKVYYLPLKVMYNQSTATTLFHSLPLLRIFVRERVIIHSHSSFSAMAHDAL
FHAKTMGLQTVFTDHSFLGFADVSSVLTKLLTVSLCDTNHIICVSYTSKENTVLRRAALNPEIVSVIPNAV
DPTDFTPDPFRRHDSITIVVSRLLVYRKIDLLSGIPELCQKYPDLNFIIG 263 (G/R) EGPKRIILEEVRERY
QLHDRVRLGALHDKDVRNVLVQGHIFLNTSLTEAFCMAIVEAASCGLQVVSTRVGGIPEVLPENLIILCE
PSVKSLCEGLEKAIFQLKSGTLPAPENIHNIKTFYTWARNVAERTEKVYDRVSVEAVLPMDKRLDRLISH
CGPVTGYIFALLAVFNFLIFLRWMTDPSIIDVAIDATGPRGAWTNNYSHSKRGGGENNEISETR 484

```

Abbildung 38: Primärsequenz des aus 484 Aminosäuren bestehenden PIG-A Proteins. Die mutierte Form wies ein Aminosäure-Austausch von Glycin (G) zu Arginin (R) an der Position 263 auf.

Diese Untersuchung wurde in Kooperation mit dem Lehrstuhl für Biologische Chemie (Technische Universität München) durchgeführt. Die bakterielle Mannosyltransferase PimB zeigte mit einem E-Wert von $7,7 \times 10^{-44}$ die beste Sequenzhomologie zum PIG-A Protein. Zudem weist dieses ebenfalls an der Phosphatidylinositol-Synthese beteiligte Enzym funktionelle Ähnlichkeit zum PIG-A Protein auf, was für die strukturelle Simulation des PIG-A Proteins von Vorteil war. Das PimB Protein ist in **Abbildung 39** dargestellt. Unter Annahme gegebener Strukturhomologie ist davon auszugehen, dass der detektierte Aminosäure-Austausch im PIG-A Protein zu einer Beeinträchtigung der enzymatischen Funktion führte. Zunächst handelte es sich bei der ausgetauschten Aminosäure Glycin um die kleinste Aminosäure, die lediglich ein H-Atom als Rest aufweist. Glycin wurde durch Arginin substituiert, eine Aminosäure mit großer, positiv geladener Seitenkette mit Guanidin-

Strukturelement. Der Aminosäure-Rest in dieser Position zeigt in das Innere der Domäne. Aufgrund dessen ist an dieser Stelle bedingt durch den großen Unterschied der Aminosäure-Reste sowie dessen Ausrichtung in das Innere der Domäne eine strukturelle Veränderung der Proteindomäne zu erwarten. Eine hierdurch bedingte Beeinflussung der enzymatischen Aktivität erscheint aufgrund der räumlichen Nähe der Aminosäure-Substitution zur Substrat-Bindungsstelle als plausibel.

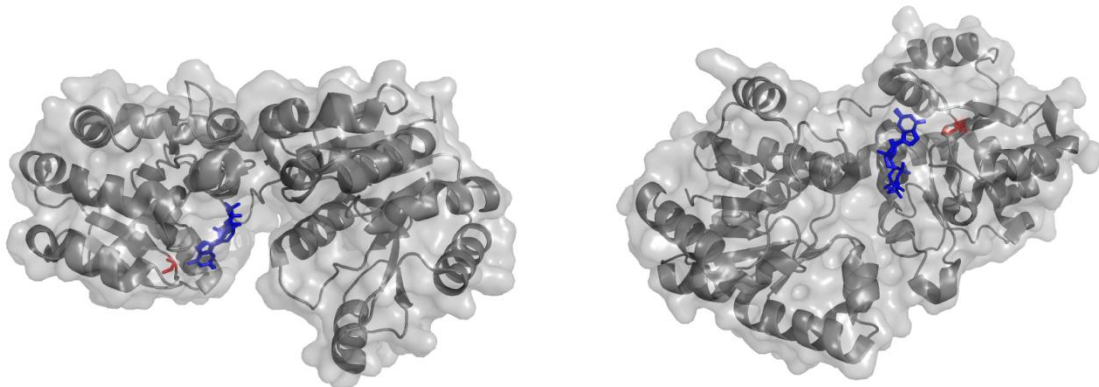


Abbildung 39: Bakterielle Mannosyltransferase PimB aus zwei unterschiedlichen Perspektiven. Dieses Enzym weist mit einem E-Wert von $7,7 \times 10^{-44}$ eine gute Sequenzhomologie zum PIG-A Protein auf. Die rot markierte Stelle zeigt die mutationsbedingte Aminosäure-Substitution von Glycin zu Arginin. In Blau dargestellt ist GDP- α -D-Mannopyranose im katalytischen Zentrum des Enzyms. PimB katalysiert die Übertragung von Mannopyranose auf Phosphatidylinositol, PIG-A die Übertragung von N-Acetylglucosamin (als UDP-GlcNAc) auf Phosphatidylinositol. Die Abbildung wurde mittels der Software PyMOL (Schrödinger) generiert.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass ein Zusammenhang zwischen dem *PIG-A* Gen und einem GPI(-) Phänotyp gefunden werden konnte, wobei nicht ausschließlich Mutationen im *PIG-A* Gen für den GPI(-) Phänotyp von TK6 Zellen verantwortlich waren. Besonders spontan auftretende GPI(-) Zellen betreffend scheint das *PIG-A* Gen in der TK6 Zelllinie keine oder lediglich eine untergeordnete Rolle zu spielen. Aufgrund dieses Sachverhaltes wurde für die TK6 Zelllinie die Existenz eines heterozygoten, autosomalen Gens, welches an der GPI-Biosynthese beteiligt ist, postuliert. Mit lediglich einem funktionellen Allel würde dieses Gen, vergleichbar zu *PIG-A*, durch das Auftreten von lediglich einer inaktivierenden Mutation ebenfalls zu einem GPI(-) Phänotyp führen. Eine Voraussetzung hierfür wäre die Beteiligung des betroffenen Gens an einem kritischen Schritt der GPI-Biosynthese. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden drei weitere TK6 Zellklone einem *next-generation sequencing* (NGS) unterzogen.

Der Vorteil eines NGS gegenüber der Sanger-Sequenzierung stellte die Möglichkeit dar, alle GPI relevanten Gene innerhalb einer Probe zu untersuchen. Hierfür wurden drei TK6-Klone eingesetzt: Der GPI(+) Klon *TK6GPI(+)*c1, der spontan entstandene GPI(-) Klon *TK6GPI(-)*cSP1 sowie der EMS induzierte GPI(-) Klon *TK6GPI(-)*cEMS4. Der GPI(+) Klon wurde eingesetzt, um die genetische Situation der TK6 Zelllinie mit funktioneller GPI-Biosynthese darzustellen. Demgegenüber sollte durch die Genom-Sequenzierung der beiden GPI(-) Klone die Ursache für den GPI(-) Phänotyp geklärt werden, da diese bei der Sanger-Sequenzierung die *PIG-A* Wildtyp-Sequenz aufwiesen.

Es stellte sich heraus, dass das auf Chromosom 17 lokalisierte *PIG-L* Gen bereits eine Deletion von 256 kb in einem Allel des *TK6GPI(+)*c1 Klons aufwies. Dies zeigte sich durch einen Abfall der Coverage (Anzahl erfolgter Reads der Sequenzen im NGS) auf 50%. Die Klone *TK6GPI(-)*cSP1 und *TK6GPI(-)*cEMS4 zeigten jeweils eine zusätzliche Deletion in dem bis dato funktionellen Allel, was den Abfall der Coverage auf 0% bedingte (**Abbildung 40**). Die Inaktivierung beider Allele des *PIG-L* Gens führte demnach in diesen beiden Zellklonen zu einem GPI(-) Phänotyp ohne Beteiligung des *PIG-A* Gens, da das *PIG-L* Gen ebenfalls essentiell für die GPI-Biosynthese ist (Watanabe et al., 1999). Die Ergebnisse sind in **Tabelle 7** zusammengefasst.

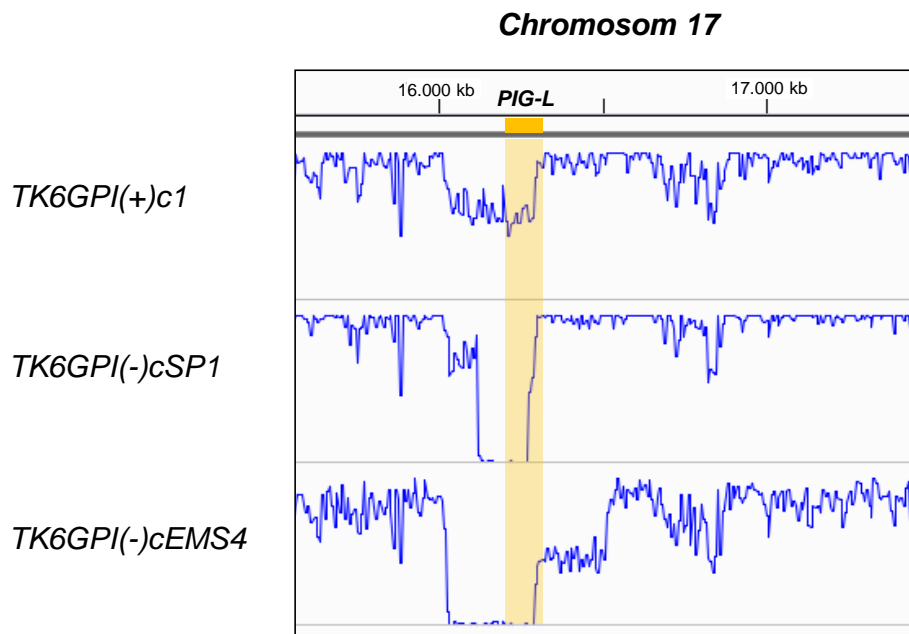
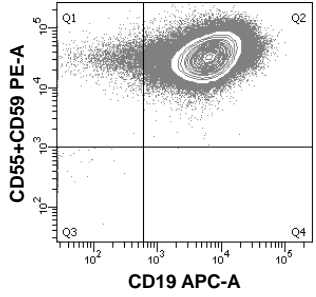
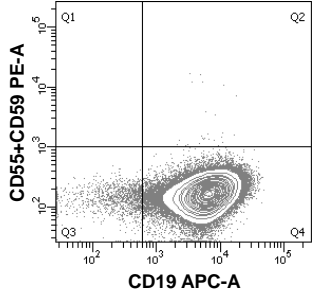
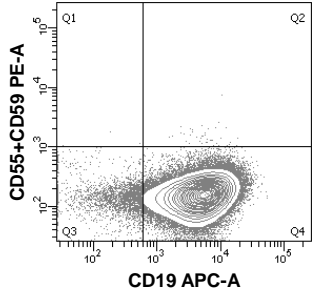


Abbildung 40: NGS Coverage der TK6 Zellklone *TK6GPI(+)*c1, *TK6GPI(-)*cSP1 sowie *TK6GPI(-)*cEMS4. Gezeigt ist ein Ausschnitt des humanen Chromosoms 17 und die Coverage (in Blau dargestellt) der NGS Sequenzierung der drei untersuchten Zellklone. Das *PIG-L* Gen ist in Gelb dargestellt. Die heterozygote Deletion im Klon *TK6GPI(+)*c1 ist durch den Abfall der Coverage auf 50 % zu erkennen (Nukleotide 16,040-16,296 kb). Die zusätzliche Deletion in den GPI(-) Zellklonen zeigte sich durch den Abfall der Coverage auf 0 %.

Tabelle 7: Zusammenfassung der NGS Daten von drei TK6 Zellklonen

GPI-Status	Klon-Bezeichnung	<i>PIG-A</i> Status	<i>PIG-L</i> Status
	TK6GPI(+)c1	Wildtyp	Heterozygot
	TK6GPI(-)cSP1	Wildtyp	LOH ¹
	TK6GPI(-)cEMS4	Wildtyp	LOH ¹

¹ LOH aufgrund einer zweiten Deletion im *PIG-L* Gen

6 ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION

Die Prüfung auf Mutagenität ist heutzutage ein essentieller Teil der toxikologischen Risikobewertung von Stoffen. Sie wird sowohl als Teil der toxikologischen Routine-Testung in der Industrie, als auch in der Forschung an Universitäten und anderen Institutionen eingesetzt. Diese Arbeit beschreibt die Methodenetablierung des *in vitro* PIG-A Assays, einem neuartigen *in vitro* Genmutations-Test basierend auf dem Mutations-bedingten Verlust GPI-verankerter Oberflächenproteine.

Im Wesentlichen basiert der *in vitro* PIG-A Assay auf Antikörperfärbung und durchflusszytometrischer Quantifizierung von mutierten GPI(-) Zellen. Aufgrund dessen erfolgt bei der Testdurchführung keine klassische Selektionierung der Mutanten-Zellen, wie es im HPRT oder TK Assay der Fall ist, weswegen eine robuste Methodik für die reproduzierbare Quantifizierung weniger mutierter GPI(-) Zellen in einem Überschuss an GPI(+) Wildtyp-Zellen entwickelt wurde (siehe 5.1). Dies setzte die Auswahl spezifischer, phänotypischer Oberflächenmarker für die Differenzierung zwischen den Zelltypen GPI(+) und GPI(-) voraus. In dieser Arbeit wurden hierzu die GPI-verankerten Oberflächenproteine CD55 und CD59 mit PE-konjugierten, primären Antikörpern gefärbt. Die Färbung von mindestens zwei GPI-abhängigen Oberflächenmarkern reduzierte dabei das Risiko, Zellen mit geringer Expression des entsprechenden Markers fälschlicherweise als GPI(-) Zelle zu interpretieren. Dieses Vorgehen wurde ebenfalls von Peruzzi und Kollegen empfohlen (Peruzzi et al., 2010).

