

# Dynamisches Monitoring in der präklinischen Wirkstoffentwicklung

Dr. Michael Schulze, Sabine Drechsler, Axel Kob, Dr. Ralf Ehret, Dr. Elke Thedinga,  
Bionas GmbH Rostock

Endpunkt-Assays eignen sich zum Screening großer Substanz-Bibliotheken in hohem Durchsatz. Dynamische Methoden sind im sekundären Screening von Wirkstoffkandidaten überlegen, da sie Aussagen über die Aktivierung oder Hemmung des Zellstoffwechsels erlauben.

**Key Words:** präklinische Wirkstoffentwicklung, Endpunkt, Toxizitätsanalyse, Zellmetabolismus, labelfrei, nicht-invasiv, multiparametrisch, Laborautomation

In der präklinischen Wirkstoffentwicklung werden *in vitro*-Testmethoden eingesetzt, um geeignete Wirkstoffkandidaten zu identifizieren. Die meisten klassischen Methoden beruhen auf Endpunkt-Tests. Dabei werden Testzellen mit dem Wirkstoffkandidaten versetzt und nach einer definierten Zeit analysiert. Der zeitliche Verlauf der Wirkung – also die Frage, was vor oder nach dem Endpunkt in einem bestimmten Testansatz geschieht – kann mit den klassischen Methoden nur mit großem Aufwand und einer Vielzahl von Testansätzen erfaßt werden. Die Bionas GmbH hat ein Testsystem zur Marktreife entwickelt,

das die Effekte des Zellstoffwechsels und der Signaltransduktion auf das umgebende Zellkulturmedium analysiert. Diese neuartige Technik ist leicht handhabbar und ermöglicht eine nicht-invasive, labelfreie und kontinuierliche Beobachtung des Zellstoffwechsels in Abhängigkeit von Testsubstanzen.

## Kontinuierliche Verlaufserfassung

Das neue Meßgerät Bionas® 2500 für lebende Zellen ermöglicht eine kontinuierliche Verlaufserfassung bei der Untersuchung von Wirkstoffkandidaten. Bionas® 2500 basiert auf

Zell-Silikon-Hybriden – das heißt, lebende Zellen werden auf Siliziumchips kultiviert (Abb. 1) – und erfaßt metabolisch relevante Parameter, wie den Sauerstoffverbrauch von Testzellen, die extrazelluläre Ansäuerungsrate sowie die Zelladhäsion. Der Read-out erfolgt kontinuierlich bis zu mehreren Tagen. Die Technologie ist bei vielen verschiedenen Zelltypen und Zelllinien einschließlich Primär-Zellkulturen anwendbar.

## Toxizitäts-Tests ohne Tierversuche

Mit Bionas® 2500 (Abb. 2) können zellschädigende Wirkstoffkandidaten in Zellkultur identifiziert werden, indem das die Zellen umgebende Medium nach Zugabe der Testsubstanzen untersucht wird. Die Zellen werden durch die eigentliche Messung nicht beeinflusst, da eine Anfärbung der Zellen entfällt. Auch Konzentrationsabhängigkeiten oder Regenerationseffekte können untersucht werden. Außer bei der Wirkstoffentwicklung liegen andere Anwendungsgebiete in der Krebsforschung, der Zellkulturüberwachung sowie bei Toxizitätsprüfungen bei der chemischen Industrie (REACH).

Der Zellstoffwechsel basiert darauf, daß die Zellen Kohlenhydrate wie Glukose aus dem Medium aufnehmen, verstoffwechseln und die dabei entstehenden Abbauprodukte (Lactat und CO<sub>2</sub>) wieder ausscheiden. Lactat und CO<sub>2</sub> liegen im Medium in dissoziierter Form vor und führen zu einer extrazellulären Ansäuerung. Für den Energiestoffwechsel benötigen die Zellen Sauerstoff, den sie aus dem Medium aufnehmen und der von den Mitochondrien zur ATP-Produktion benötigt wird. Ein wichtiger physiologischer Parameter von adhärennten Zellen stellt auch das Anheftungsverhalten dar. Ist die Zelle durch äußere Parameter gestört, so verändert sie ihre Morphologie und ihr Anheftungsverhalten. Auch die Permeabilität der Zellmembran bzw. Membranintegrität kann durch Testsubstanzen verändert und mit Bionas® 2500 analysiert werden.

