

Der Mikrokern-Test *in vitro*

Ein Verfahren zum Nachweis genotoxischer Wirkungen von Gefahrstoffen

Sabine Plöttner, Thomas Brüning, Heiko U. Kätterlein

Der Mikrokern-Test ist eine in der Toxikologie häufig verwendete Methode zum Nachweis genotoxischer Effekte in Zellen, die sich geteilt haben. Die Anzahl an Mikrokernen wird hierbei als Marker für mutagene und genotoxische Schädigungen verwendet, die durch verschiedene chemische oder physikalische Einwirkungen verursacht werden können. Im IPA wurde der Mikrokern-Test *in vitro* an der humanen Harnblasenzelllinie RT4 etabliert, um zum einen das bestehende Methodenspektrum weiter zu ergänzen und andererseits um die genotoxische Wirkung von Gefahrstoffen spezifisch unter dem Gesichtspunkt der Entstehung von Harnblasenkrebs untersuchen zu können.

Der Mikrokern-Test, auch Mikronukleus- oder MN-Test, findet eine breite Anwendung zur Charakterisierung mutagener und genotoxischer Wirkungen von Gefahrstoffen sowie in zahlreichen Biomonitoring-Studien bei gefährstoffexponierten Beschäftigten zur Abschätzung eines potenziellen Risikos für Mutationen (Fenech et al. 1999; Nersesyan et al. 2016). In den vergangenen Jahren wurde der Test auch in Feldstudien des IPA im Rahmen des biologischen Effektmonitorings durchgeführt (Welge et al. 2011). Die größte Bedeutung kommt dem MN-Test jedoch bei der Risikobewertung von Chemikalien und im Zulassungsverfahren von neuen Medikamenten zu.

Hierbei wird der Test sowohl *in vivo*, das heißt im Versuchstier, üblicherweise Ratte oder Maus, als auch *in vitro*, das heißt an Zellkulturen durchgeführt. Für beide Vorgehensweisen sind von der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD) Test-Vorschriften ver-

öffentlicht worden (Test Nr. 474: „Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test“ und Test Nr. 487: „*In Vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test“), die ein einheitliches experimentelles Vorgehen und damit eine gewisse Qualitätssicherung gewährleisten sollen.

Ein Instrument der Risikobewertung von Gefahrstoffen

Für den Mikrokern-Test *in vitro* können theoretisch alle Zellen verwendet werden, die in der Lage sind sich zu teilen, da Mikrokernkerne erst während der Kernteilung, auch Mitose genannt, entstehen. Als Endpunkt wird im MN-Test die Anzahl an Mikrokernen erfasst. Klassisch werden hierbei Präparate auf Objektträgern angefertigt, angefärbt und im Mikroskop ausgewertet. Dabei werden einzelne Zellen betrachtet und die Mikrokern-Rate ermittelt, die üblicherweise als Mikrokern pro 1.000 Zellen angegeben wird. Da es sich beim Auftreten von Mikrokernen um prinzipiell seltene Ereignisse handelt, muss eine ausreichende Zahl an Zellen mikroskopisch unter-

Kurz gefasst

sucht und bewertet werden. Das vermehrte Vorkommen von Mikrokernen, zum Beispiel nach Behandlung der Zellen mit einem Gefahrstoff, ist dabei ein Maß für dessen genotoxische Wirkung. Dabei wird die Mikrokern-Rate in Proben nach Behandlung mit einem Gefahrstoff mit der Mikrokern-Rate in unbehandelten Proben als Negativkontrolle verglichen. Um beurteilen zu können, ob eine Substanz genotoxisch wirkt oder nicht, spielt zusätzlich das Vorhandensein einer Dosis-Wirkungs-Beziehung eine wichtige Rolle (OECD 2016).

Für den Mikrokern-Test *in vitro* werden häufig humane Lymphozyten oder verschiedene Zelllinien aus Nagetieren, häufig Hamster oder Maus, sowie des Menschen verwendet und unter normalen Kulturbedingungen mit den Testsubstanzen behandelt. Die hierbei benutzten Zelllinien können aus unterschiedlichen Ursprungsgeweben stammen. In der Regel werden sie kommerziell zum Beispiel bei Zellbanken erworben, die die Authentizität der jeweiligen Zelllinie garantieren, das heißt die jeweilige Zelllinie weist für sie ganz spezifische Merkmale und Merkmalskombinationen auf. Vor ihrer Verwendung im Mikrokern-Test *in vitro* sollte jede neue Zelllinie mit Hilfe von Referenzsubstanzen auf ihre Eignung überprüft werden (OECD 2016).

