

Wirkungsbezogene Analytik in der Lebensmittelüberwachung - Gentoxizität

Dr. Georg Reifferscheid
&
Dr. Sebastian Buchinger

Bundesanstalt für Gewässerkunde
Koblenz

Agenda

- Biotestverfahren vor dem Hintergrund der BfG-Aufgaben
- geeignete Gentoxizitäts-Prüfverfahren für die Wirkungsbezogene Analytik
- Die Rolle des Metabolismus
- Testkombinationen
- Gentoxizität und Mutagenität in der Wirkungsbezogenen Analytik der BfG

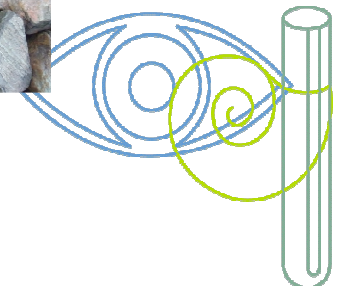
Ökotoxikologie der BfG

Aufklärung und Bewertung stofflicher Ursachen ökotoxikologischer
Wirkungen

- in Schwebstoffen, Sedimenten, Baggergut, Wasser

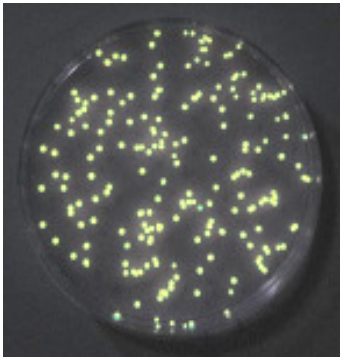


- Wasserbaumaterialien (Industrieschlacken, Kunststoffe)



... im Rahmen von Aufträgen des BMVBS und des BMU

Biologische Testverfahren zur summarischen Erfassung von Wirkungen



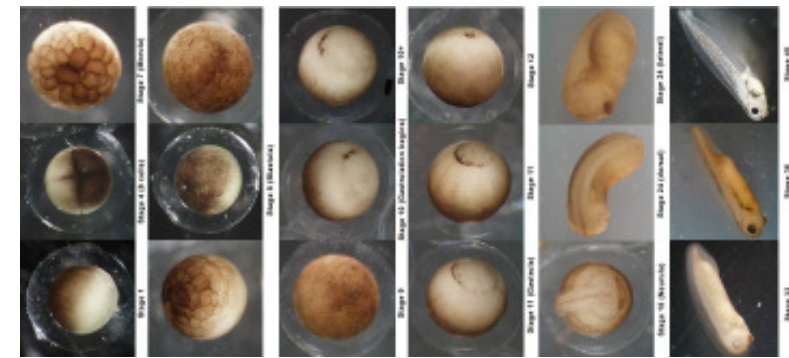
Bakterien
(Leuchtkraft)



Grünalgen
(Wachstum)



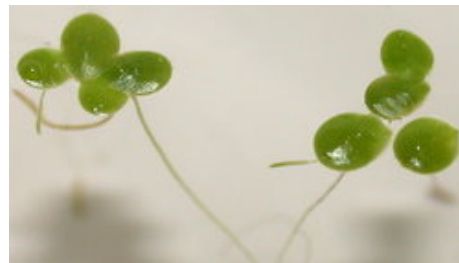
Kleinkrebse
(Mortalität,
Bewegung)



Fischeier
(Mortalität, Herzschlag, ...)



Oligochaeten
(Wachstum)



Lemnaceen
(Wachstum)

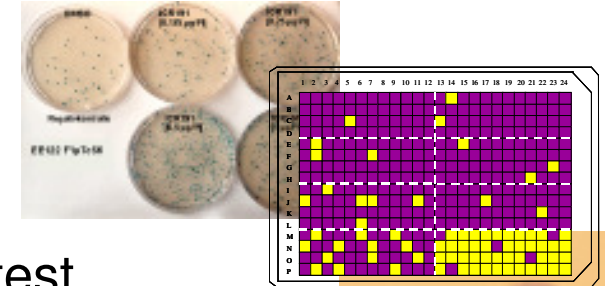


höhere Pflanzen
(Wachstum)

Biologische Testverfahren zur Erfassung mechanistischer Toxizität

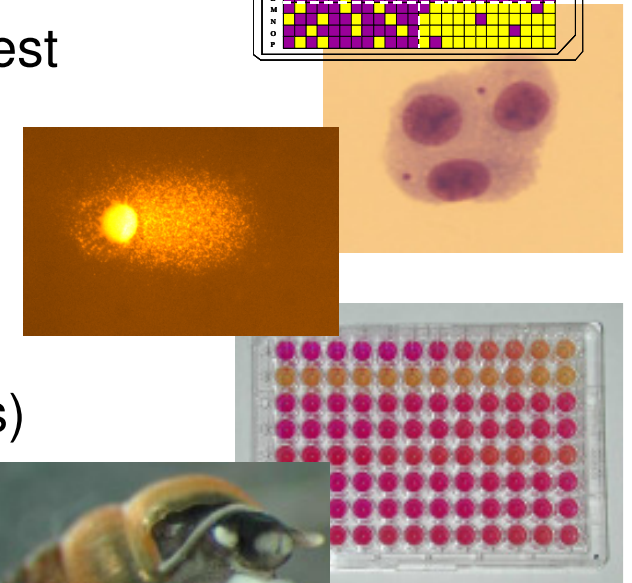
Gentoxizität und Mutagenität

umu-Test, Ames-Test, Comet-Assay, Mikrokerntest



Hormonelle Wirkungen

YES/YAS, E-Screen, MVLN, (Reproduktionstests)



Immuntoxizität

Phagozytose-Tests, oxidative Burst



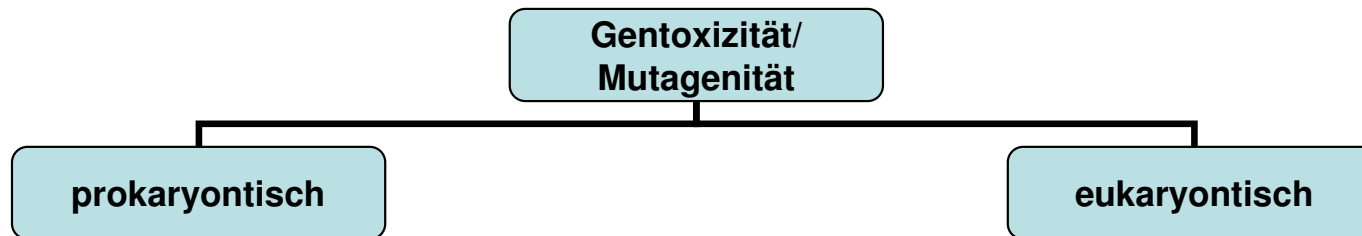
Gentoxizität, Mutagenität, Karzinogenität

DNA-Schaden → **Mutation** → → → **Krebs**

- vielfältige Beeinflussung an verschiedenen Stellen
 - Reparatur
 - Metabolismus
 - Kokarzinogene
 - Zellproliferation
 - genetische Disposition
 - Infektionen
 - Immunsystem

- Testverfahren und damit verbundene Aussagen zu
 - Messung primärer DNA-Schäden / sekundärer DNA-Schäden / Bakteriengenom / Eukaryontengenom / gentoxische Karzinogene / nichtgentoxische Karzinogene / Testkombination im Zusammenhang mit Fragestellung (Fit for Purpose-Ansatz)
- Eignung zum Einsatz in der Wirkungsbezogenen Analytik
 - Benötigte Menge und Konzentration des Testguts / Zeit / Kosten
 - Sensitivität des Testverfahrens
- Interpretation der Ergebnisse
 - Natürliche Gentoxine vs. Additive / Rückstände / durch Zubereitung Entstandene
 - *in vitro*- vs. *in vivo*-Daten
 - Mischungstoxizität
 - Qualitative oder quantitative Bewertung (Risk Assessment)

Prinzipiell geeignete Testverfahren (*in vitro*)



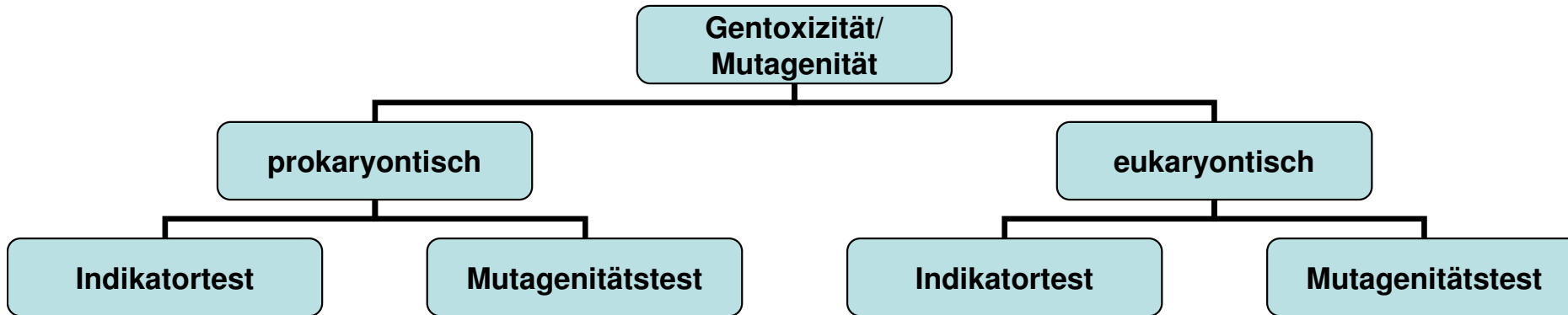
Folie 8

GR1

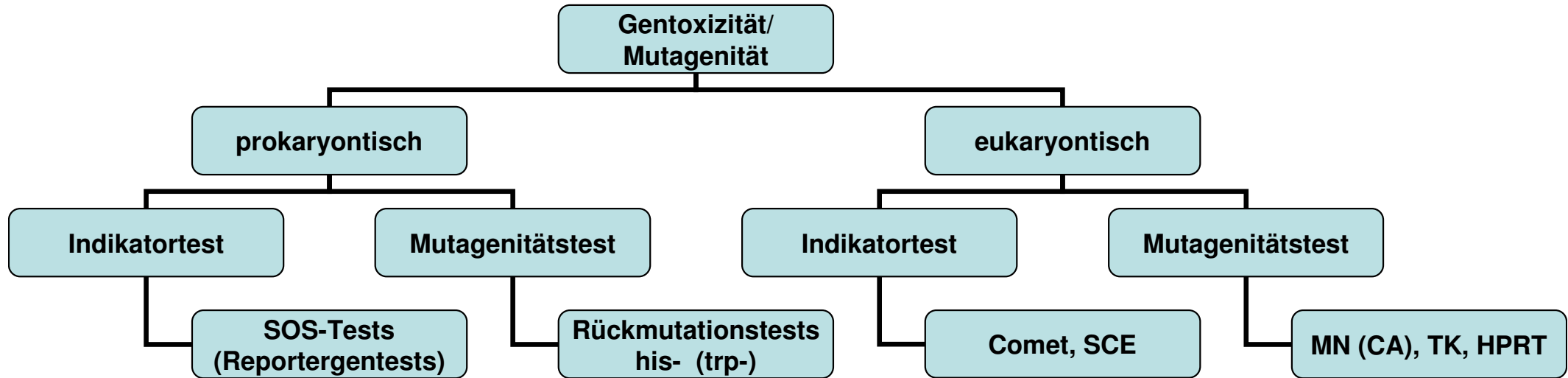
Balb/c-test berücksichtigen !!!!!