## Aktivierung des Zellstoffwechsels

Wirkstoffkandidaten können den Stoffwechsel aktivieren oder hemmen. Eine Aktivierung ist mit einem erhöhten Glukoseumsatz und dem Verbrauch von Sauerstoff und mit einer vermehrten Ausscheidung saurer Abbauprodukte verbunden. Reaktionen in der Zelle, wie die Signaltransduktionen und die Stimulationen membrangebundener Rezeptoren (G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, Tyrosinkinase-gebundene Rezeptoren oder Ionenkanäle), erfordern Energie. Die Schritte der zugrundeliegenden Reaktionskaskaden sind direkt oder indirekt ATP-abhängig. Eine

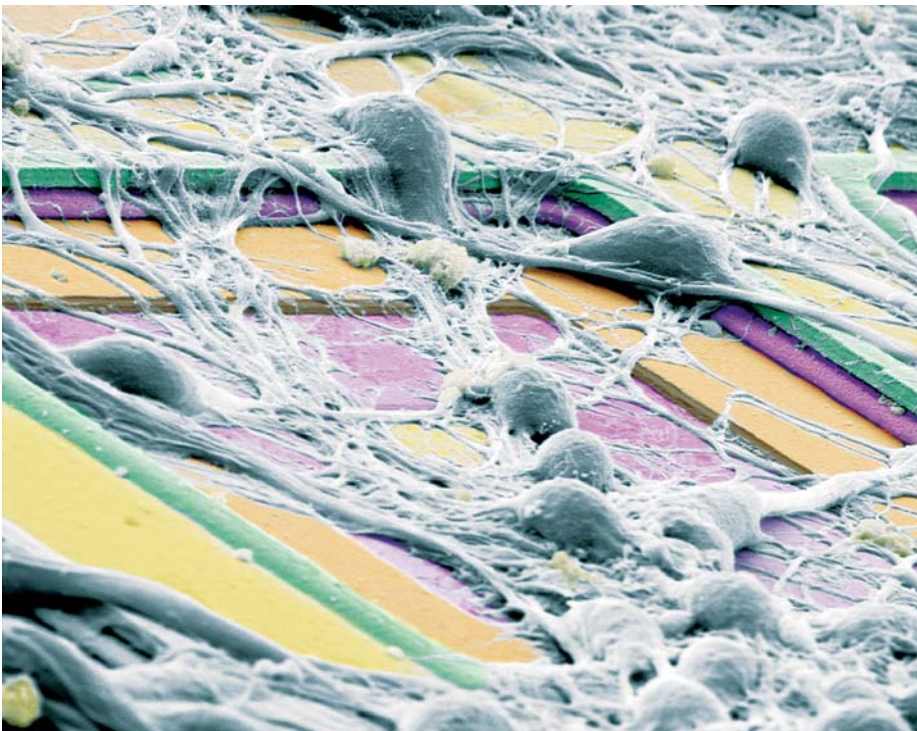


Bild 1: Neuronen auf dem Bionas® metabolic chip SC1000



Abb. 2: Bionas® 2500 analyzing system

Aktivierung des Stoffwechsels kann mit Bionas® 2500 durch die Messung der Steigerung der Ansäuerungsrate des Mediums und der Sauerstoff-Verarmung des Mediums nachgewiesen werden. Die Produktion von cAMP sowie Phosphorylierungen führen zu einer vergleichsweise geringen Ansäuerungsrate und Sauerstoffverbrauch.

### Hemmung des Zellstoffwechsels

Eine Inhibierung des Stoffwechsels geht mit einer Reduzierung der Ausscheidung von sauren Abbauprodukten und meistens mit einer Verminderung des Sauerstoffverbrauchs einher. Zudem ist eine Inhibierung bei adhärennten Zellen meistens mit einer Änderung des Anheftungsverhaltens verbunden. Lösen sich die adhärennten Zellen von der Oberfläche ab, so ist dies ein Indiz für ein Absterben der Zellen.

### Bionas® metabolic chip SC1000

Die Silizium-Sensorchips verfügen über Sensoren zur Messung von pH-Änderungen, zur Sauerstoffmessung und zur Adhäsionsbeobachtung (Abb. 3). Als pH-Sensoren werden ionensensitive Feldeffekt-Transistoren (ISFET) verwendet. Insgesamt befinden

sich fünf ISFETs auf einem Sensorchip. ISFETs bestehen aus amphoteren Materialien wie Siliziumnitrit oder Aluminiumoxid. Je nach pH-Wert lagern sich unterschiedliche Ladungskonzentrationen am amphoteren Gate-Isolator an und verschieben über den Feldeffekt die Schwellspannung des Transistors<sup>1-4</sup>. Zur Messung der Sauerstoff-Konzentrationsänderung im Medium dienen modifizierte Clark-Sensoren. Gemessen wird der Reduktionsstrom, der entsteht, wenn molekularer Sauerstoff auf der Clark-Elektrode durch den Elektronenfluß zusammen mit H<sub>2</sub>O zu OH<sup>-</sup>-Ionen reduziert wird.