Die entwickelte Färbestrategie sowie die gewählten durchflusszytometrischen Parameter zur Quantifizierung der GPI(-) Frequenz wurden einer Methodvalidierung unter Verwendung von GPI(-) TK6 Zellen unterzogen. Dabei konnten mittels Wiederfindungsanalysen von Zellproben mit unterschiedlichem Gehalt an GPI(-) Zellen die Anwendbarkeit sowie die Reproduzierbarkeit der durchflusszytometrischen Methodik bestätigt werden (**Abbildung 19**). Da diese eine komplett neuartige Methodik für die Quantifizierung mutierter Zellen darstellte, wurde die Durchflusszytometrie mit der klassischen Selektions-Methodik verglichen. Diese basiert auf einem Selektionsverfahren in 96-Well Platten (siehe 2.2.2). Dieses Vorgehen kann zur Quantifizierung der GPI(-) Frequenz eingesetzt werden, wobei Proaerolysin als Selektions-Agens dient. Um beide Methoden miteinander vergleichen zu können, wurden Zellproben mit unterschiedlichem Gehalt an GPI(-) Zellen hergestellt. Anschließend konnten die GPI(-) Frequenz der Zellproben parallel durch beide Methoden

bestimmt werden, wobei eine lineare Korrelation gefunden wurde (**Abbildung 20**). Dieses Resultat rechtfertigte die neuartige, schnellere und weniger arbeitsintensive Auswertung mittels Antikörper-Färbung und Durchflusszytometrie.

Eine essentielle Voraussetzung für die sensitive Detektion mutagener Effekte in Form von induzierten GPI(-) Frequenzen stellt eine niedrige GPI(-) Hintergrund-Frequenz unbehandelter Kontroll-Zellen dar. Hier besteht eine direkte Abhängigkeit zu der spontanen GPI(-) Rate, die im Gegensatz zur GPI(-) Frequenz nicht den Anteil an GPI(-) Zellen in einer Zellpopulation zu einer bestimmten Zeit, sondern die spontane Entstehungsrate von GPI(-) Zellen angibt. Diese ist u.a. abhängig von der genetischen Stabilität der verwendeten Zelllinie sowie der Lokalisierung und Länge des Gens. Trotz günstiger Umstände wie einer funktionstüchtigen DNA-Reparatur kommt es, aufgrund von spontan auftretenden Mutationen oder durch Fehler bei der DNA-Replikation, zum Auftreten und langsamen Akkumulieren von GPI(-) Zellen.

Die spontane GPI(-) Rate wurde experimentell ermittelt und betrug für die TK6 Zelllinie $0,76 \pm 0,43 \times 10^{-6}$ pro Zelle und Zellteilung und $0,235 \pm 0,021 \times 10^{-6}$ für die WI-L2-NS Zelllinie. Eine Ursache hierfür kann möglicherweise die Heterozygotie im *PIG-L* Gen von TK6 Zellen darstellen (**Tabelle 7**), was an späterer Stelle diskutiert wird. Experimentelle Befunde an untersuchten TK6 Zellklonen deuteten darauf hin, dass keine hypermutable TK6 Subpopulation, sondern die Zelllinie an sich von der erhöhten GPI(-) Rate betroffen ist. Die erhöhte GPI(-) Rate von TK6 Zellen erklärte den wesentlich höheren Anteil an GPI(-) Zellen der erworbenen TK6 Zelllinie (~ 3000 in 10^6) im Vergleich zur WI-L2-NS Zelllinie (~ 50 in 10^6) sowie die höhere GPI(-) Frequenz von unbehandelten TK6 Zellen im Rahmen von Substanz- sowie UV-C Behandlungen (siehe 5.5.4). Die GPI(-) Frequenz von unbehandelten (oder lediglich mit Lösemittel behandelten) TK6 Zellen betrug $28 \pm 12 \times 10^{-6}$. Dieser Wert ist potentiell dazu geeignet, auch schwache Mutagene durch eine Erhöhung der GPI(-) Frequenz detektieren zu können. Der *Workshop of Genotoxicity Testing* (IWGT) erkannte beispielsweise eine *TK1* Mutationsrate von $5,80 \times 10^{-6}$ pro Zelle und Zellteilung der L5178Y Maus-Lymphoma Zelllinie an, solange Kontrollwerte eine Mutationsfrequenz von 170×10^{-6} nicht übersteigen (Fellows et al., 2014).

Um die spontane GPI(-) Rate der TK6 Zelllinie besser einordnen zu können, wurden Vergleiche mit publizierten *ex vivo* Daten von B-Lymphoblastoiden Zellen gesunder Probanden angestellt (**Tabelle 5**). Diese wiesen spontane GPI(-) Raten zwischen $0,91 \times 10^{-6}$ und $2,46 \times 10^{-6}$ auf (Araten et al., 2013). Dementsprechend war die ermittelte GPI(-) Rate von TK6 Zellen mit $0,76 \times 10^{-6}$ im Vergleich zur *ex vivo* Situation sogar etwas verringert.

Bezüglich veröffentlichter *HPRT1* oder *TK1* Mutationsraten lag die GPI(-) Rate von TK6 Zellen im Mittelfeld; diese reichen von $<0,02 \times 10^{-6}$ für SW480 Zellen (Glaab und Tindall, 1997) bis $5,8 \times 10^{-6}$ (Fellows et al., 2014). Zusammenfassend wiesen TK6 Zellen eine zur *ex vivo* Situation verringerte GPI(-) Rate auf, die sich ebenfalls im Mittelfeld publizierter Mutationsraten bezüglich des *HPRT1* oder des *TK1* Gens bewegte. Die GPI(-) Frequenz unbehandelter Kontrollen sollte darüber hinaus die Detektion schwacher Mutagene ermöglichen. Aufgrund dessen wurde die TK6 Zelllinie trotz einer erhöhten spontanen GPI(-) Rate im Vergleich zur WI-L2-NS Zelllinie als geeignet für die Verwendung im *in vitro* PIG-A Assay beurteilt.

Die Phänotyp-Expressionszeit betrug 10 Tage für 4 h Inkubationen und 11 Tage für 24 h Inkubationen (siehe 5.5.2). Nach dieser Zeit erreichte die induzierte GPI(-) Frequenz ein konstantes Plateau. Typische HPRT Phänotyp-Expressionszeiten liegen zwischen 8 (Steen et al., 1997b) und 13 (Parry und Parry, 2012) Tage für die TK6 Zelllinie. Im Gegensatz dazu weist der TK Assay eine sehr kurze Phänotyp-Expressionszeit von lediglich 3 Tagen unter Verwendung von TK6 Zellen auf (Koyama et al., 2006). Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass für die Auswertung der Selektions-basierten Testsysteme nach der Phänotyp-Expressionszeit zusätzlich eine Koloniebildungszeit benötigt wird. Diese beträgt in der Regel zwischen 10 und 14 zusätzliche Tagen. Damit erhöht sich die Dauer der Testdurchführung auf 18-22 Tage für den HPRT Assay sowie auf 13-17 Tage für den TK Assay im Vergleich zu 10 Tage, die für die Durchführung des PIG-A Assays benötigt werden.

Unter Verwendung des Proteinbiosynthese-Inhibitors Cycloheximid konnte demonstriert werden, dass sich dessen reversibler, inhibitorischer Effekt am Tag 10 nach der Behandlung nicht weiter auswirkte (**Abbildung 33**), was von entscheidender Bedeutung für die Validität des Assays war. Es ist davon auszugehen, dass der *in vitro* PIG-A Assay 10 Tage nach erfolgter Behandlung ausschließlich irreversibel wirkende Mutagene und keine reversibel wirkenden Agentien durch eine erhöhte GPI(-) Frequenz anzeigt, die beispielsweise durch Hemmung der Protein-Biosynthese, Hemmung der GPI-Biosynthese oder Hemmung des Transports von CD55 und CD59 an die Zelloberfläche potentiell dazu geeignet wären, mutagene Effekte im *in vitro* PIG-A Assay vorzutäuschen. An dieser Stelle müssten jedoch weitere Substanzen mit den beschriebenen Wirkmechanismen getestet werden, um die Validität des *in vitro* PIG-A Assays umfassend beurteilen zu können.

Durch die Untersuchungen von Positiv- sowie Negativ-Kontrollen sollten Erkenntnisse über die GPI(-) Frequenz zur Indikation mutagener Effekte gewonnen werden. Hierfür wurden sowohl TK6 als auch WI-L2-NS Zellen mit mutagenen sowie nicht-mutagenen Kontroll-Substanzen und UV-C Strahlung behandelt und auf Mutagenität in Form einer dosisabhängigen, statistisch signifikanten Zunahme der GPI(-) Frequenz bezogen auf Kontrollansätze untersucht (siehe 5.5.4).

EMS wurde für 4 h (200 – 800 μM) sowie 24 h (100 – 200 μM) Inkubationen von TK6 Zellen und für 4 h Inkubationen von WI-L2-NS Zellen (200 – 800 μM) eingesetzt. Dabei zeigte sich bei allen Ansätzen außer dem 200 μM WI-L2-NS Ansatz eine statistisch signifikante, dosisabhängige Zunahme von GPI(-) Zellen im Vergleich zur Kontrolle, wobei der mutagene Effekt von EMS unter Verwendung der TK6 Zelllinie im Vergleich zu WI-L2-NS stärker ausgeprägt war. Als zweite Positiv-Kontrolle wurde UV-C Bestrahlung (2 – 8 J/m^2) unter Verwendung von TK6 Zellen untersucht. UV-C Bestrahlung wurde als Positiv-Kontrolle ausgewählt, da sie im Gegensatz zu allen weiteren Untersuchungen eine physikalische Noxe darstellt. Somit konnten weitere Informationen über den Anwendungsbereich des PIG-A Assays gewonnen werden. Darüber hinaus ist UV-C Bestrahlung eine beliebte Positiv-Kontrolle in Mutagenitäts-Tests, da die Bestrahlung schnell und einfach durchgeführt werden kann. UV-C Bestrahlung führte zu einer dosisabhängigen, in allen Behandlungen signifikanten Zunahme der GPI(-) Frequenz im Vergleich zur Kontrolle. Als dritte Positiv-Kontrolle wurde der mutagene Effekt von NQO (50 – 200 nM, 4 h) an TK6 Zellen untersucht. Die Mutagenität von NQO konnte durch eine dosisabhängige sowie statistisch signifikante Zunahme der GPI(-) Frequenz von Behandlungsansätzen im Vergleich zur Kontrolle demonstriert werden. Zusammenfassend konnte demnach die Mutagenität aller untersuchten Positiv-Kontrollen unter Einsatz des *in vitro* PIG-A Assays auf Basis der GPI(-) Frequenz korrekt identifiziert werden.

Als Negativ-Kontrollen wurden Pyridin sowie Cycloheximid untersucht. Pyridin wurde von dem *European Centre for the Validation of Alternative Methods* (ECVAM) als Negativ-Kontrolle für die Spezifitäts-Bewertung von neuen *in vitro* Genotoxizitäts-Tests empfohlen (Kirkland et al., 2008). Unter Verwendung der WI-L2-NS Zelllinie wurde Pyridin (1 – 10 mM, 4 h) untersucht, wobei eine statistisch signifikante ($p \leq 0,05$) Zunahme der GPI(-) Frequenz im höchsten Inkubationsansatz (10 mM, 4 h) aufgetreten war. Dies stellte ein Nachteil von WI-L2-NS gegenüber TK6 dar, denn unter Einsatz der TK6 Zelllinie führten weder Pyridin (1 – 10 mM, 4 h) noch Cycloheximid (1 – 10 mM, 4 h) zu einer statistisch signifikanten Zunahme der GPI(-) Frequenz im Vergleich zur Kontrolle. Im Falle von Cycloheximid

bestätigte sich darüber hinaus, dass dessen inhibitorischer Effekt auf die Protein-Biosynthese am Tag 10 nach der Behandlung zu keiner artifiziellen Erhöhung der GPI(-) führte.

Ein entscheidender Punkt bei der Durchführung von *in vitro* Genmutations-Tests stellt der Dosisbereich der Prüfsubstanz und die Zytotoxizität der Behandlungen dar. Es ist bekannt, dass es bei der Testung unter zu hohen und/oder zu toxischen Konzentrationen zu irrelevant-positiven *in vitro* Testergebnissen kommen kann (zusammengefasst in Elespuru et al., 2009; Kirkland et al., 2005; Scott et al., 1991). Kirkland und Kollegen bezeichneten diesen Umstand prägnant als „*overload of normal physiologie*“ (Kirkland et al., 2007a). Daher ist es von entscheidender Bedeutung, parallel zur Prüfung auf Mutagenität die korrespondierende Zytotoxizität der Behandlung zu erfassen. Im Regelfall wird vor dem eigentlichen Mutagenitäts-Experiment die Zytotoxizität der Prüfsubstanz untersucht und anschließend der Dosis-Bereich für das Mutagenitäts-Experiment festgelegt. Im Gegensatz zu den eindeutig definierten Mutagenitäts-Experimenten ist die Zytotoxizitäts-Prüfung nicht zwingend definiert, da eine Vielzahl von Methoden zur Bestimmung zytotoxischer Effekte existieren. Die OECD empfiehlt beispielsweise die Verwendung der Zytotoxizitäts-Parameter „*relative survival, RS*“ (dieser entspricht der relativen Koloniebildungsfähigkeit) oder „*relative total growth, RTG*“ (dieser entspricht dem Produkt aus der relativen Koloniebildungsfähigkeit und der relativen Zellzahl, RCC) für die Bestimmung des Dosis-Bereichs für die Durchführung des HPRT und des TK Assays, wobei die höchste Behandlungskonzentration zwischen 10 – 20 % RS oder RTG im Vergleich zur Kontrolle aufweisen sollten. Wird dieser Wert bis 10 mM Substanzkonzentration nicht erreicht, sollten 10 mM als höchste Behandlungskonzentration eingesetzt werden (OECD, 1997b). Handelt es sich bei der Prüfsubstanz um ein Arzneimittel, empfiehlt die ICH im Gegensatz zur OECD eine maximale Konzentration von lediglich 1 mM (ICH, 2008).