IPA etabliert erfolgreich Mikrokern-Test *in vitro*

Ein Fokus der experimentellen Forschungsarbeiten im IPA liegt auf der Entstehung von Harnblasenkrebs, unter anderem durch aromatische Amine und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe. Insofern war es notwendig, die genotoxische Wirkung dieser Gefahrstoffe und deren Interaktionen auf zellulärer Ebene spezifisch in Harnblasenzellen zu untersuchen, um bereits am IPA erzielte Ergebnisse zur Wirkungsweise dieser Substanzen auf molekularer Ebene

- Der Mikrokern-Test ist eine in der Toxikologie häufig verwendete Methode zur Untersuchung genotoxischer Wirkungen von Gefahrstoffen.
- Am IPA wurde der Mikrokern-Test *in vitro* erfolgreich an RT4-Harnblasenzellen etabliert und kann zukünftig flexibel auch für andere Zellmodelle und auf jeweils aktuelle Fragestellungen angepasst werden.
- Die zwei verwendeten Auswertemethoden, das heißt die zeitaufwendige Auswertung am Mikroskop und die automatisierte Messung im Durchflusszytometer, erwiesen sich beide als gleichermaßen geeignet, die genotoxische Wirkung von Gefahrstoffen *in vitro* vorherzusagen.

gezielt zu ergänzen (Plöttner et al. 2016). Zu diesem Zweck wurde die humane Harnblasenpapillom-Zelllinie RT4 für die Etablierungsarbeiten verwendet.

Klassischerweise erfolgt die Testauswertung am Mikroskop (Abbildung 1A). Dies ist mit einer durchschnittlich benötigten Zeit von 15 bis 40 Minuten pro Probe (2.000 Zellen) relativ zeitaufwendig und mutmaßlich subjektiv, denn Erfahrung und Aufmerksamkeit spielen hier eine Rolle. Am IPA wurde deshalb zusätzlich eine neue Mess- und Auswertemethode etabliert, mit deren Hilfe mehr Proben in kürzerer Zeit im Hochdurchsatzverfahren gemessen und ausgewertet werden können. Hierzu wurde ein für diesen Test relativ neues und bislang noch nicht weit verbreitetes durchflusszytometrisches Verfahren angewandt (Abbildung 1B), mit dem Mik-



Abbildung 1 (A) Am Fluoreszenzmikroskop wird die Anzahl von Mikrokernen manuell erfasst und dauert ca. 15-40 Minuten je Probe beziehungsweise 2.000 Zellen. (B) Mit Hilfe eines Durchflusszytometers (FACS) können Kerne und Mikrokern in hoher Geschwindigkeit gemessen werden (Dauer: ca. 3-10 Minuten je Probe bzw. 20.000 Zellkerne).



Abbildung 2: Experimentelles Design und zeitlicher Ablauf des MN-Tests *in vitro*.

roternraten pro 20.000 Zellkerne automatisiert und damit objektiver innerhalb von drei bis zehn Minuten ermittelt werden können, also zehnmal so viele Ereignisse in einem Viertel der Zeit.

Testdurchführung

Für die Etablierung des Mikrokern-Tests *in vitro* an der Zelllinie RT4 wurde das in Abbildung 2 dargestellte experimentelle Design verwendet. Die Zellen wurden gemäß der OECD-Vorschrift Nr. 487 und mit den dort empfohlenen Referenzsubstanzen, unter anderem Nitrochinolin-N-Oxid und Mitomycin C, behandelt.

Für die mikroskopische Auswertung wurden die Zellen auf Objektträgern mit einem DNA-Fluoreszenzfarbstoff angefärbt (Matsuoka et al. 1992). Im Fluoreszenzmikroskop wurde in jeder zuvor verblindeten Probe die Anzahl an Mikrokernen in insgesamt 2.000 intakten Zellen erfasst (Abbildung 3A). Für die Auswertung im Durchflusszytometer wurde eine Färbemethode mit zwei unterschiedlichen DNA-Fluoreszenzfarbstoffen angewendet, an deren Ende eine Lyse der Zellen erfolgte (Avlasevich et al. 2006). Im Durchflusszytometer wurden hierbei also keine intakten Zellen gemessen, sondern nur noch zwischen kleinen und großen gefärbten „Parti-