GR; 03.08.2012

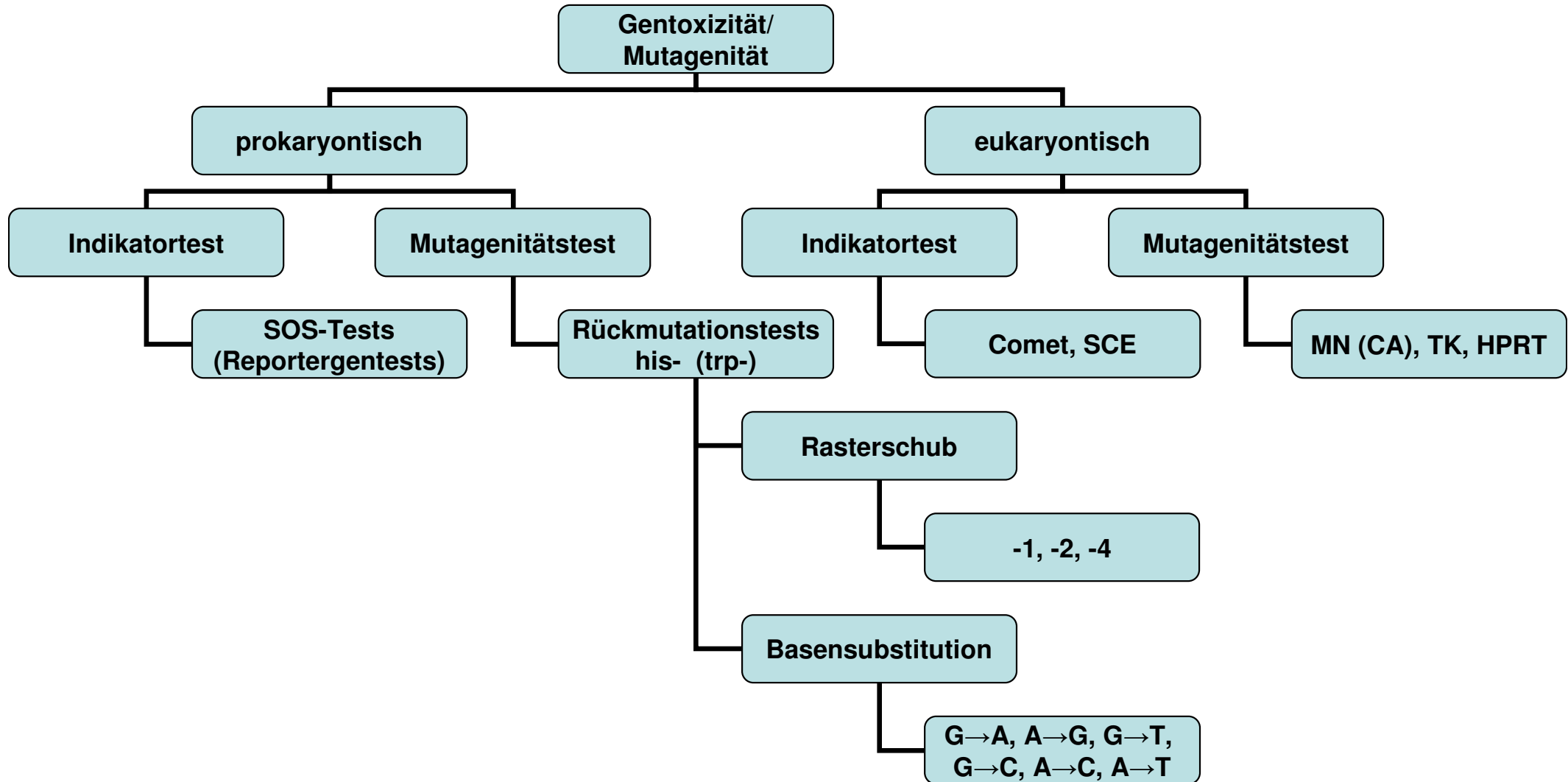
Prinzipiell geeignete Testverfahren (*in vitro*)



Prinzipiell geeignete Testverfahren (*in vitro*)

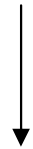


Prinzipiell geeignete Testverfahren (*in vitro*)

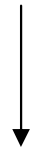


Indikator vs. Mutagenitätstestverfahren (*in vitro*)

Indikatorrestverfahren



primäre DNA-Schäden
prinzipiell reversibel



Detektion mittels
Geninduktion
(*umu*-Test, SOS-Chromotest)

Cometen-Bildung
(Comet-Assay)

Mutagenitätstestverfahren

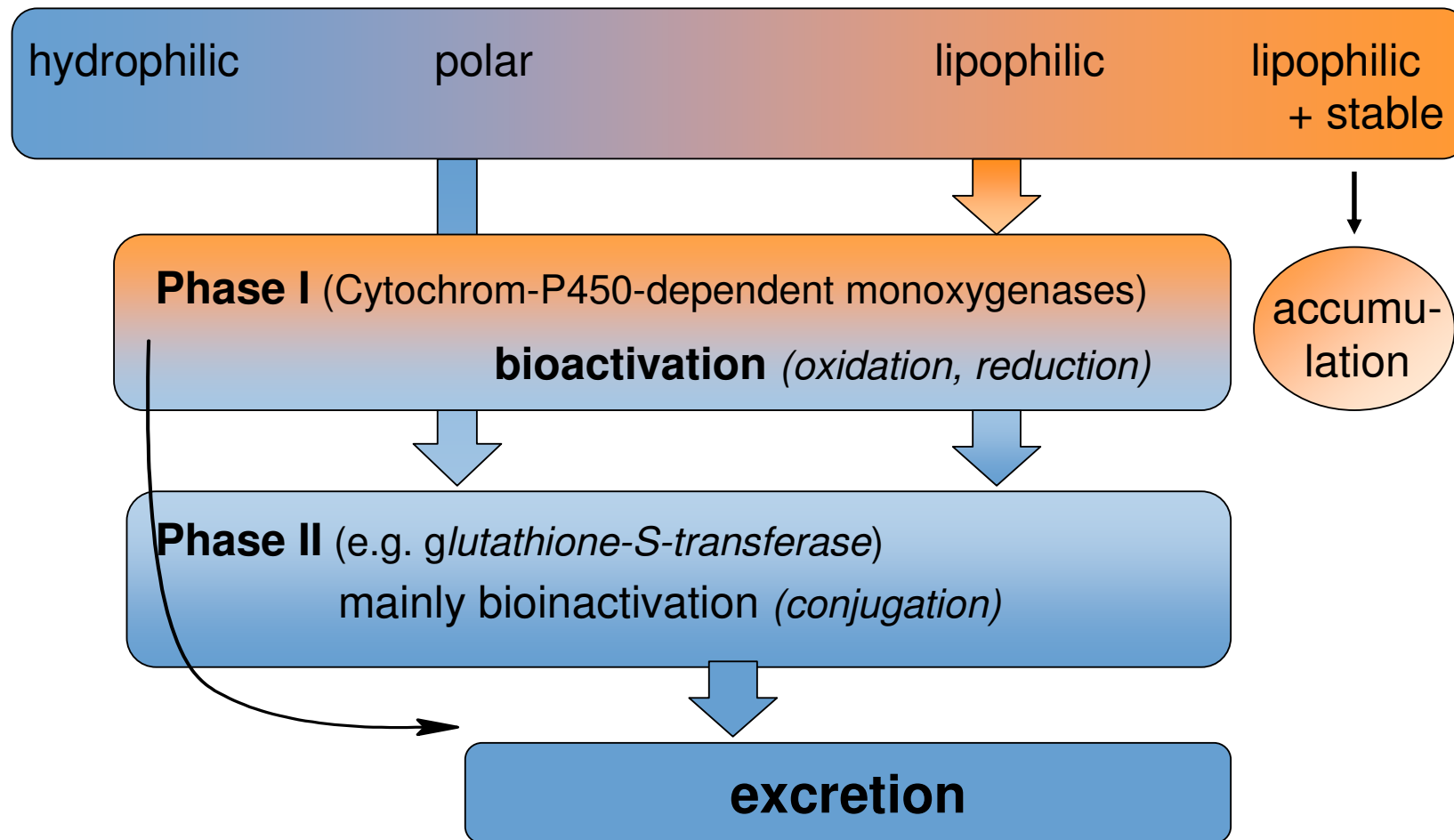


sekundäre DNA-Schäden
irreversibel

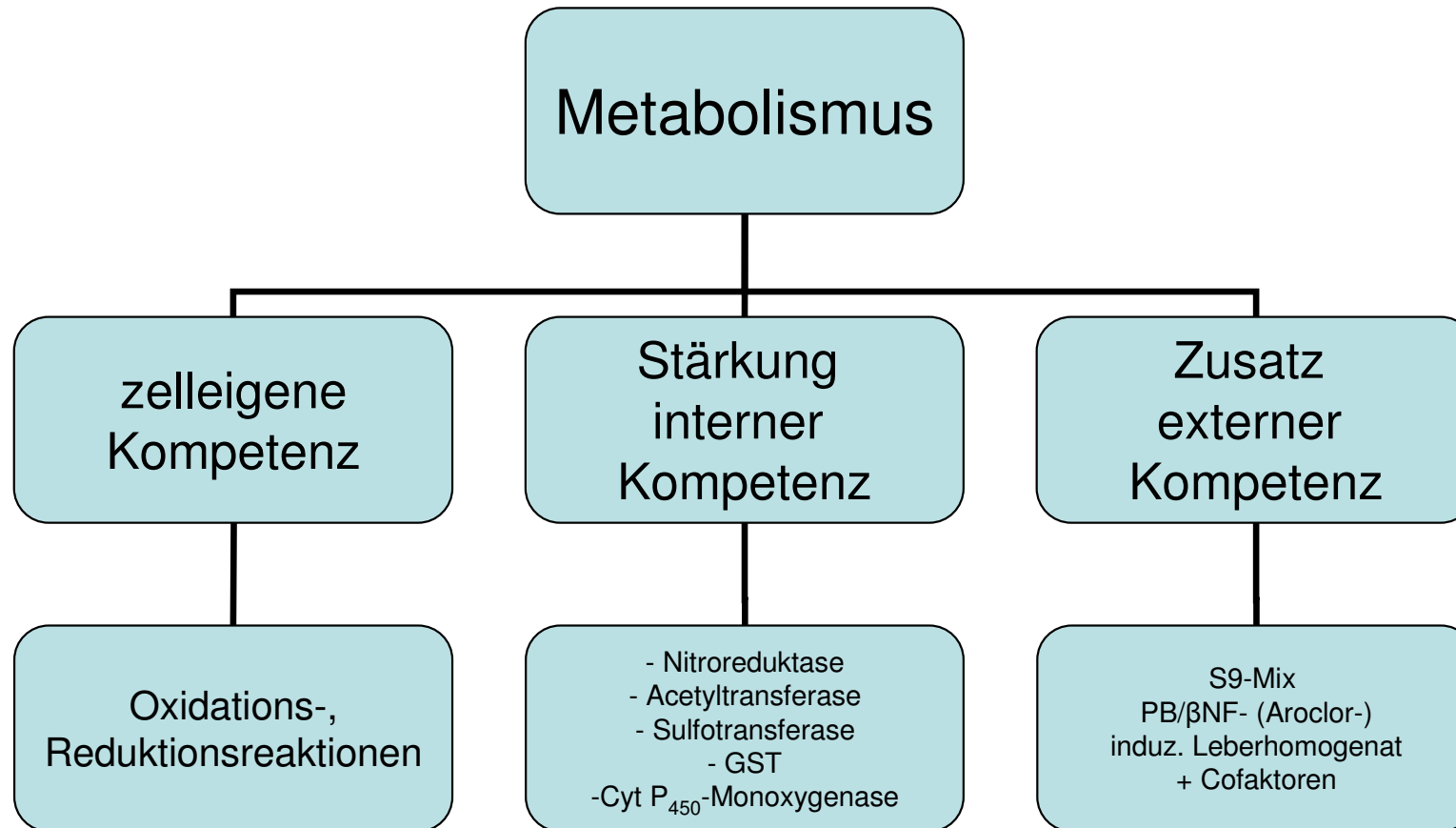


Detektion mittels
Rück- oder Vorwärtsmutation
(Ames-Test, HPRT-Test)

