



## Der automatisierte FADU-Assay: eine effiziente in-vitro-Methode zur Identifizierung erbgutschädigender Substanzen

Moreno-Villanueva *et al.* BMC Biotechnology. 2009 Apr 23;9(1):39



### Tierversuche in der Grundlagenforschung

Grundlagenforscher untersuchen, auf welche Weise bestimmte normale und pathologische Vorgänge im Körper ablaufen. Dies umfasst unter anderem die absichtliche Erzeugung von Krankheitszuständen im Versuchstier als ein sogenanntes Modell für die entsprechende Krankheit beim Menschen.

### Tierversuche in der Industrieforschung

Bevor Firmen Medikamente oder Chemikalien auf den Markt bringen dürfen, müssen sie nach den Vorschriften der Arzneimittel- und Chemikaliengesetze vorab untersuchen, ob diese Stoffe toxische Eigenschaften besitzen.



## Problematik der Tierversuche

### Ethische Bedenken

**Aufgrund ethischer Bedenken hat das Wohlergehen von Tieren einen immer höheren Stellenwert erlangt und ist für die europäische Gesellschaft zu einer kulturellen Frage geworden.**

### Information

**Die Ermittlung von mutagenen Substanzen wird meistens mittels mutagentests durchgeführt. Methoden, welche Hinweise auf Zellprozesse, wie DNA-Schäden und ihre Reparatur erfassen, könnten zusätzliche wertvolle Information liefern [Brendler-Schwaab, 2005]**

### Genauigkeit

**Die meisten Tests an Tieren über- oder unterschätzen Toxizität oder sie widerspiegeln ihre toxische Wirkung in menschlichen Körper nicht sehr gut. Die hohe Anzahl an falsch positiven Ergebnisse sind bedenklich, deshalb sind alternative Methoden bezogen auf Zellen von Säugetieren nötig [Witte, 2007]**



## Problematik der Tierversuche

### Durchsatz

**Der dramatisch gestiegene Bedarf an Chemikalien-Begutachtung erfordert die Validierung von alternativen Methoden, welche Tierversuche reduzieren können [vgl. Cordelli, 2007]**

### Zeitaufwand

**Der Zeitaufwand zum Testen, ob eine Substanz krebserzeugend ist, beträgt 5 Jahre und es werden 400 Tiere (zumeist Ratten) benötigt, die mit der maximal-tolerablen Dosis behandelt werden. Aber die Aussagekraft dieser Tests ist stark eingeschränkt aufgrund des sehr hohen Prozentsatzes an falsch-positiven Ergebnissen [Gold, 2005], d.h. der Stoff wird als krebserzeugend eingestuft, ist es aber nicht.**

### Kosten

**Eine Chemikalie, welche für ihre Registrierung getestet werden muss, kann die Verwendung von bis zu 5.000 Tieren erforderlich machen, bzw. 12.000 Tiere, wenn es sich um ein Pestizid handelt. Die Kosten für die Testung von 30.000 unregistrierte Chemikalien gemäß der REACH-Bestimmungen der Europäischen Union werden auf 5-10 Milliarden US\$ geschätzt [Abbot, 2005]**



