

Service-Magazin für Medizin und Biowissenschaften Heft 11/2011 11. November bis 9. Dezember

# Laborjournal

Toxikologie  
und  
Zellforschung

Weg vom Tierversuch?

Photo: J. B.



Foto: MIMchen/photocase

Übersicht Zellkulturen

# Zellen im Aufwind

SPECIAL Toxikologie

■ In der toxikologischen Forschung herrschte lange Zeit Flaute. Jetzt kommt Wind auf – es ist fast schon ein Sturm.

Wer Toxikologie und Zellkultur in einem Atemzug nennt, meint oft Alternativen zu Tierversuchen. Natürlich würde man aus ethischen Bedenken ebenso wie aus Kostengründen Tierversuche durch Toxizitätstest an – bestenfalls menschlichen – Zellen ersetzen. Idealerweise sollten diese Tests automatisiert, im Hochdurchsatzverfahren schnell, effizient und sicher sein. Computergestützte Modellierung könnten die *in vitro*-Verfahren ergänzen, so dass Kombinationen von *in vitro*-Tests und *in silico*-Checks valide Aussagen darüber erlauben sollten, ob eine Substanz Haut oder Augen reizend, gentoxisch oder kanzerogen oder gar systemisch toxisch ist.

## Uralte Verfahren

Was für Ansprüche! Sind etwa Tierversuche automatisiert? Lassen sich daraus Toxizitätsmodelle rechnen? Nö, oder? Und auch in der Zell(kultur)toxikologie ist man noch weit von den idealen Modellen entfernt. Aber es tut sich was in der Forschung.

Endlich, möchte man erleichtert sagen. Denn die Verfahren, mit denen die Gefährlichkeit von Chemikalien und pharmazeutischen Stoffen geprüft werden, sind größtenteils uralt. „Das System der regulatorischen Toxikologie ist eingeschlafen, wie die Märchenfigur Schneewittchen, nachdem sie in den Apfel gebissen hatte“, beklagte Thomas Hartung, Direktor des Johns Hopkins Center for Alternatives to Animal Testing (CAAT) in Baltimore, schon vor zwei Jahren in *Nature* (2009, 460:208-12). „Es gibt fast kein anderes wissenschaftliches Gebiet, in dem die wichtigsten experimentellen

Protokolle über mehr als 40 Jahre unverändert geblieben sind.“

Sich an Neues zu gewöhnen, ist ja auch so anstrengend. Dabei sind Tierversuche nicht nur umstritten und teuer, sondern auch nur beschränkt aussagekräftig. Man denke nur an Thalidomid (Contergan) oder den Antikörper TGN-1412, der 2006 in einer Phase 1-Studie fatale Nebenwirkungen bei den ersten Probanden zeigte, die man im Tierversuch nie gesehen hatte.

Es gibt nur wenige Studien zum Vergleich von Tierversuchen und *in vivo*-Daten an Menschen. Die aber zeigten, dass wir „keine 70 kg-Ratten“ sind, wie Hartung sich in seinem Artikel ausdrückte. So erwiesen sich beispielsweise 40 Prozent der Chemikalien, die an Kaninchen deutliche Reizungssymptome auslösen, im Test an Menschen als völlig harmlos (Basketter *et al.*, *Contact Dermatitis* 2004, 51:1-4). In einer Pharmastudie waren nicht einmal die Hälfte der bei Menschen beobachteten Toxizitätseffekte zuvor an Nagetieren festgestellt worden (Olson *et al.*, *Toxicol Pharmacol* 2000, 32:56-67).

Trotzdem war es bisher nur ein Häuflein idealistischer Forscher, die sich auf die Suche nach Ersatzmethoden begab. Trotz des jahrzehntelangen Desinteresses bei Behörden und Industrie sind nun plötzlich gleich drei zellbasierte Methoden zur Testung von Chemikalien und Pharmaka bei der dafür eigens gegründeten EU-Behörde ECVAM (European Centre of Alternative Methods) in der Validierung. Ups? Was ist passiert?

## Tierversuchsfreie Kosmetik

Es weht ein neuer Wind. In Europa verordnete die Politik per Gesetz einen Richtungswechsel. Die EU-Kommission verbot bereits Tierversuche für Kosmetika und untersagt den Verkauf von mit Tierversuchen getesteten Kosmetika ab 2013. In der Branche brach die Krise aus: es gab nämlich nicht genug *in vitro*-Testsysteme.

Obendrein setzte die EU 2007 REACH in Kraft. Die Abkürzung steht für Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemical Substances und besagt, dass jede im Handel befindliche Chemikalie umfassend geprüft werden muss, auch wenn sie bereits am Markt ist. Ob das sinnvoll ist oder nicht, wollen wir hier nicht erörtern. Tatsache ist, dass diese Tests ganz schön ins Geld gingen, würde man sie an Mäusen, Ratten und Kaninchen vornehmen.

Zelltests wären wohl billiger – aber es gibt sie nicht. Um das zu ändern, ließ die EU ordentlich Fördergelder springen. Zuletzt, Anfang 2011, startete das 50 Millionen Euro schwere SEURAT (Safety Evaluation Ultimately Replacing Animal Testing) mit dem Ziel, Zellsysteme und organotypische Kulturen für Tests zu etablieren, Biomarker zu identifizieren, *in silico*-Modelle zur Vorhersage von Toxizität zu entwickeln.

## Was bedeutet „toxisch“?

Anders als in Europa setzte in den USA nicht die Exekutive, sondern die Wissenschaft den neuen Kurs. Der nationale Forschungsrat entwarf gemeinsam mit den NIH und der Umweltbehörde EPA eine Vision der Toxizitätstestung im 21. Jahrhundert – Tox-21c. Ausgang war ein eher umweltpolitischer Gedanke: Menschen bringen etliche Tausend Stoffe in die Umwelt, wissen aber nichts über deren Wirkung (<http://www.epa.gov/sciencematters/august2010/oil-spill.htm>).

Um dies zu ändern, will man umfangreich Chemikalien testen und auf der Basis der erhaltenen Daten verstehen lernen, was Toxizität überhaupt ist, wie toxische Mechanismen funktionieren, um letztendlich künftig Vorhersagen treffen zu können. Inzwischen liegen die Ergebnisse einer ersten *Proof of Principle*-Studie im Rahmen des Tox-21c-Programms vor. Man hat ein zunächst Hochdurchsatz-



screening mit rein biochemischen Tests etabliert und damit die Toxizitätsprofile und Signalübertragungsmuster von über 300 Chemikalien, vorwiegend Bestandteile von Pestiziden, dokumentiert (*Toxicology* 2011, 282:1-15).

Künftig will man Tests auch an Zellkulturen, organotypischen Kulturen und kleinen Modellorganismen, wie Zebrafischen, vornehmen, denn noch weiß man nicht, inwieweit die biochemischen Daten die *in vivo*-Situation korrekt beschreiben.

Trotzdem kam diese biochemische Testbatterie schon zu einem „echten“ Einsatz, nämlich bei der Auswahl einer Chemikalie zum Auflösen des Ölteppichs im Golf von Mexiko. Man hatte alle in Frage kommenden Chemikalien geprüft und dann das Mittel genommen, das am wenigsten giftig erschien (<http://www.epa.gov/bpspill/dispersants-testing.html>).

„Auf diese Weise erhielt man zwar keine perfekte Information, aber wenigstens sehr schnell solche Daten, auf deren Basis man eine Entscheidung treffen konnte. Gerade dieses Beispiel illustriert sehr gut die neue US-Strategie“, erklärt Marcel Leist. Er ist Stiftungsprofessor der Schweizer Doerenkamp-Zbinden-Stiftung, die sich der Reduktion und dem Ersatz von Tierversuchen widmet. Außerdem ist Leist einer von zwei Direktoren des CAAT-EU, des Center to Alternatives to Animal Testing Europe. Dieses Zentrum pflegt eine enge Partnerschaft mit dem CAAT der Johns Hopkins University in Baltimore. „Praktisch bedeutet diese Strategie, dass die gesamte Toxizitätsprüfung auf den Kopf gestellt wird“, sagt Leist. „Mechanistische Toxikologie“ nennen Insider diesen Ansatz.

