

In-vitro: Genotoxikologische Risikobewertung

Automatisiertes DNA-Strangbruch-Screening mit breiter Anwendung und hohem Standardisierungspotenzial

Dr. habil. Paula Braun, Dr. Frank K. Gehring, Dr. Inka Pfitzner

Die automatisierte Genotox-Lösung Aurea gToxxs dient der Erfassung erbgutschädigender Wirkungen von Chemikalien, Botanicals und Nanopartikeln – und das ganz ohne Tierversuche.

Die DNA fungiert als genetischer und regulatorischer Informationsträger und kodiert die Abfolge des Aminosäureeinbaus bei der Proteinsynthese. Spontane oder durch genotoxische Umweltstoffe verursachte Schäden in der DNA können direkt oder indirekt die DNA-Integrität beeinträchtigen und damit zu Krankheiten, wie (Lungen-)Krebs, Gefäßerkrankungen und zu frühzeitigem Altern führen. Die Entwicklung von Methoden, die DNA-Schäden und DNA-Reparatur messen können, ist deshalb von großer Wichtigkeit.

Alternative zu Tierversuchen

Genotoxikologische Risikobewertungen werden mithilfe von Tierversuchen (in vivo), mit Gewebe- und Zellkulturen (in vitro) oder per Struktur-Wirkungs-Beziehungen (SAR) durchgeführt, um ein mögliches gesundheitsschädliches Potenzial chemischer Stoffe beim

Menschen zu beurteilen. Die derzeitigen Prüfungs- und Bewertungsansätze für Genotoxizität beruhen meist auf In-vivo-Tests gemäß standardisierter OECD-Testrichtlinien. Neben der Tatsache, dass tierische Testsysteme nur eine beschränkte Aussagekraft für eine Wirkungsbeurteilung beim Menschen haben, stellen auch zeit- und kostentechnische Überlegungen wichtige Argumente für die Entwicklung alternativer Teststrategien dar.

Die Anforderungen an die chemische Risikobewertung steigen weltweit. Die im Umlauf befindlichen Chemikalien sind nur teilweise hinsichtlich ihrer Toxizität bewertet (ca. 20%) [1]. Die Anzahl der für toxikologische und andere Sicherheitsbewertungen verwendeten Tiere ist unvermeidbar hoch. Die Durchsetzung eines strengen Reguliersystems soll sicherstellen, dass Tierversuche nur dann durchgeführt werden, wenn keine praktikablen Alternativen existieren, gemäß den Grundsätzen der 3R-Prinzipien [2].

Neben der Aufgabenstellung, die große Zahl an anstehenden Chemikalien einer angemessenen Toxikologie zu unterziehen, erfordert die sinnvolle Organisation früher Stufen der pharmazeutischen Wirkstoffentwicklung neue, schnelle und aussagekräftige In-vitro-Methoden. Die genetische Toxizität eines Kandidatenmoleküls, z.B. für ein neues Medikament, Pestizid oder einen Nahrungsmittelzusatz, kann ein Grund für den Abbruch einer Entwicklung sein. Mit Aurea gToxxs steht ein In-vitro-Screening-Verfahren bereit, das in der frühen Produktentwicklung bereits vorhersagen kann, was in der regulatorischen Screening-Batterie geschehen kann.

Ohne aufwändige Probenvorbereitung

Die gToxxs-Lösung zur Messung von DNA-Strangbrüchen basiert auf dem „Fluorimetric Detection of Alkaline DNA

Bild 1: Die DNA-Strangbruch- und -Reparaturanalyse mit der gToxss-Lösung basiert auf dem „Fluorimetric Detection of Alkaline DNA Unwinding“-Assay