In dieser Arbeit wurde zur Festlegung des Dosis-Bereiches der auf Zellproliferation basierende Zytotoxizitäts-Parameter RICC eingesetzt. RICC basiert wie RCC auf der Zellzahl, wobei ein zytotoxischer Effekt oder ein induzierter Zellzyklus-Arrest durch eine reduzierte Zellzahl der Behandlungsansätze im Vergleich zur Kontrolle sichtbar wird. Da RICC auf der Zellzahl-Zunahme und RCC auf der Zellzahl basiert, zeigt RICC einen induzierten, potentiell reversiblen Zellzyklus-Arrest sensitiver an als RCC. Daher handelt es sich bei RICC um den empfindlichsten Zytotoxizitäts-Parameter basierend auf der Messung der Zellzahl. Aufgrund dessen führen RICC und RTG in vielen Fällen zu vergleichbaren Ergebnissen (O'Donovan, 2012). Der Vorteil von RICC gegenüber RTG ist jedoch die

einfache und schnelle Testdurchführung (siehe 4.10.1), speziell unter Verwendung von Suspensionszellen. Der Einsatz zu hoher Dosen der Prüfsubstanz sollte ebenfalls durch die Verwendung der p53-profizienten humanen TK6 Zelllinie verhindert werden. Durch funktionelles p53 Protein reagiert diese Zelllinie sensitiv auf zyto- sowie genotoxische Effekte durch die Einleitung eines Zellzyklus-Arrests oder der Apoptose, was wiederum frühzeitig durch RICC detektiert wird. Zusammenfassend sollte durch die Verwendung des sensitiven Parameters RICC sowie durch die p53-profiziente Zelllinie TK6 die Mutagenitäts-Testung unter zu ausgeprägter Zytotoxizität verhindert werden, um die bestmögliche Spezifität des *in vitro* PIG-A Assays bei gleichzeitig gegebener Sensitivität zu gewährleisten.

Im Rahmen der Methodenentwicklung des *in vitro* PIG-A Assays war die Untersuchung der GPI-relevanten Genotyp- zu Phänotyp-Beziehung von Relevanz, da auf genetischer Ebene aufgeklärt werden sollte, was zu der als Endpunkt dienenden phänotypischen Veränderung führte. Im Gegensatz zum *in vitro* HPRT oder TK Assay, wo jeweils lediglich ein Gen an der phänotypischen Veränderung beteiligt ist, gestaltet sich die Situation bezüglich GPI komplexer. An der GPI-Biosynthese sind mindestens 22 unterschiedliche Gene beteiligt, wovon einzig das *PIG-A* Gen X-chromosomal lokalisiert ist (**Abbildung 6**). Es konnte bereits durch Forschung an der genetisch erworbenen Krankheit PNH gezeigt werden, dass inaktivierende Mutationen im *PIG-A* Gen zu einer dysfunktionalen GPI-Biosynthese führen, was sich in einem GPI(-) Phänotyp mit dem Verlust aller GPI-verankerten Oberflächenproteine wie CD55 und CD59 manifestiert. Aufgrund der X-chromosomalen Lokalisation des *PIG-A* Gens ist hierzu, im Gegensatz zu den autosomal lokalisierten Genen, bereits eine einzige inaktivierende Mutation ausreichend. Prinzipiell kann jedoch jedes an der GPI-Biosynthese beteiligte Gen einen GPI(-) Phänotyp induzieren, solange das Gen in einem kritischen Schritt der GPI-Biosynthese involviert ist und beide Allele eine inaktivierende Mutation tragen. Dies betrifft beim Menschen besonders heterozygote Merkmalsträger, bei denen bereits ein autosomales Gen mutationsbedingt inaktiviert vorliegt, was bereits klinisch im Zusammenhang mit PNH beschrieben wurde (siehe 2.3).

Aufgrund der dominierenden Rolle des *PIG-A* Gens wurde zunächst dieser X-chromosomale Gen-Lokus durch Sanger DNA-Sequenzierung untersucht. Nachdem die auf NCBI publizierte *PIG-A* Wildtyp-Sequenz für die TK6 Zelllinie bestätigt werden konnte, wurden spontan entstandene sowie EMS induzierte GPI(-) TK6 Klone sequenziert. Dabei zeigte sich, dass keiner der sechs spontan entstandenen GPI(-) Zellklone eine Mutation im *PIG-A* Gen aufwies. Von den 13 EMS induzierten GPI(-) Klonen konnte bei zwei Klonen keine *PIG-A* mRNA detektiert werden, sieben Klone zeigten eine GC → AT Transition des Nukleotids 903

und vier Klone waren *PIG-A* wildtyp. Es konnte demnach in 9 von 13 Fällen (~70%) eine Veränderung im *PIG-A* Gen von GPI(-) Zellen festgestellt werden. Jedoch schienen bei der TK6 Zelllinie nicht ausschließlich Mutationen im *PIG-A* Gen einen GPI(-) Phänotyp zu induzieren.

Es war auffallend, dass in allen sieben EMS-induzierten GPI(-) Klonen mit *PIG-A* Mutation stets das Nukleotid 903 betroffen war. Aufgrund der bidirektionalen Sequenzierung des Sense sowie des Antisense Stranges besteht kein Zweifel an der Sequenzierungs-Reaktion selbst. Gegebenenfalls existiert an dieser Stelle ein Hotspot für Mutationen bedingt durch die Lage dieses Nukleotids im Genom oder aufgrund von Besonderheiten in der lokalen Nukleotid-Sequenz. Der betroffene Nukleotid-Abschnitt zeigt eine auffällige Wiederholung der Nukleotide GGA, der Sequenzabschnitt lautet: 5'-GGAGGAGAGGGA-3', wobei das markierte Guanosin in der mutierten Form durch Adenosin substituiert vorlag. Möglicherweise ist aufgrund dieser GGA oder GA Wiederholungen dieser Locus anfälliger für das Auftreten von Mutationen. Eine weitere Erklärung für die Dominanz dieser expliziten Punktmutation könnte die betroffene Aminosäure im *PIG-A* Protein darstellen. An dem bakteriellen Protein PimB, welches eine gute Aminosäure-Sequenzhomologie zum *PIG-A* Protein aufweist, konnte gezeigt werden, dass die betroffene Aminosäure im katalytischen Zentrum von PimB sitzt. Überträgt man diesen Befund auf das *PIG-A* Protein, kann mit großer Sicherheit davon ausgegangen werden, dass die katalytische Aktivität des Enzyms dadurch massiv beeinträchtigt wurde. Kritisch gesehen könnte ebenfalls die Analyse identischer Subklone vermutet werden. Dies kann anhand der bis zum jetzigen Zeitpunkt vorliegenden Daten nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden, erscheint jedoch aufgrund der angewendeten Methodik (siehe 4.13) zur Selektion der GPI(-) Klone als unwahrscheinlich. Aufgrund der geringen Ausstreudichte und mikroskopischer Überprüfung kann zudem mit Gewissheit angenommen werden, dass jeder Zellklon aus einer Einzelzelle entstammte.

Wie bereits erwähnt, konnten bei zwei der 13 EMS-induzierten GPI(-) Klone nach PCR Amplifikation keine *PIG-A* cDNA nachgewiesen werden. Daher ist davon auszugehen, dass bei diesen Klonen keine *PIG-A* mRNA vorhanden war. Als Ursache hierfür können nur Vermutungen angestellt werden. So könnte es zum Auftreten von EMS-induzierten Mutationen in einem für das *PIG-A* Gen regulatorischen Bereich der DNA gekommen sein. Eine weitere Möglichkeit stellt die durch Alkylierung bedingte Inaktivierung des Promotors für das *PIG-A* Gen dar. Als eher unwahrscheinlich wird die Deletion des *PIG-A* Gens erachtet, da größere, X-chromosomale Deletionen eher mit dem Untergang der betroffenen Zelle als

mit der Manifestierung einer Deletion assoziiert sind. Unabhängig von der Ursache konnte bei diesen zwei GPI(-) Klonen die Abwesenheit der *PIG-A* mRNA und damit fehlendes *PIG-A* Protein als Ursache für den GPI(-) Phänotyp angesehen werden.

Neben den EMS-induzierten GPI(-) Zellklonen mit *PIG-A* Beteiligung wurden vier GPI(-) Zellklone mit *PIG-A* Wildtyp-Sequenz identifiziert. Von den sechs untersuchten, spontan aufgetretenen GPI(-) Zellklonen wiesen alle eine *PIG-A* Wildtyp-Sequenz auf. Demnach musste in diesen Fällen der GPI(-) Phänotyp eine andere Ursache als ein dysfunktionales *PIG-A* Gen haben. Wie bereits beschrieben, sind an der GPI-Biosynthese neben *PIG-A* mindestens 21 weitere Gene beteiligt (Nakamura et al., 2012). Es wurde daher die Hypothese aufgestellt, dass die TK6 Zelllinie in mindestens einem dieser autosomal lokalisierten Gene eine Heterozygotie aufzeigt. Dieses Gen müsste zudem an einem kritischen Schritt der GPI-Biosynthese beteiligt sein, wodurch es aufgrund einer weiteren Mutation des funktionellen Allels zu LOH und dadurch zu einem GPI(-) Phänotyp ohne *PIG-A* Beteiligung kommt. Um diese Hypothese experimentell zu bestätigen, wurden drei TK6 Zellklone zusätzlich einem NGS unterzogen. Dabei konnte in dem GPI(+) Zellklon eine heterozygote Deletion von 256 kb auf dem Chromosom 17 identifiziert werden, die nahezu das komplette *PIG-L* Gen betrifft. Somit wies dieser Klon lediglich ein aktives *PIG-L* Allel auf, verfügte jedoch noch über eine funktionelle GPI-Biosynthese. Die mittels NGS untersuchten GPI(-) TK6 Zellklone mit Wildtyp *PIG-A* Gen wiesen beide eine weitere Deletion in dem bis dato aktiven *PIG-L* Allel auf (LOH). In diesen Fällen ließ sich daher der GPI(-) Phänotyp auf das *PIG-L* Gen zurückführen. *PIG-L* codiert für eine in der ER-Membran lokalisierten De-N-Acetylase, welche im zweiten Schritt der GPI-Biosynthese die N-Acetylgruppe von N-Acetylglucosaminyolphosphatidylinositol entfernt, wonach der GPI-Präkursor von der zytosolischen Seite in das Innere des ER flippt, wo die Biosynthese fortgesetzt wird (Ferguson, 1999; Watanabe et al., 1999). Es konnte bereits gezeigt werden, dass dieser zweite, durch das *PIG-L* Protein katalysierte Schritt essentiell für die GPI-Biosynthese ist und *PIG-L* defiziente Zellen einen GPI(-) Phänotyp aufweisen (Smith et al., 1996; Watanabe et al., 1999). Lässt sich dieser Befund auf die gesamte TK6 Zelllinie übertragen, ist folgendes Szenario anzunehmen: Die TK6 Zelllinie weist neben dem X-chromosomalen *PIG-A* Gen eine Heterozygotie im autosomalen *PIG-L* Gen auf, welches ebenso wie *PIG-A*, nach Mutations-bedingter Inaktivierung des funktionellen Allels, einen GPI(-) Phänotyp induziert.

Es ist bekannt, dass sich die Zelllinien TK6 und WI-L2-NS im p-Arm des Chromosoms 17 (hier ist u.a. *PIG-L* lokalisiert) unterscheiden, wobei Homozygotie für die WI-L2-NS und Heterozygotie für TK6 Zelllinie beschrieben wurde (Amundson et al., 1993). Es ist daher

möglich, dass die WI-L2-NS Zelllinie die Heterozygotie im *PIG-L* Gen nicht aufweist, was jedoch experimentell nicht untersucht wurde. Jedoch deuten viele experimentelle Daten darauf hin. WI-L2-NS Zellen wiesen im Vergleich zu TK6 einen geringeren Anteil an GPI(-) Zellen in dem käuflich erworbenen Zell-Batch auf, zeigten eine geringere spontane GPI(-) Rate, niedrigere GPI(-) Frequenzen von unbehandelten Kontrollen sowie eine geringere Empfindlichkeit gegenüber der Mutagenität von EMS. Diese Befunde erscheinen unter Annahme einer *PIG-L* Heterozygotie in TK6, nicht aber in WI-L2-NS Zellen als plausibel, da durch die Beteiligung von zwei GPI-relevanten Genen (*PIG-A* und *PIG-L*) die Auftretswahrscheinlichkeit eines GPI(-) Phänotyps vergrößert wird.

Aufgrund der höheren Sensitivität gegenüber dem Mutagen EMS, der korrekten Identifizierung von Pyridin als nicht-Mutagen sowie der Ausbildung einer komplett GPI(-) Zellpopulation nach Proaerolysin-Behandlung wurde die TK6 gegenüber der WI-L2-NS Zelllinie für die Verwendung im *in vitro* *PIG-A* Assay bevorzugt. Dies betraf im Rahmen der vorliegenden Arbeit vor allem die Untersuchung von Positiv- sowie Negativ-Kontrollen.