### Tests auf Transkriptomebene...

In Europa hat man dasselbe Ziel, aber einen anderen Weg gewählt. Man will die Toxizitäts-Signalwege mit ‚Omik‘-Techniken aufspüren, vor allem mit Transkriptomik, Proteomik und Metabolomik. Eine richtungsweisende Transkriptom-Arbeit stammt von Heidrun Ellinger-Ziegelbauer und Kollegen (*Mutation Research* 2008, 637:23-39), die sie allerdings noch mit Ratten gemacht haben. Sie suchten nach molekularen Markern, die zuverlässig das krebsauslösende Potenzial einer Substanz anzeigen, indem sie die Tiere mit bekanntermaßen kanzerogenen sowie harmlosen Substanzen behandelten und dann das Transkriptom der Leberzellen analysierten. Durch den Vergleich der RNA-Muster konnten sie Expressionsprofile definieren und daraus die Kanzeroge-

nität von Validierungssubstanzen mit fast 90-prozentiger Exaktheit klassifizieren. Darüber hinaus konnten sie anhand der Profile sogar genotoxische Leberkarzinogene von solchen unterscheiden, die nicht genotoxisch sind, also den Leberkrebs auf anderem Wege als über DNA-Schädigung auslösen. Diese Marker waren schon nach 14 Tagen messbar – ein gewöhnlicher Kanzerogenitätstest dauert indes bis zu zwei Jahren. Die Frage ist, ob diese Expressionsprofile sich auch *in vitro* an Zellkulturen darstellen lassen.

Leider lassen sich Leberzellen nicht so einfach kultivieren. „In Kultur verändern sie sich sofort, dedifferenzieren zu einem eher mesenchymalen Zustand“, weiß Jan Hengstler aus eigener Erfahrung. Der Leiter der Projektgruppe „Systemtoxikologie“ am Leibniz-Institut für Arbeitsforschung an der TU Dortmund hat lange herumgepuzzelt, bis er Bedingungen fand, unter denen die Hepatozyten wenigstens einige ihrer *in vivo*-Funktion behalten. Hengstler und seine Mitarbeiter stellten fest, dass in kultivierten Zellen der MAP-Kinase-Signalweg überaktiv ist und die Dedifferenzierung vorantreibt (*Hepatology* 2009, 49(6):2031-43). Hemmt man ihn mit Inhibitoren, verhalten sich die kultivierten Hepatozyten wesentlich ähnlicher denen *in vivo*. „Damit sind wir natürlich noch nicht zufrieden, denn die Inhibitoren an sich haben ja schon sub-toxische Wirkungen auf die Zellen“, so Hengstler. Durch computergestützte Modellierung fand er heraus, dass die Eigenschaften der Hepatozyten schon in der Leber sehr von ihrem dreidimensionalen Umfeld abhängen. Die Zellen haben nämlich eine polare Struktur mit Blut auf der einen, Gallengefäßen auf der anderen Seite. In einem guten Kultursystem sollten die Zellen diese Polarität nicht verlieren.

### ... oder gleich im Zellkern

Viel leichter als Leber- und Nierenzellen lassen sich Hautzellen kultivieren – sehr zur Freude der Kosmetikhersteller, die ja nun ohne Tierversuche feststellen müssen, ob ihre Lidschatten, Wimperntuschen oder Feuchtigkeitscremes möglicherweise die Haut reizen oder allergen wirken. Zwar gibt es schon *in vitro*-Tests, mit denen man das Hautreizungspotenzial einer Substanz beurteilen kann. Doch bei den Allergietests geht es noch nicht ohne Tierversuche.

Andreas Natsch von der Firma Givaudan Schweiz AG, einem der führenden Hersteller von Duft- und Aromastoffen, machte sich deshalb mit Kollegen ▶

**CANDOR**<sup>®</sup>  
The ELISA Experts



**CANDOR – Erfinder des LowCross-Buffer<sup>®</sup>**

- innovative Lösungen
- höchstmögliche Qualitätsstandards
- individueller Expertenservice

**zur Verbesserung der Präzision Ihrer Ergebnisse**

CANDOR Bioscience GmbH

selber ans Werk, einen neuen Test zu entwickeln. Allergen wirkende Substanzen können kovalent an Proteine binden. Diese veränderten Eiweiße kommen dem Körper fremd vor – das Immunsystem beginnt sein Werk. Der direkte Weg, Allergenität zu messen, wäre also ein Peptidbindungstest. Allerdings erwischt man damit nicht solche Substanzen, die von der Zelle erst zu dem allergenen Molekül umgewandelt werden. Dafür wäre ein zellulärer *in vitro*-Test nötig.

Es war bekannt, dass elektrophile Moleküle an ein cysteinereiches Protein namens Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*) kovalent binden. Diese Reaktion führt zur Trennung von Keap 1 und dem Transkriptionsfaktor Nrf2 (*nuclear factor-erythroid 2-related factor 2*). Dadurch reichert sich Nrf2 im Zellkern an und aktiviert Gene, die ein *antioxidant responsive element* (ARE) in ihrer Promotorsequenz enthalten. Auf Basis dieser Signalkette entwickelten die Givaudan-Forscher einen Test mit transgenen humanen HaCaT-Keratinocyten, die ein ARE-gesteuertes Reporter-gen (Luciferase) enthalten.

Der Weg, den man zur Entwicklung dieses Tests eingeschlagen hat, entspricht genau der Tox-21c-Strategie (*Toxicol Sci* 2010, 113(2):284-92, *Toxicol Appl Pharmacol* 2010, 245:281-90, *Toxicol in Vitro* 2011, 25:733-44). Der Test macht sich einen etablierten Toxizitäts-Signalweg zu Nutze, erlaubt Dosis-abhängige Messungen und lässt sich im High-Throughput-Verfahren automatisieren. Kein Wunder, dass er sich bereits im Peer-Review für die Prevalidierung befindet, obwohl er erst vor kurzem entwickelt wurde. Die Resultate erwartet Natsch für Ende März. Derzeit werde er

bereits für das Screening von Substanzen eingesetzt, könne aber Tierversuche noch nicht vollständig ersetzen.

Die Vorhersagekraft des KeratinoSys-Tests entspricht der anderer *in vitro*-Tests wie MuSST oder H-Clat, die sich derzeit in der Validierung durch die ECVAM befinden. Allerdings sei HaCaT einfacher und schneller, so Natsch. Um falsch-negative

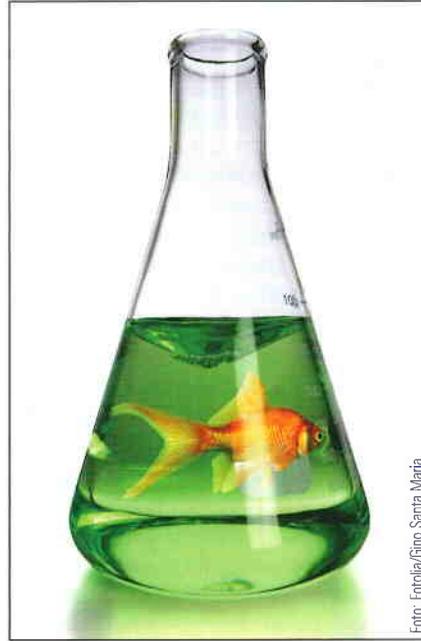


Foto: Fotolia/Gino Santa Maria

sierten Tests und Biomarkern für die Untersuchung von toxischen Effekten bei wiederholter Gabe von Substanzen. Da sie die systemische Giftigkeit simulieren sollen, sollte man auch verschiedene Zellarten wie Herz-, Nieren-, Leber- und Nervenzellen testen. Diese Zellen müssen in Kultur über lange Zeit stabil sein und sich vermehren, damit man genug Zellen zum Messen hat – man sucht ja nach Langzeiteffekten. Nur fühlen sich eigentlich alle primären Zellen in der Kultur unwohl – auch Nierenzellen. Genau damit aber wollen die Mitglieder der Arbeitsgruppe von Paul Jennings an der Medizinischen Universität Innsbruck arbeiten. Sie nutzen daher eine Zelllinie, die Mitarbeiter der Wiener Firma Evercyte GmbH mit Hilfe eines humanen Telomerase-Gens (hTERT) immortalisiert hatten (*Am J Physiol Renal Physiol* 2008, 295:F1365-75).