Die Adhäsionsbeobachtung erfolgt über einen IDEs-Sensor, der aus interdigitalen Pd-Elektroden besteht. Zwischen beiden Elektroden liegt ein Wechselstrom an. Durch den Bewuchs der Elektroden mit Zellen oder durch die Ausbreitung der Zellen auf dem Sensor wird der Wechselstromfluß zwischen den Elektroden eingeschränkt. Als Meßgröße wird hierbei die Kapazität detektiert<sup>5-6</sup>.

Die Silizium-Sensorchips sind auf einer 40-Pin-Standard-Chipgrundplatte kontaktiert und mit einem biokompatiblen schwarzem Kunststoff verkapselt. Die Verkapselung bildet auf der Mitte der Chipoberfläche eine trogförmige Aussparung, in der sich die unbeschichtete Sensoroberfläche

befindet. Die Zellen werden direkt auf der Siliziumoberfläche im Trog ausgesät. Eine Beschichtung der Siliziumoberflächen mit Adhäsionsvermittlern wie Poly-L-Lysin, Collagen, Laminin etc. ist möglich, ohne daß die Funktion der Sensoren beeinflusst wird.

### Bionas® 2500 analyzing system

Zur Analyse des Zellstoffwechsels werden die mit Zellen besiedelten Sensorchips in das Bionas-System eingelegt. Es können sechs Sensorchips parallel ausgelesen werden. Das Gerät verfügt über eine automatische Fluidik-Einheit, welche die Zellen in regelmäßigen, programmierbaren Abständen mit frischem Medium oder Medium mit Testsubstanz versorgt. Die eigentliche Meßkammer hat ein Volumen von 6 µl und ermöglicht daher eine sehr sensitive Detektion von extrazellulären Änderungen. Der Meßbetrieb erfolgt im sogenannten Stop & Go-Modus.

Die Messungen der Ansäuerungsrate und des Sauerstoffverbrauches finden während der Stop-Phase des Pumpzyklus statt (Bild 4). Während der Go-Phase (mindestens 3 min bei einer Flußrate von 56 µl/min) wird das alte Medium± Testsubstanz gegen frisches Medium± Testsubstanz ausgetauscht. Die Raten der Ansäuerung und des Sauerstoffverbrauchs werden aus den Steigungen der Stop-Phasen ermittelt. Die Messung der Zelladhäsion ist weitgehend strömungsunabhängig und kann daher durchgehend erfolgen.

Das Bionas® 2500 analyzing system ist mit einer Steuer- und Auswertungssoftware ausgestattet, die die direkte Ansteuerung des Systems und des Autosamplers ermöglicht und die erfaßten Daten online visualisiert. Der Autosampler ermöglicht ein automatisiertes und unbeaufsichtigtes Abarbeiten der Meß-Sequenz mit langer walk-away-Zeit. Der Vorteil der online-Beobachtung des zel-

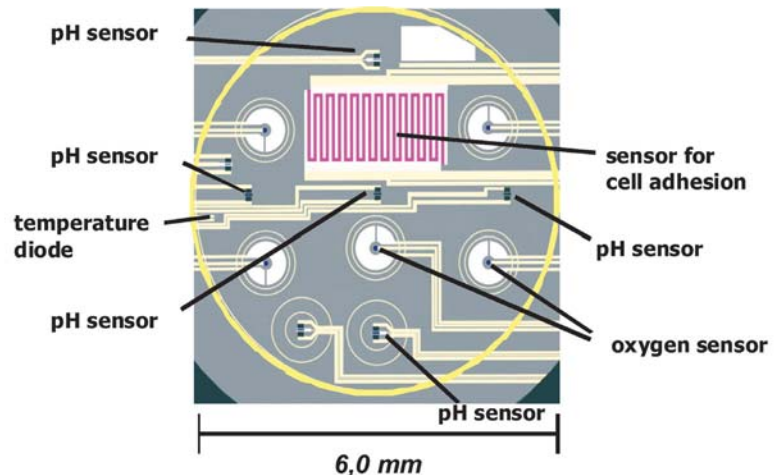


Abb. 3: Silizium-Sensorchip mit Sensoren zur Messung von pH-Änderungen, zur Sauerstoffmessung und zur Adhäsionsbeobachtung