## Alternative Strategien zu Tierversuchen

### In-vitro-Versuche in menschlichen Zellen und Geweben Studien mit Probanden Computer und mathematische Modelle

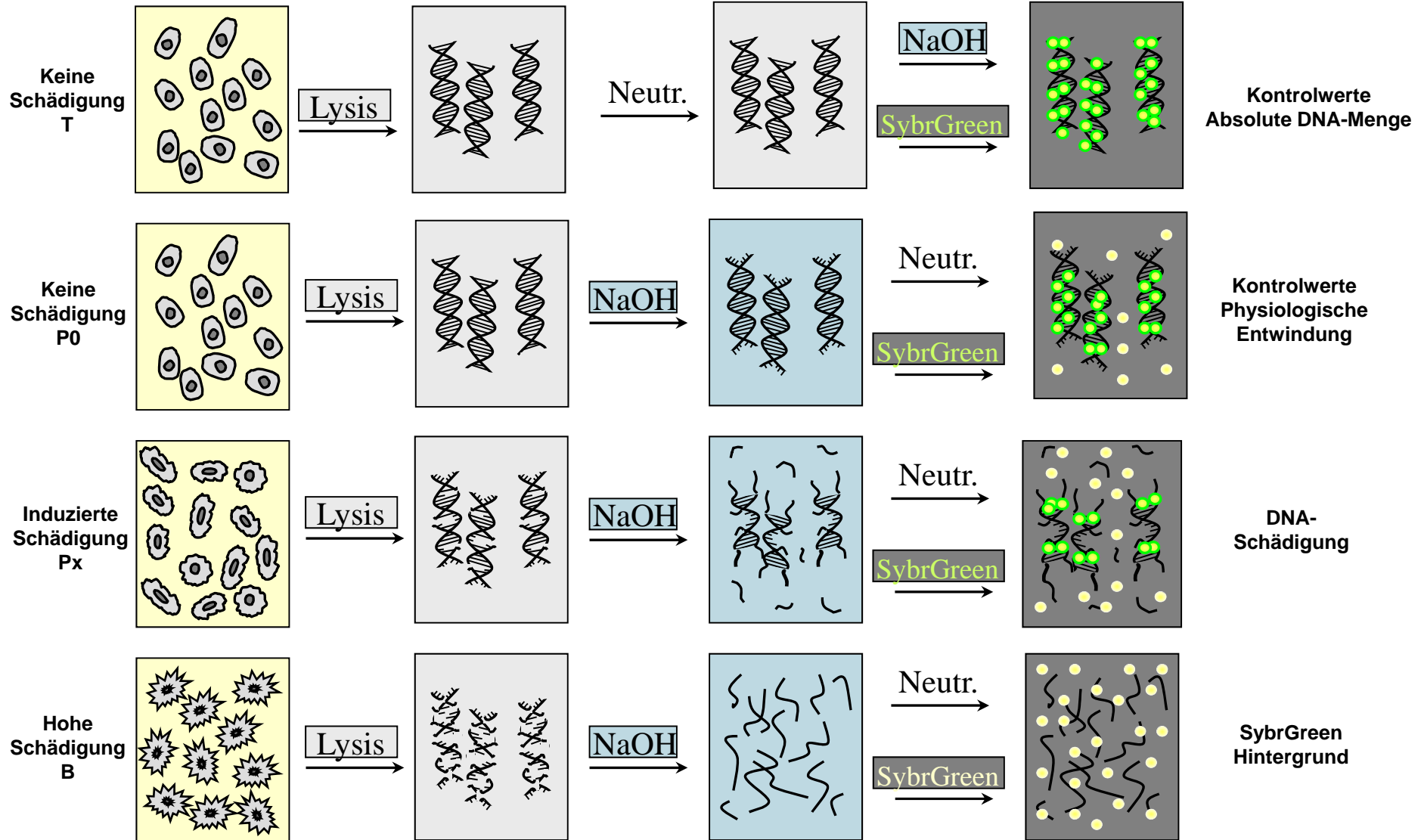
### 3R-Prinzip

- Ersatz (**R**eplacement) → Kommt man für die Untersuchung bestimmter biologischer Vorgänge ganz ohne Tiere aus?
- Verringerung (**R**eduction) → Wie kann man die Anzahl der letztlich doch noch benötigten Tiere minimieren?
- Leidensverminderung bei Tierversuchen (**R**efinement) → Können Versuche so durchgeführt werden, dass die Tiere weder Stress noch Schmerzen verspüren?

Mittlerweile wird das 3R-Prinzip als Synonym zu "Alternativmethoden" verwendet.