### Zellen unter Stress

Damit suchen die Wissenschaftler um Jennings nun nach Biomarkern – zunächst einmal unter den Metaboliten, die die Zellen ins Medium abgeben. Und sie wurden auch fündig. Sie entdeckten, dass die Nierenzellen unter Stress vermehrt Laktat bilden.

„Auch gestresste Leberzellen und Fibroblasten bilden Laktat [*Toxicol In Vitro*, 24.5.2011 online vorab veröffentlicht]. Das ist ein sehr zuverlässiger Marker, der anschlägt, bevor der Zelltod eintritt“, sagt Jennings. „Laktat ist ein idealer Marker für Langzeittests, weil man es im Medium messen kann. Das ist preiswert und einfach.“ Doch Laktat zeigt nicht an, welche Art von Stress die Zelle hat. Also

Resultate aufzuspüren, also Substanzen zu identifizieren, die keine Bindungen mit Keap1 eingehen, schlagen die Forscher vor, parallel zu ihrem Test immer einen Peptidbindungstest zu machen. „Ein Battery Approach, mehrere Tests, wird allgemein diskutiert“, sagt Natsch.

Als besonderes problematisch entwickelt sich die Entwicklung von zellba-

**PEPROTECH**  
Manufacturer of Quality Cytokine Products

Produkte für die Stammzellforschung

Cytokines • Chemokines Growth Factors • Animal-Free Recombinant Proteins  
Antibodies • ELISA Kits • Serum-Free Media Supplements

**VERTRAUEN**

Seit mehr als 20 Jahren stellt PeproTech Inc. rekombinante Proteine, sowie Antikörper und ELISA Kits her.

**QUALITÄT**

Seit 5 Jahren ist unsere Niederlassung in Deutschland Ihr zuverlässiger Partner für Forschung, Produktion und Zelltherapie.

**SERVICE**

PeproTech GmbH • Hamburg • 0800 436 99 10 • 040/734 35 77 70 • info@peprotech.de • www.peprotech.com

suchen die Innsbrucker Forscher nun im Transkriptom der gestressten Zellen nach toxikologisch relevanten Signaturen, die möglicherweise Hinweise darauf geben, was in den Zellen eigentlich vor sich geht.

Nicht nur immortalisierte Zellen sind langlebig, sondern auch Stammzellen lassen sich in Kultur gut vermehren. Da sie obendrein sehr empfindlich auf Störungen reagieren und dies mit einem veränderten Entwicklungsmuster phänotypisch sogar zeigen, gelten sie als veritable Kandidaten für Zellkultur-Ersatzmodelle. Es gibt bereits einen Test auf der Basis von embryonalen Mausstammzellen, den Embryonic Stem Cell Test, kurz EST (*Nat Protoc* 2011, 6(7):961-78). Dabei misst man, wieviel Prozent der Zellen sich zu schlagenden Herzvorläuferzellen differenzieren.



Foto: iStock/peiderk

„Es ist sensitiver als ein zytotoxischer Test, der lediglich die Vitalität der Zellen misst“, sagt Stammzellexperte Jürgen Hescheler von der Universität Köln, der das SEURAT-Teilprojekt „Detective“ zur Identifizierung von Biomarkern koordiniert. Die ECVAM hat den Test validiert, inzwischen wird er industriell genutzt.

Im Rahmen des Tox-21c-Projekts wurden ebenfalls Stammzellen von Mäusen als Testmaterial geprüft. In einer ersten größeren Studie hat man den Einfluss von 309 Chemikalien auf die Entwicklung von embryonalen Stammzellen von Mäusen untersucht (Kelly Chandler *et al.*, *Plos One* 2011, 6(6):e18540). Bei 56 Substanzen wurde man fündig. Aus diesen Daten entwickelten die US-Forscher *in silico*-Modelle für Toxizitäts-Signalübertragungswege.

Ebenso kann das Metabolom von Stammzellen wertvolle Informationen darüber liefern, welche Einflüsse Chemikalien auf Entwicklungsprozesse haben (Nicole Kleinstreuer, *Toxicol Appl Pharmacol*, 3.9.2011 online vorab veröffentlicht).

### Tests an Menschen(-Zellen)

„Eine weitere Verbesserung der Stammzelltests wäre die Nutzung menschlicher Stammzellen“, sagt Hescheler. Dafür kämen sowohl embryonale Zellen wie induzierte Stammzellen in Frage. Erste

Versuche haben Hescheler und Kollegen schon gemacht. Sie stellten fest, dass das starke Teratogen Cytarabin (Ara-C) bei menschlichen embryonalen Stammzellen eine ganze Reihe von ektodermalen Markergenen induziert und mesodermale Marker inhibiert, es mithin also die Neurogenese stimuliert (*Br J Pharmacol* 2011, 162:1743-56).

„Die Industrie ist sehr interessiert an der Entwicklung solcher Verfahren“, sagt Hescheler. Er glaubt, dass Stammzellen nicht zuerst und vor allem zur Behandlung Erkrankter eingesetzt werden sollten, sondern vielmehr im Vor-Screening und der Toxikologie erst die richtige Anwendung finden werden.

Das alles ist aber noch Zukunftsmusik. Nun sind zwar schon Tests in der Validierung durch die EU-Behörden, doch das kann dauern, berichten die Forscher. Bernhard Wolf von der TU München sagt: „Wir wundern uns schon, wie zäh die Verhandlungen mit den Behörden sind.“ Er hat mit seinen Kollegen ein relativ einfaches, zellbasiertes, kontinuierliches und automatisiertes Verfahren entwickelt. Über Parameter wie Sauerstoffgehalt und pH sowie bildgebende Verfahren lässt sich damit die Vitalität der Testzellen messen. Dieses Verfahren wurde jüngst für den Zukunftspreis des Bundespräsidenten vorgeschlagen. Es kam aber nicht in die Endausscheidung – dafür kann man bei der Firma Cellasys GmbH, einer Ausgründung aus der Arbeitsgruppe Wolf, schon heute Geräte und Software für solche Zelltests kaufen. Und neue Methoden mit dreidimensionalem, sogenanntem „Mikrogewebe“, sind in der Testphase.

### Zu strenge Vorschriften?

In der Forschergemeinde wundert man sich vielfach über die strengen Validierungsvorschriften – insbesondere angesichts der Tatsache, dass die heute angewendeten Tierversuche zwar seit zig Jahren im Einsatz und von eingeschränkter Aussagekraft sind, aber nie auf Herz und Nieren geprüft wurden. Andererseits will man natürlich größtmögliche Sicherheit, bevor eine Chemikalie, ein Kosmetikum, ein Medikament in die Welt gesetzt wird.

Was könnte man also tun?

Marcel Leist meint: „Ich könnte mir vorstellen, die Validierung an private Unternehmen zu vergeben, so wie man das mit der Zertifizierung von Studiengängen auch macht. Das würde bestimmt erheblich schneller gehen.“

Aber ob das mit der EU-Bürokratie zu machen ist? **KARIN HOLLRICHER**

## Die neuen VWR® UHP Pipetten (Ultra High Performance)



- Einkanal- und Mehrkanalpipetten (8/12)
- Variable Volumeneinstellung mit höchster Genauigkeit und Präzision
- Ergonomische Pipette mit deutlich reduziertem Kraftaufwand
- 4-stellige, sehr gut ablesbare farbcodierte Volumeneinstellung
- UV-beständig und vollständig autoklavierbar
- Perfektes Preis-/Leistungsverhältnis ab 165 €

Weitere Informationen unter  
<http://de.vwr.com> oder  
[info@de.vwr.com](mailto:info@de.vwr.com)

VWR International GmbH  
Hilpertstraße 20A  
64295 Darmstadt  
Tel.: 06151/3972-0



Simulation und Modelle

# Der Computer als Labor

SPECIAL Toxikologie

Computermodelle sind auch in der Toxikologie nützlich und können helfen, Labor- und Tierversuche einzusparen: In Duebendorf versucht eine Doktorandin die Auswirkungen von Chemikalien auf Fische im Modell darzustellen; in Basel entwickelt ein Wissenschaftler eine Software, die Toxizität an der Strukturformel erkennt.