Unwinding“- (FADU-) Assay [3]. Im Unterschied zu vielen gängigen genotoxikologischen Tests benötigt die robuste FADU-Methode keine aufwändige Probenvorbereitung. Die automatisierte Methode [4, 5] misst die vorhandenen DNA-Strangbrüche zum Zeitpunkt der Zell-Lyse. Unter genau kontrollierten Bedingungen kommt es zur teilweisen Entwindung der doppelsträngigen DNA (dsDNA). Der Entwindungsprozess wird danach durch eine definierte pH- und Temperaturveränderung abgestoppt und die verbleibende dsDNA mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes SybrGreen[®] spezifisch markiert. Der Grad der gemessenen Fluoreszenz korreliert mit dem Ausmaß der DNA-Schädigung; dabei zeigt eine geringe Fluoreszenzintensität eine hohe Zahl an Doppelstrangbrüchen (DSB) an. Bild 3 zeigt das schematische FADU-Messprinzip [6]. Kontrollproben der Gesamt-DNA (maximale Fluoreszenz; Kontrolle 1) werden parallel zur Gesamt-dsDNA nach Entwindung unter physiologischen Bedingungen (100 %-Wert; keine induzierte Schädigung durch Testsubstanzen, Kontrolle 2) und unter maximal schädigenden Bedingungen (Fluoreszenzhintergrund; hohe Dosis) erfasst.

Aussagen zur DNA-Reparaturkapazität möglich

Die gToxss-Lösung bietet eine breite Anwendbarkeit eines sehr einfachen und schnellen Protokolls zum Nachweis von DSB, das unabhängig von ihrem Wirkungsmechanismus, auf bisher alle getesteten Substanzen angewendet werden konnte. Es werden ca. 100 Zellen/Well, je nach Zelltyp, für das Screening per gToxss benötigt. Bei Anwendung der zeitaufgelösten Messoption der Strangbruchanalyse bietet das Verfahren zusätzliche wertvolle Informationen über die DNA-Reparaturkapazität und damit den physiologischen Zustand der Zellen.

Bei Aurea gToxss handelt es sich um eine Komplettlösung mit maßgeschneiderten Assay-Kits zur Erfassung von DNA-Strangbrüchen. Der gToxss-Analyser vereint die CyBio[®] Liquid-Handling- und Automations-Robotik von Analytik Jena und das 3T PelTherm[®], ein äußerst leistungsfähiges Peltier-Element-basiertes Temperiersystem mit fünf unabhängigen Temperatureinheiten von -2 °C bis 80 °C.

Die gToxss-Lösung ist mit vorprogrammierten Methoden ausgestattet, die jedem Labormitarbeiter, unabhängig von vorhandenen Gerätekenntnissen, die Bedienung ermöglichen. Das Aurea-Team liefert maßgeschneiderte Applikations-Packages (Software, SOP, Assay-Kit), die auf die individuellen Applikations-,



Bild 2: Zwei Fliegen mit einer Klappe: Tierexperimente reduzieren und Zeit sparen.

Durchsatz- und Kapazitätsanforderungen unterschiedlicher Ansätze abgestimmt sind.

Der gTOXSS-Analyser für vollautomatisches 96-kanaliges Pipettieren bedient auf zwölf Deckpositionen in zwei Ebenen die mit Zellproben, Puffer-, Farb- oder Waschlösungen bestückten Mikrotiterplatten. Auf fünf Positionen werden bis auf 0,1 °C genau die relevanten Temperaturen mit einer Abkühlungsgeschwindigkeit von bis zu 12 °C/min

und einer Erwärmungsgeschwindigkeit von bis zu 22 °C/min erreicht. Die effiziente Temperaturregulierung ist ein wesentliches Kennzeichen des angebotenen Gesamtsystems und verbessert die statistische Wiederholbarkeit bei gleichzeitigem Zeitgewinn.

Die präzise Dispensiertechnik gewährleistet die gleichmäßige, abgestufte Verteilung der Flüssigkeiten bei exakter Höhenkontrolle auf die einzelnen Wells. Mit hoher Wiederholbarkeit und Präzision werden die notwendigen Übersichtungs- und Mischverfahren zur DNA-Entwindung und Markierung abgearbeitet. Die Generierung von bis zu 288 unabhängigen Messwerten, ermöglicht eine zuverlässige Abschätzung des Genotox-Potenzials bei einer hohen statistischen Relevanz in nur einem Run.

Risikobewertung mit Modell-Zelllinie HepaRG

Die HepaRG-Zelllinie wird als kommerzielles Modell menschlicher Hepatozyten eingesetzt und exprimiert die metabolisierenden Enzyme der Leber. Dadurch können Verbindungen, wie z.B. Aflatoxine, die ihre toxische Wirkung nur nach metabolischer Aktivierung entfalten, in vitro geprüft werden. Die Anwendbarkeit der HepaRG-Zelllinie in gToxss basierten Genotoxizitäts-Studien wurde mit einer biotransformationsabhängigen Substanz gezeigt [7].

