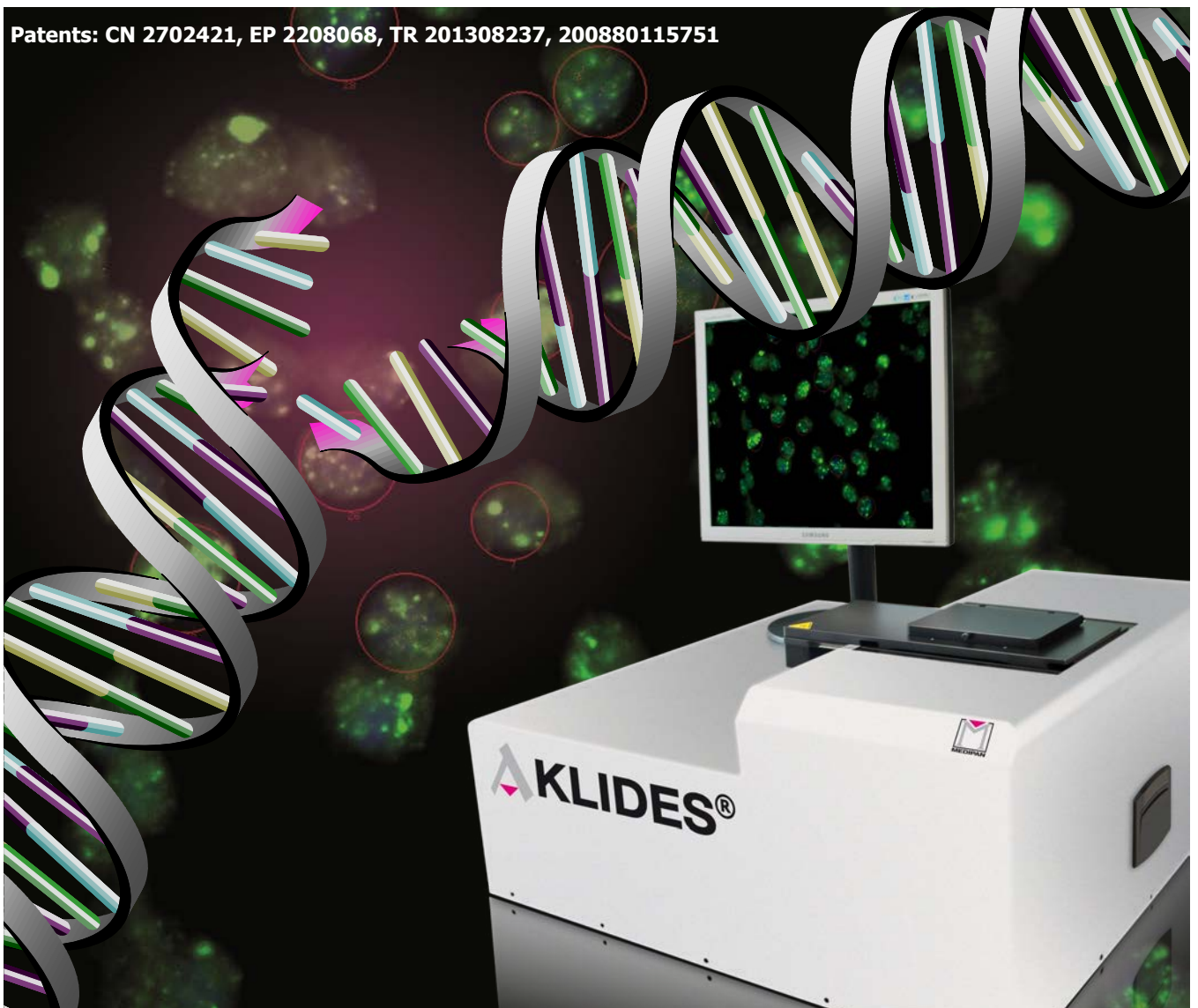