Im Rahmen dieser Dissertation ist es gelungen, einen neuartigen *in vitro* Genmutations-Assay basierend auf dem GPI-Status von Säugerzellen zu entwickeln. Das hierzu etablierte Testprotokoll sowie die durchflusszytometrische Analyse der Zellen konnten erfolgreich validiert werden und ermöglichten eine sensitive sowie reproduzierbare Quantifizierung weniger mutierter GPI(-) Zellen in einem Überschuss an GPI(+) Wildtyp-Zellen. Die verwendeten Zelllinien TK6 und WI-L2-NS wiesen hinsichtlich der spontanen GPI(-) Rate sowie der Empfindlichkeit gegenüber der Mutagenität von EMS Unterschiede auf, für die auf genetischer Ebene durch die *PIG-L* Heterozygotie in TK6 eine Erklärung gefunden werden konnte. Alle untersuchten Kontrollen führten in TK6 Zellen zu korrekten Testergebnissen, wobei durch Cycloheximid gezeigt werden konnte, dass der *PIG-A* Assay irreversible Mutationen und keine reversiblen Effekte wie beispielsweise Inhibition der Protein-Biosynthese durch eine Erhöhung der GPI(-) Frequenz anzeigt. Somit steht zukünftig mit dem *in vitro* *PIG-A* Genmutations-Assay unter Verwendung von TK6 Zellen ein vielversprechendes Testsystem für die *in vitro* Forschung zur Verfügung. Durch weitergehende Untersuchungen sollte die *PIG-L* Heterozygotie der TK6 Zelllinie bestätigt werden. Durch die Testung weiterer Positiv-Kontrollen mit unterschiedlichem genotoxischem Wirkmechanismus sowie weiterer Negativ-Kontrollen sollte zudem die Sensitivität sowie die Spezifität des *in vitro* *PIG-A* Assays weiter aufgeklärt werden.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Abrami L, Fivaz M, Decroly E, Seidah NG, Jean F, Thomas G, Leppla SH, Buckley JT, van der Goot FG (1998) The pore-forming toxin proaerolysin is activated by furin. *J Biol Chem* 273(49):32656-32661

Abrami L, Fivaz M, van der Goot FG (2000) Adventures of a pore-forming toxin at the target cell surface. *Trends Microbiol* 8(4):168-172

Ames BN (1971) The detection of chemical mutagens with enteric bacteria *Chemical mutagens*. Springer, 267-282

Amthauer R, Kodukula K, Gerber L, Udenfriend S (1993) Evidence that the putative COOH-terminal signal transamidase involved in glycosylphosphatidylinositol protein synthesis is present in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci* 90(9):3973-3977

Amundson SA, Liber HL (1991) A comparison of induced mutation at homologous alleles of the tk locus in human cells. *Mutat Res-Fund Mol M* 247(1):19-27

Amundson SA, Xia F, Wolfson K, Liber HL (1993) Different cytotoxic and mutagenic responses induced by X-rays in two human lymphoblastoid cell lines derived from a single donor. *Mutat Res-Fund Mol M* 286(2):233-241

Araten DJ, Golde DW, Zhang RH, Thaler HT, Gargiulo L, Notaro R, Luzzatto L (2005) A quantitative measurement of the human somatic mutation rate. *Cancer Res* 65(18):8111-8117

Araten DJ, Krejci O, DiTata K, Wunderlich M, Sanders KJ, Zamechek L, Mulloy JC (2013) The rate of spontaneous mutations in human myeloid cells. *Mutat Res-Fund Mol M* 749(1):49-57

Araten DJ, Martinez-Climent JA, Perle MA, Holm E, Zamechek L, DiTata K, Sanders KJ (2010) A quantitative analysis of genomic instability in lymphoid and plasma cell neoplasms based on the PIG-A gene. *Mutat Res-Fund Mol M* 686(1-2):1-8

Bailey G, Williams D, Orner G, Hendricks J, Pereira C (2012) Cancer risk at ultra-low dose: Lessons learned from 40,000-animal cancer dose-response studies. *Gene Environ* 34(4):157-164

Benigni R, Bossa C (2011) Alternative strategies for carcinogenicity assessment: an efficient and simplified approach based on in vitro mutagenicity and cell transformation assays. *Mutagenesis* 26(3):455-460

Beranek DT (1990) Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutat Res-Fund Mol M* 231(1):11-30

Bernheimer AW, Avigad LS (1974) Partial characterization of aerolysin, a lytic exotoxin from *Aeromonas hydrophila*. *Infection and Immunity* 9(6):1016-1021

Bolt HM (2003) Genotoxicity—threshold or not? Introduction of cases of industrial chemicals. *Toxicology letters* 140:43-51

Boveri T (1914) *Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren*. Gustav Fischer, Jena

- Chakraborty T, Huhle B, Hof H, Bergbauer H, Goebel W (1987) Marker exchange mutagenesis of the aerolysin determinant in *Aeromonas hydrophila* demonstrates the role of aerolysin in *A. hydrophila*-associated systemic infections. *Infection and Immunity* 55(9):2274-2280
- Diep DB, Nelson KL, Raja SM, Pleshak EN, Buckley JT (1998) Glycosylphosphatidylinositol anchors of membrane glycoproteins are binding determinants for the channel-forming toxin aerolysin. *J Biol Chem* 273(4):2355-2360
- Diwan BA, Palmer AE, Ohshima M, Rice JM (1985) N-Nitroso-N-methylurea initiation in multiple tissues for organ-specific tumor promotion in rats by phenobarbital. *Journal of the National Cancer Institute* 75(6):1099-1105
- Dobrovolsky VN, Miura D, Heflich RH, Dertinger SD (2010) The In Vivo Pig-a Gene Mutation Assay, a Potential Tool For Regulatory Safety Assessment. *Environ Mol Mutagen* 51(8-9):825-835
- Eisenbrand G, Metzler M, Hennecke FJ (2005) *Toxikologie für Naturwissenschaftler und Mediziner*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim
- Eisenhaber B, Bork P, Eisenhaber F (2001) Post-translational GPI lipid anchor modification of proteins in kingdoms of life: analysis of protein sequence data from complete genomes. *Protein Engineering* 14(1):17-25
- Elespuru RK, Agarwal R, Atrakchi AH, Bigger CAH, Heflich RH, Jagannath DR, Levy DD, Moore MM, Ouyang Y, Robison TW (2009) Current and future application of genetic toxicity assays: the role and value of in vitro mammalian assays. *Toxicol Sci* 109(2):172
- Enninga IC, Groenendijk R, Filon A, Van Zeeland A, Simons J (1986) The wavelength dependence of UV-induced pyrimidine dimer formation, cell killing and mutation induction in human diploid skin fibroblasts. *Carcinogenesis* 7(11):1829-1836
- Evan GI, Vousden KH (2001) Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411(6835):342-348
- Farber E (1984) The multistep nature of cancer development. *Cancer Res* 44(10):4217-4223
- Fellows MD, McDermott A, Clare KR, Doherty A, Aardema MJ (2014) The spectral karyotype of L5178Y TK+/- mouse lymphoma cells clone 3.7. 2C and factors affecting mutant frequency at the thymidine kinase (tk) locus in the microtitre mouse lymphoma assay. *Environ Mol Mutagen* 55(1):35-42
- Ferguson MA (1999) The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. *Journal of cell science* 112(17):2799-2809
- Ferguson MA, Kinoshita T, Hart GW (2009) *Essentials of Glycobiology*, 2nd edition edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- Fetterhoff T, Holland S, Wile K (1993) Fluorescent detection of non-viable cells in fixed cell preparations. *Cytometry* 14(Suppl 6):27
- Furth EE, Thilly WG, Penman BW, Liber HL, Rand WM (1981) Quantitative assay for mutation in diploid human lymphoblasts using microtiter plates. *Anal Biochem* 110(1):1-8
- Fusco J, Ockey CH, Fox M (1986) Molecular analysis of X-ray-induced mutants at the HPRT locus in V79 Chinese hamster cells. *Int J Radiat Biol* 49(6):1011-1020

Glaab WE, Tindall KR (1997) Mutation rate at the hprt locus in human cancer cell lines with specific mismatch repair-gene defects. *Carcinogenesis* 18(1):1-8

Gollapudi BB, Lynch AM, Heflich RH, Dertinger SD, Dobrovolsky VN, Froetschl R, Horibata K, Kenyon MO, Kimoto T, Lovell DP (2014) The in vivo Pig-a assay: A report of the International Workshop On Genotoxicity Testing (IWGT) Workgroup. *Mutat Res-Gen Tox En*

Graw J (2010) *Genetik*. Springer, Berlin Heidelberg New York

Green MH, O'Neill JP, Cole J (1995) Suggestions concerning the relationship between mutant frequency and mutation rate at the hprt locus in human peripheral T-lymphocytes. *Mutat Res-Envir Muta* 334(3):323-339

Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5):646-674

Harris CC (1991) Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s. *Cancer Res* 51(18 Supplement):5023s-5044s

Hillmen P, Bessler M, Mason PJ, Watkins WM, Luzzatto L (1993) Specific defect in N-acetylglucosamine incorporation in the biosynthesis of the glycosylphosphatidylinositol anchor in cloned cell lines from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Proc Natl Acad Sci* 90(11):5272-5276

ICH (1996) International Conference on Harmonisation (ICH). *Genotoxicity: Specific Aspects of Regulatory Genotoxicity Tests for Pharmaceuticals (S2A)*

ICH (2008) International Conference on Harmonisation (ICH): *Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use S2 (R1)*.

Ikenaga M, Takebe H, Ishii Y (1977) Excision repair of DNA base damage in human cells treated with the chemical carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide. *Mutat Res-Fund Mol M* 43(3):415-427

Ikezawa H (2002) Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 25(4):409-417

Jacinto FV, Esteller M (2007) MGMT hypermethylation: a prognostic foe, a predictive friend. *DNA repair* 6(8):1155-1160

Jacobson ED, Krell K, Dempsey MJ (1981) The wavelength dependence of ultraviolet light - Induced cell killing and mutagenesis in L5178Y mouse lymphoma cells *J Photochem Photobiol* 33(2):257-260

Jeannot E, Pogribny IP, Beland FA, Rusyn I (2011) Chronic administration of ethanol leads to an increased incidence of hepatocellular adenoma by promoting *H-ras*-mutated cells. *Cancer Lett* 301(2):161-167

Jhappan C, Noonan FP, Merlino G (2003) Ultraviolet radiation and cutaneous malignant melanoma. *Oncogene* 22(20):3099-3112

Jones DR, Varela-Nieto I (1998) The role of glycosyl-phosphatidylinositol in signal transduction. *The international journal of biochemistry & cell biology* 30(3):313-326

Karp G (2005) *Molekulare Zellbiologie*. Springer, Berlin Heidelberg New York

Kinoshita T, Inoue N, Murakami Y (2014) Glycosylphosphatidylinositol-N-Acetylglucosaminyltransferase (GPI-GlcNAc Transferase): A Complex Comprised of PIGA, PIGC, PIGH, PIGQ, PIGP, PIGY and DPM2. *Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes*:1193-1208

- Kirkland D, Aardema M, Banduhn N, Carmichael P, Fautz R, Meunier J, Pfuhler S (2007a) In vitro approaches to develop weight of evidence (WoE) and mode of action (MoA) discussions with positive in vitro genotoxicity results. *Mutagenesis* 22(3):161-175
- 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-Gen Tox En* 584(1):1-256
- Kirkland D, Kasper P, Müller L, Corvi R, Speit G (2008) Recommended lists of genotoxic and non-genotoxic chemicals for assessment of the performance of new or improved genotoxicity tests: a follow-up to an ECVAM workshop. *Mutat Res-Gen Tox En* 653(1):99-108
- Kirkland D, Pfuhler S, Tweats D, Aardema M, Corvi R, Darroudi F, Elhajouji A, Glatt H, Hastwell P, Hayashi M (2007b) 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
- Kirkland D, 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):114-132
- Knudson AG (2001) Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nature Reviews Cancer* 1(2):157-162
- Koyama N, Sakamoto H, Sakuraba M, Koizumi T, Takashima Y, Hayashi M, Matsufuji H, Yamagata K, Masuda S, Kinae N (2006) Genotoxicity of acrylamide and glycidamide in human lymphoblastoid TK6 cells. *Mutat Res-Gen Tox En* 603(2):151-158
- Kraemer KH, Levy DD, Parris CN, Gozukara EM, Moriwaki S, Adelberg S, Seidman MM (1994) Xeroderma pigmentosum and related disorders: examining the linkage between defective DNA repair and cancer. *Journal of investigative dermatology* 103:96-101
- Krawitz PM, Höchsmann B, Murakami Y, Teubner B, Krüger U, Klopocki E, Neitzel H, Hoellein A, Schneider C, Parkhomchuk D (2013) A case of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria caused by a germline mutation and a somatic mutation in PIGT. *Blood* 122(7):1312-1315
- Krüger CT, Hofmann M, Hartwig A (2014) The in vitro PIG-A gene mutation assay: mutagenicity testing via flow cytometry based on the glycosylphosphatidylinositol (GPI) status of TK6 cells. *Arch Toxicol*:1-15
- Lambert IB, Singer TM, Boucher SE, Douglas GR (2005) Detailed review of transgenic rodent mutation assays. *Mutat Res-Rev Mutat* 590(1):1-280
- Lesieur C, Vecsey-Semjen B, Abrami L, Fivaz M, Gisou van der Goot F (1997) Membrane insertion: the strategies of toxins. *Mol Membr Biol* 14(2):45-64
- Levy JA, Virolainen M, Defendi V (1968) Human lymphoblastoid lines from lymph node and spleen. *Cancer* 22(3):517-524
- Löbsack T (1969) Jagd auf mutagene Stoffe Die Zeit. vol 44. Verlagsgruppe Georg von Holtzbrinck, Hamburg
- Luzzatto L (2013) PNH from mutations of another PIG gene. *Blood* 122(7):1099-1100
- Lynch AM, Sasaki JC, Elespuru R, Jacobson-Kram D, Thybaud V, De Boeck M, Aardema MJ, Aubrecht J, Benz RD, Dertinger SD (2011) New and emerging technologies for genetic toxicity testing. *Environ Mol Mutagen* 52(3):205-223

- Marquardt H, Schäfer SG (1994) Lehrbuch der Toxikologie. BI Wissenschaftsverlag, Mannheim Leipzig Wien Zürich
- Miura D, Dobrovolsky VN, Mittelstaedt RA, Kasahara Y, Katsuura Y, Heflich RH (2008) Development of an In Vivo Gene Mutation Assay Using the Endogenous Pig-A Gene: II. Selection of Pig-A Mutant Rat Spleen T-Cells With Proaerolysin and Sequencing Pig-A cDNA From the Mutants. *Environ Mol Mutagen* 49(8):622-630
- Miura D, Shaddock JG, Mittelstaedt RA, Dobrovolsky VN, Kimoto T, Kasahara Y, Heflich RH (2011) Analysis of Mutations in the Pig-a Gene of Spleen T-cells from N-Ethyl-N-nitrosourea-Treated Fisher 344 Rats. *Environ Mol Mutagen* 52(5):419-423
- Miyata T, Takeda J, Iida Y, Yamada N, Inoue N, Takahashi M, Maeda K, Kitani T, Kinoshita T (1993) The cloning of PIG-A, a component in the early step of GPI-anchor biosynthesis. *Science* 259(5099):1318-1320
- Miyata T, Yamada N, Iida Y, Nishimura J, Takeda J, Kitani T, Kinoshita T (1994) Abnormalities of PIG-A transcripts in granulocytes from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *New Engl J Med* 330(4):249-255
- Mora C, Tittensor DP, Adl S, Simpson AG, Worm B (2011) How many species are there on Earth and in the ocean? *PLoS Biology* 9(8):e1001127
- Morita T, Nagaki T, Fukuda I, Okumura K (1992) Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells. *Mutat Res-Fund Mol M* 268(2):297-305
- Motoyama N, Naka K (2004) DNA damage tumor suppressor genes and genomic instability. *Curr Opin Genet Dev* 14(1):11-16
- Müller A, Klöppel C, Smith-Valentine M, Van Houten J, Simon M (2012) Selective and programmed cleavage of GPI-anchored proteins from the surface membrane by phospholipase C. *BBA-Biomembranes* 1818(1):117-124
- Nakamura J, Gul H, Tian X, Bultman SJ, Swenberg JA (2012) Detection of PIGO-Deficient Cells Using Proaerolysin: A Valuable Tool to Investigate Mechanisms of Mutagenesis in the DT40 Cell System. *PloS one* 7(3):e33563
- NCBI (2014) http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_002641.3 - Besucht am 15.08.2014
- Nishiwaki-Matsushima R, Ohta T, Nishiwaki S, Suganuma M, Kohyama K, Ishikawa T, Carmichael WW, Fujiki H (1992) Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *Journal of cancer research and clinical oncology* 118(6):420-424
- NPCR (2015) <http://apps.nccd.cdc.gov/uscs/toptencancers.aspx#Footnotes> - Besucht am 03.01.2015
- Nunoshiba T, Demple B (1993) Potent intracellular oxidative stress exerted by the carcinogen 4-nitroquinoline-N-oxide. *Cancer Res* 53(14):3250-3252
- O'Donovan M (2012) A critique of methods to measure cytotoxicity in mammalian cell genotoxicity assays. *Mutagenesis* 27(6):615-621
- OECD (1997a) Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test
- OECD (1997b) Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Test No. 476: In vitro Mammalian Cell Gene Mutation Test.