Gerade erst hat der Forscher die Strukturformel der neu entdeckten antibiotisch wirksamen Substanz in den Computer eingegeben, schon ist die Analyse abgeschlossen. Die tägliche Dosis, so errechnet es die Software, sollte beim Menschen 100 Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht nicht überschreiten. Eine kanzerogene Wirkung ist nicht zu erwarten. Die Substanz sollte nicht in die Umwelt gelangen, da sie für Arthropoden bereits in geringen Konzentrationen giftig ist.

Zukunftsmusik? Ja, noch. Doch die Informatik hat bereits die Fährte dieser schönen Vision der Zukunft aufgenommen. Die Gemeinschaft der Wissenschaftler, die sich nicht damit begnügen, bloß von einem allwissenden Analyseprogramm für chemische Verbindungen zu träumen, wächst. Konkrete Forschungsansätze sollen helfen, für neu beschriebene Substanzen deren mögliche Toxizität schon im Vorfeld zuverlässig abzuschätzen. Von anderen Modellen erhofft man sich Vorhersagen, welche Auswirkungen auf ein Ökosystem durch bestimmte Chemikalien zu erwarten sind.

Aufwändige Experimente mit Zellkulturen und Versuche an lebenden Tieren will man damit einschränken. Auch die Kosten für die Entwicklung von Medikamenten, Kosmetika oder Chemikalien für die Landwirtschaft ließen sich drastisch reduzieren, gäbe es zuverlässige Computermodelle zur Vorhersage von negativen

Effekten. Doch wie bildet man die Wechselwirkungen eines Moleküls mit einem Organismus sinnvoll ab?

## Wann ist ein Gift ein Gift?

Die große Herausforderung für die Modellierung besteht zunächst einmal in der Vereinfachung komplexer Zusammenhänge. Welche Grundprinzipien lassen sich erkennen, wenn eine toxische Substanz auf einen Organismus trifft?



Oft wird erst viel zu spät klar, wie toxisch Substanzen tatsächlich sind. Dies anhand der Struktur vorherzusagen, wäre von Vorteil.

Erweist sich eine Chemikalie als giftig, so kann dies unterschiedliche Folgen für den Organismus haben. Man spricht hier von *endpoints*. Ein möglicher Endpunkt wäre der Tod. Daneben gibt es subletale Endpunkte, wenn eine Substanz dem Organismus zwar Schaden zufügt, sich aber nicht tödlich auswirkt.

Zunächst einmal sollte ein Modell abbilden, unter welchen Bedingungen überhaupt ein bestimmter Endpunkt erreicht wird, also eine toxische Wirkung

eintritt. Wer einen Pfirsich isst, nimmt möglicherweise Blausäure auf, hat aber nicht mit Vergiftungserscheinungen zu rechnen. Hingegen kann der Verzehr von Bittermandeln gefährlich werden, denn bekanntlich macht ja die Dosis das Gift, wie schon Paracelsus erkannt hatte.

Ein weiterer Faktor ist die Zeit. So enthält die Luft einer Raucherkeipe eine mehr oder weniger konstante Schadstoffkonzentration. Sowohl Besucher als auch Wirt sind derselben Giftkonzentration ausgesetzt, doch der Wirt trägt sicher ein höheres Risiko für Gesundheitsschäden, da er die belastete Luft länger einatmet.

## Zeit und Dosis

Diesen Zusammenhang zwischen Konzentration und Zeit formuliert die Habersche Regel, benannt nach dem Chemiker Fritz Haber. Demnach bestimmt das Produkt aus Giftkonzentration und Dauer der Exposition die biologische Wirkung. Eine geringe Dosis Gift über einen langen Zeitraum hat in diesem Modell denselben Effekt wie eine hohe Dosis, der man für kurze Dauer ausgesetzt ist. Die Habersche Regel ist damit auf Szenarien beschränkt, in denen sich ein Gift akkumuliert und vom Organismus nicht ausgeschieden oder abgebaut werden kann, oder aber auf Substanzen, die irreversible Schäden hinterlassen.

Für reversible Effekte ist das Critical Body Residue-Modell (CBR) brauchbarer. Hier geht man von einem individuellen Schwellenwert aus, ab dem ein bestimmter Endpunkt, also beispielsweise der Tod, erreicht wird. Unterhalb dieses Schwellenwerts tritt der Endpunkt nicht ein, auch wenn die Konzentration über eine lange Zeit aufrechterhalten wird.

Für irreversible Effekte lässt sich dieses Modell erweitern mit dem Konzept der Critical Target Occupation (CTO). Beispiele wären Chemikalien, die irreversibel an bestimmte Rezeptoren oder die DNA binden. Es dürfte schwer sein, ein allgemeingültiges Modell zu erstellen, das mit

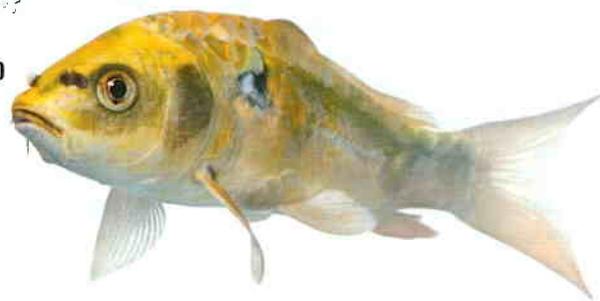


Foto: iStock/Getty



überschaubaren Annahmen die Wirkung beliebiger Substanzen auf andere Organismen vorhersagt. Genau das aber wäre für ökologische Fragen interessant.

Wie könnte man sich einem solchen Modell dennoch nähern?

## Kinetik und Dynamik

Julita Stadnicka ist Doktorandin bei der Eidgenössischen Anstalt für Wasserversorgung, Abwasserreinigung und Gewässerschutz (eawag) im schweizerischen Dübendorf. In der Gruppe um Kristin Schirmer erstellt sie unter anderem Modelle zur Aquatischen Ökotoxikologie. Wie wirken sich freigesetzte Gifte auf Lebensgemeinschaften in Gewässern aus?



Bild: Quinten Metsys/Encyclopaedia Britannica

„All Ding' sind Gift und nichts ohn' Gift; allein die Dosis macht, das ein Ding kein Gift ist“, wusste schon **Paracelsus**.

Beispiele hierfür sind etwa Insektizide, wie sie in der Landwirtschaft zum Einsatz kommen.

Stadnicka möchte die Auswirkungen von Chemikalien auf Fische vorhersagen, dabei aber auch komplexere Zusammenhänge erfassen und subletale Effekte sinnvoll abbilden. „Was passiert mit den Tieren, wenn sie überleben? Ist ihr Wachstum beeinträchtigt? Falls sie sich fortpflanzen, welche Auswirkungen hat das auf den Nachwuchs“, fragt sie sich.

Grundlage ihrer Arbeit sind die Konzepte der Toxikokinetik und Toxikodynamik. Die Toxikokinetik bildet ab, welchen Einwirkungen die Chemikalie unterliegt. Wie verändern sich Konzentration und Verteilung der Substanz im Organismus? Welche Organe werden erreicht und welche Prozesse wirken hier auf die Substanz ein? Wird der Stoff abgebaut und falls ja, welche Metaboliten bildet er?

Toxikodynamische Modelle hingegen betrachten die Auswirkungen auf den Organismus. Welche Schäden am Lebewesen treten durch die Substanz auf? Wie hoch ist die Sterblichkeit?

„Die Toxikokinetik sagt uns, was im Organismus mit der Chemikalie passiert, die Toxikodynamik gibt Aufschluss darüber, was die Chemikalie mit dem Organismus macht“, fasst Stadnicka zusammen. Modelle, die beide Konzepte vereinen, werden als toxikokinetisch-toxikodynamische (TKTD) Modelle bezeichnet – das Arbeitsfeld Stadnickas und ihrer Kollegen (für eine Einführung in das Thema siehe *J Env Monit* 2010 Nov;12(11):2056-61).