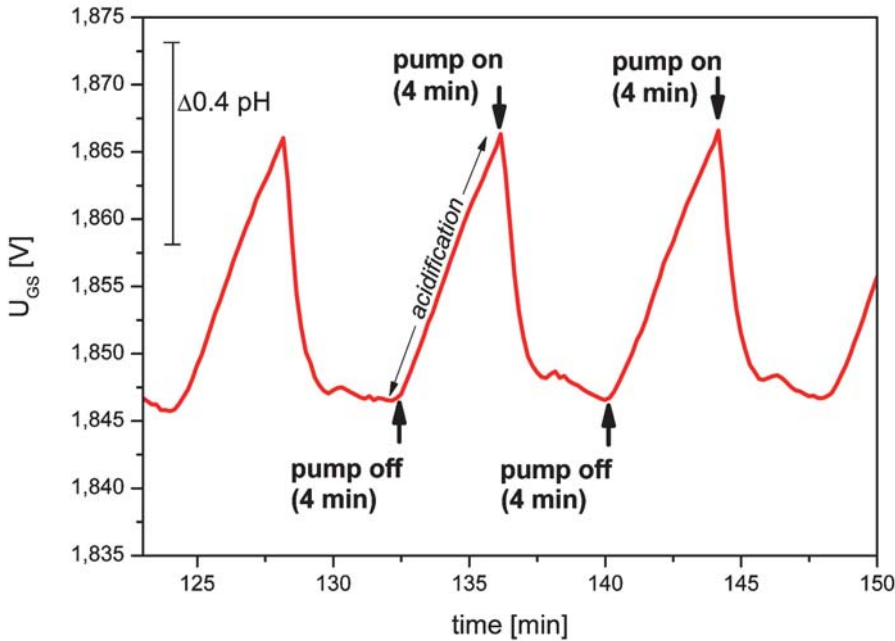


Abb. 4: Die Ansäuerungsaktivität wird ebenso wie der Sauerstoffverbrauch (nicht gezeigt) während der Stop-Phase des Pumpzyklus gemessen.

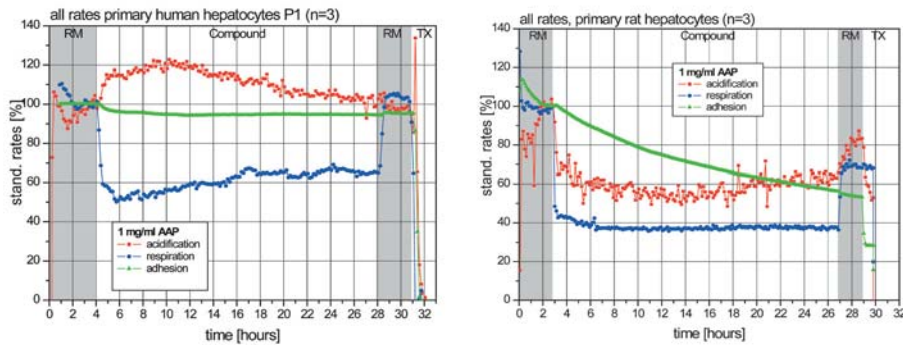


Abb. 5: Primäre Hepatozyten aus Mensch (links) und Ratte (rechts) werden mit 1 mg/ml Paracetamol (Compound) inkubiert. Dargestellt sind die Ansäuerungsrate (rot), Atmungsrate (blau) und Adhäsion (grün) der primären Hepatozyten. RM (Running Medium, Medium ohne Testsubstanz), Stand. Rates (standardisierte Raten), TX (0,2% Triton X-100 in RM).

lulären Metabolismus wird beim Vergleich von primären humanen Hepatozyten und primären Rattenhepatozyten deutlich. Beide Testzelllinien wurden in speziellem Medium ohne Carbonatpuffer auf kollagenbeschichteten Sensorchips kultiviert. Als Testsubstanz diente Paracetamol (Acetaminophen (AAP): IC<sub>50</sub> 19 mM, [7]), welches für seine Lebertoxizität bekannt ist. Paracetamol gehört zu der Gruppe der nichtsteroidalen antiinflammatorischen und antiphlogistischen Mittel. Der Wirkungsmechanismus erfolgt über die Hemmung der Cyclooxygenase (COX). In Abbildung 5 ist zunächst eine Einlaufphase mit Medium ohne Paracetamol gezeigt (Running medium, RM). Nach etwa drei Stunden (3h) erfolgte die Zugabe von 1 mg/ml Paracetamol (compound). Dargestellt sind die Ansäuerungsrate (rot), Atmungsrate (blau) und Adhäsion (grün) der primären Hepatozyten aus Ratte und Mensch. Während bei den humanen Hepatozyten nur die Atmungsaktivität reduziert

wird, zeigen die Rattenhepatozyten deutlich stärkere Effekte. Nicht nur die Atmungsrate ist schneller und stärker reduziert. Auch die Ansäuerungsrate ist bei den Rattenhepatozyten schon während der ersten 30 min Exposition mit Paracetamol deutlich inhibiert. Außerdem nimmt die Adhäsion der Zellen auf der Chipoberfläche langsam, aber kontinuierlich ab.