Chromosomenaberration
(CA-Test, MN-Test)



Metabolismus in bakteriellen Testverfahren



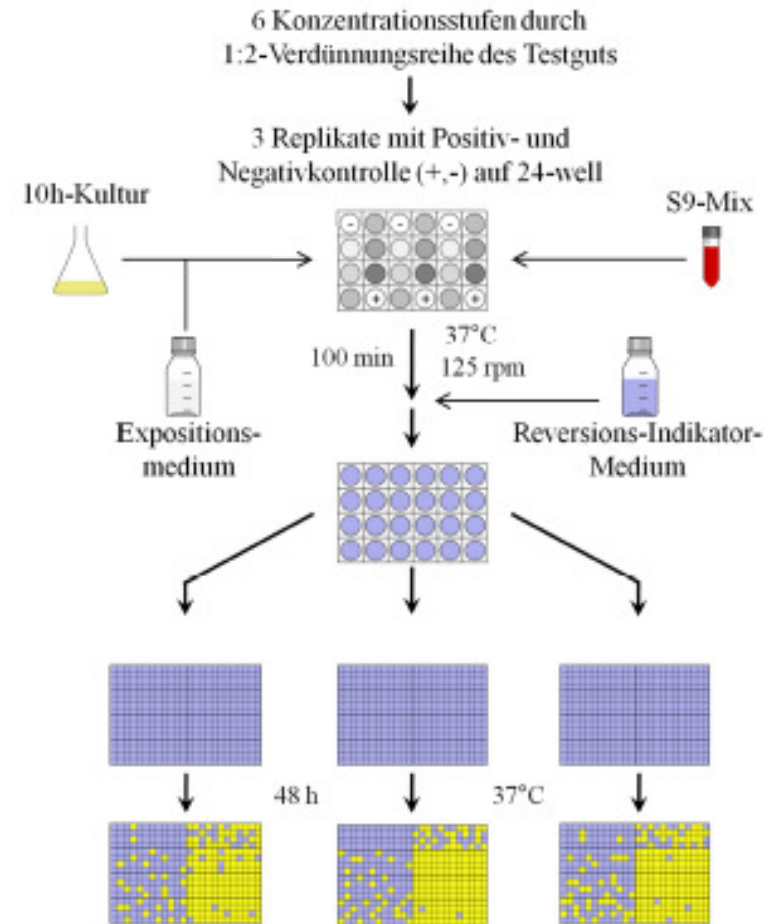
Bei Zusatz externer Kompetenz führt i.d.R. zu einer
Überbewertung der metabolischen Aktivierung (worst case)

klassisch



ISO 16240:2005

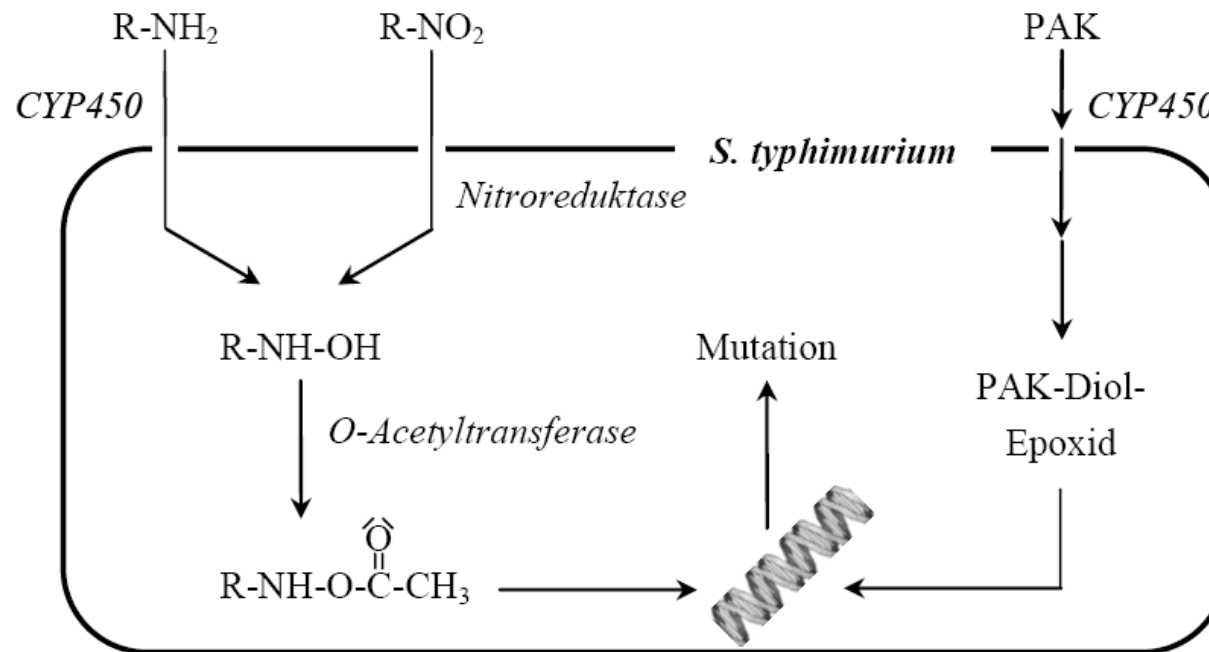
Fluktuationstest



ISO 11350:2012

Reifferscheid et al. 2012, EMM 53,3,185-197
(enthält Vorschlag für eine statistische Betrachtung
von Daten aus Fluktuationstests)

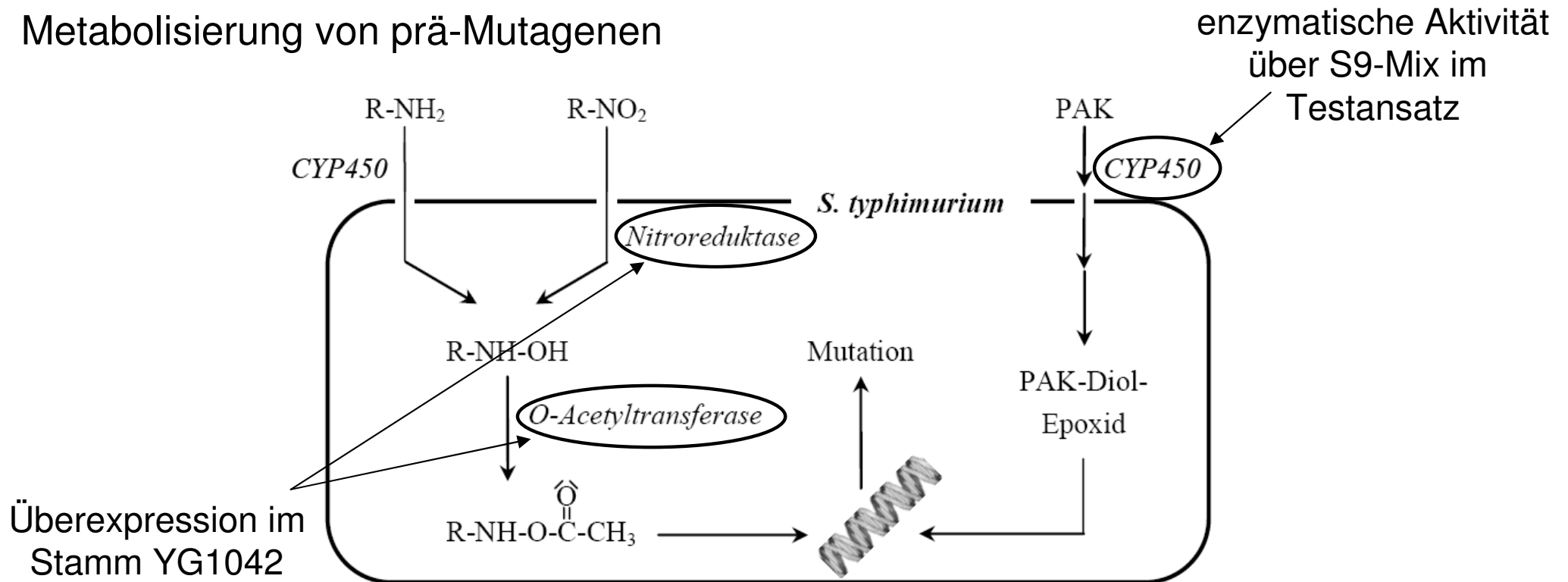
Ames-Teststämme und metabolische Kompetenz



genetische Eigenschaften	frs (Rasterschub)	bps (Basensubstitution)
Standard	TA98	TA100
NR-	TA98NR	TA100NR
NR+	YG1021	YG1026
oAT-	TA98/1,8-DNP6	TA100/1,8DNP
oAT+	YG1024	YG1029
NR+/oAT+	YG1041	YG1042