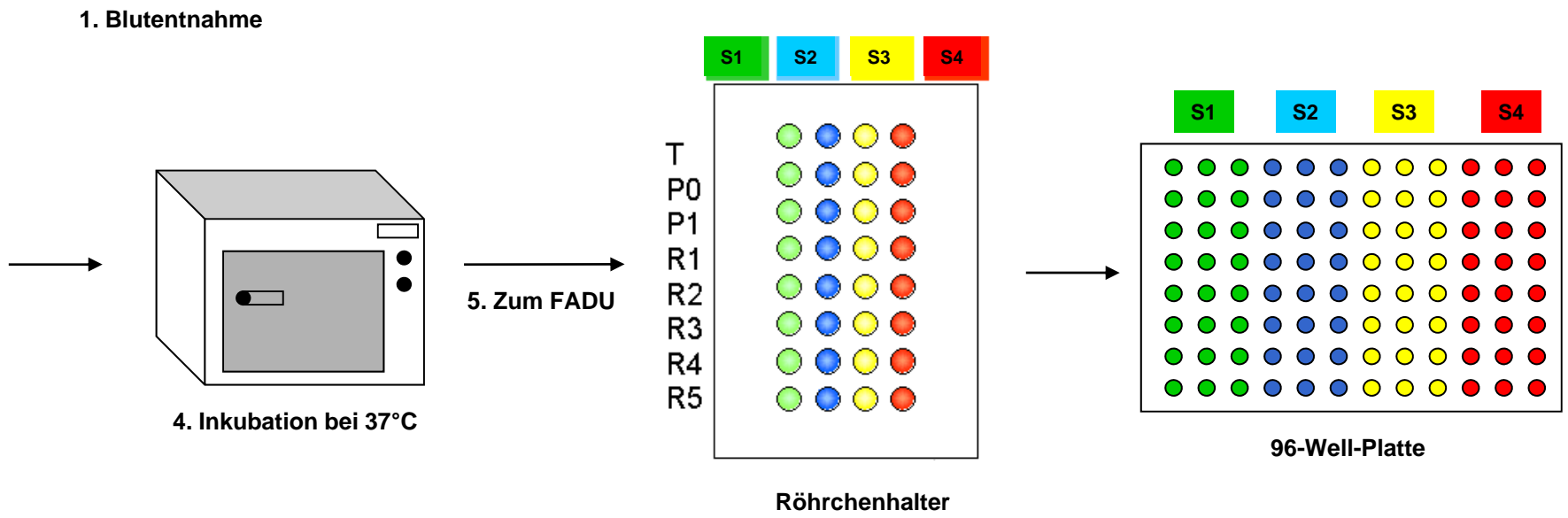
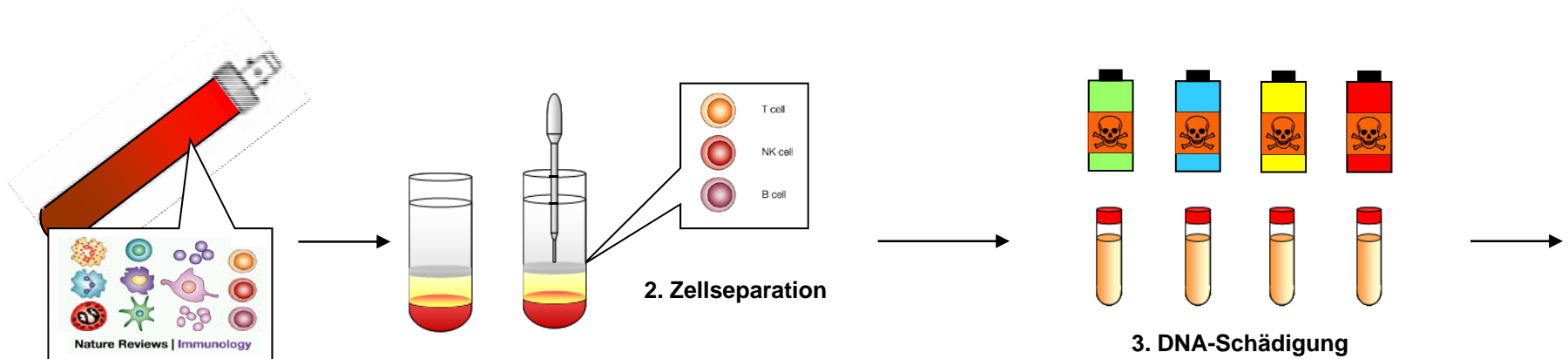
# Fluorimetric Analysis of Alkaline DNA Unwinding (Birnboim 1982)