- Parker CJ (2007) The pathophysiology of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Exp Hematol* 35(4):523-533

- Parry JM, Parry EM (2012) *Methods in Molecular Biology* 817 (Springer Protocols) - Genetic Toxicology: Principles and Methods. Humana Press, New York
- Paulick MG, Bertozzi CR (2008) The Glycosylphosphatidylinositol Anchor: A Complex Membrane-Anchoring Structure for Proteins. *Biochemistry* 47(27):6991-7000
- Peruzzi B, Araten DJ, Notaro R, Luzzatto L (2010) The use of PIG-A as a sentinel gene for the study of the somatic mutation rate and of mutagenic agents in vivo. *Mutat Res-Rev Mutat* 705(1):3-10
- Pfuhler S, Fellows M, Van Benthem J, Corvi R, Curren R, Dearfield K, Fowler P, Frötschl R, Elhajouji A, Le Hégarat L (2011) In vitro genotoxicity test approaches with better predictivity: Summary of an IWGT workshop. *Mutat Res-Gen Tox En* 723(2):101-107
- Phonetheswath S, Franklin D, Torous DK, Bryce SM, Bemis JC, Raja S, Avlasevich S, Weller P, Hyrien O, Palis J, MacGregor JT, Dertinger SD (2010) Pig-a Mutation: Kinetics in Rat Erythrocytes Following Exposure to Five Prototypical Mutagens. *Toxicol Sci* 114(1):59-70
- Rosse WF, Ware R (1995) The molecular basis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 86(9):3277-3286
- Rotoli B, Luzzatto L (1989) 7 Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Baillieres Clin Haematol* 2(1):113-138
- Ryu J-C, Youn J-Y, Kim Y-J, Kwon O-S, Song Y-S, Kim H-T, Cho K-H, Chang I-M (1999) Mutation spectrum of 4-nitroquinoline N-oxide in the lacI transgenic Big Blue Rat2 cell line. *Mutat Res-Gen Tox En* 445(1):127-135
- Schwartz JL, Jordan R, Evans HH, Lenarczyk M, Liber HL (2004) Baseline levels of chromosome instability in the human lymphoblastoid cell TK6. *Mutagenesis* 19(6):477-482
- Scott D, Galloway SM, Marshall RR, Ishidate Jr M, Brusick D, Ashby J, Myhr BC (1991) Genotoxicity under extreme culture conditions: a report from ICPEMC Task Group 9. *Mutat Res-Rev Genet* 257(2):147-205
- Sedgwick B, Bates PA, Paik J, Jacobs SC, Lindahl T (2007) Repair of alkylated DNA: recent advances. *DNA repair* 6(4):429-442
- Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A (2011) Cancer statistics, 2011. *CA Cancer J Clin* 61(4):212-236
- Simons K, Toomre D (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nature reviews Molecular cell biology* 1(1):31-39
- Sinha RP, Häder D-P (2002) UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochem Photobiol Sci* 1(4):225-236
- Smith TK, Cottaz S, Brimacombe JS, Ferguson MA (1996) Substrate Specificity of the Dolichol Phosphate Mannose: Glucosaminyl Phosphatidylinositol 14-Mannosyltransferase of the Glycosylphosphatidylinositol Biosynthetic Pathway of African Trypanosomes. *J Biol Chem* 271(11):6476-6482
- Steen AM, Meyer KG, Recio L (1997a) Analysis of hprt mutations occurring in human TK6 lymphoblastoid cells following exposure to 1, 2, 3, 4-diepoxybutane. *Mutagenesis* 12(2):61-67
- Steen AM, Meyer KG, Recio L (1997b) Characterization of hprt mutations following 1, 2-epoxy-3-butene exposure of human TK6 cells. *Mutagenesis* 12(5):359-364

- Swierenga S, Heddle J, Sigal E, Gilman J, Brillinger R, Douglas G, Nestmann E (1991) Recommended protocols based on a survey of current practice in genotoxicity testing laboratories, IV. Chromosome aberration and sister-chromatid exchange in Chinese hamster ovary, V79 Chinese hamster lung and human lymphocyte cultures. *Mutat Res-Fund Mol M* 246(2):301-322
- Takeda J, Miyata T, Kawagoe K, Iida Y, Endo Y, Fujita T, Takahashi M, Kitani T, Kinoshita T (1993) Deficiency of the GPI anchor caused by a somatic mutation of the PIG-A gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cell* 73(4):703-711
- Van Zeeland A, Simons J (1976) Linear dose - response relationships after prolonged expression times in V-79 Chinese hamster cells. *Mutat Res-Fund Mol M* 35(1):129-137
- Vries Hd (1901-1903) *Die Mutationstheorie. Versuche und Beobachtungen über die Entstehung von Arten im Pflanzenreich.* vol Bd. I, Bd. II. Verlag von Veit and Company, Leipzig
- Watanabe R, Ohishi K, Maeda Y, Nakamura N, Kinoshita T (1999) Mammalian PIG-L and its yeast homologue Gpi12p are N-acetylglucosaminylphosphatidylinositol de-N-acetylases essential in glycosylphosphatidylinositol biosynthesis. *Biochem J* 339:185-192
- Watson JD, Crick FH (1953) Molecular structure of nucleic acids. *Nature* 171(4356):737-738
- Weinberg RA (1989) Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Res* 49(14):3713-3721
- Weinstein IB (1988) The origins of human cancer: molecular mechanisms of carcinogenesis and their implications for cancer prevention and treatment—twenty-seventh GHA Clowes memorial award lecture. *Cancer Res* 48(15):4135-4143
- Williams DE, Orner G, Willard KD, Tilton S, Hendricks JD, Pereira C, Benninghoff AD, Bailey GS (2009) Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and ultra-low dose cancer studies. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 149(2):175-181
- Yu S, Guo Z, Johnson C, Gu G, Wu Q (2013) Recent progress in synthetic and biological studies of GPI anchors and GPI-anchored proteins. *Curr Opin Chem Biol* 17(6):1006-1013
- Zhang J, Powell SN (2005) The role of the BRCA1 tumor suppressor in DNA double-strand break repair. *Mol Cancer Res* 3(10):531-539
- Zhen W, Denault C, Loviscek K, Walter S, Geng L, Vaughan A (1995) The relative radiosensitivity of TK6 and WI-L2-NS lymphoblastoid cells derived from a common source is primarily determined by their p53 mutational status. *Mutat Res Lett* 346(2):85-92
- Zölzer F, Kiefer J (1984) Wavelength dependence of inactivation and mutation induction to 6-thioguanine-resistance in V79 Chinese hamster fibroblasts. *J Photochem Photobiol* 40(1):49-53

8 ANHANG

8.1 Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin D
AD	Actinomycin D
ADP	Adenosintriphosphat
AML	Akute myeloische Leukämie
ANOVA	Analysis of variance
APC	Allophycoerythrin / Adenomatous polyposis coli (Gen)
BER	Basenexzisionsreparatur
BSA	Bovine serum albumin
CAT	Chromosomenabberations-Test
CD	Cluster of differentiation
CPD	Cyclobutan Pyrimidin Dimer
DAF	Decay-accelerating factor
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DNA	Deoxyribonucleic acid
EMS	Ethylmethansulfonat
ENU	N-Ethyl-N-nitrosoharnstoff
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
FLAER	Fluorescein labeled proaerolysin variant
FSC	Forward scatter
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GPI(-)	GPI-Defizienz / -defizient
GPI(/)	Phänotyp mit geringer GPI-Expression
GPI(+)	GPI-Profizienz / -profizient
GPI-PLC	Glycosylphosphatidylinositol spezifische Phospholipase C
GPI-PLD	Glycosylphosphatidylinositol spezifische Phospholipase D
GPI-T	Glycosylphosphatidylinositol-Transamidase
h	Stunde(n)
HI	Helligkeits-Index

HPRT / HPRT1	Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase (1)
ICH	International Conference on Harmonisation
LFA-3	Lymphocyte function-associated antigen 3
LOH	Loss of heterozygosity
m/v	Masse / Volumen
MGMT	O ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
min	Minute(n)
mM, µM, nM, pM	Milli-, micro-, nano-, pikomolar
MNT	Mikronukleus-Test
MYC	Myelocytomatose (Gen)
NCAM	Neutral cell adhesion molecule
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NPCR	National Program of Cancer Registries
NQO	4-Nitrochinolin-N-oxid
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
PAK	Polyzyklischer aromatischer Kohlenwassertoff
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin / Phosphoethanolamin
PIG	Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis
PIG-A	Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class A
PIG-L	Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class L
PI-PLC	Phosphatidylinositol spezifische Phospholipase C
PNH	Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie
PVZ	Populationsverdopplungszeit
RAS	Rat sarcoma (Gen)
RB	Retinoblastom (Gen)
RCC	Relative cell counts
REACH	Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals
RICC	Relative increase in cell counts
RNA	Ribonucleic acid
rpm	Rotations per minute
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunde(n)

SSC	Side scatter
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlordibenzodioxin
TK / TK1	Thymidinkinase (1)
UDS	Unscheduled DNA synthesis
v/v	Volumen / Volumen
VSG	Variant cell surface glycoprotein
WHO	World Health Organization
ZKS	Zellkulturschale

8.2 Verwendete Chemikalien und biologische Materialien

4-Nitrochinolin-N-oxid (NQO)	Sigma-Aldrich
7-AAD Lösung	Biolegend
Actinomycin D (AD)	Roth
Agarose	Roth
Bromphenolblau	Sigma
BSA (Serum Albumin Fraktion V)	Roth
Cycloheximid	Roth
DMSO	Sigma-Aldrich
Ethanol (reinst)	Roth
Ethylmethansulfonat (EMS)	Sigma-Aldrich
Formaldehyd	Roth
Fötale Kälberserum (FKS)	Gibco
Gelred Nucleic Acid Stain	Biotium
Glycerin	Roth
G-spin Total DNA Extraction Kit	Intron Biotechnology
Human TruStain FcX (Fc-Rezeptor Block)	Biolegend
Maus anti-human CD19-APC (HIB19)	Biolegend
Maus anti-human CD55-PE (JS11)	Biolegend
Maus anti-human CD59 (p282)	Biolegend
Maus anti-human CD59-PE (p282)	Biolegend
Mercaptoethanol	Roth
Natriumhydrogencarbonat	Roth
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich

PI-PLC	Sigma
Proaerolysin	Dr. Peter Howard, University of Saskatchewan, Canada
Pyridin	Sigma-Aldrich
qScript cDNA Synthesis Kit	Quanta BioScience
RNA-Isolierungs Kit NucleoSpin RNA	Macherey-Nagel
RPMI-1640 (mit L-Glutamin, ohne NaHCO ₃)	Sigma-Aldrich
Taq PCR Core Kit	Quiagen
TK6 Zelllinie	CLS Cell Lines Service GmbH
Tris	Roth
WI-L2-NS Zelllinie	Public Health England
Ziege anti-Maus IgG (polyklonal)	Biolegend

8.3 Lösungen und Puffer

7-AAD haltiger Färbepuffer	Färbepuffer mit 0,7 µg/mL 7-AAD
Färbepuffer	PBS mit 1% BSA (m/v) und 0,1% Natriumazid (m/v)
Fixierungs-Puffer	PBS mit 1% Formaldehyd (v/v) und 2,5 µg/mL Actinomycin D
Kryo-Medium	FKS mit 10% DMSO (v/v)
Ladepuffer	1 mL Glycerin 3 mL bidestilliertes Wasser 5 mg Bromphenolblau
PBS	0,1 M NaCl 0,0045 M KCl 0,007 M Na ₂ HPO ₄ 0,003 M KH ₂ PO ₄
TAE Puffer	0,04 M Tris 0,001 M Na ₂ EDTA 0,02 M Essigsäure

8.4 Verbrauchsmaterialien

24-Well Lochplatten, transparent	TPP
96-Well Lochplatten, transparent	TPP
6-Well Lochplatten, transparent	TPP
Cellstar Ø 35 mm Zellkulturschalen (PS)	Greiner Bio-One
Kryoröhrchen mit Gewinde 1,8 mL	Sarstedt
Mikroreaktionsgefäße (1,5 mL und 2 mL)	Sarstedt
Nadeln 0,4 mm	Terumo
PCR-Streifen	Sarstedt
Pipettenspitzen 0,1 – 20 µL	Brand
Pipettenspitzen 1 – 200 µL	Roth
Pipettenspitzen 100 – 1000 µL	Sarstedt
Pipettenspitzen 500 – 5000 µL	Eppendorf
Pipettierwannen für 8-Kanal Pipette 100 mL	NeoLab
Plastikröhrchen (15 mL und 50 mL)	Sarstedt
Spritzen 1 mL	Braun
Zellkulturflaschen verschiedener Größe	TPP / Sarstedt
Zellkulturschalen Ø 60 mm	Sarstedt

8.5 Verwendete Geräte

8-Kanal Pipette (max. 100 µL je Kanal)	Eppendorf
Bildanalysator LAS-3000	Fuji
Brutschrank Heracell 150i	Thermo Scientific
Cryo 1 °C Cooler	VWR
Durchflusszytometer LSR Fortessa	Becton Dickinson
Elektrophorese Kammer	Peqlab
Heizschüttler MKR13	HLC
Kolbenhubpipetten (verschiedene Volumina)	Eppendorf
Konfokalmikroskop Axiovert 40C	Zeiss
Multipette	Eppendorf
Plattenlesegerät Infinite M200PRO	Tecan
Reinstwasseranlage Milli-Q	Millipore
Schwenkplatte 3012	GFL

Software DNADynamo (Version 1.0)	BlueTractorSoftware
Software Origin (Version 9.1)	OriginLab
Software PyMOL (Version 1.3)	Schrödinger
Spannungsquelle EPS601 für Elektrophorese	Amersham Bioscience
Thermocycler T100	Biorad
Tischzentrifuge 5417R (kühlbar)	Eppendorf
Ultrafeinwaage BP 61S	Sartorius
UV-C Strahlungsquelle VL-6C 254 nm	Vilber Lourmat
Vortex Genie 2T (mit und ohne Aufsatz)	Scientific Industries
Waage VWR 1502	Sartorius
Wasserbad	Memmert
Zellzählgerät Coulter Z2	Becton & Dickinson
Zentrifuge 5810R (kühlbar)	Eppendorf

8.6 Ergänzende Daten

8.6.1 Testprotokoll für den in vitro PIG-A Assay

PIG-A Assay

A) Bestimmung der GPI(-) Frequenz in TK6 Zellen

Geräte: Zellzählgerät, Zentrifuge für Mikroreaktionsgefäße (Tubes) bei 250 g (4 °C), Zentrifuge für 15 – 50 mL Tubes bei 250 g (4 °C), Zellzählgerät, Schwenkplatte, Vortex mit Aufsatz (z.B. Vortex Genie 2T mit Aufsatz für 60 Reaktionsgefäße), Vortex ohne Aufsatz, Multipette für 150 µL, 500 µL und 1 mL Aliquots.

Materialien: 15 mL Tubes, 5 mL FACS-Tubes, 2 mL Tubes (Rundboden), Styroporbox mit Eis für Antikörper-Inkubation.

Reagenzien/Chemikalien: Maus anti-human CD59-PE (clone p282, Biolegend Cat. 304708), Maus anti-human CD55-PE (clone JS11, Biolegend Cat. 311308), Maus anti-human CD19-APC (clone HIB19, Biolegend Cat. 302212), 7-Aminoactinomycin D (7-AAD)-Lösung (50 µg/mL, Biolegend Cat. 420404), Actinomycin D (Roth, Cat. 8969.1), Phosphate buffered saline (PBS), Rinderserumalbumin (BSA), Natriumazid, Dimethylsulfoxid (DMSO).

Puffer:

Färbepuffer: PBS mit 1% BSA (w/v) und 0,1% Natriumazid (w/v). Kalt lagern und kalt verwenden! Nach Herstellung durch einen Faltenfilter filtrieren. Min 3 Monate haltbar.

7-AAD Puffer: Färbepuffer mit 0,7 µg/mL 7-AAD (m/v). Kalt lagern und kalt verwenden! Vor Licht schützen! Min 1 Monat haltbar.

Herstellung von 13 mL 7-AAD Puffer (in 15 mL Tube mit Alufolie umwickelt):

12,82 mL Färbepuffer + 182 µL 7-AAD Lösung (Biolegend)

Fixierungs-Puffer: PBS + 1% Formaldehyd (v/v) + 2,5 µg/mL Actinomycin D. Kalt lagern und kalt verwenden! Vor Licht schützen! Min. 1 Monat haltbar.

Herstellung von 10 mL Fixierungs-Puffer (in 15 mL Tube mit Alufolie umwickelt):

9730 µL PBS, 270 µL Formaldehyd (37%) und 2,5 µL Actinomycin D-Lösung (10 mg/mL in DMSO)

PBS: Bidestilliertes Wasser mit 0,1M NaCl, 0,0045M KCl, 0,007M Na₂HPO₄, 0,003M KH₂PO₄.

Anmerkungen: Mit Fluoreszenzfarbstoffen unter ausreichendem Lichtausschluss arbeiten. Ab Punkt 6. **Nitrilhandschuhe** tragen! 7-AAD, Actinomycin D und Formaldehyd sind genotoxisch! **Zentrifugationsbedingungen: 250 g, 4 °C, 5 min**

Testdurchführung (Dreifachbestimmung der GPI(-) Frequenz aus einem Ansatz):

1. Zellen gründlich (!) resuspendieren und 8 Mio Zellen in ein 15 mL Tube überführen, zentrifugieren. Überstand absaugen. Tubes auf Eis lagern.
2. Zellpellet in 3 mL Färbepuffer aufnehmen, mehrmals mit der Pipette resuspendieren, Zellzahlbestimmung.
3. *Pipettieren der Aliquots:* 15 mL Tube kurz auf mittlerer Stufe vortexen und dreimal 2 Mio Zellen in je ein 2 mL Tube (Rundboden) pipettieren¹. Tubes zentrifugieren und Überstand abkippen². Zugabe von je 150 µL Färbepuffer mit einer Multipette.
4. *Antikörper-Färbung:* Tubes 20 sek zentrifugieren (falls sich Zellen durch das Abkippen an der Wandung befinden), mit *gepoolter anti-human CD19/55/59 Antikörper-Lösung* versetzen (in den Färbepuffer pipettieren und Pipette nachspülen) und in einem Vortex mit Aufsatz auf mittlerer Stufe 20 sek resuspendieren. Danach Tubes 15 min auf Eis (Styroporbox mit Deckel) auf einer Schwenkplatte im Dunkeln inkubieren.

Gepoolte anti-human CD19/55/59 Antikörper-Lösung: Hier können die benötigten Volumina variieren, da die käuflich erworbenen Antikörper sich im Proteingehalt unterscheiden können. Als praktikabel haben sich für eine Färbung von 2 Mio Zellen erwiesen: 0,175 µg Maus anti-human CD19-APC, 0,6 µg Maus anti-human CD55-PE und 2,4 µg Maus anti-human CD59-PE. Stets für einen Ansatz mehr poolen, damit die Antikörper-Lösung für alle Ansätze ausreicht.

Anschließend Tubes 20 sek fügen, erneut auf einem Vortex mit Aufsatz auf mittlerer Stufe 20 sek resuspendieren. Weitere 15 min Inkubation auf Eis (in Styroporbox mit Deckel) auf einer Schwenkplatte im Dunkeln.

5. *Waschprozedur*: Nach der Inkubation erfolgt direkt die Zugabe von je 1 mL Färbepuffer je Tube mit einer Multipette. Ansätze auf einem Vortex mit Aufsatz auf mittlerer Stufe 40 sek resuspendieren. Anschließend zentrifugieren und Überstand abkippen². Diese Waschprozedur mit 1 mL Färbepuffer wiederholen. Nach dem Zentrifugationsschritt Überstand erneut abkippen².
6. *Färbung toter Zellen*: Auf die Zellpellets 500 µL 7-AAD Puffer (Multipette) geben. Tubes anschließend mit einem Vortex mit Aufsatz auf mittlerer Stufe 20 sek resuspendieren. Anschließend 7 min auf Eis (dunkel) auf einer Schwenkplatte inkubieren. Danach zentrifugieren.
7. *Fixierung*: Ab diesem Punkt Tubes **einzel**n bearbeiten. Überstand der 7-AAD Färbung abkippen und 200 µL Fixierungs-Puffer (CAVE! Enthält Formaldehyd) zugeben. Sofort auf mittlerer Stufe 3 sek vortexen, um Klumpung der Zellen zu vermeiden. Tube auf Eis (dunkel) stellen und mit nächstem Tube weiter verfahren. Zur FACS-Messung die Zellen in ein FACS-Tube überführen und mit bis zu 10.000 Events/sek am Durchflusszytometer analysieren.

¹ Zur Vermeidung von Blasen beim Aliquotieren der Zellen, die später beim Abkippen stören, folgendermaßen pipettieren: Pipette etwas weiter als zum ersten Druckpunkt durchdrücken, dann die Pipette mit Zellsuspension füllen. Die Pipette beim Überführen der Zellen in ein Tube nun lediglich bis zum ersten Druckpunkt betätigen. Auf diese Weise wird das korrekte Volumen pipettiert, es entstehen dabei jedoch keine störenden Blasen.

² Tubes mit der Öffnung zum Rotormittelpunkt ausgerichtet zentrifugieren. Saugfähiges Papier auf den Tisch legen. Anschließend den Überstand durch Neigung des Tubes (ggf. durch einen leichten Ruck) in ein Gefäß werfen. Nach dem Werfen den Neigungswinkel des Tubes nicht verändern. Nun durch leichtes Tupfen auf das Papier die Restflüssigkeit entfernen. Anschließend das Tube mit dem Zellpellet in ein Rack stellen. Die Zellpellets ohne Flüssigkeit sollten nicht länger als 2 min ohne Pufferzugabe an der Luft verbleiben. Die simultane Bearbeitung von bis zu 12 Proben ist jedoch möglich.

B) Inkubation von TK6 Suspensionszellen

Geräte: Brutschrank, Zellzählgerät, Zentrifuge für 15 – 50 mL Tubes bei 250 g

Materialien: 25 und 75 cm² Zellkulturflaschen, 15 und 50 mL Tubes

Reagenzien/Chemikalien: Die Zellen werden in RPMI-1640 mit 0,3 g/L L-Glutamin und 2 g/L Natriumhydrogencarbonat mit 10 % (v/v) fötalem Kälberserum (FKS) und 100 U/mL Penicillin/Streptomycin inkubiert sowie kultiviert. Als Lösemittel für lipophile Substanzen sollte DMSO mit maximal 0,5 % (v/v) im Inkubationsansatz eingesetzt werden.

Anmerkungen: Die maximale Konzentration der Prüfsubstanz sollte einen RICC-Wert (siehe Teil C) von 10 % im Vergleich zur Kontrolle nicht unterschreiten. Aufgetaute Zellen sollten aufgrund der Akkumulation von GPI(-) Zellen bis maximal fünf Tage nach Inkulturnahme für Inkubationen verwendet werden (siehe [1]).