Metabolisch aktive Stämme zur Erfassung mutagener Potentiale

Metabolisierung von prä-Mutagenen



Metabolisch aktive Teststämme geben Hinweise auf Substanzklassen

Folie 17

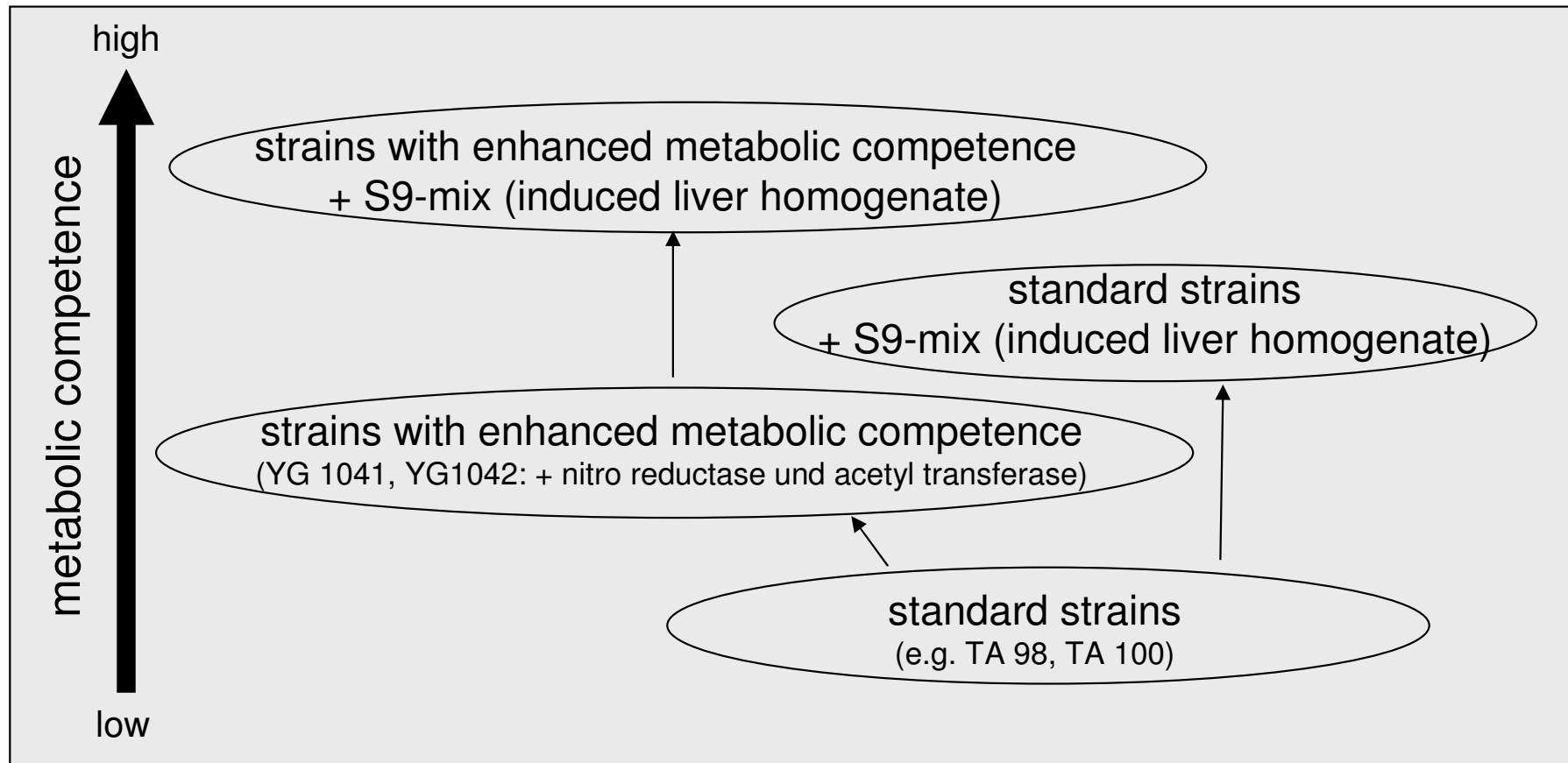
sbu1

Dieser Ansatz wurde bei der "Spittelwasserpublikation" angewendet.

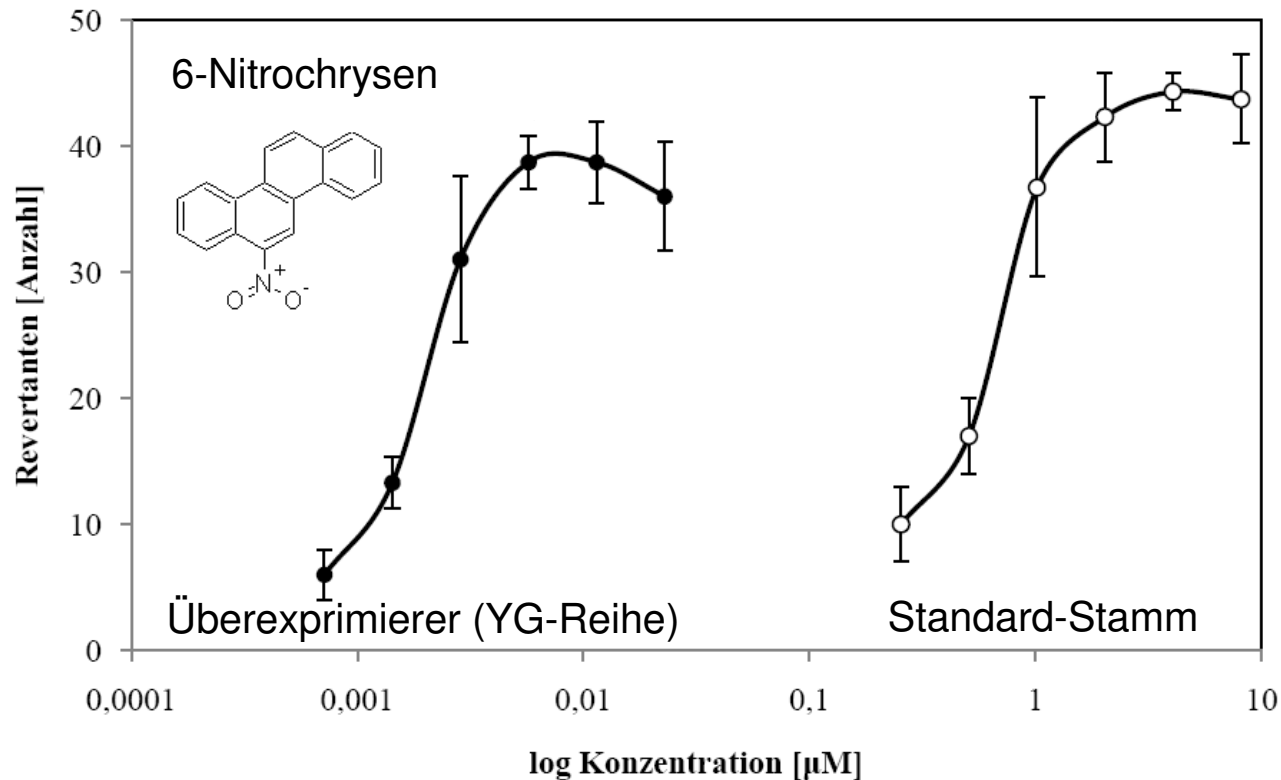
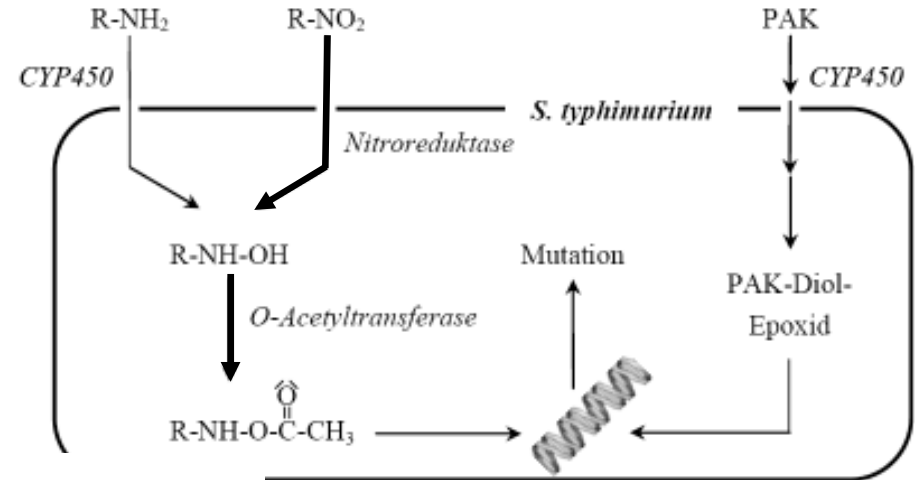
G. Reifferscheid, S. Buchinger, Z. Cao, and E. Claus, Identification of mutagens in freshwater sediments by the Ames-fluctuation assay using nitroreductase and acetyltransferase overproducing test strains. Environ Mol Mutagen (2011) in press

Buchinger; 12.05.2011

Ames Fluktuationstest und metabolische Kompetenz

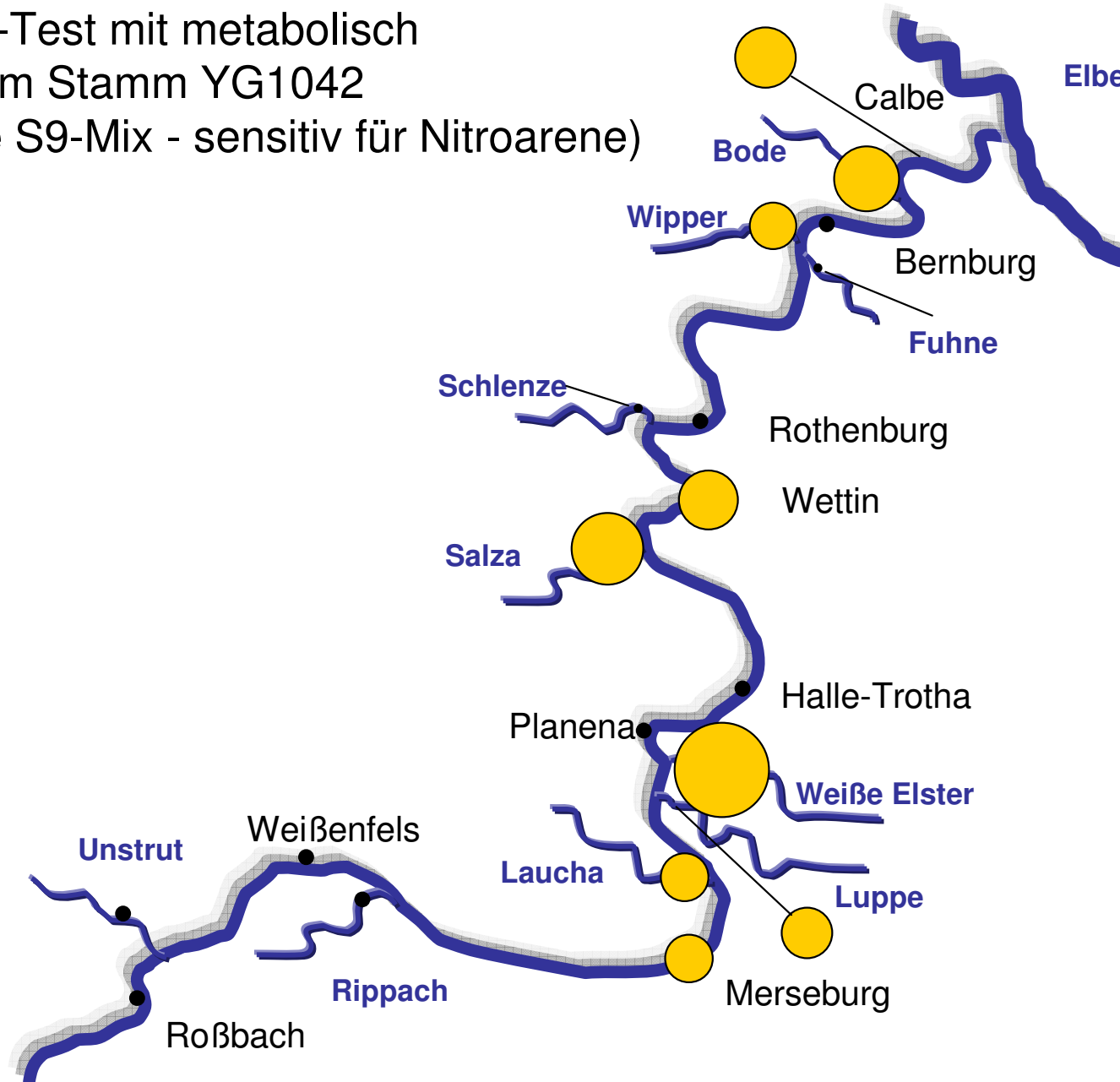


Metabolisch aktive Teststämme zur Erfassung mutagener Potentiale



Mutagene Potentiale von Sedimentextrakten

- Ames-Test mit metabolisch aktivem Stamm YG1042
(ohne S9-Mix - sensitiv für Nitroarene)