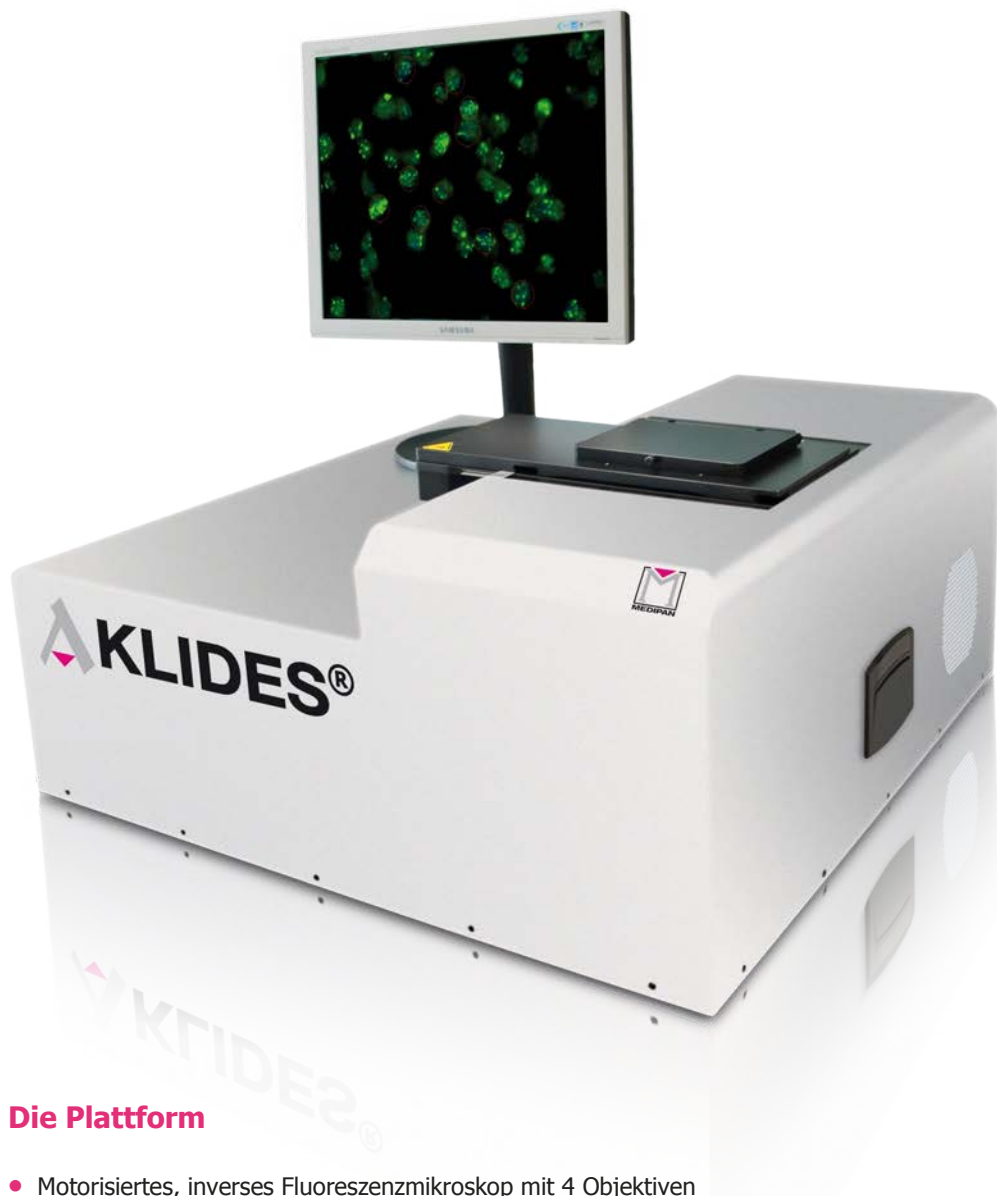