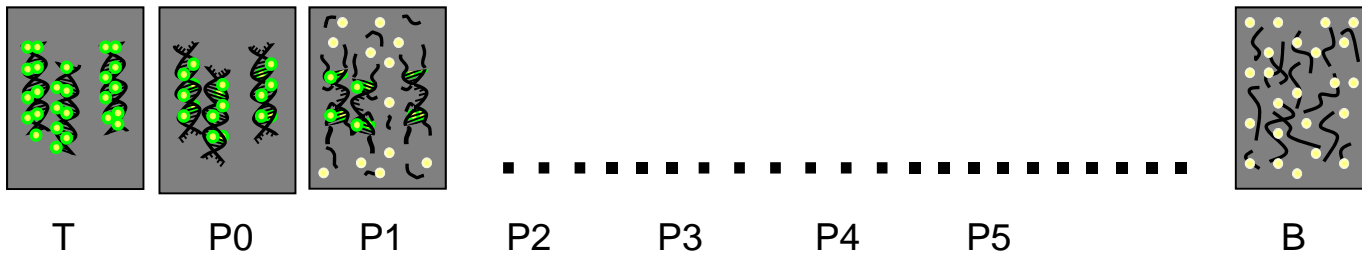
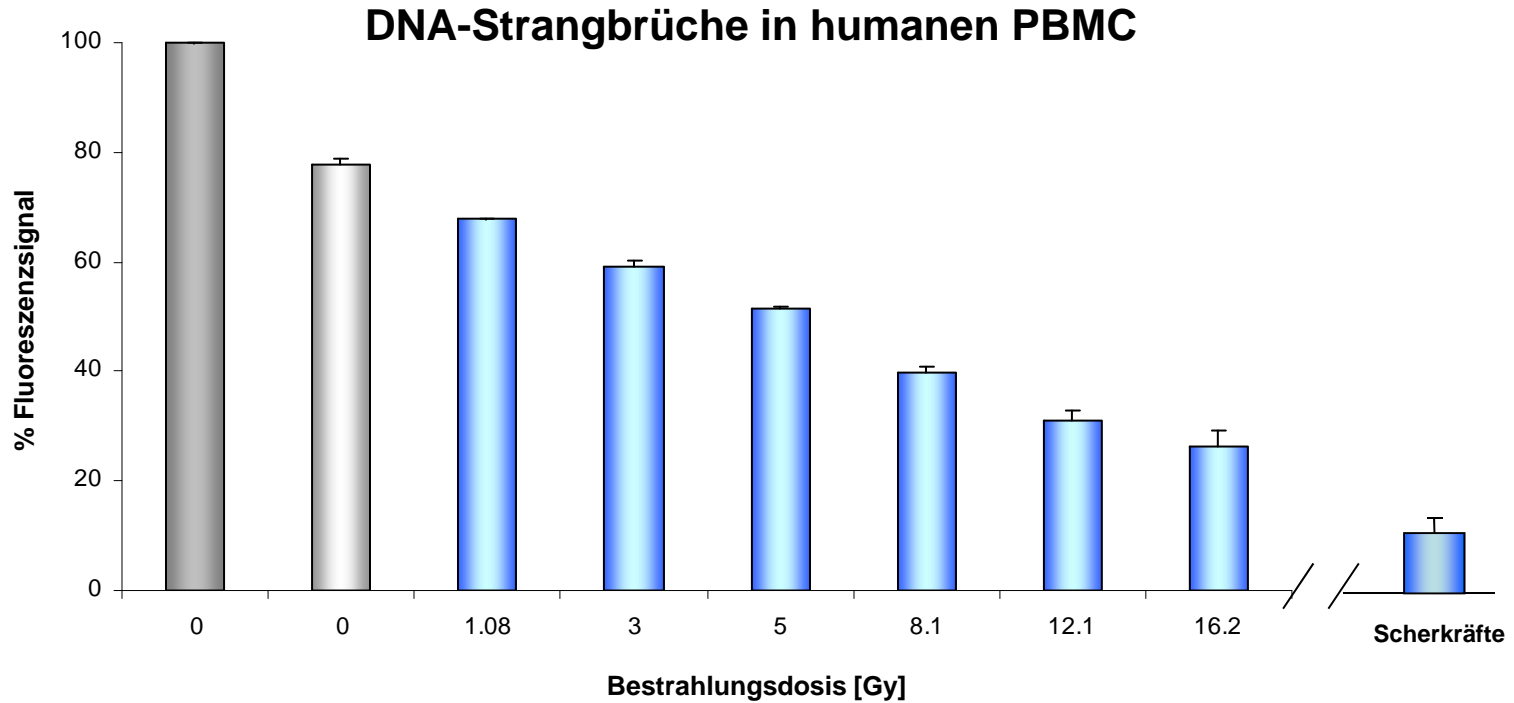