### Reaktionen primärer Hepatozyten aus Ratte und Mensch auf Paracetamol

Durch die kontinuierliche Verlaufserfassung wird die sequentielle Beeinflussung des Zellstoffwechsels deutlich, die mit den Methoden der Endpunkt-Analyse nicht beobachtet werden kann. Zur Untersuchung der Regeneration wurde statt Medium + Paracetamol nur Medium über die Zellen geleitet (ab ca. 27 h, graues Feld). Während

die humanen Hepatozyten vollständige Regeneration zeigen, erreicht die Ansäuerungsrate der Rattenzellen nur 85% und die Sauerstoffrate nur 70% der ursprünglichen Aktivität. Die Adhäsion zeigt keinerlei Regenerierung, was auf eine dauerhafte Schädigung der Zellen hinweist. Während die humanen Zellen noch für weitere Tests verwendet werden könnten, haben die Rattenhepatozyten durch Paracetamol irreversibel Schaden genommen.

In der letzten Phase der Messung wurden die Zellen in Medium mit 0,2% Triton X-100 abgetötet. Die Behandlung mit Triton X-100 ist ein Test für die Sensoren, der zeigt, daß die aufgenommenen Daten valide sind und keine Artefakte darstellen.

### Fazit

Bionas *in vitro*-Silizium-Sensorchip-Technologie ist leicht handhabbar und ermöglicht eine nicht-invasive, labelfreie und kontinuierliche Beobachtung des Zellstoffwechsels in Abhängigkeit von Testsubstanzen. Das System liefert mehr Informationen als herkömmliche Endpunkttests und wird nicht durch Marker beeinflusst. So konnten durch die kontinuierliche Verlaufserfassung bei primären Hepatozyten von Ratte und Mensch deutliche Unterschiede in der zeitlichen Beeinflussung des Zellstoffwechsels in Reaktion auf Paracetamol gezeigt werden. Neben der Testung von adhären Zellen oder Primärzellen mit verschiedenen Testsubstanzen und/oder verschiedenen Konzentrationen ist auch der Vergleich von Zellen verschiedener Spender möglich.

### Literatur

- [1] Baumann, W., Lehmann, M., Bitzenhofer, M., Schwinde, A., Brischwein, M., Ehret, R. und Wolf, B., *Sensors and Actuators B* 55 (1999), 77-89.
- [2] Lehmann, M., Baumann, W., Brischwein, M., Ehret, R., Kraus, M., Schwinde, A., Bitzenhofer, M., Freund, I., Wolf, B., *Biosensors & Bioelectronics* 15 (3-4) (2000), 117-124.
- [3] Lehmann, M., Baumann, W., Brischwein, M., Gahle, H.J., Freund, I., Ehret, R., Drechsler, S., Palzer, H., Kleintges, M., Sieben, U., Wolf, B., *Biosensors & Bioelectronics*, 16/3 (2001), 195-203.
- [4] Ehret, R., Baumann, W., Brischwein, M., Lehmann, M., Henning, T., Freund, I., Drechsler, S., Friedrich, U., Hubert, M.-L., Motrescu, E., Kob, A., Palzer, H., Wolf, B., *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 369 (2001), 30-35.
- [5] Ehret, R., Baumann, W., Brischwein, M., Schwinde, A., Stegbauer, K., Wolf, B., *Biosensors & Bioelectronics* 12 (1) (1997), 29-41.
- [6] Ehret, R., Baumann, W., Brischwein, M., Schwinde, A., Wolf, B., *Medical & Biological Engineering & Computing* 36 (1998), 365-370.
- [7] Clemedson, C. et al. *ATLA* 24 (1996), 273-311.

### Korrespondenzadresse

Dr. Michael Schulze  
 Bionas GmbH  
 Friedrich-Barnewitz-Straße 3  
 D-18119 Rostock-Warnemünde  
 Tel.: +49-(0)381-5196-241  
 Fax: +49-(0)381-5196-246  
 eMail: michael.schulze@bionas.de  
 www.bionas.de