AKLIDES[®] Cell Damage

**Standardisierte und automatische Bestimmung von
DNA Doppelstrangbrüchen mittels Immunfluoreszenz**

Patents: CN 2702421, EP 2208068, TR 201308237, 200880115751



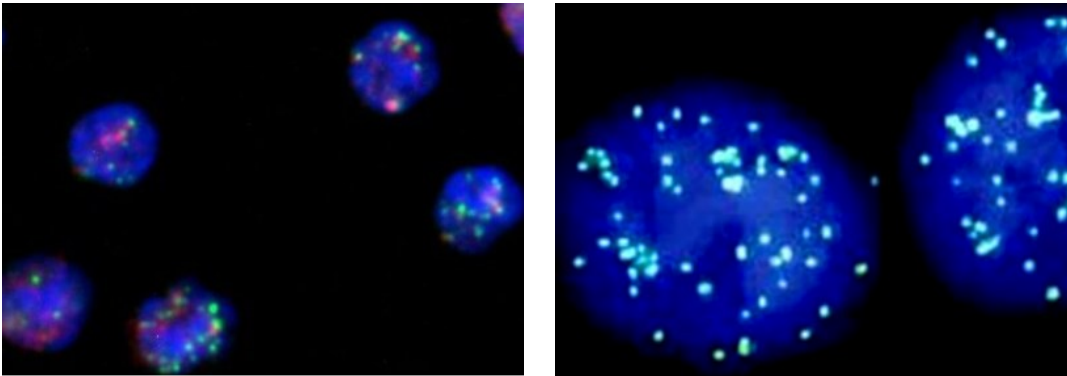


Die Plattform

- Motorisiertes, inverses Fluoreszenzmikroskop mit 4 Objektiven
- Motorisierter x-y Probenstisch für bis zu 5 Objektträger
- LED Lichtquelle (4 Wellenlängen)
- CCD Graustufenkamera
- PC inklusive AKLIDES® Software

Applikationen für γ -H2AX als Biomarker

- Strahlenbiologie / Biodosimetrie
- Beurteilung der individuellen Empfindlichkeit zu Radio- und Chemotherapien
- Autoimmune und altersbedingte Erkrankungen
- Genotoxizität/Medikamentenentwicklung
- Genomintegrität / DNA Reparaturwege



Biomarker der zellulären Stressantwort

Quantitative Bestimmung von DNA Doppelstrangbrüchen (DSB) mittels Immunfluoreszenz

- **Standardisierte und automatische** Bildanalyse zur Bestimmung von DNA Doppelstrangbrüchen
 - **erstmalig** Vergleich von Untersuchungsergebnissen möglich
 - Geeignet für medizinische Screenings
- **Automatische** Bestimmung von Foci mit **verschiedenen** Fluoreszenzfarbstoffen
- **Kombinierte** Bestimmung von Foci mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen zur Bewertung von DNA **Reparaturmechanismen**
- **Modulare** Software zur Auswertung von verschiedenen **Zelllinien** und humanen Lymphozyten

Vorteile der automatischen Auswertung

- Standardisierte und vergleichbare Ergebnisse zwischen Geräten durch Intensitätskalibrierung der LED Lichtquelle
- Standardisierte Ergebnisse von Proben durch neuartige Mikrobead-basierte Reaktionskontrolle
- Integrierte Dunkelkammer
- Detaillierte Ergebnisse durch Ausgabe von folgenden Parametern:
 - Anzahl der gemessenen Zellen
 - Anzahl der Zellen mit Foci
 - Durchschnittliche Anzahl der Foci pro Zelle
 - Mittlere Foci-Intensität
 - Prozentualer Anteil der Zellen mit Foci = gesamte Zellschädigung
 - Durchschnittliche Durchmesser der Foci und Zellen
- Probenspezifische Reports im pdf- und xls- Format
- Datenbank und Archivierung der Ergebnisse
- Messung von 100 Zellen in 8 Minuten
- 5fach schnellere Analysezeit verglichen zur manuellen Auswertung
- Zeit-, personal- und kosteneffiziente Auswertung

Wissenschaftlicher Hintergrund

DNA-Schäden wie DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) können nach Behandlung mit ionisierender Strahlung oder mutagenen Substanzen wie Zytostatika beobachtet werden. Zellen sind in der Lage, diese Schäden zu erkennen und zu reparieren. Die DNA-Reparaturmechanismen arbeiten in der Regel fehlerfrei, so dass keine Konsequenzen für die Zellen entstehen. Jedoch können exzessive DNA-Schäden zu Zelltod oder sogar zu einer onkogenen Transformation der Zelle führen. Die Kenntnisse über die Entstehung und vor allem die Reparatur dieser Schäden sind eine wichtige Voraussetzung für die Vermeidung von krankhaften Veränderungen als auch für die optimale Anwendung der ionisierenden Strahlen in Medizin und Technik.

