

## **Mitochondriale Toxizität**

Maria Hellmund\*, Marian Raschke

Bayer Pharma AG, Global Early Development, Investigational Toxicology, Mechanistic Toxicology Berlin

(\*Studentin im Masterstudiengang Toxikologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin)

### **Hintergrund**

Mitochondrien erfüllen im Zellstoffwechsel eine Reihe essentieller Aufgaben, wie z. B. die ATP-Produktion im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS), und stellen somit einen wichtigen Angriffspunkt für unerwünschte Arzneimittelwirkungen dar.

Dabei können mitochondrientoxische Wirkungen über verschiedene molekulare Mechanismen erfolgen, z. B.:

- Hemmung der mitochondrialen Atmungskette
- Entkopplung der OXPHOS
- Inhibierung von DNA-Replikation oder Proteinbiosynthese in Mitochondrien
- Induktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)
- Hemmung der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren

Mitochondriale Fehlfunktionen werden als eine Haupt-ursache für arzneimittelinduzierte Leberschäden diskutiert.<sup>1</sup> So wurden z. B. die mittlerweile als potente Mitochondrientoxine bekannten Arzneimittel Tolcapon (Parkinson-Therapeutikum) und Troglitazon (Antidiabetikum) aufgrund ihrer hepatotoxischen Eigenschaften vom Markt genommen.<sup>2</sup>

### **Detektion mitochondrientoxischer Substanzwirkungen**

Es gibt eine Vielzahl von *in vitro*-Methoden, mit denen unerwünschte Wirkungen auf Mitochondrien bereits während der

Wirkstofffindung, z. B. in der Phase der Leitstrukturgenerierung und -optimierung, erfasst und so vermieden werden können.

Im Rahmen meiner Masterarbeit<sup>3</sup> wurden drei *in vitro*-Methoden zur Erfassung mitochondrialer Toxizität in HepG2-Zellen etabliert und durch Testung von Referenzsubstanzen, deren toxische Wirkungen über verschiedene molekulare Mechanismen vermittelt werden, miteinander verglichen. Die Arbeit sollte u. a. klären, welche der Mechanismen mit den einzelnen Assays detektiert werden können und wie ein sinnvolles Screening durchgeführt werden sollte.

**Assay 1** quantifiziert den zellulären ATP-Gehalt, da das Mitochondrium in vielen Zellen den Hauptort der ATP-Synthese bildet. Hierfür werden Zellen parallel in glucose- (Glu) oder galactosehaltigem (Gal) Medium kultiviert. In Gegenwart von Glu decken die Zellen ihren ATP-Bedarf hauptsächlich über die Glykolyse („Crabtree-Effekt“). Steht jedoch ausschließlich Gal als Substrat zur Verfügung, verringert sich der Anteil des aus der Glykolyse stammenden ATP aufgrund der langsameren Reaktionskinetik des glykolytischen Gal-Abbaus um ca. 80 %. Daher sind die Zellen auf die ATP-Synthese durch die OXPHOS der Mitochondrien angewiesen.<sup>4</sup> Eine selektive Reduktion des zellulären ATP-Gehaltes in Gal-Medium kann so als Hinweis auf eine mitochondrientoxische Substanzwirkung gewertet werden. Die ATP-Bestimmung erfolgt im Lysat der Zellen über eine Luciferin/Luciferase-Reaktion, wobei das generierte Lumineszenzsignal proportional zur Menge des freigesetzten ATP ist und mit Hilfe eines Luminometers erfasst wird.

**Assay 2** nutzt den Farbstoff JC-10, dessen Fluoreszenzeigenschaften von der Ausprägung des mitochondrialen Membranpotentials (MMP) abhängen. In gesunden und voll energetisierten Zellen akkumuliert der Farbstoff in den Mitochondrien und bildet dort rot-fluoreszierende Aggregate (~590 nm). Bei einem reduzierten MMP, z. B. aufgrund einer mitochondrientoxischen Substanzwirkung, liegt der Farbstoff überwiegend als grün-fluoreszierendes Monomer (~525 nm) im Cytosol der Zellen vor. Eine Reduktion des MMP wird anhand der Abnahme der JC-10-Aggregate durch Fluoreszenzmikroskopie (z. B. High Content Imaging) bestimmt.

**Assay 3** vergleicht die relativen Gehalte von zwei Proteinen der Atmungskette mittels immunocytochemischer Detektion (ICC), wobei ein Protein im Zellkern und das andere auf der DNA des Mitochondriums kodiert ist. Eine behandlungsbedingte Beeinträchtigung der mitochondrialen Transkription oder Translation führt so zu einer relativen Abnahme des mtDNA-kodierten Proteins, die mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert wird.

Die drei Methoden bilden verschiedene Endpunkte mitochondrialer Toxizität ab. Sie unterscheiden sich in den Untersuchungen hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen molekularen Mechanismen mitochondrialer Toxizität. Entkoppler der OXPHOS und Inhibitoren der Atmungskette ließen sich gut mit den ersten beiden Assays erfassen. Inhibitoren der mitochondrialen Proteinbiosynthese und mtDNA-Replikation konnten ausschließlich mit dem dritten Assay detektiert werden.

Alle drei Assays waren in der Lage, zwischen primärer Mitochondrientoxizität und genereller Cytotoxizität zu differenzieren. Eine substanzinduzierte Bildung von ROS in Mitochondrien wurde in keinem der Assays abgebildet. Demnach sind zur Erfassung solcher Wirkungen spezielle Methoden erforderlich.

Aufgrund der ermittelten Selektivität der Assays gegenüber den verschiedenen Mechanismen mitochondrialer Toxizität sollte ein sinnvolles Screening von Wirkstoffkandidaten durch kombinierte Anwendung der Assays erfolgen.

1. Pessayre, D. et al. Hepatotoxicity due to mitochondrial dysfunction. *Cell Biology and Toxicology*. 1999; 15: 367-373
2. Dykens J., Will Y. Drug-induced mitochondrial dysfunction. New York: John Wiley, 2008
3. Hellmund, M. Vergleich verschiedener Methoden zur Detektion mitochondrialer Toxizität *in vitro*. Masterarbeit, Charité-Universitätsmedizin Berlin, 2015

4. Reitzer, L. J. et al. Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. *J Biol Chem.* 1979; 254: 2669-76