Bild 5 zeigt die DNA-Strangbruchfrequenzen in HepaRG-Zellen (Biopredic International, France), ausgelöst durch die

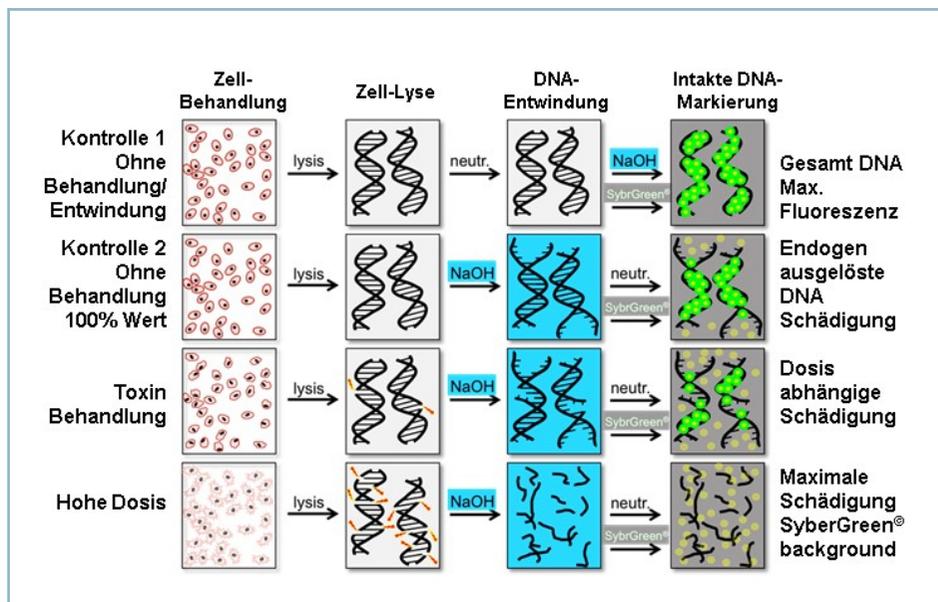


Bild 3: Prinzip des Aurea gToxss.



Bild 4: Die automatisierte Genotox-Lösung.

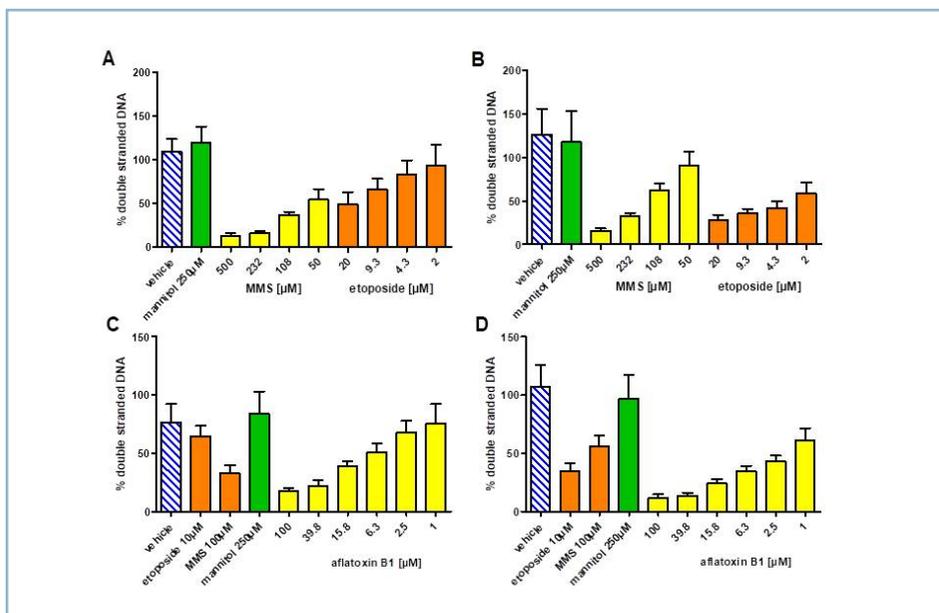


Bild 5: gToxss-Genotoxizität-Tests mit HepaRG Leberzellmodellen.