DNA-Doppelstrangbrüche werden in der Zelle sehr schnell erkannt. Hierfür ist primär die Kinase Ataxia teleangiectasia mutated (ATM) verant-

wortlich. Die Phosphorylierung des Serins 139 des Histons H2AX lässt das γ -H2AX entstehen. Das p53 bindende Protein 53BP1 bindet an das phosphorylierte H2AX (γ -H2AX) und reguliert die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen.

Mit Hilfe geeigneter Antikörper können γ -H2AX und 53BP1 markiert werden, so dass mittels sekundärer Fluorochrom-markierter Antikörper einzelne Doppelstrangbrüche nachgewiesen werden können (Abbildung 1). Das erhaltene Fluoreszenzsignal wird in Form eines Focus (Bildpunkt) sichtbar. Sowohl γ -H2AX als auch 53BP1 bilden Foci, die zu einem gewissen Grad kolokalisieren.

Nach Bestrahlung oder Behandlung von Zellen mit genotoxischen Substanzen können dosisabhängig erhöhte Fociwerte gemessen werden (Abbildung 2).

Abbildung 1:
Schematische Darstellung eines DSB-Nachweises über γ -H2AX Foci mittels Immunfluoreszenz.

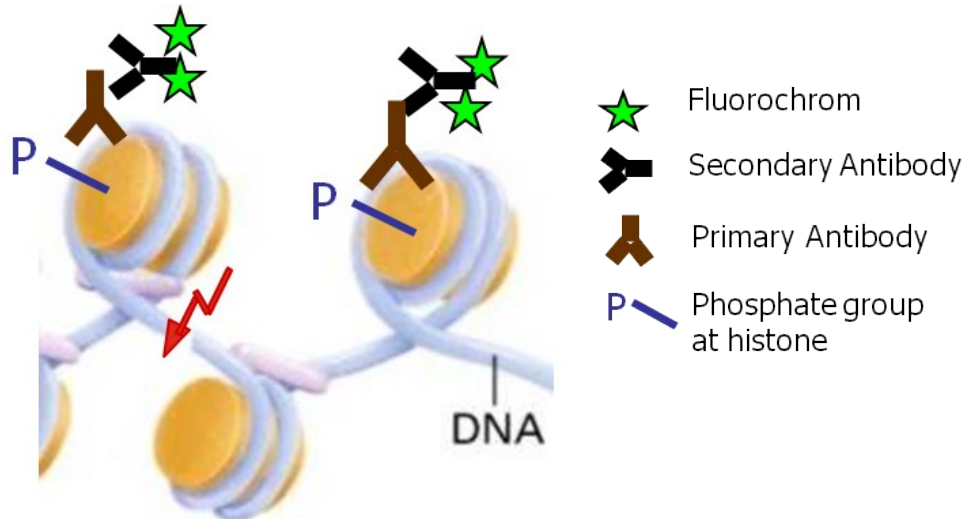
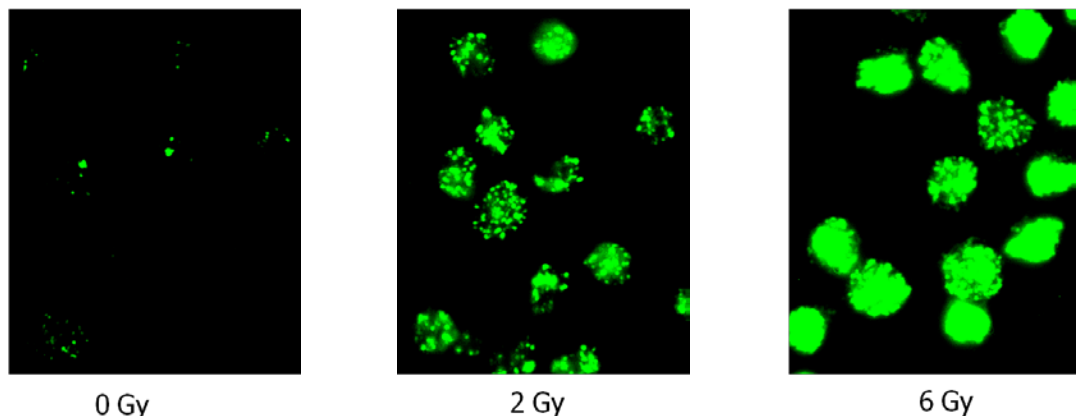


