

# Permanente embryonale Keimzelllinien - eine *in vitro* Alternative zur Beurteilung von Keimzellmutagenität

Martina Klemm, Elke Genschow, Inge Pohl, Christa Barrabas, Manfred Liebsch und Horst Spielmann  
ZEBET/ Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV), D-Berlin

## Zusammenfassung

Mit der 7. Änderung der EG-Richtlinie 67/548 in das nationale Gesetz zum Schutz vor gefährlichen Stoffen (ChemG) und der neuen MAK- und BAT-Werte Liste 2000 wurden die Prüfanforderungen um die Prüfung auf keimzellmutagene Eigenschaften erweitert. Regulatorisch akzeptierte *in vivo* Testsysteme zur Abschätzung stadienspezifischer Mutagenität sind der sogenannte "Dominante Letaltest (DL)" und der "Spezifische-Lokus-Test (SL)" mit Mäusen. Ein *in vitro* Testsystem zur Beurteilung von Keimzellmutagenität, insbesondere hinsichtlich geschlechtsspezifischer Effekte eines Mutagens, steht zur Zeit jedoch noch nicht zur Verfügung.

Ziel dieses Projektes ist die Entwicklung und Etablierung eines *in vitro* Prüfverfahrens auf für Keimzellen mutagene Eigenschaften mit Hilfe von permanenten embryonalen Keimzelllinien der Maus. Nach erfolgreicher Etablierung und genetischer Charakterisierung der embryonalen Keimzelllinien vom BALB/cJ Mausstamm wurden Zytotoxizitätsstudien (MTT-Test) und Genotoxizitätsprüfungen (SCE-Indikator) anhand positiver Standard-Referenzmutagene und Negativkontrollen durchgeführt. Die weibliche Keimzelllinie EG<sub>3</sub> reagierte wesentlich sensibler hinsichtlich der gewählten zytotoxischen und genotoxischen Endpunkte als die zum Vergleich getesteten 3T3 Mausfibroblastenzellen und wurde daher zur Entwicklung eines *in vitro* Klassifizierungsmodells auf der Grundlage genotoxischer und nicht-genotoxischer *in vivo* Daten eingesetzt. In Anwendung der linearen Diskriminanzanalyse wurden 3 Endpunkte zur korrekten Klassifizierung (100%) der Testsubstanzen ermittelt: der SCE<sub>200</sub> Wert (Verdopplung des Mittelwertes der SCE-Rate auf 200%) der Keimzelllinie EG<sub>3</sub> im 3 und 24 Stunden Ansatz und der IC<sub>50</sub> Wert der EG<sub>3</sub>-Zellen nach 3-stündiger Substanzgabe.

Summary: Permanent embryonic mouse germ cell-lines, an *in vitro* alternative to *in vivo* germ cell mutagenicity tests. Germ cell mutagenesis is required by the 7<sup>th</sup> amendment of the directive 67/548 EEC into the national regulations on existing chemicals. Officially accepted *in vivo* test systems for stage specific mutagenicity are the dominant lethal (DL) test and the specific locus test (SLT) in mice. An acceptable *in vitro* alternative designed to address germ cell mutagenesis and discriminate between male and female specific effects is not available at present.

In order to offer a sensitive and predictive *in vitro* method to assess the genotoxic potential of chemical agents on male and female reproduction, we established primordial germ (PG) cell-derived permanent embryonic germ (EG) cell lines of the mouse (strain BALB/cJ). The differences in developmental sensitivity of the EG<sub>3</sub> cell line and differentiated fibroblast cells 3T3 were comparatively tested with cytotoxicity assay (MTT test) and genotoxic studies (SCE-assay) under identical test conditions. The concentration-response curves reflected the female cell line EG<sub>3</sub> to be extremely sensitive concerning cytotoxic and genotoxic endpoints. Therefore this cell line was used to classify *in vivo* genotoxic and non-genotoxic test substances with different potential endpoints. Applying linear discriminant analysis three endpoints were identified for the correct classification (100%) of all test chemicals, namely the SCE<sub>200</sub> value (increase of 200% in the mean number of SCEs per metaphase spread) for EG<sub>3</sub> (3hrs and 24hrs assay) and the IC<sub>50</sub> value for EG<sub>3</sub> after 3hrs of exposure to test chemicals.