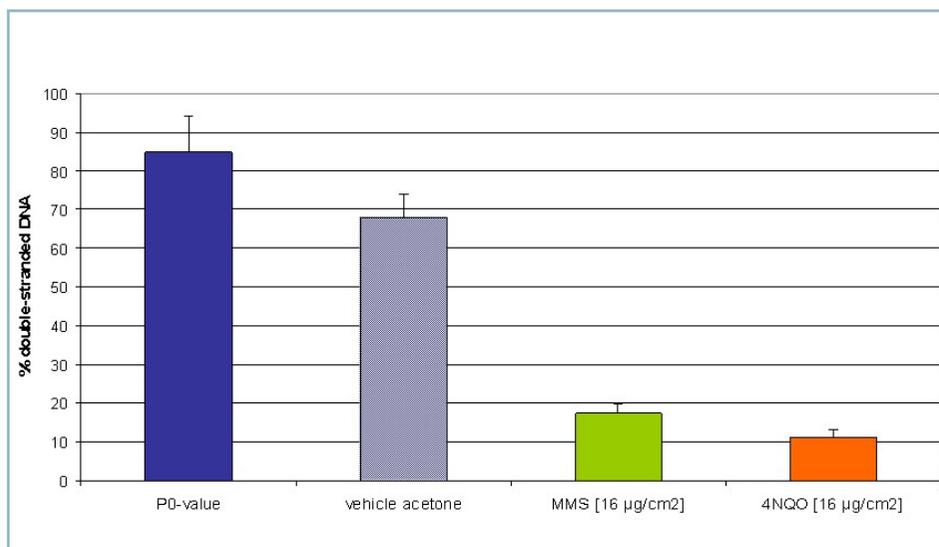


Bild 6: gToxss-Genotoxizität-Tests an rekonstruierten Hautmodellen.

genotoxischen Substanzen Etoposid, Methylmethansulfonat (MMS) oder Aflatoxin B (Exposition: 3 h (A, C) und 24 h (B, D)). Mannitol und 0,5% DMSO (Vehikel) werden als Kontrollansätze mitgeführt. Die Daten sind als Prozentsatz der unbehandelten Kontrollen angegeben. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte mit Standardabweichungen von mindestens zwei getrennten Experimenten ($n = 6$). Die Behandlung mit allen drei Noxen zeigte nach 3 h nur geringe zytotoxische Wirkung (nicht gezeigt), jedoch signifikant dosisabhängige Wirkung auf die DNA-Schädigung (A, C) und somit die genotoxische Wirkung. Die 24-Stunden-Exposition dagegen führt im Fall von Etoposid und Aflatoxin B neben genotoxischen Effekten (B, D) auch zu starken Auswirkungen auf die Zellviabilität (nicht gezeigt). Interessanterweise nehmen die durch MMS verursachten DNA-Schäden mit der Expositionsdauer ab, was auf einen spezifischen DNA-Reparaturmechanismus in den HepaRG-Zellen hindeutet. Diese Ergebnisse unterstreichen die breit-gefächerten Einsatzmöglichkeiten der gToxss-Lösung beispielsweise bei der Beurteilung der klinischen Signifikanz von Chemotherapeutika und der Entwicklung therapeutischer Strategien.

Risikobewertung an humanen, rekonstruierten Hautmodellen

Der Weg der Aufnahme einer Substanz in den Körper ist mitentscheidend für die Entfaltung der Wirksamkeit. Medikamente, die auf die Haut aufgetragen werden und über den transdermalen Weg in den Organismus übergehen, müssen die Barriere-Funktion der Haut überwinden. Rekonstruierte Hautmodelle sind daher als Modell für Arzneimittelabsorptionsstudien sehr interessant. Die Eignung der gToxss-Lösung für die genotoxikologische Risikobewertung an humanen, rekonstruierten Hautmodellen wurde demonstriert [8].