Abbildung 2:
Dosis-Wirkungskurve von γ -H2AX Foci in humanen Zellen nach Bestrahlung (Runge et al. Int J Radiat Biol, May 2012; 88 (5): 439-447)



Die Analyse von γ -H2AX Foci ist ein etablierter Marker zur Bestimmung von DNA Doppelstrangbrüchen und damit der Zellschädigung. DNA-Reparaturmechanismen können dagegen über den Anteil am p53 bindenden Protein 53BP1 beurteilt werden. Kombiniert man die Analyse von γ -H2AX und 53BP1 sowie deren Kolo-kalisation kann die Reparaturkapazität der Zelle eingeschätzt werden (Abbildung 3).

Die quantitative Bestimmung von Foci mittels Immunfluoreszenz ist eine sehr sensitive Methode, mit der sowohl Einzelzellen als auch einzelne Foci beurteilt werden können. Diese Parameter können vollautomatisch mit der AKLIDES® Nuk Software gemessen werden.

Individuelle Unterschiede in der Reparaturfähigkeit sowie Reparaturdefekte können anhand von Unterschieden in der Reparaturkinetik nachgewiesen werden. Nach Bestrahlung von Zellen zeigt sich zunächst ein steiler Anstieg in der Anzahl der γ -H2AX Foci gefolgt von einem kontinuierlichen Abfall zurück zum Normalwert (Abbildung 4). Im Vergleich dazu zeigen Zellen mit defekten DNA-Reparaturmechanismen auch nach 24 Stunden noch erhöhte Fociwerte.

Dieser Ansatz kann auch zur Untersuchung von genotoxischen Substanzen verwendet werden. DNA-Schäden und DNA-Reparaturkapazität von Zellen werden in verschiedenen Applikationsgebieten sowohl in der Grundlagenforschung als auch in der Klinik gemessen.