Nun gibt es auch für TKTD-Modelle unterschiedliche Herangehensweisen, die von den eigenen Fragestellungen abhängen. Im einfachsten Fall möchte man wissen, wann eine Chemikalie tödlich wirkt und wann nicht. Hier gibt es zunächst zwei unterschiedliche Konzepte, das Ereignis „Tod“ als Endpunkt in einem Modell zu beschreiben.

## Schwellenwert zum Tod

Der eine Ansatz wäre, den Tod als stochastisches Ereignis zu betrachten. Demnach ließe sich für eine toxische Substanz eine Dosierung finden, bei der die Wahrscheinlichkeit, zu sterben, beispielsweise 50 Prozent beträgt. „Setzt man 100 Fische dieser Dosis aus, so werden 50 Tiere überleben“, erklärt Stadnicka.

Der zweite Ansatz betrachtet den Tod als Ereignis, das bei Überschreitung eines individuellen Schwellenwerts eintritt. Auch diese Sichtweise kann erklären, warum bei einer bestimmten Dosis die Hälfte der Tiere stirbt, nämlich genau dann, wenn die Dosis für 50 Prozent der Organismen über der individuellen Toleranzschwelle liegt. Der Unterschied zeigt sich erst, wenn man das hier geschilderte Gedankenexperiment mit den 50 überlebenden Fischen wiederholt, nachdem die Tiere sich vollständig von der Giftwirkung aus dem ersten Versuch erholt haben.

„Nach dem Konzept der individuellen Toleranz müssten alle 50 Tiere überleben, denn die schwächeren Fische mit niedriger Toleranz sind ja schon im ersten Experiment gestorben; nach dem Ansatz des stochastischen Todes aber stirbt wieder die Hälfte und es bleiben 25 Tiere übrig“, erklärt Stadnicka.

Beide Ansätze werden im *general unified threshold model of survival* (GUTS) vereint, so dass sich sowohl stochastische Effekte als auch individuelle Eigenschaften berücksichtigen lassen.

Doch Gifte können auch subletale Effekte ausüben und dem Ökosystem Schaden zufügen, ohne einzelne Individuen zu töten. Eine hormonähnliche Substanz könnte beispielsweise Wachstum und Entwicklung hemmen und weniger Nachkommen einer Spezies zur Folge haben. Die Population wird dann durch die Wirkung einer Chemikalie dezimiert, ohne dass durch diese unmittelbar Individuen sterben. Bei solchen Szenarien versagt GUTS, doch es gibt Ansätze, die hier weiterhelfen.

*Dynamic energy budget* (DEB) ist ein solches Konzept, das im Zusammenhang mit toxischem Stress als DEBtox bezeichnet wird. DEB-basierte Modelle erklären toxische Effekte durch eine Beeinträchtigung der Verfügbarkeit von Ressourcen, die der Organismus zur Aufrechterhaltung physiologischer Prozesse benötigt. Solche Ressourcen lassen sich allgemein als Energie darstellen und erlauben es, verschiedene subletale Endpunkte in ein Modell einfließen zu lassen.

Im GUTS ist ein Organismus nach Einwirkung einer Chemikalie entweder tot oder lebendig. DEBtox hingegen erlaubt auch abgestufte Werte, etwa Reproduktions- oder Nahrungsaufnahmeraten. Außerdem lassen sich verschiedene Endpunkte miteinander verknüpfen. Hemmt eine Chemikalie etwa die Aufnahme von Nährstoffen, so können infolgedessen auch Wachstum und Reproduktionsrate beeinträchtigt sein.

DEBtox bietet im Vergleich zu GUTS also weit reichende Möglichkeiten, Voraussetzungen zu den Auswirkungen giftiger Substanzen zu treffen. Allerdings sind auch entsprechend mehr Daten zu verarbeiten, so dass DEBtox deutlich unhandlicher als GUTS ist. Die Wahl des passenden Modells hängt also vom Projekt ab.

„Bei meiner Arbeit verwende ich GUTS, um das Überleben der Fische vorherzusagen; erst wenn subletale Endpunkte von Interesse sind, greife ich auf DEBtox zurück“, so Stadnicka.

Bislang sind die Daten zu Stadnickas Versuchen noch nicht publiziert, doch Kollegen von ihr haben bereits zu anderen Organismen Ergebnisse veröffentlicht, beispielsweise ein Paper über die Auswirkungen des Insektizids Diazinon auf Bachflohkrebse (*Gammarus pulex*) (*Environ Sci Technol* 2010, 44(10):3963-71). Statt den Tieren eine einmalige Dosis der Substanz zu verabreichen oder sie permanent einer konstanten Konzentration auszusetzen, wurde in den Experimenten mit zwei Pulsen gearbeitet. Die erste Diazinongabe erfolgte zu Beginn des Versuchs, der zweite Puls nach 2, 7 oder 15 Tagen. Auch ▶

im Freiland treten solche Pulse auf, etwa wenn auf dem Feld neben einem Bachlauf in bestimmten Zeitintervallen Insektizide gespritzt werden.

Betrachtet man in diesem Experiment die Toxikokinetik, so stellt man fest, dass bereits einen Tag nach dem ersten Puls praktisch kein Diazinin mehr vorhanden ist, weder im Wasser noch in den Bachflohkrebschen. Ein ausschließlich toxikokinetisches Modell würde nun für den zweiten Puls vorhersagen, dass die Sterblichkeit unter der Annahme eines stochastischen Todes identisch mit der des ersten Pulses ist. Tatsächlich aber trifft dies nur auf die Versuche zu, bei denen der zweite Puls nach 15 Tagen gegeben wurde. Wird der zweite Puls schon nach 2 oder 7 Tagen gegeben, stirbt ein im Vergleich zum ersten Puls signifikant höherer Anteil der Tiere.

Für eine genaue Vorhersage genügt es also nicht, sich auf die Toxikokinetik zu beschränken. Neben der Frage, was dem Giftstoff widerfährt, ist eben auch relevant, welche Schäden dieser Giftstoff im Organismus hinterlässt. Selbst wenn die Bachflohkrebschen keinem Diazinin mehr ausgesetzt sind, benötigen sie eine gewisse Zeit, um sich von dem toxischen Stress zu erholen. Andernfalls hat die zweite Diazinin-Exposition eine höhere Todesrate zur Folge – man bezeichnet diesen Effekt als *carry-over*.

Das Modell muss also um eine toxikodynamische Komponente erweitert werden, um die experimentellen Daten genauer abbilden zu können.

### Struktur von Gift

Stadnicka betont, dass diese Modelle nicht ohne Experimente auskommen. „Wichtig ist, dass wir zunächst Messwerte haben, um unser Modell zu kalibrieren. Anschließend können wir die Erkenntnisse auf andere Szenarien extrapolieren.“

Dabei geht sie davon aus, dass ein auf eine bestimmte Fischart kalibriertes Modell auch auf andere Fischarten mit ähnlichen Ansprüchen übertragbar ist. Der Bachflohkrebs wiederum repräsentiert einen Süßwasserarthropoden. Auf diese Weise sollen sich künftig Umwelt Risiken besser abschätzen lassen, die von chemischen Verbindungen ausgehen.

Nun setzen TKTD-Modelle voraus, dass man die Chemikalie kennt, deren Effekte man voraussagen will. Erst die experimentellen Daten liefern Aufschluss darüber, wie die Parameter in einer Simulation zu wählen sind. Wäre es nicht praktisch, wenn eine Software lediglich eine

Strukturformel analysieren müsste, um die Toxizität der entsprechenden Substanz vorauszusagen? Genau dieses Ziel hat sich der promovierte Chemiker Christoph Helma auf die Fahne geschrieben. In Basel hat er sein eigenes Unternehmen, die „in silico toxicology gmbh“, gegründet und ist an der Entwicklung des Programms „Lazy Structure-Activity Relationships“ (lazar) beteiligt.