Folie 20

sbu3

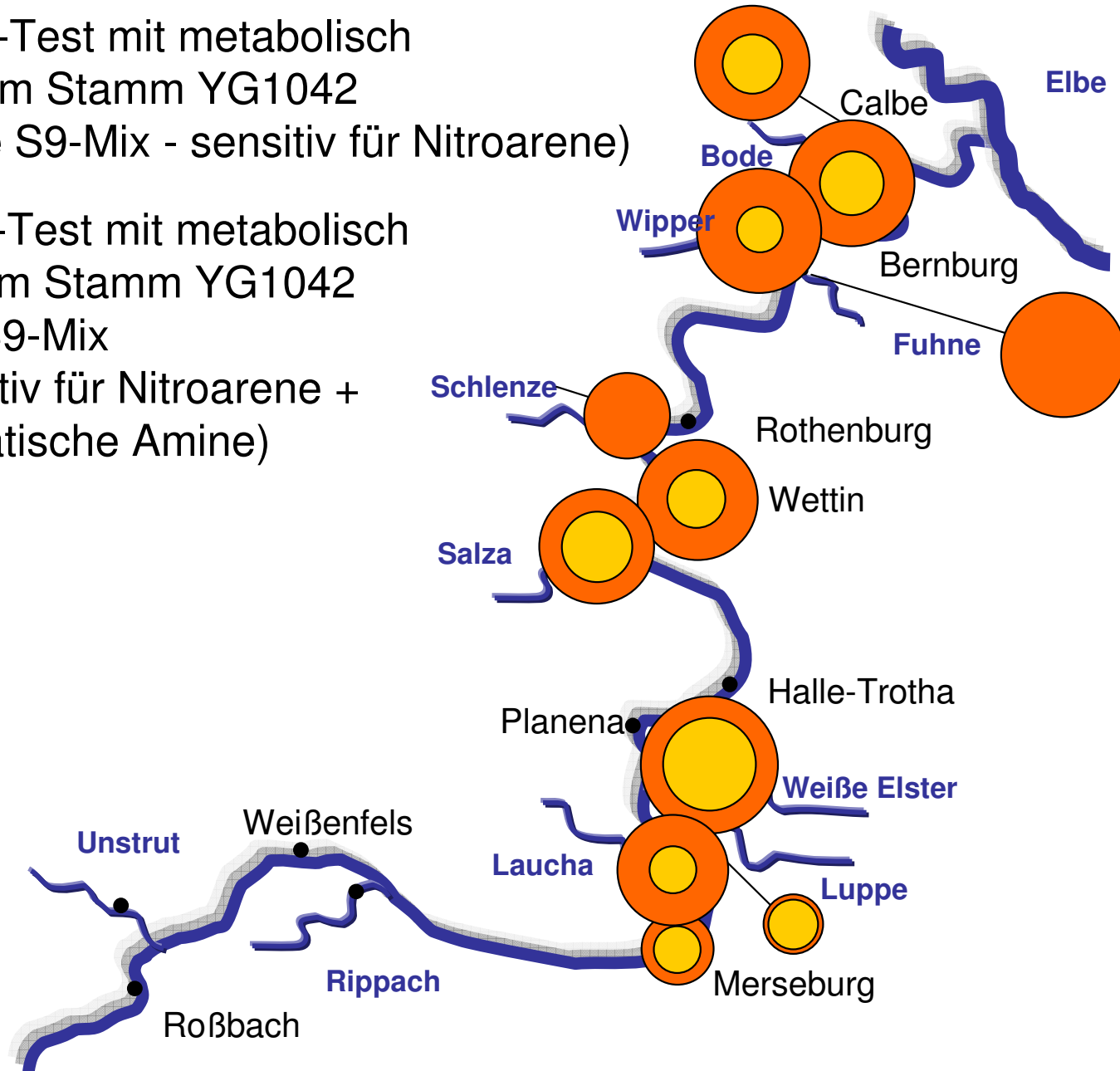
Punkte markieren Probenahmestellen.

Fläche der Kreise ist proportional zu mutagenem Effekt (konzentrationsnormierte Anzahl von Revertanten)

Buchinger; 11.05.2011

Mutagene Potentiale von Sedimentextrakten

- Ames-Test mit metabolisch aktivem Stamm YG1042 (ohne S9-Mix - sensitiv für Nitroarene)
- Ames-Test mit metabolisch aktivem Stamm YG1042 (mit S9-Mix - sensitiv für Nitroarene + aromatische Amine)



[International round-robin study on the Ames fluctuation test](#) Reifferscheid, G.; Maes, H. M.; Allner, B.; et al.
Source: ENVIRONMENTAL AND MOLECULAR MUTAGENESIS Volume: **53** Issue: **3** Pages: **185-197** Published: **APR 2012**

[Estrogenic effects along the river Saale](#) Buchinger, Sebastian; Heining, Peter; Schlüsener, Michael; Reifferscheid, Georg; Claus, Evelyn Source: ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY AND CHEMISTRY, accepted with minor revisions **SEP 2012**

[Effect directed analysis and mixture effects of estrogenic compounds in a sediment of the river Elbe](#) Schmitt, Sebastian; Reifferscheid, Georg; Claus, Evelyn; et al. Source: ENVIRONMENTAL SCIENCE AND POLLUTION RESEARCH Volume: **19** Issue: **8** Pages: **3350-3361** Published: **SEP 2012**

[Roles of human sulfotransferases in genotoxicity of carcinogens using genetically engineered umu test strains](#)
Author(s): Oda, Yoshimitsu; Zhang, Yu; Buchinger, Sebastian; et al. Source: ENVIRONMENTAL AND MOLECULAR MUTAGENESIS Volume: **53** Issue: **2** Pages: **152-164** Published: **MAR 2012**

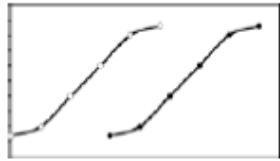
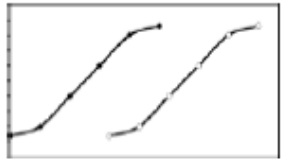
[Polar Compounds Dominate in Vitro Effects of Sediment Extracts](#) Luebcke-von Varel, Urte; Machala, Miroslav; Ciganek, Miroslav; et al. Source: ENVIRONMENTAL SCIENCE & TECHNOLOGY Volume: **45** Issue: **6** Pages: **2384-2390** DOI: **10.1021/es103381y** Published: **MAR 15 2011**

[Identification of Mutagens in Freshwater Sediments by the Ames-Fluctuation Assay Using Nitroreductase and Acetyltransferase Overproducing Test Strains](#) Reifferscheid, Georg; Buchinger, Sebastian; Cao, Zhi; et al.
Source: ENVIRONMENTAL AND MOLECULAR MUTAGENESIS Volume: **52** Issue: **5** Pages: **397-408** Published: **JUN 2011**

[Cell-Based Genotoxicity Testing Genetically Modified and Genetically Engineered Bacteria in Environmental Genotoxicology](#) Author(s): Reifferscheid, Georg; Buchinger, Sebastian
Book Editor(s): Belkin, S; Gu, MB Source: WHOLE CELL SENSING SYSTEMS II: APPLICATIONS Book Series: **Advances in Biochemical Engineering-Biotechnology** Volume: **118** Pages: **85-111** Published: **2010**

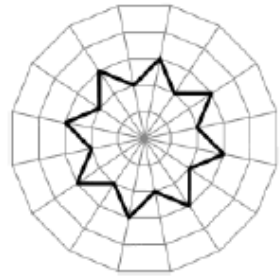
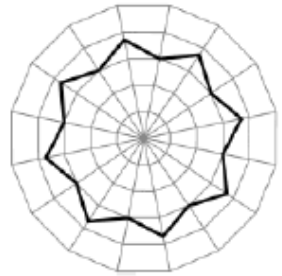
[Hazard characterization and identification of a former ammunition site using microarrays, bioassays, and chemical analysis](#)
Author(s): Eisentraeger, Adolf; Reifferscheid, Georg; Dardenne, Freddy; et al. Source: ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY AND CHEMISTRY Volume: **26** Issue: **4** Pages: **634-646** Published: **APR 2007**