# FADU: Wie funktioniert es?





# FADU: Wie funktioniert es?



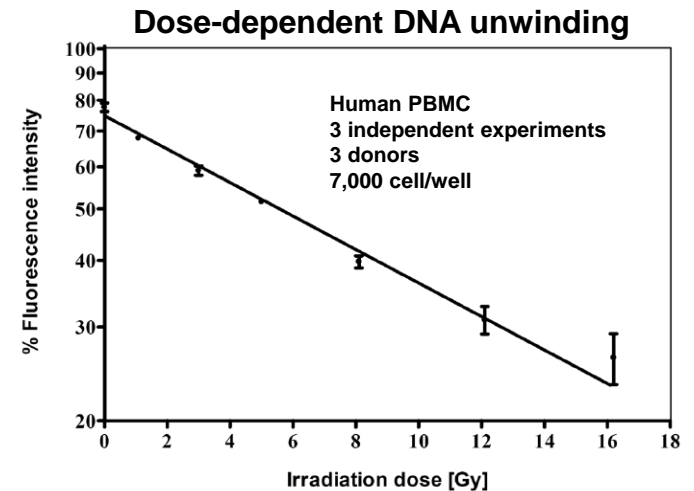


## Vergleich Kometenassay vs. automatisierter FADU

COMET-ASSAY		FADU-ASSAY	
Einzelschritte	Zeit [Min]	Einzelschritte	Zeit [Min]
Vorbereitung von Puffern: Alle vorhanden in Vorräten	5	Vorbereitung von Puffer: Alle vorhanden in Vorräten	5
Vorbereitung Agarose: Verteilung auf 24 Eppendorfs	20	Geräte: Einschalten des Roboters	2
Geräte: Aufbau der Gelelektrophorese-Apparatur	15		
Eppendorfs mit Agarose auf 37°C stellen	15		
Schädigung	30		
Einbetten der Zellen im Agarose auf Objektträgern	60	Zugabe von Suspensionspuffer	5
Agarose abkühlen lassen	10	Automatisierte Schritte: Verteilung der Proben auf die 96-Well-Platte, Lyse, Entwindung, Neutralization, SybrGreen	120
Lyse	30		
Alkalischer Puffer	60		
Elektrophorese	30		
70% Ethanol	5		
Objektträger trocknen lassen	60		
SybrGreen-Anfärbung	15		
SybrGreen trocknen lassen	> 240	Fluorimeter	2
Mikroskopaufnahme	> 60		
Auswertung	> 60	Auswertung	10
Gesamte Zeit	>715	Gesamte Zeit	174