Wie kann man nun die Toxizität einer Substanz vorhersagen, zu der keine experimentellen Daten vorliegen und lediglich die Strukturformel bekannt ist? Eine Möglichkeit besteht darin, die Wechselwirkung des Moleküls mit den Signalwegen im Organismus zu simulieren, was aber nur für überschaubare Fragen praxistauglich ist.

„Wenn wir beispielsweise einen klar definierten Rezeptor haben, der wichtig für irgendeine Giftwirkung ist, lässt sich



Vorhersage der Giftigkeit: Wahrsagerei bei Medikamentenentwicklung und Chemikalienüberprüfung?

das modellieren“, erklärt Helma und fügt hinzu: „Uns interessieren aber die großen Effekte: Ist eine Verbindung krebserregend oder nicht? Verursacht sie Langzeitschäden?“ Für solch generelle Aussagen zur Toxizität müsste ein Programm aber jeden relevanten Signalweg eines Organismus abbilden, was natürlich unrealistisch ist. Helmas lazarus kommt ohne diese Details aus und betrachtet lediglich die Strukturformel und den entsprechenden Endpunkt, beispielsweise Kanzerogenität.

„Unsere Programme sind chemisch und biologisch ziemlich dumm und wissen eigentlich gar nichts darüber“, so Helma, „aber dafür beherrschen sie Statistik und Data-Mining“. Da ist also eine Software, die eine Strukturformel sieht und daraus Angaben über die Toxizität ableitet, ohne auch nur die geringste Ahnung zu haben, welche chemischen Effekte das entsprechende Molekül hat und wo im Organismus es reagiert.

Auf den ersten Blick klingt das erstaunlich, doch wir alle kennen ähnliche

Programme aus dem Alltag. So hat ein lernender Spamfilter, der die E-Mails sortiert, ja auch keine Ahnung von Grammatik und kümmert sich nicht um semantische Zusammenhänge im Text. Stattdessen analysiert er statistische Merkmale der vorkommenden Wörter und errechnet daraus eine Wahrscheinlichkeit. Voraussetzung ist, dass der Spamfilter zuvor trainiert wurde und genügend Spam und Nicht-Spam gesehen hat. „Rein technisch verwendet ein Spamfilter andere Algorithmen, aber konzeptionell kann man sich das Funktionsprinzip von lazarus in etwa so vorstellen“, erklärt Helma.

### Eine lernende Software

Will man lazarus zur Vorhersage von Toxizität verwenden, benötigt man zunächst einmal Trainingsdaten. Dabei kommt es auf die Endpunkte an. Beispielsweise könnte man bestehende Datenbanken nach allen Substanzen durchsuchen, für die eine Kanzerogenität bei Nagetieren experimentell nachgewiesen wurde. Für das Training bekommt lazarus nun die Strukturformel jedes untersuchten Moleküls sowie einen Wert, der die ermittelte Kanzerogenität angibt. Je mehr Daten zur Verfügung stehen, desto zuverlässiger wird lazarus später arbeiten.

Doch wie kann die Software dann auf die Kanzerogenität eines vollkommen unbekanntes Moleküls schließen? Eine Strukturformel, die es noch nie zuvor gesehen hat!

Bei der Analyse einer Strukturformel sucht lazarus in seinen Trainingsdaten nach ähnlichen Molekülen und ihren zugehörigen Werten zur Toxizität. Je ähnlicher ein Molekül, desto stärker wird dieser Wert gewichtet. Daraus errechnet das Programm dann einen Wert für das unbekanntes Molekül. „Wenn wir zu einer Eingabe zehn ähnliche Verbindungen finden, die alle krebserregend sind, dann ist es naheliegend, dass auch die unbekanntes Substanz kanzerogen ist“, so Helma.

Das Grundprinzip dieser Analyse wird als *nearest neighbour* bezeichnet, weil der Algorithmus nach ähnlichen Molekülen, sozusagen nach „Nachbarn“ sucht. Um eine Aussage darüber treffen zu können, wie benachbart die Substanzen aus den Trainingsdaten sind, werden deren Strukturen zunächst in Substrukturen zerlegt.

„Wir haben einen großen Sack voll Moleküle, dessen Inhalt wir in kleinere Bestandteile zerlegen, um dann zu schauen, welche dieser Bestandteile mit unserer Aktivität zusammenhängen könnten“,

fasst Helma das Grundprinzip zusammen. Solche Substrukturen, die im Zusammenhang mit der untersuchten Aktivität stehen, werden als *structural alerts* bezeichnet. Diese ermittelt lazar aus den Trainingsdaten und zieht sie für die Analyse neuer Strukturen und dem Auffinden des *nearest neighbour* heran. „Durch diese *structural alerts* dampfen wir die zu untersuchende Datenmenge ziemlich ein“, ergänzt Helma.

### Bitte nicht zu genau!

Bildet ein Modell die chemische Realität noch adäquat ab, wenn es sich auf wenige Substrukturen beschränkt, die aus statistischen Gründen als relevant angesehen werden? Prinzipiell kann man Analysealgorithmen und deren Regelwerke zur Modellierung beliebig kompliziert gestalten, so lange Speicherkapazität und Rechenleistung noch mitspielen. Jedoch ist ein komplexes Modell nicht automatisch besser für Vorhersagen geeignet.

„Zu ungenau ist natürlich jeder Algorithmus, der für die



Foto: Lara Winckler, Bild: iStock/Okrea

Vor dem Computermodell für Toxizitäts-Tests stehen die experimentellen Daten.

Frage zu einfach ist“, erklärt Helma und nennt als Beispiel Korrelationsgeraden, die für nicht-lineare Zusammenhänge unbrauchbar sind. „Man kann aber auch Modelle entwickeln, die viel zu genau sind und einfach so lange mit den Trainingsdaten herumprobieren, bis eine Methode scheinbar perfekt passt“, so Helma weiter. In diesem Fall hätte das Modell eine extrem hohe Übereinstimmung mit den Trainingsdaten, würde aber für neue Strukturen letztlich nur Zufallszahlen liefern – ein Phänomen, das als *overfitting* bezeichnet wird.

Damit man sich auf lazars Vorhersagen verlassen kann, genügt es also nicht, das Programm einfach nur mit möglichst vielen Trainingsdaten zu füttern. Man benötigt anschließend auch Testdaten, mit denen sich die Zuverlässigkeit des Modells überprüfen lässt. „Diese Testdaten dürfen natürlich nicht in den Trainingsdaten enthalten sein“, merkt Helma an.

### Medikamententests

Ähnlich wie TKTD-Modelle kann auch lazar helfen, den Umfang an Laborexperimenten zu reduzieren. So ist es bei der Entwicklung neuer Medikamente sehr nützlich, schon im Vorfeld die Toxizität eines Kandidatenmoleküls abschätzen zu können. „Viele Verbindungen lassen sich auf diese Weise frühzeitig aussortieren, bevor das erste Experiment am Tier stattfindet“, so Helma.

Ein weiteres Anwendungsfeld ergibt sich im Zusammenhang mit der EU-Verordnung REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals). „Dabei geht es um die Registrierung von Industriechemikalien und Aufbereitung von Altstoffen, zu denen es teilweise gar keine Toxizitätsdaten gibt“, berichtet Helma. „Ein Großteil der Verbindungen soll möglichst ohne Tierversuche nachgeprüft werden.“

Zwar ist es noch ein langer Weg bis zum Supercomputer, der jede beliebige Substanz analysieren und dessen Folgen für Organismen und Umwelt vorhersagen kann. Als Ergänzung zu klassischen Laborexperimenten aber werden Computermodelle in der Toxikologie immer wichtiger. „Die Frage ist, wie gut wir uns an die Wirklichkeit annähern können, aber das selbe Problem haben ja *in vitro*-Assays auch“, stellt Helma abschließend fest, „auch sie sagen nicht immer vorher, was im Tier passiert und müssen ständig überprüft, validiert und verbessert werden“.

Wer lazar selbst einmal ausprobieren möchte, kann das online tun (<http://lazar.in-silico.ch/predict>): einfach eine Strukturformel zeichnen und diese auf verschiedene toxikologisch relevante Endpunkte hin überprüfen lassen.