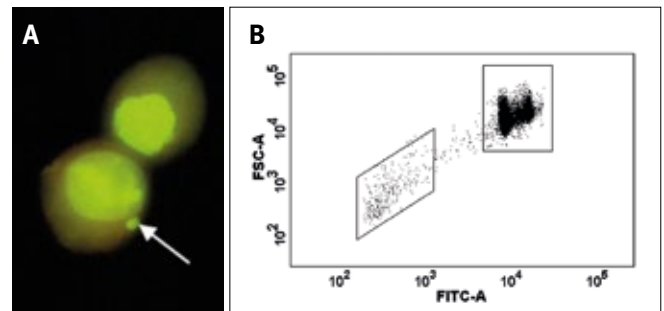


Abbildung 3: (A) Acridinorange-gefärbte Zelle mit Mikrokern (Pfeil) bei der Auswertung am Fluoreszenzmikroskop. (B) Repräsentativer Dotplot der MN-Auswertung nach Messung am Durchflusszytometer.

keln“ als Mikrokern beziehungsweise Kerne unterschieden (Abbildung 3B). Bei der durchflusszytometrischen Messung wurden insgesamt 20.000 Zellkerne erfasst und die Anzahl der anteilig vorhandenen Mikrokern bestimmt.

Unterschiedliche Methoden – vergleichbare Ergebnisse

Vergleicht man die Ergebnisse zur Änderung der Mikrokern-Raten der behandelten RT4-Zellen mit denen in unbehandelten Zellen (MN-Hintergrundraten), sieht man für die getesteten Substanzen und mit beiden Auswertemethoden – erwartungsgemäß – eine konzentrationsabhängige Erhöhung der Mikrokern. Das bedeutet, der Mikrokern-Test *in vitro* kann mit diesem Zellmodell und im beschriebenen experimentellen Design durchgeführt und zukünftig auch auf andere Gefahrstoffe angewendet werden.

Vergleicht man die Ergebnisse der beiden Auswerteverfahren miteinander, steigen bei den Referenzsubstanzen sowohl die im Mikroskop als auch die im Durchflusszytometer gefundenen Mikrokern-Raten sehr ähnlich an (Abbildung 4). Insgesamt sind also die Ergebnisse vergleichbar.

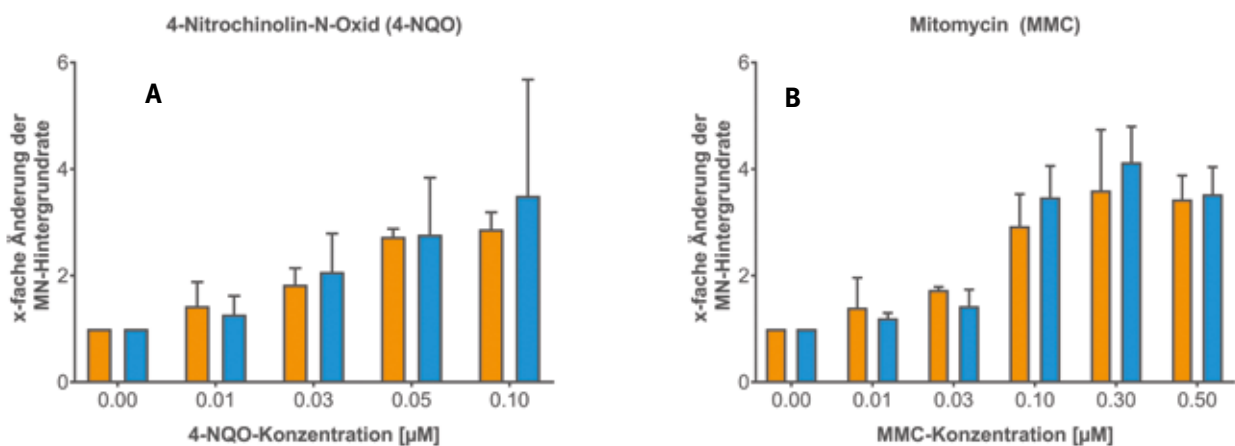


Abbildung 4: Änderung der Mikrokern-Raten im Vergleich mit unbehandelten Zellen nach Behandlung mit (A) 4-Nitrochinolin-N-Oxid oder (B) Mitomycin C. Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung sind in Orange und die der durchflusszytometrischen Auswertung in Blau dargestellt. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei Experimenten.