1. Schnell →3 Stunden (davon 2 Stunden reine “Maschinenzeit”)
2. Einfach zu erlernen und durchzuführen
3. Hohe Reproduzierbarkeit
4. Robust
5. Kostengünstig
6. Automatisiert
7. Hoher Durchsatz

### FADU-Methode: Kalibrierungskurve







SEVENTH FRAMEWORK  
PROGRAMME



Universität  
Konstanz



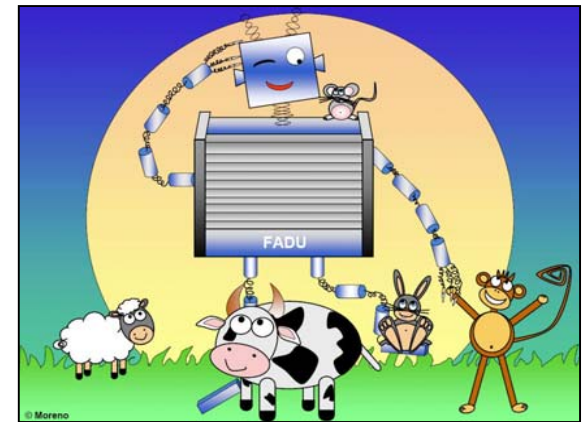
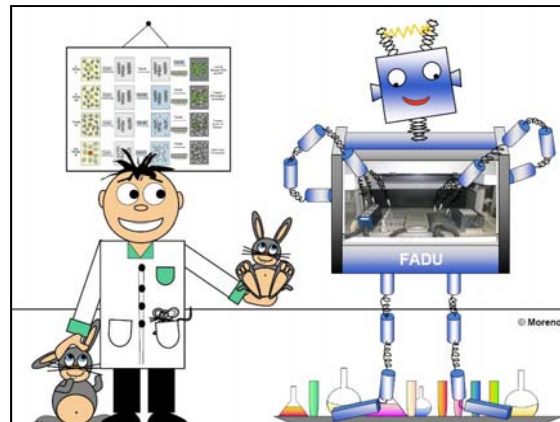
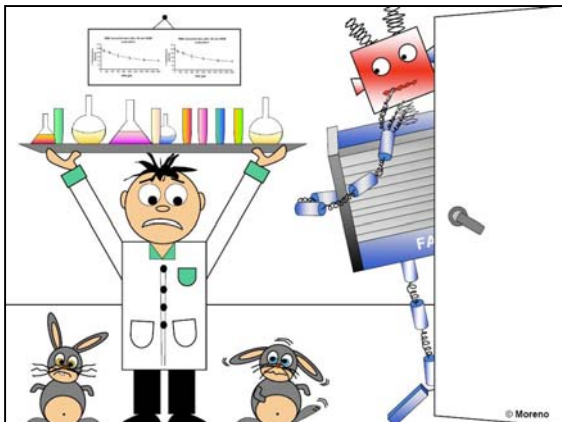
Ursula M. Händel Tierschutzpreis

Dr. Maria Moreno-Villanueva

## Zusammenfassung

Wir haben eine automatisierte in-vitro-Methode zu Messung von DNA-Strangbrüchen und DNA-Reparatur entwickelt, welche wertvolle Informationen im Rahmen von pharmakologischen, toxikologischen, epidemiologischen und arbeitsmedizinischen Studien beitragen kann. Aufgrund der verbesserten Präzision, des erhöhten Durchsatzes und des geringen experimentellen Aufwands können in kurzer Zeit qualitativ hochwertige Daten zum genotoxischen Potenzial von unbekanntem Substanzen gewonnen werden und dadurch die Zahl an Versuchstieren, die zurzeit in der Forschung eingesetzt werden, vermindert werden.

### Mit anderen Worten...



**Vielen Dank!**