Keywords: 3R, replacement, EG cell lines, *in vitro* germ cell mutagenicity, cytotoxicity, genotoxic potential, prediction endpoints

## 1 Einleitung

Alternative Testmethoden sind bereits Bestandteil pharmakologisch-toxikologischer Teststrategien, es existiert jedoch noch keine *in vitro* Alternative zu den aufwendigen *in vivo* Keimzellmutagenitätstests (Brusick, 1980; Holden, 1982; Adler and Ashby, 1989; Waters et al., 1994; Allen et al., 1995; Vogel and Natarajan, 1995; Adler et al., 1996). Da der Nachweis zwischen

der Exposition mit einem für Keimzellen mutagenen Stoff und dem Auftreten von Erbkrankheiten beim Menschen kaum zu erbringen ist (DFG, 2000), sind Keimzellmutagene bisher nur aufgrund erhöhter Mutationsraten bei den Nachkommen exponierter Versuchstiere durch *in vivo* Prüfmethoden zu identifizieren (OECD, 1993; Richtlinien 421 und 422). Eine Abgrenzung zytotoxischer von genotoxischen Effekten ist dadurch jedoch nicht möglich, und auch

die Frage nach substanzabhängiger, geschlechtsspezifischer Keimzellmutagenese bleibt offen. *In vitro* screening Tests mit Keimzelllinien wären eine realistische Alternative für komplexe und kostenintensive Segment 1-, 2- und 3-Studien (OECD, 1983) und könnten eine geschlechtsspezifische Risikoabschätzung ermöglichen, immer vorausgesetzt, diese Tests wären in der Lage, toxische Substanzen korrekt zu klassifizieren (Brown et al., 1995).

Ziel unserer Studie war die Etablierung eines *in vitro* screening Tests zur Untersuchung der Keimzellmutagenese mit Hilfe embryonaler Keimzelllinien der Maus. Die neu etablierte embryonale weibliche Keimzelllinie EG<sub>3</sub> wurde vergleichend mit der Fibroblastenlinie 3T3 hinsichtlich ihres Potentials zur korrekten Klassifizierung von *nicht-* und *genotoxischen* Testsubstanzen erfasst. Die Untersuchungen basierten auf Zytotoxizitätsstudien und der Ermittlung der Halbhemmkonzentration (IC<sub>50</sub> Wert) im MTT Test nach 3 bzw. 24-stündiger Substanzzugabe. Zudem wurden die Genotoxizitätseffekte mit Hilfe des Schwesterchromatid-Austausch (SCE) Tests nach 3 bzw. 24 Stunden Substanzwirkung festgestellt. Aus den Konzentrations-Wirkungskurven wurde die statistisch signifikante, konzentrationsabhängige Verdopplung des Mittelwertes der SCE-Rate auf 200% (SCE<sub>200</sub>) im Vergleich zum SCE-Kontrollwert ermittelt. Mit Hilfe der linearen Diskriminanzanalyse wurde die Prädiktivität der zyto- und genotoxischen Endpunkte zur korrekten Klassifizierung der Testsubstanzen ermittelt.

## 2 Material und Methode

### 2.1 Etablierung der embryonalen Keimzelllinien

Primordiale Keimzellen (PGC) wurden aus dem posterioren Abschnitt der Embryonalreihe von 8,5 Tage alten BALB/cJ Mausembryonen isoliert (Matsui et al., 1992; Cooke et al., 1993). Die kaudale Region des Embryo (*"primitive streak"* und *"allantois"*) wurde mit Hilfe einer 0,125% Trypsin/EDTA Lösung disaggregiert und auf Mitomycin-inaktivierten SL/SL4<sup>m220</sup> Fibroblastenzellen ausgesät. Nach 6-tägiger Kultivierung wurden einige Zellen mit alkalischer Phosphatase (AP) hinsichtlich ihres undifferenzierten Zustandes überprüft. Nach 10-tägiger Primärkultur erfolgte eine Subklonierung der PGC's und erneute Passagen bis hin zur permanenten Keimzelllinie (EG). Eine Weiterkultivierung der Keimzellen als undifferenzierte, pluripotente Zelllinien erfolgte in Anwesenheit von *Leukaemia inhibitory factor* (LIF) (Evans and Kaufman, 1981; Robertson, 1987). Zur Geschlechtsbestimmung der embryonalen Keimzelllinien wurden  $\gamma$ -spezifische Sequenzen der isolierten DNA mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion (PCR) exponentiell ampli-

fiziert (Laird et al., 1991) und im Agarosegel durch Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