MARIO REMBOLD

abcam<sup>®</sup>  
discover more

## Produkte für die Zebrafisch-Forschung

### CyGEL™:

- Zur Immobilisierung von lebenden Zellen und Organismen – besonders geeignet zur Untersuchung von Zebrafischembryos und adulten Tieren
- Im gekühlten Zustand flüssig, bei Raumtemperatur ein Gel
- Thermoreversibles Gel ermöglicht einfache Probenrückgewinnung



Auf unserer Webseite finden Sie auch Informationen über unser umfangreiches Angebot an Zebrafischantikörpern.

### Abcam

Tel: 030 896 779 154  
Fax: 0800 664 8480  
[orders@abcam.com](mailto:orders@abcam.com)

Discover more at [abcam.com](http://abcam.com)

Der Multi-Organ-Chip (auf dem Tisch, verschlaucht) besteht aus einer Flusszelle, die Wachstumskammern, Kanäle und Reservoirs enthält.

Organs-on-a-Chip

# Bioreaktoren im Chipformat

■ Frank Sonntag und seine Kollegen am Dresdner Fraunhofer-Zentrum entwickeln eine miniaturisierte Plattform zur Kultivierung mehrerer Organsysteme, die viele Tierexperimente überflüssig machen könnte.

„Unsere Gruppe ist etwas außergewöhnlich hier“, verrät Frank Sonntag. Der promovierte Ingenieur leitet am Fraunhofer-Institut für Werkstoff- und Strahltechnik (IWS) das Projekt zur Entwicklung eines Multi-Organ-Bioreaktors im Chipformat. Sonntag führt mich in sein Labor, in dem mehrere Mikrosystemtechniker mit Feile und Lötkolben hantieren und an Geräten herumschrauben. „Wir sind im Vorbereitungsstress für die Biotechnica-Messe, wo wir unsere Plattform vorstellen möchten“, erklärt Sonntag das rege Treiben und drückt mir einen dieser Organ-Chips in die Hand. Meine Augen jagen über die nächste Bench auf der Suche nach Handschuhen, doch der Elektrotechniker beruhigt mich: „Wir sind Ingenieure und verantwortlich für die Hardware-Plattform. Mit lebenden Zellen arbeiten wir hier im IWS nicht.“

Das Forschungsprojekt „Organs-on-a-Chip“ ist eine interdisziplinäre Kooperation aus Fraunhofer IWS und dem Institut für Biotechnologie der TU Berlin unter Leitung von Roland Lauster. „Die Berliner Kollegen kümmern sich um die Biologie, allen voran der geistige Vater dieser Entwicklungen, Uwe Marx“, so Sonntag. Der Mediziner Marx beschäftigt sich seit 20 Jahren mit Organmodellen. Nun arbeitet er zusammen mit seinen Berliner Kollegen und dem Team um Frank Sonntag an der Umsetzung seiner Idee, mehrere Mikro-Organen in einem gemeinsamen Miniatur-Kreislauf wachsen zu lassen.

„Unsere Organe bestehen aus winzigen Funktionseinheiten, die einen Millimeter und kleiner sind und die gesamte Organfunktion beinhalten. Nachdem die Welt das

gelernt hatte, war uns klar, dass wir dann auch mehrere solcher Mikro-Organen – verbunden über einen gemeinsamen Kreislauf – zusammen kultivieren können“, so Marx.

## Biologe trifft Ingenieur

Sonntag und Marx sind alte Bekannte. „Wir haben schon vor zehn Jahren zusammen gearbeitet und die Elektronik zur Steuerung von Bioreaktoren entwickelt“, erzählt Sonntag. Marx rief 2008 in Dresden an und erläuterte seine Idee vom Multi-Organ-System. „Wie kann man das bauen“, war die Frage, mit der sich Sonntag und sein Team seitdem beschäftigen.

Geeignete Plattform war ein Bioreaktor im Mikrochip-Format, in dem man die jeweils kleinsten funktionellen Einheiten wichtiger Organe, wie Haut, Leber, Darm und Niere, als dreidimensionale, organotypische Gewebekulturen züchten kann. Im Chip sind Kanäle integriert, die einen Mikro-Kreislauf bilden und damit die Zusammenschaltung dieser kleinen Struktureinheiten erlauben. So ist die Kommunikation zwischen den unterschiedlichen Zelltypen möglich und Wechselwirkungsprozesse können charakterisiert werden. Als Ersatz für Tierexperimente soll damit schließlich auch die Biochemie des Menschen simuliert werden.

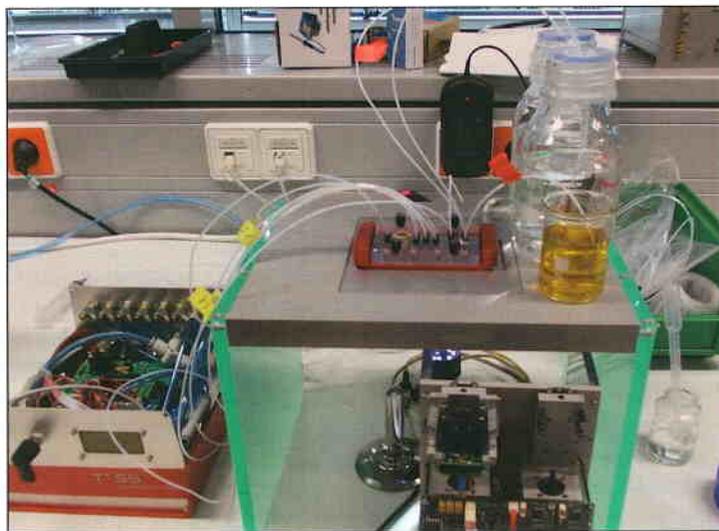
Die Idee war gut und reif für eine kommerzielle Verwertung, fand das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF). Mit dem Erfolg in der 3. Auswahlrunde der „Gründungsoffensive Biotechnologie“ (GO-Bio) erhielt das Team im März 2010 rund 3 Millionen Euro, um den Multi-Organ-Bioreaktor im Chipformat zu entwickeln und auf dieser Grundlage ein Unternehmen zu gründen. Uwe Marx kannte sich aus in der Gründerszene, so dass bereits im Februar 2010 die Firma TissUse entstand.

Den Organ-Chip halte ich immer noch in der Hand. Er hat die Größe einer Kreditkarte und besteht aus einer Flusszelle, die Wachstumskammern, Kanäle und Reservoirs enthält. Als Material für die Flusszelle

wählten die Ingenieure Polydimethylsiloxan (PDMS), ein durchsichtiges, ungiftiges und chemisch inertes Silikon. „Am ersten Prototyp haben wir gelernt, was alles nicht geht“, schmunzelt Sonntag und ergänzt: „Wir versuchten den Aufbau über aufwendige Glas-Silizium-Glas-Verbundsysteme zu realisieren. Das machte diese Chips extrem teuer und als die Kollegen sie beim Sterilisieren fallen ließen, gingen sie sofort kaputt.“

Der neue Chip ist einfacher und vor allem günstiger herzustellen. Die neue Flusszelle wird nun gegossen, indem man das flüssige Zweikomponenten-Polymer PDMS in eine Form spritzt und im Ofen aushärten lässt. „Wenn man die Flusszelle anders gestalten und beispielsweise die Kanäle des Mikrofluidiksystem anders verlegen möchte, dann muss man nur das Abformwerkzeug anpassen und kann so beliebig viele solcher Flusszellen relativ günstig herstellen“, erläutert Sonntag.

Der Mikro-Kreislauf wird durch winzige Peristaltikpumpen angetrieben, die zusammen mit Ventilen direkt in die Flusszelle integriert sind. Als obere Abdeckung



Fotos (3): Kai Krämer



Für Frank Sonntag (li.) und Sven Brincker ist es ist nur noch eine Frage von einigen

dient eine Anschlussplatte aus Kunststoff, die Schlauchanschlüsse für die Fluidik und Pneumatik trägt. Die Unterseite der neuen Flusszelle wird von einem Glasobjektträger abgeschlossen, der in einer temperierbaren Aufnahme befestigt ist. Die Steuerung übernimmt ein Mikrocontroller, der die Temperatur regelt, die Pumpen steuert und die PC-Kommunikation ermöglicht.

