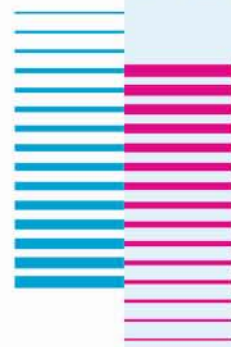


**Stiftung zur Förderung  
der Erforschung von  
Ersatz- und  
Ergänzungsmethoden  
zur Einschränkung von  
Tierversuchen**

**set**



## Projekt

Entwicklung eines *in vitro*-Testsystems zur Prüfung der  
Kanzerogenität von Chemikalien im hohen Durchsatz

Prof. Dr. Pablo Steinberg, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

12/2010 – 11/2011



**3R** reduce  
refine  
replace

Mainzer Landstraße 55  
60329 Frankfurt/Main  
Telefon 069-2556-1226  
[www.stiftung-set.de](http://www.stiftung-set.de)  
[info@stiftung-set.de](mailto:info@stiftung-set.de)

[www.stiftung-set.de](http://www.stiftung-set.de)

## Entwicklung eines *in vitro*-Testsystems zur Prüfung der Kanzerogenität von Chemikalien im hohen Durchsatz

Beim Mehrstufenmodell der Kanzerogenese wird die Tumorentstehung in drei Phasen, die der Initiation, Promotion und Progression, unterteilt. Während der Initiationsphase werden durch Genmutationen Onkogene aktiviert bzw. Tumorsuppressorgene inaktiviert. In der Phase der Tumorpromotion wird die Proliferation der initiierten Zellen angeregt, was zur Bildung von präneoplastischen Läsionen führt. Aus einer präneoplastischen Läsion kann durch weitere genetische Veränderungen in der Progressionsphase ein maligner Tumor entstehen. Diesem Modell entsprechend können an der Tumorentstehung beteiligte Kanzerogene in zwei Kategorien eingeteilt werden: 1) Genotoxische Substanzen: sie interagieren mit der DNA und lösen dadurch irreversible genetische Veränderungen aus; 2) Tumor-Promotoren: sie können durch eine Reihe unterschiedlicher epigenetischer Mechanismen das Zellwachstum, insbesondere das der initiierten Zellen, stimulieren, wobei die Substanzen selbst keine irreversible Veränderungen in den Zellen verursachen.

Ob Chemikalien krebserregend wirken, wird in Kanzerogenitätsstudien ermittelt. Solche Studien klären, ob eine Substanz über einen Zeitraum von zwei Jahren zur Ausbildung von Krebserkrankungen in einem Nagetier führt. Der Aufwand solcher Studien ist beträchtlich, denn deren Vorbereitung, Durchführung und Auswertung dauern etwa drei Jahre bei einem Finanzbedarf von durchschnittlich 1 Mio. € pro Studie. Nach der EU-Chemikalienverordnung (REACH) wird eine Bewertung vieler Chemikalien hinsichtlich ihres kanzerogenen Potenzials in den nächsten Jahren notwendig sein, so dass man mit einer steigenden Zahl an Kanzerogenitätsstudien in Säugetieren rechnen muss. Abhilfe könnten in diesem Zusammenhang *in vitro*-Tests liefern, die reproduzierbar bestimmte Kriterien der malignen Transformation prüfen.

Der BALB/c-3T3-Zelltransformationstest und der Weichagar-Assay sind zwei gut etablierte *in vitro*-Systeme, die kombiniert eine einfache quantitative Analyse des krebserregenden Potenzials von Chemikalien ermöglichen könnten. Der BALB/c-3T3-Zelltransformationstest basiert darauf, dass BALB/c-3T3 Zellen, die durch eine Inkubation mit Chemikalien transformiert werden, nach Verlust der Zell-Zell-Kontaktinhibition Herde bilden. Dabei dient die Zahl der gebildeten Zellherde als Maß für das transformierende Potenzial der jeweils getesteten Substanz. Mit Hilfe des Weichagar-Assays kann eindeutig festgestellt werden, ob Epithelzellen maligne transformiert sind. Nicht transformierte Epithelzellen benötigen zum Überleben den Kontakt zu benachbarten Zellen sowie zu einem Wachstumssubstrat. Beim Wegfallen dieser Bedingungen wird in den nicht transformierten eine bestimmte Form von programmiertem Zelltod, die Anoikis, ausgelöst. Dagegen können sich maligne transformierte Epithelzellen ohne weiteres in Weichagar vermehren. Obwohl der Weichagar-Koloniebildungs-Assay als „Gold-Standard“ für den Nachweis einer malignen Zelltransformation gilt, wurde er bisher nicht in Testsysteme zur Prüfung der krebserregenden Wirkung von Chemikalien integriert.