Datenreduzierung



ROHDATEN

$$2 \cdot 16 \cdot 6 = 192 \text{ Dp}$$



CDR-PROFILE

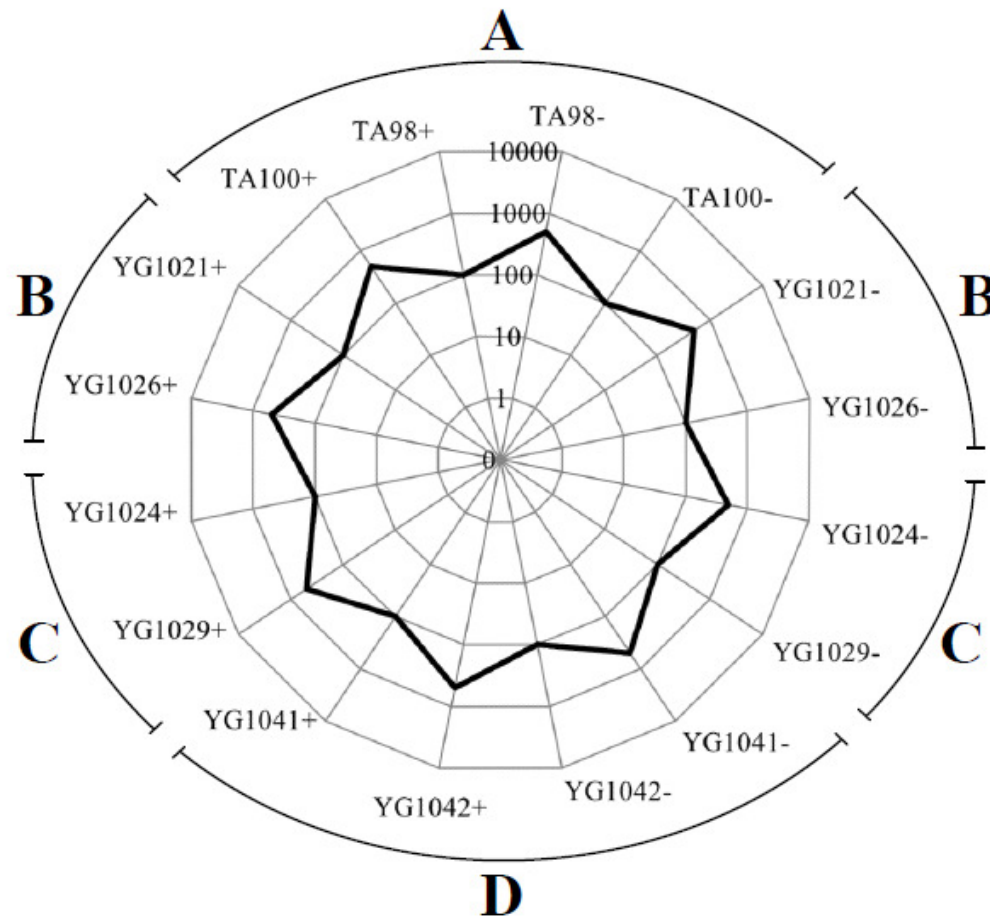
$$2 \cdot 16 = 32 \text{ Dp}$$

2 Stoffe
 16 Bedingungen
 6 Kurvenpunkte

$$CDR = \frac{\sum_{n=1}^i \frac{Rev_i}{c_i}}{n}$$

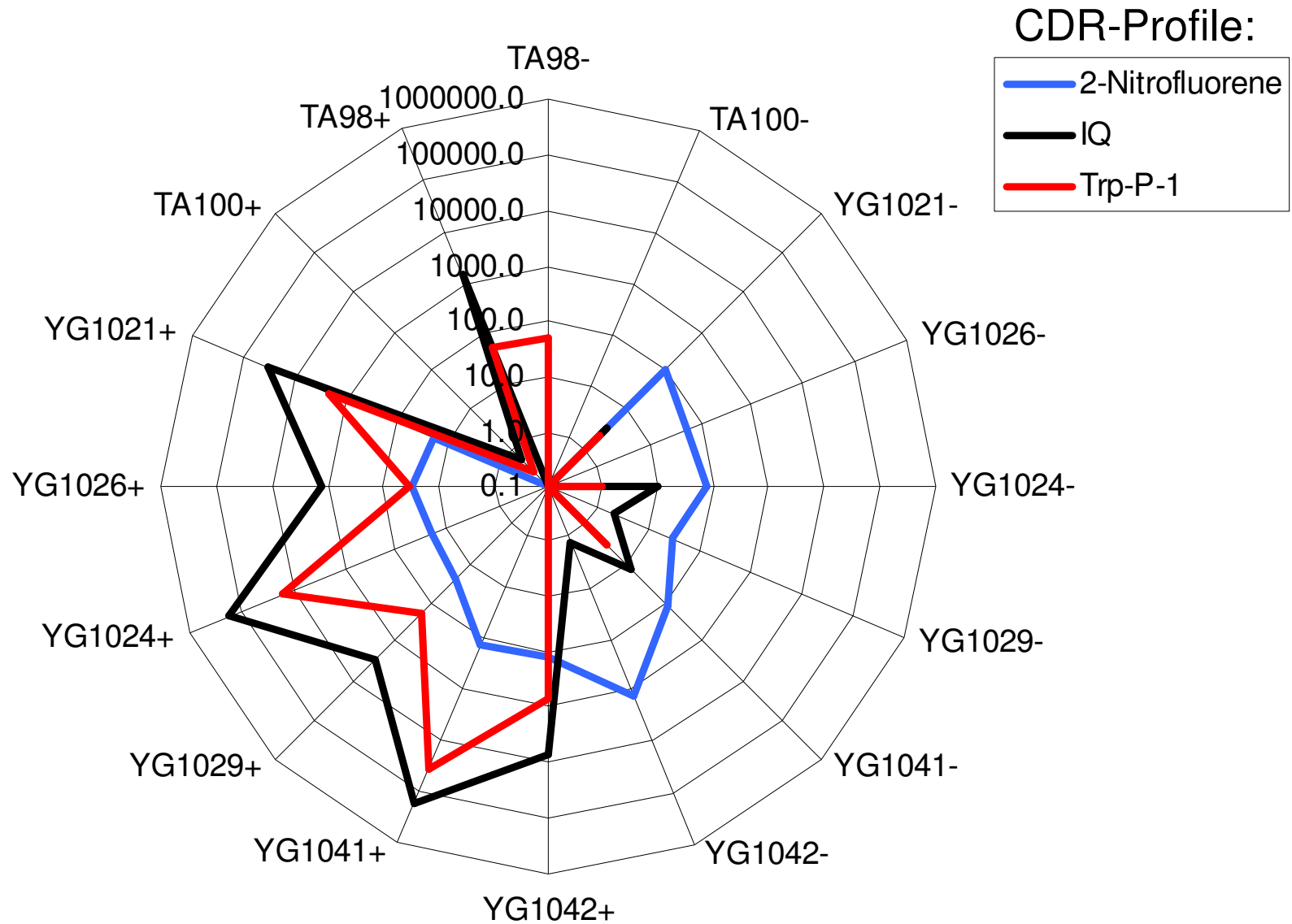
Vergleichbarkeit

Netzdiagramm zur Darstellung des CDR-Profiles einer Testsubstanz

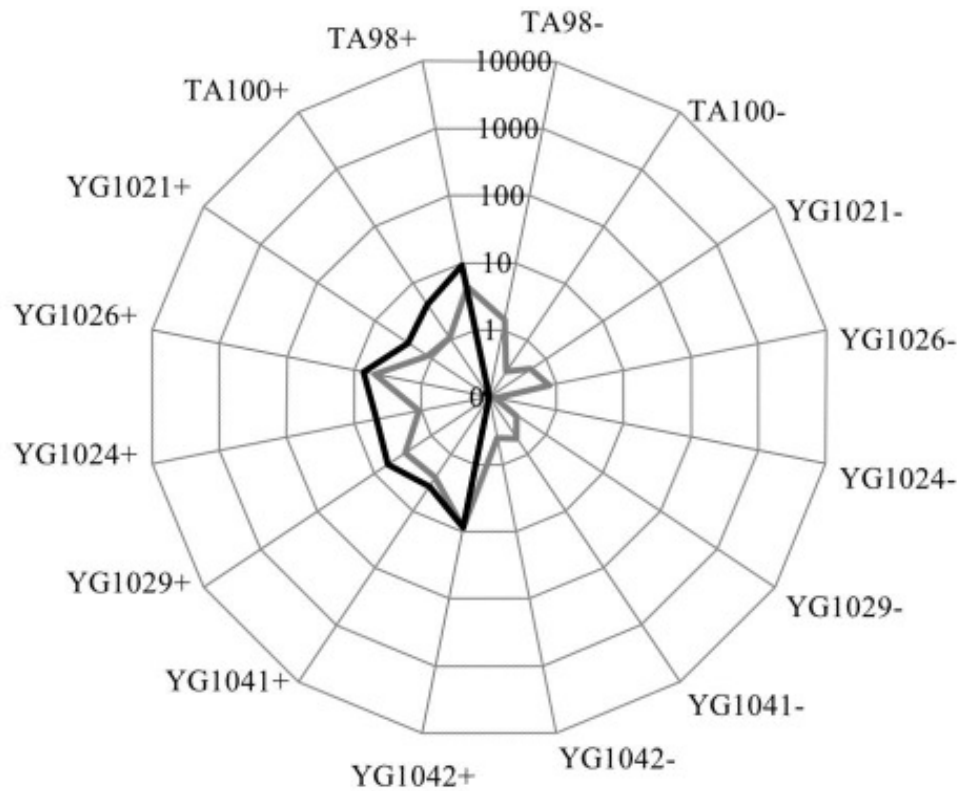


- A Standardteststämme
- B Nitroreduktase-Überexprimierer
- C Acetyltransferase-Überexprimierer
- D Nitro- und Acetyltransferase-Überexprimierer

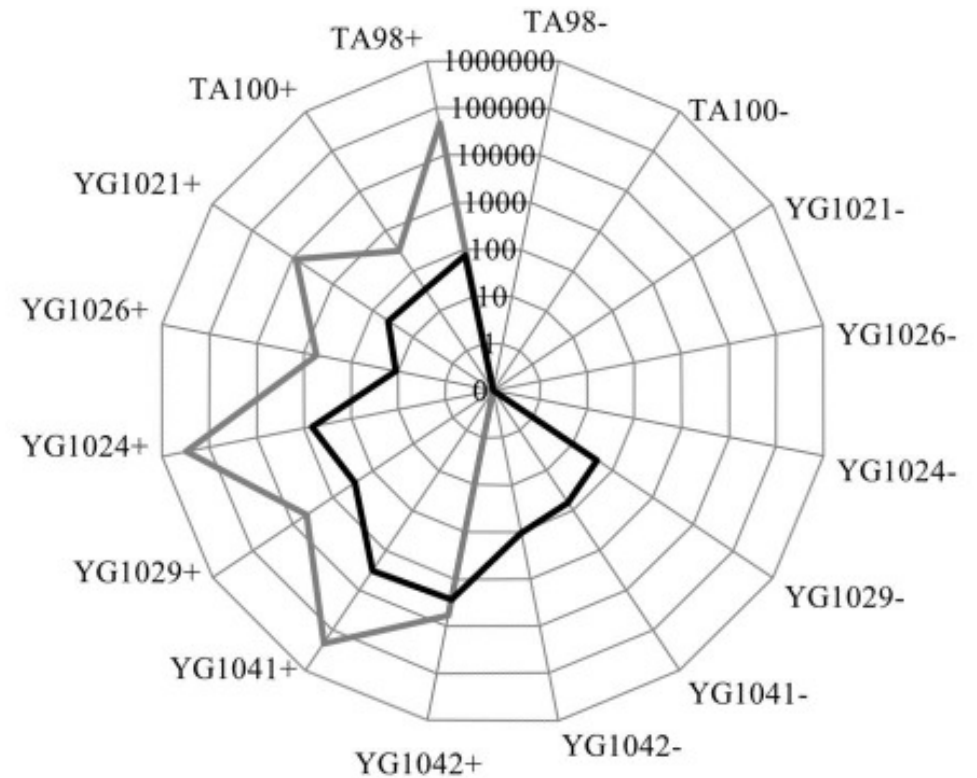
Netzdiagramme



Netzdiagramme (BaP:DMBA, 2-AA:IQ)



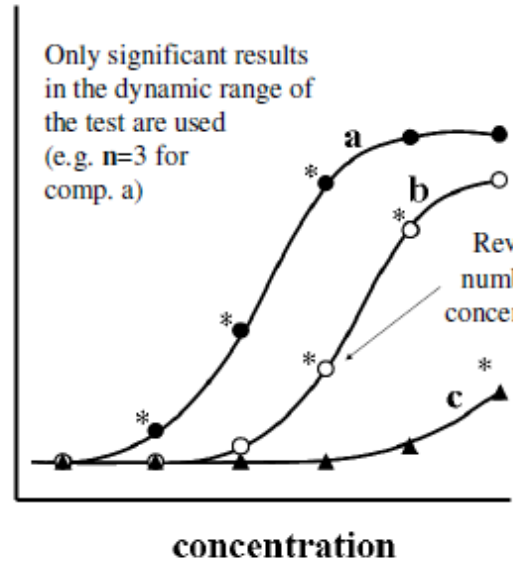
CDR-Profil von Benzo[a]pyren (—) und 7,12-Dimethylbenzo[a]anthracen (—)



CDR-Profil von 2-Aminoanthracen (—) und 2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinolin (IQ) (—)

Quantifizierung der Ähnlichkeit

number revertant wells (Strain 2)