### 2.2 Zellkultur

Die BALB/c 3T3 Fibroblastenzellen (Klon 31, ICN Flow, D-Eschwege) wurden in Dulbecco's modifiziertem *Eagle's Medium* (DMEM) unter Zugabe von 10% fötalem Kälberserum (FCS, PAA), 4mM Glutamin, 50 U Penicillin/ml and 50 mg Streptomycin/ml kultiviert. Die EG-Zellen dagegen wurden in DMEM unter Zusatz von 15% FCS (PAA), 2mM Glutamin, 50 U Penicillin/ml, 50 mg Streptomycin/ml, 1% nicht essentiellen Aminosäuren, 0.1%  $\beta$ -Mercaptoethanol und 1000 U *Leukaemia inhibitory factor* (LIF)/ml kultiviert. Für die Gewinnung von EG-Zellen war die Zugabe von 20 ng/ml *basic fibroblast growth factor* (bFGF) notwendig.

### 2.3 Zytotoxizitätsstudien

Zur Bestimmung der zytotoxischen Effekte verschiedener Testsubstanzen auf die weibliche Keimzelllinie EG<sub>3</sub> und die 3T3 Fibroblastenzellen wurde der 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromid (MTT) Test in Abwesenheit von LIF durchgeführt.

Dazu wurden  $4.8 \times 10^4$  Zellen/200  $\mu$ l Medium pro Vertiefung einer 96-well Mikrotiterplatte ausgesät und durch 24-stündige Vorkultur bis zur exponentiellen Wachstumsphase gebracht. In standardisierten Protokollen erfolgte die Substanzzugabe für 3 bzw. 24 Stunden in jeweils 8

verschiedenen Konzentrationen und 6 Replikaten, Lösungsmittelkontrollen wurden vergleichend erfasst. Die höchste Testkonzentration ergab sich aus der Toxizität bzw. Löslichkeit der Testsubstanzen. Als zytotoxischer Endpunkt wurde der IC<sub>50</sub> Wert sowohl für EG<sub>3</sub>- als auch 3T3-Zellen als Halbhemmkonzentration des Zellwachstums aus den entsprechenden Konzentrations-Wirkungskurven quantitativ mittels ELISA-Reader ermittelt.

### 2.4 Studien zur Genotoxizität

Die etablierten EG<sub>3</sub>- und 3T3 Zellen wurden wiederum in der exponentiellen Wachstumsphase der Testsubstanz in 5 verschiedenen Konzentrationen im Doppelanatz für 3 bzw. 24 Stunden ausgesetzt (Abbildung 1). Der Nachweis des Schwesterchromatid-Austauschs (OECD-Richtlinie 479) erfolgte durch BrdU-Einbau ( $10^{-5}$  M BrdU) und anschließender färberischer Differenzierung der unterschiedlich stark substituierten Chromatiden mittels Fluoreszenz-plus Giemsa (FPG)-Technik (Perry and Wolff, 1985). Als genotoxischer Endpunkt wurde der SCE<sub>200</sub> Wert aus den Konzentrations-Wirkungskurven der genotoxischen und nicht-genotoxischen Testsubstanzen ermittelt. Hierbei handelt es sich um die konzentrationsabhängige Verdopplung des Mittelwertes der SCE-Rate auf 200% im Vergleich zum SCE-Kontrollwert. Vergleichend wurden noch die Verdreifachung (SCE<sub>300</sub>), bis hin zur Verfünffachung (SCE<sub>500</sub>) des Mittelwertes der SCE-Rate erfasst.