Durchführung:

Beispielhaft wird folgender Versuchsansatz beschrieben: Eine Kontrolle und drei Konzentrationen einer lipophilen Testsubstanz, 4 h Inkubation mit 5 Mio Zellen pro Ansatz.

- 1) Kryokonservierte Zellen (Mutanten-abgereichert, siehe Teil D) für die Testdurchführung mindestens zwei bis drei Tage vor der Inkubation in Kultur nehmen, damit ausreichend Zellen zur Verfügung stehen. Bei gewünschter Durchführung einer Doppelbestimmung (2 x 4 = 8 Ansätze) die Zellen vier Tage vorher in Kultur nehmen. Es besteht weiterhin die Möglichkeit, die Anzahl der Zellen pro Inkubation von 5 Mio (in 10 mL RPMI-1640) auf 3 Mio (in 6 mL RPMI-1640) zu reduzieren, bspw. falls zu wenig Zellen zur Verfügung stehen oder Testsubstanz eingespart werden soll.
- 2) Die Testsubstanz-Lösungen in DMSO 200-fach konzentrierter herstellen im Vergleich zur Endkonzentration im RPMI-1640 Medium. Die Lösungen wenn möglich erst kurz vor der Zugabe zu den Zellen herstellen.
- 3) Zellsuspension gründlich resuspendieren, 21 Mio Zellen in ein 50 mL Tube überführen, zentrifugieren (250 g, RT, 5 min), den Überstand absaugen und 42 mL RPMI-1640 (37 °C) zugeben. Erneut gründlich resuspendieren und je 10 mL Aliquots in kleine Zellkulturflaschen (ZKF) pipettieren.
- 4) Es folgte die Zugabe von je 50 µL der Testsubstanz-Stammlösungen (200-fach konzentriert, 50 µL auf 10 mL entspricht einer 1:200 Verdünnung). Die Testsubstanz

dabei direkt in das Medium pipettieren und die Pipettenspitze nachspülen). Wurden weniger Zellen in einem geringeren Volumen RPMI-1640 eingesetzt, muss ebenfalls das Volumen der Testsubstanz-Stammlösungen angepasst werden.

- 5) Durch Schwenken der ZKF die Testsubstanz im Medium verteilen und für 4 h im Brutschrank inkubieren.
- 6) Die Zellsuspension wird aus den ZKF in 15 mL Tubes überführt. Diese werden bei 250 g und RT für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und die Zellen in 4 mL PBS (37 °C) resuspendiert. Anschließend erneut für 5 min unter gleichen Bedingungen zentrifugieren, das PBS absaugen und das Zellpellet in 3 mL RPMI-1640 (37 °C) gründlich resuspendieren. Es folgt eine Zellzahl-Bestimmung.
- 7) Abschließend werden 2 Mio Zellen in 25 mL RPMI-1640 oder wahlweise 1 Mio Zellen in 35 mL RPMI-1640 ausgestreut. Siehe hierzu „Subkultivierung für die Phänotyp-Expression“.

Subkultivierung für die Phänotyp-Expression:

Die Phänotyp-Expressionszeit beträgt 10 Tage nach 4 h und 11 Tage nach 24 h Inkubationen. Hierbei ist es möglich, die Zellen im 2 oder 3 Tage-Rhythmus zu subkultivieren. Generell ist der 2 Tage-Rhythmus zu bevorzugen, da in diesem Fall mehr Zellen subkultiviert werden.

Für den 2 Tage-Rhythmus werden 2 Mio Zellen in 25 mL RPMI-1640 und für den 3 Tage-Rhythmus 1 Mio Zellen in 35 mL RPMI-1640 subkultiviert. Folgende Subkultivierungsprozedere werden vorgeschlagen:

Mo Inkubation (4 h), subkultivieren von 2 Mio Zellen in 25 mL → **Mi** subkultivieren von 2 Mio Zellen in 25 mL → **Fr** subkultivieren von 1 Mio Zellen in 35 mL → **Mo** subkultivieren von 1 Mio Zellen in 35 mL → **Do Auswertung**.

Di Inkubation (4 h), subkultivieren von 1 Mio Zellen in 35 mL → **Fr** subkultivieren von 1 Mio Zellen in 35 mL → **Mo** subkultivieren von 2 Mio Zellen in 25 mL → **Mi** subkultivieren von 2 Mio Zellen in 25 mL → **Fr Auswertung**.

Wahlweise können die Zellen stets im 2 Tage-Rhythmus kultiviert werden; in diesem Fall muss jedoch am Wochenende gearbeitet werden:

Mo Inkubation (4 h), subkultivieren von 2 Mio Zellen in 25 mL → **Mi** subkultivieren von 2 Mio Zellen in 25 mL → **Fr** subkultivieren von 2 Mio Zellen in 25 mL → **So** subkultivieren von 2 Mio Zellen in 25 mL → **Di** subkultivieren von 2 Mio Zellen in 25 mL → **Do Auswertung**.

C) Bestimmung der Zytotoxizität der Behandlung mittels RICC

Geräte: Zellzählgerät

Materialien: 24-Well Lochplatten

Anmerkung: *In vitro* Mutagenitäts-Tests wie der PIG-A Assay neigen dazu, unter zu ausgeprägter Zytotoxizität der Prüfsubstanz zu irrelevant-positiven Testergebnissen zu führen. Aufgrund dessen sollte die höchste eingesetzte Konzentration einen RICC-Wert von 10% im Vergleich zur Kontrolle keinesfalls unterschreiten. Ebenfalls sollte mindestens eine Konzentration ohne ausgeprägte Zytotoxizität eingesetzt werden [1].

Durchführung:

Zur Ermittlung von RICC werden die Zellen nach erfolgter Behandlung (nach Schritt 6, Teil A) in 24-Well Platten ausgestreut und deren Zellzahl nach 48 h am Zellzählgerät bestimmt. Je Inkubationsansatz (und der Kontrolle) werden hierfür 50.000 Zellen in 500 µL RPMI-1640 pro Well in drei Wells (Dreifachbestimmung) ausgestreut. Anschließend werden die Zellen für 48 h im Brutschrank gelagert. Anschließend wird die Zellsuspension in den Wells gründlich resuspendiert und die Zellzahl am Zellzählgerät bestimmt. Es empfiehlt sich, die Zellzahl je Ansatz in einer Doppelbestimmung zu ermitteln. Somit ergeben sich insgesamt sechs Messwerte für jeden Ansatz. Diese werden gemittelt und für die Berechnung von RICC herangezogen:

$$\text{RICC (\% der Kontrolle)} = [(Zellzahl^*_{\text{Behandlung}} - 0,1 \times 10^6) / (Zellzahl^*_{\text{Kontrolle}} - 0,1 \times 10^6)] \times 100$$

*Zellzahl in Zellen / mL

D) Abreicherung von GPI(-) Zellen, Kryokonservierung und Inkulturnahme

Geräte: Kühlschrank, Cryo 1 °C Cooler (VWR)

Materialien: Cellstar Zellkulturschalen (ZKS) Ø 35 mm (Greiner bio one), 75 und 175 cm² Zellkulturflaschen, 15 und 50 mL Tubes, Kryo-Tubes (mit Schraubgewinde)

Reagenzien/Chemikalien: Ziege anti-Maus IgG (polyclonal, Biolegend Cat. 405301), Maus anti-human CD59, (clone p282, Biolegend Cat. 304702), BSA, Fötales Kälberserum (FKS)

Puffer und Lösungen: PBS (siehe Teil A), BSA-Lösung (2 % BSA m/v in PBS), Kryo-Medium (FKS mit 10% DMSO v/v)

Anmerkung: Bei allen Pipettier- sowie Absaugschritten muss darauf geachtet werden, die Lösung **vorsichtig am Rand der ZKS** einlaufen zu lassen oder vorsichtig am Rand, bestenfalls ohne direkte Berührung des Bodens abzusaugen. **Auf keinen Fall darf mitten auf der Schale gearbeitet werden**, da anderweitig gebundene Antikörper oder an diese gebundene Zellen vorzeitig abgelöst werden wodurch die Abreicherung misslingt.

Durchführung:

- 1) Für eine Durchführung wird 1 mL Ziege anti-Maus IgG Lösung (10 mg Antikörper in PBS, 4 °C) in eine Cellstar Zellkulturschale pipettiert und über Nacht im Kühlschrank inkubiert.
- 2) Am Folgetag wird die Lösung abgesaugt. Es werden 1 mL BSA-Lösung (2 % BSA m/v in PBS) in die Schale pipettiert und für 1 h bei RT inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren.
- 3) Die BSA-Lösung wird abgesaugt. Es werden 1 mL Maus anti-human CD59 Lösung (5 mg Antikörper in PBS) in die Schale pipettiert und für 1 h bei RT auf einer Schwenkplatte inkubiert.
- 4) Die Lösung wird abgesaugt. Anschließend werden 1 mL PBS in die Schale pipettiert. Diese wird 3 sek vorsichtig geschwenkt (8er Bewegungen), wonach das PBS abgesaugt wird.
- 5) Es erfolgt die Zugabe von 1×10^6 TK6 Zellen in 1 mL RPMI-1640 (37 °C). Die Zellen werden für 1 h im Brutschrank inkubiert.

- 6) Nach erfolgter Inkubation wird der Überstand abgesaugt, es wird 1 mL RPMI-1640 (37 °C) in die Schale pipettiert und die ZKS wird leicht geschwenkt (8er Bewegungen). Diese Wasch-Prozedur wird weitere drei Mal wiederholt, um eine nahezu quantitative Abreicherung der GPI(-) Zellen zu erzielen.
- 7) Es werden 10 mL RPMI-1640 (37 °C) in eine 75 cm² ZKF vorgelegt. Abschließend wird der Zelllayer gründlich mit 1 mL RPMI-1640 (37 °C) resuspendiert (wobei die Zellen von der ZKS abgelöst werden). Die Zellsuspension wird in die vorgelegten 10 mL RPMI-1640 pipettiert. Dieser Schritt wird weitere zwei Mal mit je 1 mL RPMI wiederholt.

Kryokonservierung:

Es empfiehlt sich, nach erfolgter Abreicherung mindestens 15 Aliquots mit je 3-4 Mio Zellen zu konservieren. Hierfür werden die abgereicherte Zellen entsprechend hochkultiviert, wofür sie bei einer Zelldichte von ca. $0,5 - 1,0 \times 10^6$ Zellen / mL von der 75 in eine 175 cm² ZKF mit 60 – 80 mL RPMI-1640 überführt werden. Nach ausreichender Zelldichte (aber maximal $1,0 \times 10^6$ Zellen / mL) wird die Zellsuspension in 50 mL Tubes überführt und bei 250 g bei RT für 5 min zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand abgesaugt und die Zellen in Kryo-Medium mit einer Zelldichte von 4×10^6 Zellen / mL resuspendiert. Die Kryo-Tubes werden mit je 1 mL Zellsuspension befüllt und in den auf 4°C vorgekühlten Cryo 1 °C Cooler gestellt. Dieser wird anschließend über Nacht im Biofreezer gelagert. Am Folgetag können die Aliquots in Flüssigstickstoff überführt werden. Dabei muss ein antauen der Tubes verhindert werden.

Inkulturnahme:

In ein 15 mL Tube werden 10 mL RPMI-1640 (37 °C) vorgelegt. Das Kryo-Tube wird bis zum Auflösen des letzten Eiskristalls in ein 37 °C warmes Wasserbad gehalten. Sofort im Anschluss wird die Zellsuspension in die 10 mL PRMI-1640 pipettiert und die Spitze wird einmal nachgespült. Das 15 mL Tube wird verschlossen, zwei Mal invertiert und anschließend bei 250 g und RT für 5 min zentrifugiert. In der Zwischenzeit werden 20 mL RPMI-1640 (37 °C) in eine 75 cm² ZKF vorgelegt. Der Überstand des zentrifugierten 15 mL Tubes wird abgesaugt, das Zellpellet in 10 mL RPMI-1640 aufgenommen und ebenfalls in die 75 cm² ZKF pipettiert (Gesamtvolumen 30 mL RPMI-1640).