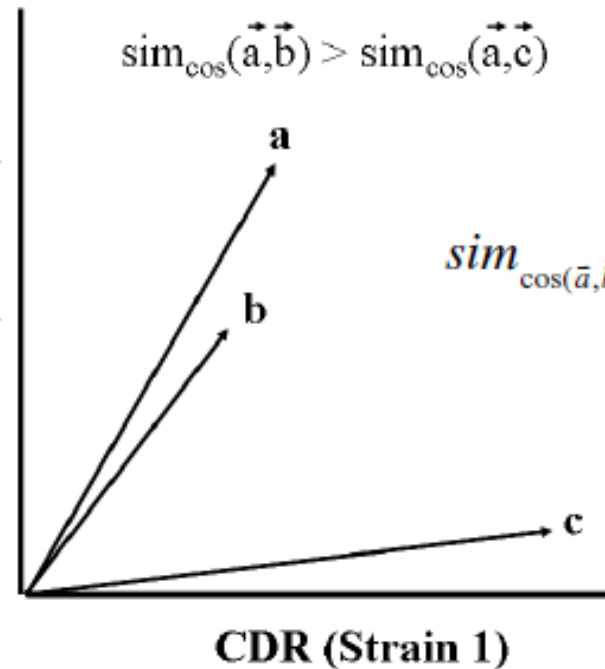


$$CDR = \frac{\sum_{i=1}^n \frac{r_i}{c_i}}{n}$$

The resulting 16 CDR-values constitute a compound specific vector

$$\vec{a} = \begin{pmatrix} CDR_1 \\ CDR_2 \\ \dots \\ CDR_i \end{pmatrix}$$

CDR (Strain 2)

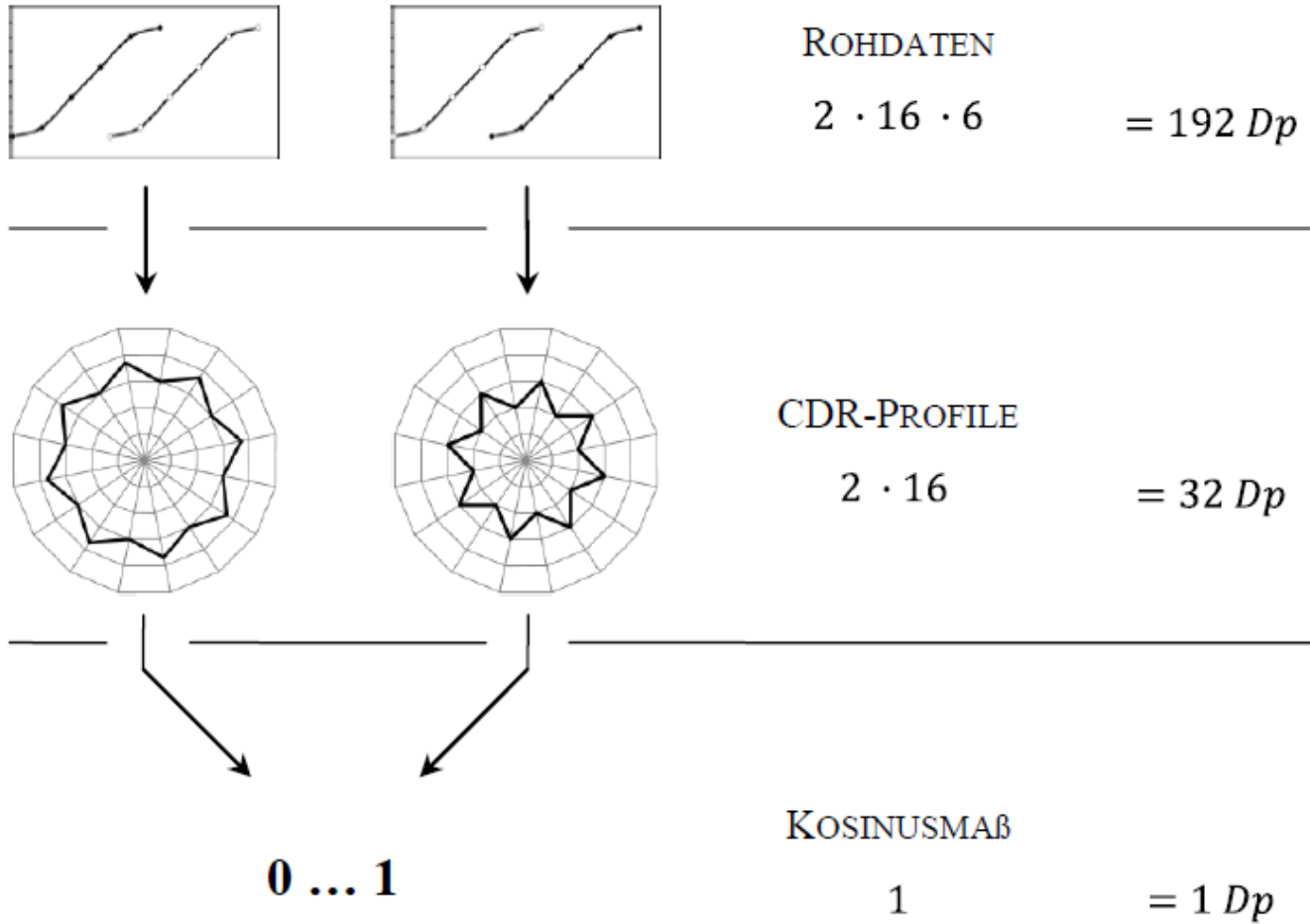


$$\text{sim}_{\cos}(\vec{a}, \vec{b}) = \frac{\vec{a} \cdot \vec{b}}{|\vec{a}| \cdot |\vec{b}|}$$

Bachelorarbeiten:

Hendrik Pollmann
Madeleine Klumb

Datenreduzierung



Vergleichbarkeit

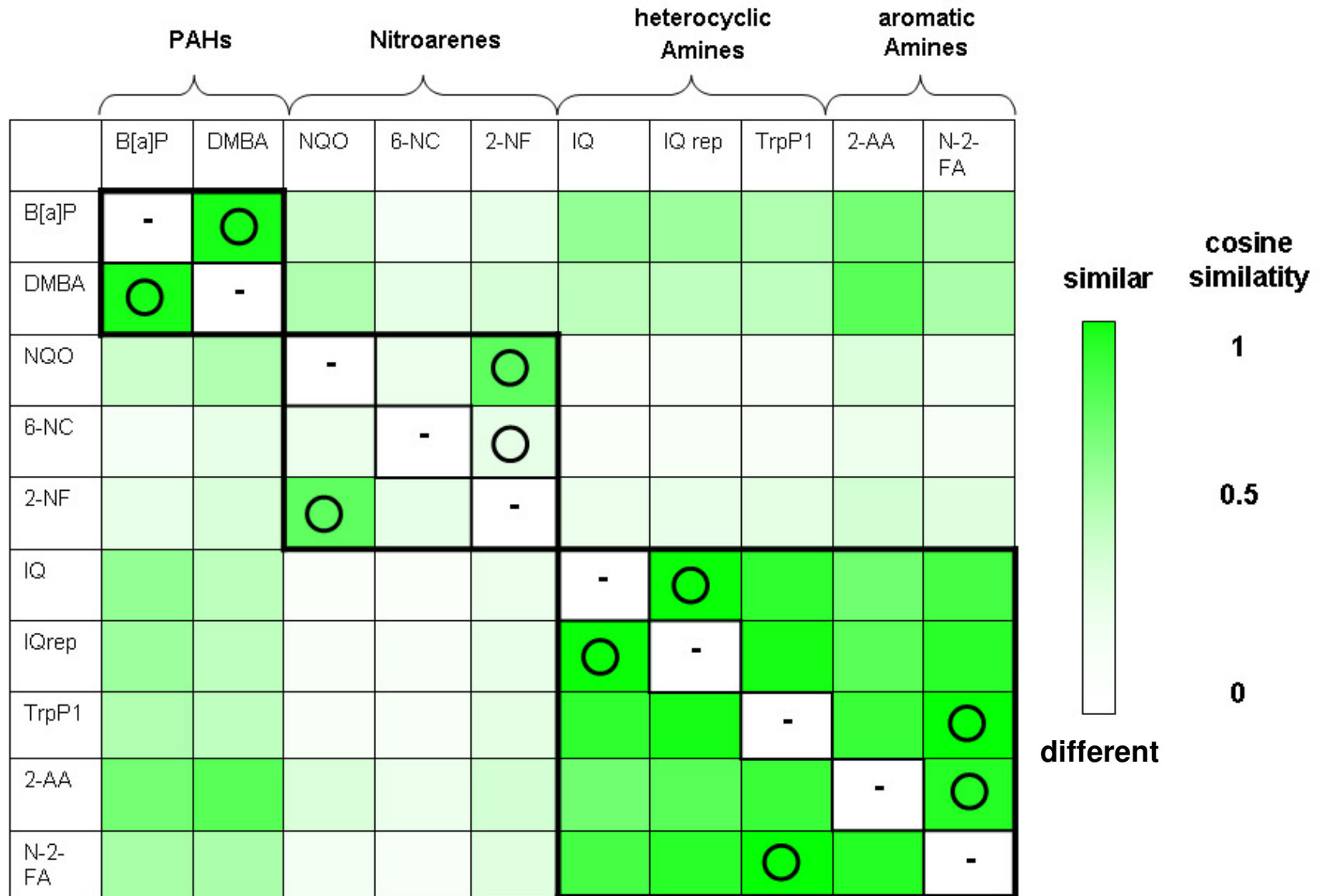
2 Stoffe
 16 Bedingungen
 6 Kurvenpunkte

$$CDR = \frac{\sum_{n=1}^i \frac{Rev_i}{c_i}}{n}$$

$$sim_{cos}(\vec{a}, \vec{b}) = \frac{\vec{a} \cdot \vec{b}}{|\vec{a}| \cdot |\vec{b}|} = \frac{\sum_{i=1}^n a_i \cdot b_i}{\sqrt{\sum_{k=1}^n (a_k)^2} \cdot \sqrt{\sum_{j=1}^n (b_j)^2}}$$