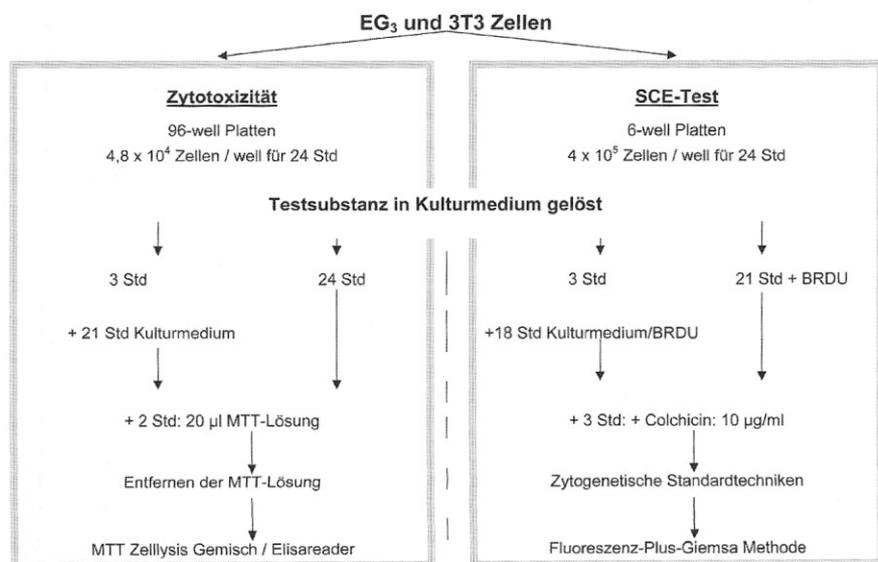


Abbildung 1: Zytotoxizitäts- und Genotoxizitätsansatz für EG<sub>3</sub> und 3T3 Zellen

## 2.5 Testchemikalien

Als Standard-Referenzmutagene wurden Ethylnitrosoharnstoff (ENU, CAS-No 759-73-9), Methylnitrosoharnstoff (MNU, CAS-No 684-93-5), Methylmethansulfonat (MMS, CAS-No 66-27-3), Hydroxyharnstoff (HU, CAS-No 127-07-1) und Mitomycin C (MMC, CAS-No 50-07-7) verwendet. Penicillin G (CAS-No 69-57-8), Saccharin (82385-42-0) und L-Ascorbinsäure (CAS-No 134-03-2) dienten als Negativkontrollen.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Zytotoxizitätsstudien

Die zytotoxische Wirksamkeit der 5 getesteten Mutagene auf die EG<sub>3</sub>-Keimzellen ergab folgende hierarchische Ordnung (siehe Tab. 1):

MNU, ENU) weder im 3 Stunden noch im 24 Stunden Ansatz bei höchster Testkonzentration ein IC<sub>50</sub> Wert ermittelt werden. Selbst eine Exposition der 3T3 Zellen auf die stark zytotoxisch wirksamen Testsubstanzen MMC und MMS führte nur bei extrem hoher Substanzkonzentration zu vergleichbaren IC<sub>50</sub> Werten im 3 und 24 Stunden Ansatz. Mit den drei genotoxischen Negativkontrollen dagegen konnten bei der Fibroblastenlinie 3T3 im 24-stündigen Testansatz IC<sub>50</sub> Werte ermittelt werden.

### 3.2 SCE Studien zur Genotoxizität

Zur Beurteilung der Relevanz des SCE<sub>200</sub> Wertes als toxikologischen Endpunkt wurden die EG<sub>3</sub>- und die 3T3 Zellen den 5 Mutagenen und den 3 Negativkontrollen in Übereinstimmung mit den Zytoto-

reicht werden. Keine der positiven Testsubstanzen induzierte bei den 3T3 Zellen eine Verdopplung des Mittelwertes der SCE-Rate.

### 3.3 Prädiktivität der zytotoxischen und genotoxischen Endpunkte

Mit Hilfe der linearen Diskriminanzanalyse (Backhaus et al., 1996) ergab sich aus der vorliegenden Studie, daß eine korrekte Klassifizierung der ausgesuchten Testsubstanzen in die beiden Klassen: nicht und stark genotoxisch mit Hilfe eines einzigen Endpunktes erfolgen konnte. Als geeignete Endpunkte wurde der SCE<sub>200</sub> Wert der Keimzelllinie EG<sub>3</sub> im 3 Stunden, oder im 24 Stunden Ansatz und der IC<sub>50</sub> Wert nach 3-stündiger Exposition ermittelt. Anhand der abgelesenen SCE<sub>200</sub>/bzw. IC<sub>50</sub> Werten aus den Konzentrations-Wir-

Tab. 1: *In vitro* Zytotoxizitätstest der EG<sub>3</sub> und 3T3 Zellen (IC<sub>50</sub> Werte) mit 5 positiven Mutagenen und drei genotoxischen Negativkontrollen im 3 und 24 Stunden Ansatz