„Die technischen Anforderungen, wie Biokompatibilität und Sterilisierbarkeit, die von Seiten der Biologen an unsere Chips gestellt wurden, konnten wir mit dieser Plattform umsetzen“, so Sonntag. Und da ein Zellbiologe nur glaubt, was er sieht, können die Wachstumskammern vollflächig mikroskopiert werden. Neben der Entnahme von Medium für nicht-invasive Toxizitätstests ist auch die fluoreszenzbasierte Bestimmung von Zelleigenschaften, wie etwa der Viabilität, möglich. Um das Substanztestsystem so einfach wie möglich zu gestalten, konstruierte das Biologen-Ingenieure-Team den Multi-Organ-Chip von vorneherein so, dass er auch ohne Inkubator betrieben werden kann.

### Organe *in silico*

Doch was wächst denn nun im Mikrochip-Bioreaktor? „Zunächst wuchs da gar nichts“, erzählt BTA Sven Brincker. „Uns war anfangs nicht klar, dass PDMS – das Material der Flusszelle – sehr hydrophob ist und keine Zellen darauf adhären können.“ „Außerdem war es sehr schwer, den Chip zu befüllen, da das Medium schlecht in die hydrophoben Kanäle eindringen konnte. Jede Luftblase wurde hier zum Problem“, erinnert sich Sonntag.

Abhilfe schaffte eine Plasmabehandlung – aktiviertes Gas, das in seine Ionen und Elektronen getrennt wurde. „Die Plasmabehandlung bewirkt, dass ein Wasserstoffatom durch eine Hydroxylgruppe substituiert wird, wodurch die Oberfläche hydrophil wird“, erläutert Sonntag.

Endothelzellen waren die ersten Bewohner des Multi-Organ-Chips. Ein einschichtiger Verband aus humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen – isoliert aus Spenderhaut – kleidete alle Wachstumskammern und Kanäle aus. Diese „Endothelialisierung“ bildet die Grundlage für eine Vaskularisierung der Organmodelle, die aus Sauerstoffmangel die Bildung von Mikrokapillaren induzieren sollen. Statt mit Zellkulturmedium möchten die Forscher den Chip in Zukunft mit Vollblut betreiben. Hier verhindern die geschlossenen biologischen Kanäle Immun- und Gerinnungsreaktionen, die durch Kontakt mit der künstlichen Oberfläche auftreten könnten. Außerdem dichtet die vollständig abschließende Endothelzellschicht den Chip ab.

„Der biologische Kreislauf ist extrem wichtig. Wir haben früher mit den technischen Kanälen den Fehler gemacht, dass wir die Endothelzellen unterschätzt haben. Ohne die ist kein dauerhaft stabiles homöostatisches System möglich“, merkt Marx an. „Wenn wir die Pumpe anschalten und den Kreislauf starten, richten sich die zunächst chaotisch orientierten Endothelzellen in Strömungsrichtung aus“, berichtet Brincker begeistert und ergänzt: „Die Endothelialisierung ist mein persönliches Highlight; hier habe ich viel Herzblut und Arbeit reingesteckt.“ Das war auch nötig, denn die Handhabung eines Mikro-Bioreaktors muss man erstmal lernen: „Wir reden hier über winzige Volumina von weniger als 30 µl. Die sind schnell verdunstet oder ausgelaufen. Mit Zellkulturflaschen kann fast jeder arbeiten, aber um den Chip luftblasenfrei zu befüllen, bedarf es einiges an Erfahrung“, so Brincker.

Um eine Alternative zu Tierexperimenten zu schaffen, müssen möglichst viele verschiedene Organsysteme auf dem Chip wachsen, so dass die wesentlichen pharmakokinetischen und toxikologischen Eigenschaften der zu testenden Substanz untersucht werden können. Die so genannten ADMET-Parameter (Absorption, Distribution, Metabolismus, Exkretion, Toxizität) fassen dies zusammen.

Die Eintrittspforte des Chips für die zu testende Substanz bildet ein mehrschichtiges Epidermis-Dermis-Modell mit einer Oberfläche von 14,3 mm<sup>2</sup>. Hierfür werden aus Spenderhaut gewonnene dermale Fi-

broblasten und Keratinozyten benutzt. Ein Fibringel mit Fibroblasten stellt als Dermis-Äquivalent die Basisschicht in einem Transwell-Zellkultureinsatz dar. Darauf ausgesäte Keratinozyten bilden eine mehrschichtige Epidermis aus.

Das Besondere ist, dass die Berliner einen Haarfollikel in ihr Hautäquivalent integrieren konnten. Aus dem per Mikro-manipulation in die Epidermis eingesetzten Follikel wächst ein Haar. Für die Substanztestung ist das hochinteressant, da über die Haarfollikel die meisten Stoffe in die Haut eindringen. Die Koryphäe für das Haar im Berliner Team ist Gerd Lindner, der kürzlich die Züchtung eines menschlichen Haarfollikels aus körpereigenen Zellen publizierte (*J Biotechnol* 2011, 152(3):108-12).

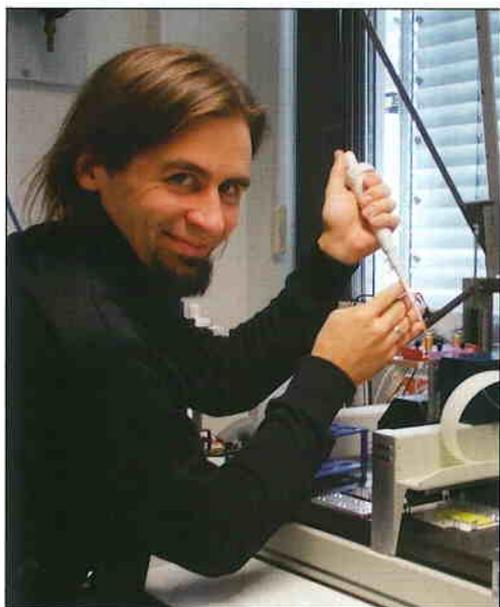
„Unser Hautmodell enthält alle für die Substanztestung nötigen Bestandteile. Die richtige Haut besitzt aber außerdem noch Schweißdrüsen, Talgdrüsen, jede Menge Rezeptoren und eine Fettschicht darunter. Um dies zu realisieren brauchen wir noch zwanzig Leute, die zehn weitere Jahre forschen“, blickt Marx in die Zukunft. Noch fehlt die Verbindung von Hautmodell mit Haarfollikel und endothelialisiertem Chip, um das Hautmodell zu vaskularisieren und hierdurch langzeitstabil zu halten. „Das wollen wir in diesem Jahr auf jeden Fall noch realisieren“, so Brincker zielstrebig.

Statische Hautmodelle ohne ständige Versorgung über ein Kreislaufsystem eignen sich aufgrund der relativ kurzen Lebenszeit nur für die Testung einer Substanz auf akute Toxizität. Die Wissenschaftler streben mit ihrem Chip eine Langzeitmessung über 90 Tage als dynamisches Modell an. Diesen Zeitraum fordert die Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD) für tierexperimentelle Toxizitätsbestimmung nach wiederholter oraler Gabe. Mit dem vaskularisierten Hautmodell könnten die ADMET-Parameter Absorption, Distribution und Toxizität untersucht werden. Um auch den Metabolismus und die Exkretion zu analysieren, bedarf es noch einer Leber und einer Niere im Mikro-Maßstab.

Ob die Forscher alle Organmodelle selbst erfinden wollen, bleibt abzuwarten. Der Weg zum Multi-Organ-Bioreaktor ist geebnet, aber noch nicht asphaltiert. Die Interdisziplinarität haben die Dresdner Mikrosystemtechniker und die Berliner Biotechnologen bereits gemeistert.

„Wir vertragen uns hervorragend, zumindest seit dem Tag, an dem im Chip zum ersten Mal irgendetwas gewachsen ist“, grinst Sonntag.

KAI KRÄMER



Jahren, bis sie mit ihrem Multi-Organ-Chip einen kompletten Körper simulieren können.