Kosinusmaß - Einzelsubstanzen

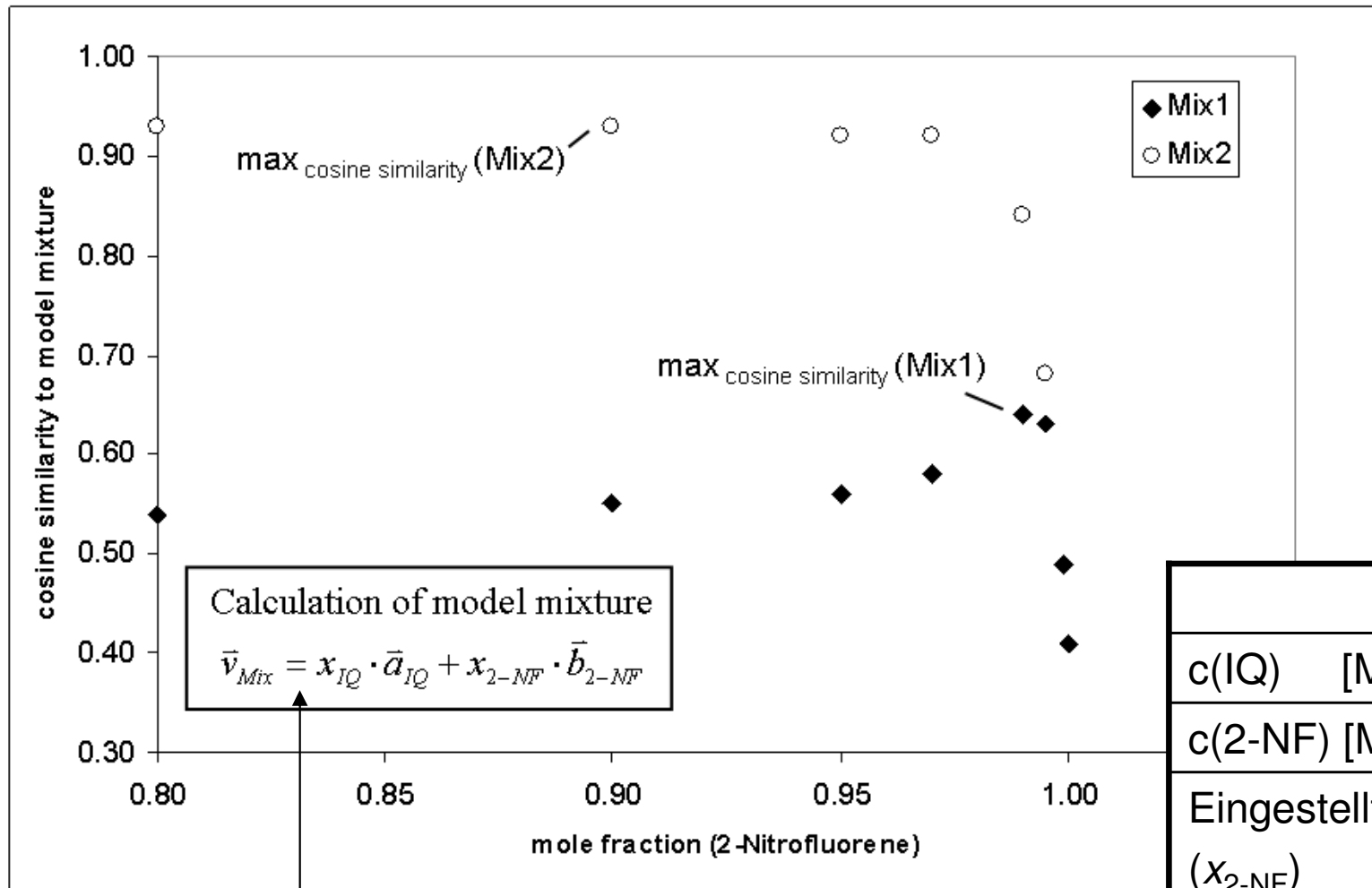
○: Maximales
Kosinusmaß
(maximale
Übereinstimmung)
zwischen
CDR-Profilen



B(a)P: Benzo[a]pyrene, **DMBA**: Dimethylbenzantracene, **NQO**: 4-Nitroquinoline-1-oxide, **6-NC**: 6-Nitrochrysene, **2-NF**: 2-Nitrofluorene, **IQ**: 2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, **TrpP1**: 3-Amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole, **2-AA**: 2-Aminoantracene, **N-2-FA**: N-2-Fluorenylacetamide

Kosinusmaß – Mischung (erste Schritte)

Bekannte Komponenten, unbekanntes Mischungsverhältnis

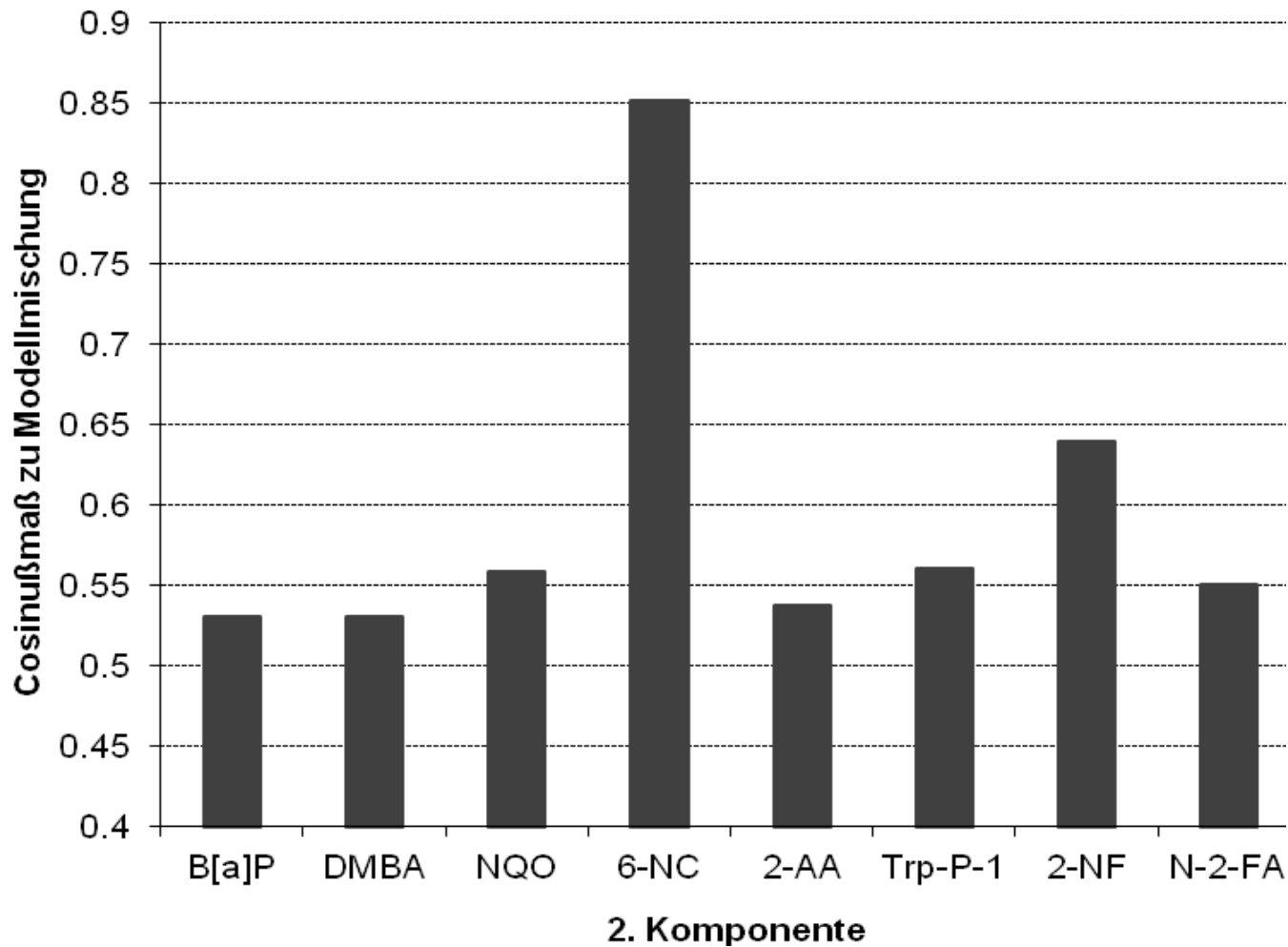


	Mix1	Mix2
c(IQ) [M]	5,0 E-10	5,0 E-9
c(2-NF) [M]	5,0 E-07	5,0 E-8
Eingestellt (x_{2-NF})	0.999	0.9
Gemessen (x_{2-NF})	0.99	0.9

Annahme einer additiven Wirkung

Kosinusmaß – Mischung (erste Schritte)

Eine bekannte (IQ), eine unbekannte Komponente
→ Mit welcher Modellkomponente ergibt sich die höchste
Übereinstimmung?



Kirkland D, Reeve L, Gatehouse D, Vanparys P.

A core *in vitro* genotoxicity battery comprising the Ames test plus the *in vitro* micronucleus test is sufficient to detect rodent carcinogens and *in vivo* genotoxins.

Mutat Res. 2011 Mar 18;721(1):27-73.

Analyse der Ergebnisse von 557 Karzinogenen und 405 *in vivo* Genotoxinen mit dem Ames-Test und dem *in vitro* Mikrokerntest

Fazit:

“...Almost all of the 962 rodent carcinogens and *in vivo* genotoxins were detected by an *in vitro* battery comprising Ames+MNvit.

...

Thus, there is no convincing evidence that any genotoxic rodent carcinogens or *in vivo* genotoxins would remain undetected in an *in vitro* test battery consisting of Ames+MNvit.“

- *In vitro*-Verfahren Ames-Fluktuationstest, *umu*-Test, *in vitro* MN-Test eignen sich für die Wirkungsbezogene Analytik
- Standardisierte Testverfahren (ISO, OECD) stehen zur Verfügung
- Fit for Purpose-Ansatz notwendig
- Versuch zur „Stoffidentifikation“ anhand von CDR-Profilen und Cosinusmaß
- Neuere Literaturdaten lassen den Schluss zu, dass Ames-Test und *in vitro*-MN Test ausreichen, um mit hinreichender Sicherheit *in vivo*-Gentoxine und Karzinogene zu detektieren

3 – 7 June 2013

6th International Conference on Water Resources and Environment Research

Water & Environmental Dynamics

www.water-environment.org

[Home](#)

[Session Programme](#)

[Deadlines & Milestones](#)

[Venue](#)

[Contact](#)

Water and Environmental Dynamics

We are happy to invite you to join us for the **6th International Conference on Water Resources and Environment Research (ICWRER)** which will take place in Koblenz, Germany, from June 3–7 2013.

The conference on water and environment research is an independent platform providing scientists with a possibility to present and discuss their work in the fields of hydrology, environmental research, aquatic ecosystem research, water resources research and management as well as global change. Many sectors of human activity are highly dynamic and at the same time closely linked to the availability of good quality water, e.g. energy, agriculture, transportation. The focus of the 6th conference is set on fostering an integrative understanding of water and the environment. It brings together physical,

MENU

- [Session Programme](#)
- [Scientific steering committee](#)
- [Registration](#)
- [Accommodation](#)
- [Venue](#)
- [Deadlines & Milestones](#)
- [Abstract submission](#)

DOWNLOAD

[Water and Environmental Dynamics \(PDF\)](#)

OCTOBER 2012

M T W T F S S

3 – 7 June 2013

6th International Conference on Water Resources and Environment Research
Water & Environmental Dynamics

www.water-environment.org

[Home](#)

[Session Programme](#)

[Deadlines & Milestones](#)

[Venue](#)

[Contact](#)

Water and Environmental Dynamics

We are happy to invite you to the 6th International Conference on Water Resources and Environment Research

Resources and Environment Research

Germany from 3-7 June 2013

Water

place in Koblenz,

Session: In vitro Toxicology – use and misuse in risk assessment and regulatory frameworks

[Session Programme](#)

- [Scientific steering committee](#)
- [Registration](#)
- [Accommodation](#)
- [Venue](#)
- [Deadlines & Milestones](#)
- [Abstract submission](#)

DOWNLOAD

[Water and Environmental Dynamics \(PDF\)](#)

OCTOBER 2012

M T W T F S S

Danke für Ihre Aufmerksamkeit!

Dr. Georg Reifferscheid
reifferscheid@bafg.de

Dr. Sebastian Buchinger
buchinger@bafg.de