[1] Krüger CT, Hofmann M, Hartwig A (2014) *The in vitro PIG-A gene mutation assay: mutagenicity testing via flow cytometry based on the glycosylphosphatidylinositol (GPI) status of TK6 cells. Archives of toxicology:1-15.*

8.6.2 GPI(-) Frequenzen der Positiv- und Negativ-Kontrollen

EMS, 4h Inkubation, TK6:

Konzentration	GPI(-) Frequenz (x10 ⁻⁶)		MW ± SD
	Experiment 1	Experiment 2	
Kontrolle (DMSO 0,5 % v/v)	28 / 59 / 39	46 / 49 / 47	45 ± 10
200 µM	110 / 99 / 91	77 / 83 / 69	88 ± 15
500 µM	231 / 235 / 207	227 / 210 / 201	219 ± 14
800 µM	220 / 228 / 253	282 / 294 / 230	251 ± 31

EMS, 4h Inkubation, WI-L2-NS:

Konzentration	GPI(-) Frequenz (x10 ⁻⁶)		MW ± SD
	Experiment 1	Experiment 2	
Kontrolle (DMSO 0,5 % v/v)	11 / 9 / 15	6 / 6 / 4	9 ± 4
200 µM	26 / 21 / 34	16 / 17 / 11	21 ± 8
500 µM	95 / 75 / 80	49 / 53 / 54	68 ± 18
800 µM	94 / 102 / 134	42 / 35 / 46	76 ± 40

EMS, 24h Inkubation, TK6:

Konzentration	GPI(-) Frequenz (x10 ⁻⁶)		MW ± SD
	Experiment 1	Experiment 2	
Kontrolle (DMSO 0,5 % v/v)	34 / 45 / 33	30 / 25 / 31	33 ± 7
100 µM	76 / 97 / 103	115 / 144 / 126	110 ± 24
150 µM	187 / 190 / 177	142 / 122 / 125	157 ± 31
200 µM	238 / 238 / 221	267 / 267 / 252	247 ± 18

UV-C, TK6:

Dosis	GPI(-) Frequenz (x10 ⁻⁶)		MW ± SD
	Experiment 1	Experiment 2	
Kontrolle (unbestrahlt)	13 / 10 / 13	26 / 20 / 26	18 ± 7
2 J/m ²	79 / 59 / 61	70 / 80 / 78	71 ± 9
5 J/m ²	90 / 90 / 109	94 / 95 / 84	94 ± 8
8 J/m ²	120 / 125 / 108	160 / 145 / 133	132 ± 19

NQO, 4h Inkubation, TK6:

Konzentration	GPI(-) Frequenz (x10 ⁻⁶)		MW ± SD
	Experiment 1	Experiment 2	
Kontrolle (DMSO 0,5% v/v)	38 / 32 / 33	24 / 28 / 33	31 ± 5
50 nM	119 / 118 / 95	81 / 92 / 96	100 ± 15
100 nM	126 / 129 / 110	111 / 119 / 128	121 ± 9
200 nM	179 / 188 / 189	122 / 116 / 129	154 ± 35

Cycloheximid, 4h, TK6:

Dosis	GPI(-) Frequenz (x10 ⁻⁶)		MW ± SD
	Experiment 1	Experiment 2	
Kontrolle (DMSO 0,5% v/v)	21 / 16 / 14	32 / 30 / 38	25 ± 10
1 mM	28 / 27 / 24	19 / 22 / 13	22 ± 6
5 mM	29 / 37 / 36	24 / 21 / 24	29 ± 7
10 mM	14 / 11 / 10	19 / 18 / 27	17 ± 6

Pyridin, 4h, TK6:

Dosis	GPI(-) Frequenz (x10 ⁻⁶)		MW ± SD
	Experiment 1	Experiment 2	
Kontrolle (Aqua Bidest.)	24 / 21 / 15	19 / 18 / 12	18 ± 4
1 mM	31 / 33 / 25	12 / 14 / 15	22 ± 9
5 mM	38 / 32 / 21	16 / 25 / 24	26 ± 8
10 mM	35 / 20 / 21	30 / 35 / 29	28 ± 7

Pyridin, 4h, WI-L2-NS:

Dosis	GPI(-) Frequenz (x10 ⁻⁶)		MW ± SD
	Experiment 1	Experiment 2	
Kontrolle (Aqua Bidest.)	6 / 4 / 5	5 / 3 / 6	5 ± 1
1 mM	7 / 2 / 5	8 / 7 / 6	6 ± 2
5 mM	2 / 7 / 7	5 / 11 / 7	7 ± 3
10 mM	9 / 12 / 6	9 / 11 / 13	10 ± 3

8.6.3 PIG-A mRNA Wildtyp und Mutanten Nukleotid-Sequenz

¹GACTCCGGCTGCAGCCGCGGGAGGTCCGGACACTGGCGGCCATGGAACTCACCGGT
AATAGAGGACACATCTCTTAACTGGGTTGCTCTAAGAACTGATGTCTAAACCGTCTCAGC
ATGGCCTGTAGAGGAGGAGCTGGGAATGGCCACCGTGCCTCAGCTACACTCTCTCGGG
TTAGCCCTGGAAGTCTTTACACATGTAGAACCCGTACCCATAATATATGCATGGTATCTG
ACTTTTTCTACCCAAATATGGGAGGCGTGGAAAGCCACATTTACCAGCTCTCTCAGTGC
CTGATTGAAAGAGGGCATAAGGTTATAATTGTCACCCATGCTTATGGAAATCGAAAAGG
CATCCGTTACCTCACCAGTGGCCTCAAAGTCTATTACTTGCCTCTGAAAGTCATGTACAA
CCAGTCTACAGCCACGACCCTCTTTCACAGTCTGCCATTGCTCAGGTACATATTTGTTCCG
GGAGAGAGTCACGATAATCCATTCACATAGTTCTTTTTCTGCTATGGCCCATGATGCTCT
CTTCCACGCCAAGACAATGGGGCTTCAGACAGTCTTCACGGACCATTCCCTTTTTGGAT
TTGCTGATGTCAGCTCGGTGCTTACAAACAAGCTTCTAACCGTGTCTCTTTGTGATACAA
ACCACATCATTTGTGTGTCTTATACTAGTAAGGAAAATACTGTAAGAGCAGCACTGA
ATCCTGAAATAGTGTCCGTCATTCTAATGCTGTAGATCCTACTGACTTCACTCCAGACC
CATTTAGAAGGCATGATAGTATAACTATTGTTGTTGTCAGCAGACTTGTTTACAGAAAAG
GGATCGATTTGCTTAGTGGTATAATACCTGAACTCTGTCAGAAATATCCAGATTTAAATTT
CATAATTGGA(⁹⁰³G→A)GAGAGGGACCAAAGAGAATCATTTTGAAGAAGTTCGGGAAAG
ATACCAGCTGCATGACAGGGTGCCTTTTTGGGAGCTTTAGAACACAAGGATGTTAGAA
ATGTCTTAGTTCAAGGACATATTTTTCTGAATACCTCCCTTACTGAAGCATTCTGCATGG
CGATCGTGGAAGCAGCCAGTTGTGGTTTACAGGTTGTAAGTACCAGAGTTGGTGGAAAT
CCTGAGGTGCTTCCAGAAAACCTTATTATTTTATGTGAGCCTTCAGTAAAATCTTTGTGT
GAAGGATTGAAAAGGCTATTTTCCAACCTGAAGTCAGGGACATTGCCAGCTCCAGAAAA
CATCCATAACATAGTAAAGACTTTCTACACCTGGAGGAATGTTGCAGAAAGAACTGAAAA
GGTATATGACCGGGTATCAGTGGAAAGCTGTGTTGCCAATGGACAAACGACTGGACAGA
CTTATTTCTCACTGCGGCCAGTAACAGGCTACATCTTTGCTTTGTTGGCAGTTTTCAAC
TTCCTCTTCTCATTCTTTCTTGAGATGGATGACTCCAGATTCTATCATTGATGTTGCAATAG
ATGCCACTGGGCCACGGGGTGCCTGGACTAATAACTATTCTCACAGTAAAAGAGGGGG
TGAGAATAATGAGATATCTGAAACCAGGTAG¹⁵⁷¹(...)

8.6.4 Primer für die PIG-A cDNA PCR sowie für die Sanger Sequenzierung

Tabelle 8: Primer für die PCR Amplifikation und für die Sanger-Sequenzierung. fw = forward, rv = reverse

Primer	Sequenz fw (Sense)	Sequenz rv (Antisense)
<i>P1</i>	CGGTAATAGAGGACACAT	GGAATGACGGACACTAT
<i>P2</i>	CTTCTAACCGTGTCTCTT	TGTCCAGTCGTTTGTC
<i>P3</i>	TTATGTGAGCCTTCAGTAA	TGAATGATATAGAGGTAGCA

PUBLIKATIONSLISTE

Publikationen

- Krüger CT, Hofmann M, Hartwig A (2014) *The in vitro PIG-A gene mutation assay: mutagenicity testing via flow cytometry based on the glycosylphosphatidylinositol (GPI) status of TK6 cells*. Archives of toxicology:1-15
- Krüger CT, Lachenmeier DW, Kratz E, Mildau G (2011) *Rapid Colorimetric Analysis of para-Phenylenediamine in Henna-based, Non-permanent Tattoo Color Mixtures*. Cosmetics&Toiletries 126(7):496-501

Vorträge auf Fachtagungen

- 28. Fachtagung der Gesellschaft für Umwelt-Mutationsforschung
Düsseldorf, 04. – 06. März 2015
Gesellschaft für Umwelt-Mutationsforschung (GUM)
„The in vitro PIG-A gene mutation assay - mutagenicity testing via flow cytometry based on the glycosylphosphatidylinositol (GPI) status of TK6 cells“
- 7. Nachwuchswissenschaftler-Meeting der Studiengruppe Biochemische Pharmakologie und Toxikologie
Günzburg, 12. – 13. September 2014
Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie (GBM)
„The in vitro PIG-A gene mutation assay - mutagenicity testing via flow cytometry based on the glycosylphosphatidylinositol (GPI) status of TK6 cells“
- 2. Workshop „Nachwuchsförderung“ der Gesellschaft für Umwelt-Mutationsforschung
Düsseldorf, 03. Juli 2014
Gesellschaft für Umwelt-Mutationsforschung (GUM)
„The in vitro PIG-A gene mutation assay - mutagenicity testing via flow cytometry based on the glycosylphosphatidylinositol (GPI) status of TK6 cells“

Posterbeiträge

- ToxNet Baden-Württemberg Symposium 2012
Karlsruhe, 23. November 2012
Toxikologie-Netzwerk Baden-Württemberg (ToxNet)
“The in vitro Pig-A assay – a promising approach for faster mutagenicity testing in mammalian cells”

- 42. Fachtagung der European Environmental Mutagen Society
Warschau (Polen), 16. – 20. September 2012
European Environmental Mutagen Society (EEMS)
„The PIG-A assay as an in vitro variant – a promising approach for mutagenicity testing”
Ausgezeichnet mit einem Posterpreis

- 26. Fachtagung der Gesellschaft für Umwelt-Mutationsforschung
Mainz, 28. Februar – 02. März 2012
Gesellschaft für Umwelt-Mutationsforschung (GUM)
„The new PIG-A assay as an in vitro variant – a promising approach for a new mutagenicity assay”

LEBENS LAUF

Persönliches

Name Christopher-Tilman Krüger
Geburtsdatum 30.12.1984 in Pforzheim
Staatsangehörigkeit deutsch

Promotion

Seit 05.2011 Promotion im Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. Andrea Hartwig
Karlsruher Institut für Technologie (KIT)

Studium und Staatsexamen

05.2010 – 04.2011 Staatsexamen Lebensmittelchemie
CVUA Karlsruhe

06.2009 – 02.2010 Diplomarbeit im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Dr. Manfred Metzler
Universität Karlsruhe (TH)
Thema: Methodenetablierung zur Bestimmung von 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-desoxyguanosin aus Zellen mittels LC-MS/MS

10.2004 – 02.2010 Studium der Lebensmittelchemie
Universität Karlsruhe (TH)

Schulische Ausbildung

1995 – 2004 Gymnasium Neuenbürg (Enzkreis)
Abschluss: Abitur

1991 – 1995 Grundschule Schlossbergschule, Neuenbürg (Enzkreis)

DANKSAGUNG

Denken und danken sind verwandte Wörter; wir danken dem Leben, in dem wir es bedenken. (Thomas Mann, 1875-1955)

In diesem Sinne möchte ich mich bei meiner Professorin Andrea Hartwig bedanken, die meine Promotion ermöglicht und begleitet hat. Danke für deine Unterstützung, dein Vertrauen und die gemeinsamen, lehrreichen Diskussionen. Ich würde mich sofort wieder dafür entscheiden, bei dir zu promovieren. Ebenfalls will ich mich bei meinen Kollegen und Kolleginnen bedanken; durch euch ist die Promotion wie im Fluge vergangen. Dies betrifft sowohl die in den Süden gezogenen „Berliner“ Annetta, Elisa, Liza und Daniel (mein lieber Emre), als auch Elena, Barbara, Beate und Sarah aus dem hohen Norden. Nicht zu vergessen die „neue Generation“ mit Rebecca, Matze (mein Sohn, ich bin stolz auf dich), Nadin ohne e und Doro. Mein besonderer Dank gilt meiner Büro-Ehe Bettina Maria „Bettinsche“ Fischer, die mit mir nicht nur das Büro, sondern ebenfalls ihre Lebensweisheiten, so manchen Schwank, als auch „Café au lait“ teilte. Nach jedem Streit folgte eine wundervolle Versöhnung, wie es nur in den besten Büro-Ehen der Fall ist. Auch bei unserem „lebensmittelchemischen“ Arbeitskreis mit Martin, Felix, Daniel, Judith, Andi, Rachel, und Pepe will ich mich bedanken, bei dir Pepe explizit für die spannenden, politischen Diskussionen. Außerdem hat die Einführung des „Mettwochs“ die universitäre Woche entscheidend bereichert! Vielen Dank daher an Martin und den „Mettkönig“ aus Franken. Zudem möchte ich mich bei meinen beiden Diplomandinnen Mareike und Bea für ihr Interesse und hervorragende Mitarbeit bedanken. Natürlich dürfen in diesem Kapitel die Eltern, die nicht-universitären Freundinnen und Freunde sowie die feste Freundin nicht fehlen. Beginnen möchte ich bei meinen Eltern, die mich stets unterstützt und an mich geglaubt haben. Vielen Dank, dass ihr immer für mich da wart und seid. Ich habe hier in Karlsruhe einen wirklich ganz hervorragenden Kreis an tollen Menschen um mich, viele aus dem alten Freundeskreis, aber auch Karlsruher Neuzugänge. Euch allen vielen Dank für alles, was Freunde eben ausmacht, ich werde Karlsruhe nur schweren Herzens verlassen. Besseren Ersatz werde ich nicht finden. Mein letzter Dank gebührt meiner Freundin, die sich so manche naturwissenschaftliche Ausschweifung meinerseits geduldig angehört hat, meistens ohne sich zu beschweren...