Eine Vielzahl von potenziell krebserregenden Chemikalien entfaltet erst nach einer metabolischen Aktivierung, die durch verschiedene fremdstoffmetabolisierende Enzyme katalysiert werden kann, ihr tumorigenes Potenzial. Somit sollten neu zu entwickelnde *in vitro*-Testverfahren, die die *in vivo*-Situation aus metabolischer Sicht weitestgehend wiedergeben sollen, unbedingt einen solchen Metabolisierungsschritt beinhalten.

Ziel des Gesamtvorhabens ist, den BALB/c-3T3-Zelltransformationstest mit dem Weichagar-Assay zu kombinieren. Dabei soll in einem ersten Schritt ein Metabolisierungssystem an den BALB/c-3T3-Zelltransformationstest gekoppelt werden. Die anschließende Kombination der zwei oben genannten Assays soll erstmalig die *in vitro*-Prüfung von Chemikalien hinsichtlich ihres krebserregenden Potenzials in hohem Durchsatz ermöglichen und dadurch zu einer wesentlichen Reduktion der Zahl der Tierversuche führen.

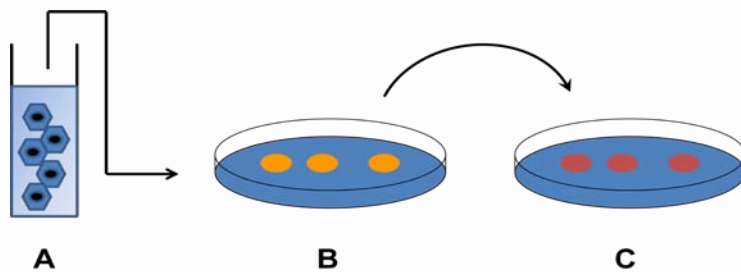


Abb. 1 Kopplung eines Metabolisierungssystems an den BALB/c-3T3-Zelltransformationstest: A) Inkubation der Testsubstanz mit einem Leber-Homogenat; B) Kultivierung der BALB/c-3T3-Zellen mit dem Inkubationsüberstand; C) Auszählen der Herde transformierter Zellen

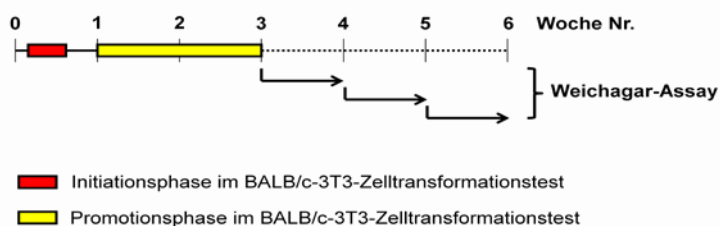


Abb. 2 Kopplung des BALB/c-3T3-Zelltransformationstests mit dem Weichagar-Assay

## Projektleiter



### Prof. Dr. Pablo Steinberg

Jahrgang 1958. Biochemie-Studium in Buenos Aires 1976-1982; Promotion 1985. Habilitation Toxikologie 1994. Professur für Ernährungstoxikologie am Institut für Ernährungswissenschaft der Universität Potsdam 1998-2008. Geschäftsführender Direktor dieses Instituts 2002-2008. Professur für Lebensmitteltoxikologie und Ersatz-/Ergänzungsmethoden zum Tierversuch und Direktor des Instituts für Lebensmitteltoxikologie und Chemische Analytik der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover seit April 2008.

## Mitarbeiter



### Maria Daniela Brauneis

Jahrgang 1983. Studium Veterinärmedizin TiHo Hannover 2003-2009. Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Labor für Biomechanik und Biomaterialien der Orthopädischen Klinik ,Medizinische Hochschule Hannover 2009-2010. Seit Januar 2011 Doktorandin am Institut für Lebensmitteltoxikologie und Chemische Analytik, Abteilung Lebensmitteltoxikologie und Ersatz-/Ergänzungsmethoden zum Tierversuch, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover.



### Sandra Oortgiese

Jahrgang 1988. Ausbildung zur veterinärmedizinisch-technischen Assistentin in Hannover 2007-2010. Seit Januar 2011 im Institut für Lebensmitteltoxikologie und Chemische Analytik, Abteilung Lebensmitteltoxikologie und Ersatz-/Ergänzungsmethoden zum Tierversuch, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover.

## Ausführende Institution

Professur für Lebensmitteltoxikologie und Ersatz-/Ergänzungsmethoden zum Tierversuch  
 Institut für Lebensmitteltoxikologie und Chemische Analytik  
 Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover  
 Bischofsholer Damm 15  
 30173 Hannover

## Förderungslaufzeit

01.12.2010 - 30.11.2011

Im Anschluss an diesen Zeitraum wird dieses Projekt für ein weiteres Jahr von der Schweizer Doerenkamp-Zbinden-Stiftung gefördert werden.