Testsubstanz	IC <sub>50</sub> (µg/ml) EG <sub>3</sub>		IC <sub>50</sub> (µg/ml) 3T3	
	3Std	24Std	3Std	24Std
Mitomycin C (MMC)	4	0,7	>20 *	20
Methylmethansulfonat (MMS)	70	22	140	140
Hydroxyharnstoff (HU)	130	30	>3000 *	>3000 *
Methylnitrosoharnstoff (MNU)	490	285	>750 *	>750 *
Ethylnitrosoharnstoff (ENU)	800	310	>1000 *	>1000 *
Ascorbinsäure	>1000 *	860	285	200
Penicillin G	>3000 *	>3000 *	>3000 *	975
Saccharin	>15000 *	12750	>15000 *	7250

\*kein IC<sub>50</sub> Wert konnte bis zur höchsten Testkonzentration erreicht werden (limitierter Faktor: Substanzlöslichkeit)

MMC wurde als die stärkste zytotoxisch wirksame Substanz ermittelt, und zwar mit einem IC<sub>50</sub> Wert von 0,7 µg/ml im 24 Stunden Ansatz und 4 µg/ml im 3 Stunden Ansatz, gefolgt von MMS, HU und MNU. Der geringste zytotoxische Effekt erfolgte durch Exposition der EG<sub>3</sub>-Keimzellen auf ENU, sowohl im 3 Stunden, als auch im 24 Stunden Ansatz. Keinerlei zytotoxischen Effekte wurden durch Einsatz der drei genotoxisch negativen Testsubstanzen (Penicillin G, Saccharin, Ascorbinsäure) im 3 Stunden Ansatz hervorgerufen, wohingegen eine 24-stündige Substanzzugabe nur bei extrem hoher Konzentration zu einer Halbhemmkonzentration (IC<sub>50</sub> Wert) bei Saccharin und Ascorbinsäure führte.

Bei der Fibroblastenlinie 3T3 konnte hingegen mit 3 der 5 Mutagene (HU,

xizitätsstudien für 3 bzw. 24 Stunden ausgesetzt, wobei die SCE-Normalverteilung bis hin zur höchsten Testkonzentration (SCE<sub>300</sub>-SCE<sub>500</sub>) erhalten blieb. Auffällig war, daß die EG<sub>3</sub>-Keimzellen hinsichtlich des genotoxischen Endpunktes wesentlich sensibler auf alle Mutagene reagierten als in den Zytotoxizitätsstudien. Es ergab sich die gleiche hierarchische Ordnung bis auf eine Ausnahme (siehe Tab. 2), denn bei der Reaktion der Keimzelllinie EG<sub>3</sub> auf die Testsubstanz ENU zeigte sich eine verstärkte genotoxische Sensitivität, sowohl im 3 als auch im 24 Stunden Ansatz. Erwartungsgemäß konnte mit den 3 Negativkontrollen (Penicillin G, Saccharin, Ascorbinsäure) weder im 3 noch im 24 Stunden Ansatz eine Verdopplung des Mittelwertes der SCE-Rate auf 200% er-

kungskurven wurden 100% der ausgewählten Testsubstanzen *in vitro* korrekt klassifiziert (Tabellen 1 und 2).

## 4 Diskussion

Mit Hilfe der vorliegenden Studie wurden sowohl die Grenzen der Zelllinie 3T3 aufgrund ihrer geringen Sensitivität gegenüber den gewählten Endpunkten aus dem Bereich der Zytotoxizität und Genotoxizität aufgezeigt, als auch die besondere Eignung der embryonalen weiblichen Keimzelllinie EG<sub>3</sub> für die Bewertung eines Stoffes bezüglich der MAK-Anforderungen (DFG, 2000) zur Identifizierung potentieller Keimzellmutagene unterstrichen. Eine Bewertung der Eignung der männlichen Keimzelllinie EG<sub>2</sub> steht zur

**Tab. 1: *In vitro* Gentoxizitätstest der Keimzelllinie EG<sub>3</sub> (SCE<sub>200</sub> Wert) mit 5 positiven Mutagenen und drei genotoxischen Negativkontrollen im 3 und 24 Stunden Ansatz**

Testsubstanz	SCE <sub>200</sub> Wert EG <sub>3</sub> (µg/ml)	
	3 Std	24 Std
Mitomycin C (MMC)	0,0095	0,0014
Methylmethansulfonat (MMS)	0,225	0,16
Ethylnitrosoharnstoff (ENU)	3,475	4,25
Hydroxyharnstoff (HU)	12,75	2,15
Methylnitrosoharnstoff (MNU)	26,5	22,5
Ascorbinsäure	> 1000 *	> 1000 *
Penicillin G	> 3000 *	> 3000 *
Saccharin	> 15000 *	> 15000 *