Mikrokerne

Mikrokerne können durch physikalische oder chemische Einwirkungen (Noxen) verursacht werden. Sie sind im Zytoplasma von Zellen der Interphase, das heißt der Zeit im Zellzyklus zwischen zwei Mitosen (Kernteilungen), sichtbar und können zusätzlich zum eigentlichen Zellkern auftreten. Ihren Namen verdanken Mikrokerne der Tatsache, dass sie aus kernhaltigem Material bestehen und wesentlich kleiner als der Hauptkern einer Zelle sind.

Bei Mikrokernen handelt es sich um Chromosomen-Bruchstücke oder ganze Chromosomen, die während der Mitose nicht in den eigentlichen Zellkern integriert wurden. Wenn Mikrokerne aus Chromosomen-Bruchstücken bestehen, spricht man von klastogenen Effekten. Von aneugenen Effekten ist die Rede, wenn Mikrokerne aus ganzen Chromosomen bestehen und Resultat einer Chromosomen-Fehlverteilung sind.

Fazit

Der Mikrokern-Test *in vitro* konnte erfolgreich an der humanen Harnblasenpapillomzelllinie RT4 etabliert werden und steht als weitere Untersuchungsmethode im IPA für die Risikobewertung von Gefahrstoffen mit besonderem Fokus auf Harnblasenkrebs zur Verfügung. Bei Bedarf kann der Mikrokern-Test *in vitro* relativ einfach auch auf andere Zellmodelle wie zum Beispiel der Lunge angepasst werden. Hierzu ist eine Überprüfung der Eignung des jeweils neuen Zellmodells mit Referenzsubstanzen gemäß OECD erforderlich.

Für die Auswertung des Mikrokern-Tests *in vitro* wurden zwei Verfahren miteinander verglichen: Einerseits wurde die klassische Auswertung am Mikroskop durchgeführt, die zwar zeitaufwendig und mutmaßlich subjektiv, aber zurzeit immer noch „state-of-the-art“ ist. Andererseits wurde die für den Mikrokern-Test noch relativ junge und noch nicht so stark verbreitete Messung im Durchflusszytometer eingesetzt, um Proben objektiver und im Hochdurchsatzverfahren messen und auswerten zu können. Die mikroskopische Auswertemethode lieferte – trotz mutmaßlich größerer Subjektivität – ähnliche Ergebnisse wie die durchflusszytometrische Methode. Beide verwendeten Auswertemethoden erscheinen gleichermaßen geeignet, die genotoxische Wirkung von Gefahrstoffen vorherzusagen. In Hinblick auf die relativen Erhöhung der MN-Raten oder den Konzentrationsbereich, in dem genotoxische Effekte beobachtet wurden, kommt man mit beiden Methoden zu ähnlichen Einschätzungen.

Zukünftig kann der Mikrokern-Test *in vitro* flexibel auf jeweils aktuelle Fragestellungen der Unfallversicherungsträger angepasst werden. Für welches Auswerteverfahren man sich letztendlich entscheidet, ist eher von studienspezifischen

Literatur

Avlasevich SL et al. In vitro micronucleus scoring by flow cytometry: differential staining of micronuclei versus apoptotic and necrotic chromatin enhances assay reliability. *Environ Mol Mutagen.* 2006; 47: 56-66

Fenech M et al. The HUMAN MicroNucleus Project - An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat Res.* 1999; 428: 271-283

Matsuoka A et al. Evaluation of the micronucleus test using a Chinese hamster cell line as an alternative to the conventional in vitro chromosomal aberration test. *Mutat Res.* 1992; 272: 223-236

Neresesyan A et al. Use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay in occupational biomonitoring of genome damage caused by in vivo exposure to chemical genotoxins: Past, present and future. *Mutat Res.* 2016; 770 (Part A): 1-11

OECD. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Test Nr. 487 In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test, 26 Seiten, Angenommen am: 29.07.2016.

Plöttner S et al. Effects of benzo[a]pyrene, aromatic amines, and a combination of both on CYP1A1 activities in RT-4 human bladder papilloma cells. *J Toxicol Environ Health A.* 2016; 79: 1106-1117

Welge P et al. Assessment of micronuclei in lymphocytes from workers exposed to vapours and aerosols of bitumen. *Arch Toxicol.* 2011; 85 Suppl 1: S65-S71

schen und technischen Aspekten abhängig und kann dementsprechend für die unterschiedlichen wissenschaftlichen Fragestellungen am IPA individuell und qualitätsgesichert angepasst werden.

Die Autoren:
**Prof. Dr. Thomas Brüning, Dr. Heiko U. Käfferlein,
 Dr. Sabine Plöttner**
 IPA