Bild 6 zeigt die DNA-Strangbruchfrequenz in 3D-Hautmodellproben (epiCS, CellSystems) normiert auf die Gesamt-DNA. Die Abbildung fasst die normale physiologische Ausgangssituation (Kontrolle 2, blau) und die Schädigung in Abhängigkeit von der Wirkstoffbehandlung mit MMS (grün), 4-NQO (orange) und in Aceton (Vehikel; grau) zusammen. Der Mittelwert und die Standardabweichung wurden aus zwei getrennten Experimenten ($n = 6$) ermittelt. Die genotoxikologischen Substanzen MMS und 4-NQO lösen im Vergleich zu unbehandelten 3D-

Hautmodellen, wie in der Literatur beschrieben, eine erhöhte Frequenz an DSB aus. Erste Experimente mit dem Ziel, die manuellen Arbeitsschritte der Gewebezerkleinerung zu optimieren, zeigten, dass Punch-Biopsien zwar bisher noch eine höhere Varianz aufweisen, jedoch eine praktikable Alternative zur zeitaufwändigen enzymatischen Zellver-einzelung darstellen. Die weitere Optimierung des manuellen Gewebeprozesses zielt darauf ab, zukünftig die Vorhersageleistung genotoxischer Effekte in 3D-Hautmodellen weiter zu vereinfachen.

Fazit

In-vitro-Modellsysteme in Verbindung mit der automatisierten Strangbruchanalyse durch Aureka gToxss sind eine wertvolle Alternative zu In-vivo-Studien. Der größte Vorteil von Aureka gToxss besteht in dem hohen Standardisierungspotenzial, das Reproduzierbarkeit und damit Vergleichbarkeit der Ergebnisse ermöglicht, auch wenn sie von verschiedenen Forschungsgruppen generiert wurden. Darüber

hinaus machen hohe Effizienz, geringe Kosten und die fehlende ethische Problematik gToxss besonders attraktiv für Screening-Ansätze, mit deren Ergebnisse weitere Studien konzipiert werden können.

Hinsichtlich der Empfindlichkeit, der Genauigkeit, dem Arbeitsaufwand, dem Probanddurchsatz und der Kosten ist die Automatisierung der genotoxikologischen Bewertung als äußerst wertvoll zu betrachten.

Referenzen

- [1] S. Uptown, 2017 https://www.youtube.com/watch?v=GrwFa_BYgMM.
- [2] Russell and Birch, 1959, *The Principles of Humane Experimental Technique*. http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane_exp/het-toc.
- [3] H. C. Birnboim, J. J. Jevcak, *Cancer Res.*, 1981, 41, 1889-1892.
- [4] M. Moreno-Villanueva, R. Pfeiffer, T. Sindlinger, A. Leake, M. Müller, T. B. L. Kirkwood, A. Bürkle, *BMC Biotechnology*, 2009, 9, 39.
- [5] M. Moreno-Villanueva, T. Eltze, D. Dressler, J. Bernhardt, C. Hirsch, P. Wick, G. von Scheven, K. Lex, A. Bürkle, *ALTEX*, 2011, 28, 295-303.

- [6] M. Moreno-Villanueva, A. Bürkle, *High-Throughput Screening Methods in Toxicity Testing*, (Hrsg.: P. Steinberg), John Wiley & Sons, New Jersey, 2013.
- [7] D. Dressler, I. Pfitzner, G. Daniel, K. Engelhart-Jentzsch, I. Hanegraaff, P. Braun, Ch. Chesne, F.K. Gehring. 2018, *SOT 57th Annual Meeting and ToxExpo, San Antonio, March 11th-15th*.
- [8] D. Dressler, I. Pfitzner, G. Daniel, K. Engelhart-Jentzsch, P. Braun, H. Fuchs, F.K. Gehring. 2018, *SOT 57th Annual Meeting and ToxExpo, San Antonio, March 11th-15th*.

AUTORIN

PhD Paula Braun

Dr. Frank K. Gehring

3T GmbH & Co. KG, Tuttlingen

www.3t-analytik.de

Ihre Vorteile auf einen Blick:

- Schnelle und automatische Bestimmung des genotoxischen Potenzials
- Erfassung der DNA-Schädigung und der DNA-Reparaturkapazität
- Einsparung von Kosten und Zeit bei der Absicherung von Produkte und wissenschaftlichen Ergebnissen