\*kein SCE<sub>200</sub> Wert konnte bis zur höchsten Testkonzentration erreicht werden (limitierter Faktor: Substanzlöslichkeit)

Zeit noch aus. Wertvolle Informationen über die Zuverlässigkeit unseres *in vitro* Prädiktionsmodells zur korrekten Klassifizierung in die beiden Klassen: nicht und stark genotoxisch wird die Erweiterung des Spektrums der Testsubstanzen entsprechend der MAK-Werteliste erbringen. Langfristig gesehen erscheint uns eine Reduktion in der Rate der korrekten Klassifizierung durch Verbreiterung der Testsubstanzklassen unumgänglich, gleichermaßen wird eine Kombination verschiedener Endpunkte zu einer verbesserten Einordnung in die Klassen nicht-, schwach und stark genotoxisch nötig sein, aber die Etablierung embryonaler Keimzelllinien eröffnet zumindest eine realistische *in vitro* Alternative zur geschlechtsspezifischen Keimzellmutagenese und Risikoabschätzung.

#### Danksagung

Die Autoren danken dem BMBF für die finanzielle Förderung dieses Vorhabens (Projekt Nr.: BEO 31/0311307).

#### Literatur

- Adler, I.-D. and Ashby, J. (1989). The present lack of evidence for unique rodent germ-cell mutagens. *Mutation Research* 212, 55-66.
- Adler, I.-D., Anderson, D., Benigni, R. et al. (1996). Synthesis report of the step project detection of germ cell mutagens. *Mutation Research* 353 (1-2), 65-84.
- Allen, J. W., Ehling, U. H., Moore, M. M. et al. (1995). Germ line specific factors in chemical mutagenesis. *Mutation Research* 330 (1-2), 219-31.
- Backhaus, K., Erichson, B., Plinke, W. et al. (1996). *Multivariate Analysemethoden*. 8. Auflage. Berlin, Heidelberg, New York, London: Springer Verlag.
- Brusick, D. (1980). *Principles of Genetic Toxicology*. New York: Plenum Press.
- Brown, N. A., Spielmann, H., Bechter, R. et al. (1995). Screening chemicals for reproductive toxicity: the current alternatives. The report and recommendations of an ECVAM/ETS workshop (ECVAM workshop 12). *ATLA* 23, 868-882.
- Cooke, J. E., Godin, I., French-Constant, C. et al. (1993). Culture and Manipulation of Primordial Germ Cells. *Methods in Enzymology* 225, 37-58.
- DFG (2000). *MAK- und BAT-Werte-Liste, Mitteilung 36 der Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe*. D-Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH.
- Evans, M. J. and Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156.
- Holden, H. E. (1982). Comparison of somatic and germ cell models for cytogenetic screening. *J. Appl. Toxicol.* 2, 196-200.
- Laird, P. W., Zijderveld, A., Linders, K. et al. (1991). Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Research* 19 (5), 4293.
- Matsui, Y., Zsebo, K. and Hogan, B. L. M. (1992). Derivation of pluripotent embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* 70, 841 - 847.
- OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) (1983). *Guidelines for testing of chemicals, Section 4, Health effects, Guideline 416*. Paris: OECD.
- OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) (1993). *Guidelines for testing of chemicals, Section 4, Health effects, Guideline 421, 422 and 479*. Paris: OECD.
- Perry, P. and Wolf, S. (1974). New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature* 251, 156-158.
- Robertson, E. (ed.) (1987). Embryo-derived stem cell lines. In *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach* (71-112). Oxford: IRL Press.
- Vogel, E. W. and Natarajan, A. T. (1995). DNA damage and repair in somatic and germ cells in vivo. *Mutation Research* 330 (1-2), 183-208.
- Waters, M. D., Stack, H. F., Jackson, M. A. et al. (1994). The performance of short-term tests in identifying potential germ cell mutagens: a qualitative and quantitative analysis. *Mutation Research* 341, 109-131.

#### Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Horst Spielmann  
ZEBET im BgVV  
Diedersdorfer Weg 1  
D-12277 Berlin  
Tel.: +49-0188-8412 2270  
Fax: +49-0188-8412 2958  
E-mail: zebet@bgvv.de