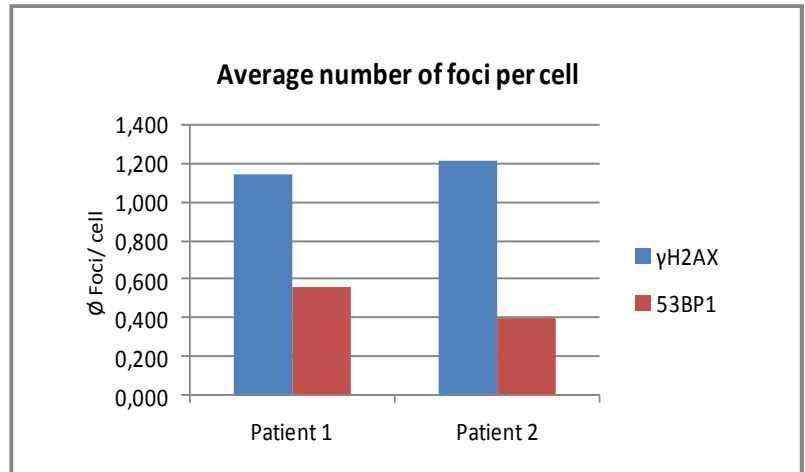


Abbildung 3: Kombinierte Messung von γ -H2AX und 53BP1 Foci

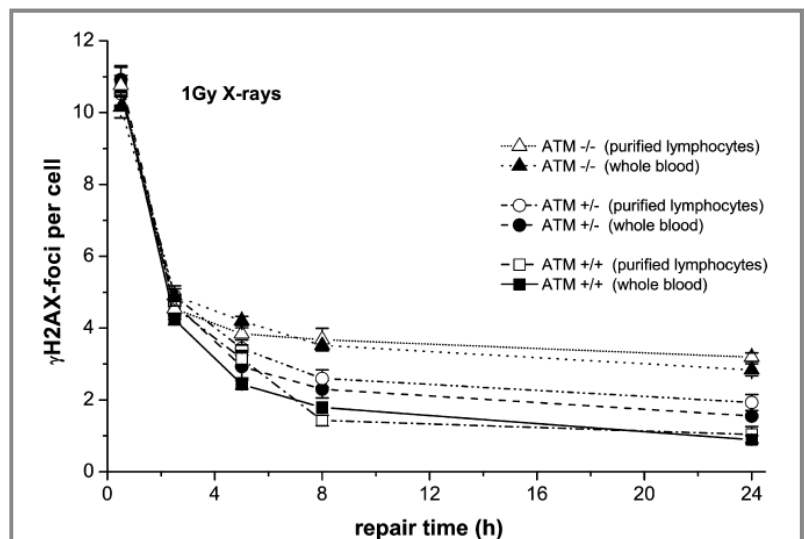


Abbildung 4: Kinetik der γ -H2AX Foci von Krebspatienten nach Bestrahlung mit 1 Gy (Rübe et al., Int J Radiat Oncol Phys 2010 Oct 1; 78 (2): 359-69)

References

- (1) Rübe CE, Fricke A, Schneider R, Simon K, Kuhne M, Fleckenstein J, et al. DNA repair alterations in children with pediatric malignancies: novel opportunities to identify patients at risk for high-grade toxicities. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010 Oct 1;78(2):359-69.
- (2) Runge R, Hiemann R, Wendisch M, Kasten-Pisula U, Storch K, Zöphel K, Fritz C, Roggenbuck D, Wunderlich G, Conrad K, Kotzerke J. Fully automated interpretation of ionizing radiation-induced γ H2AX foci by the novel pattern recognition system AKLIDES®. *Int J Radiat Biol.* 2012 May;88(5):439-47.
- (3) Schmid TE, Zlobinskaya O, Multhoff G. Differences in Phosphorylated Histone H2AX Foci Formation and Removal of Cells Exposed to Low and High Linear Energy Transfer Radiation. *Curr Genomics* 2012 Sep;13(6):418-25.
- (4) Valdiglesias V, Giunta S, Fenech M, Neri M, Bonassi S. γ H2AX as a marker of DNA double strand breaks and genomic instability in human population studies. *Mutat Res* 2013 Jul;753(1):24-40.
- (5) Willitzki A, Lorenz S, Hiemann R, Guttek K, Goihl A, Hartig R, et al. Fully automated analysis of chemically induced γ H2AX foci in human peripheral blood mononuclear cells by indirect immunofluorescence. *Cytometry A* 2013 Nov;83(11):1017-26.
- (6) Reddig A, Lorenz S, Hiemann R, Guttek K, Hartig R, Heiserich L, Eberle C, Peters V, Schierack P, Sack U, Roggenbuck D, Reinhold D. Assessment of Modulated Cytostatic Drug Resistance by Automated γ H2AX Analysis. *Cytometry Part A* 2015 Aug;87A:724-732.
- (7) Reddig A, Fatahi M, Friebe B, Guttek K, Hartig R, Godenschweger F, Roggenbuck D, Rieke J, Reinhold D, Speck O. Analysis of DNA Double-Strand Breaks and Cytotoxicity after 7 Tesla Magnetic Resonance Imaging of Isolated Human Lymphocytes. *PLOS ONE* | DOI:10.1371/journal.pone.0132702 July 15, 2015.

Das Softwaremodul leistet eine vollautomatische Auswertung

Automatische Focussierung und Zellidentifikation werden mit 60facher Vergrößerung im DAPI-Kanal vorgenommen (Abbildung 5A).

Die sensitive Erfassung des γ -H2AX Fluoreszenzsignals im grünen FITC-Kanal erfolgt in mehreren z-Ebenen (Abbildung 5B). Das gleiche gilt für die Messung von 53BP1 im roten APC-Kanal.

Zur **automatischen Analyse** werden die Signale des DAPI-, FITC- und APC-Kanals übereinander gelegt. Die angewendeten Algorithmen erstellen eine 3-dimensionale Matrix aus den x, y und z Koordinaten detektierter Foci.

Jeder Foci wird mit Detailparametern wie Größe und Intensität beschrieben.

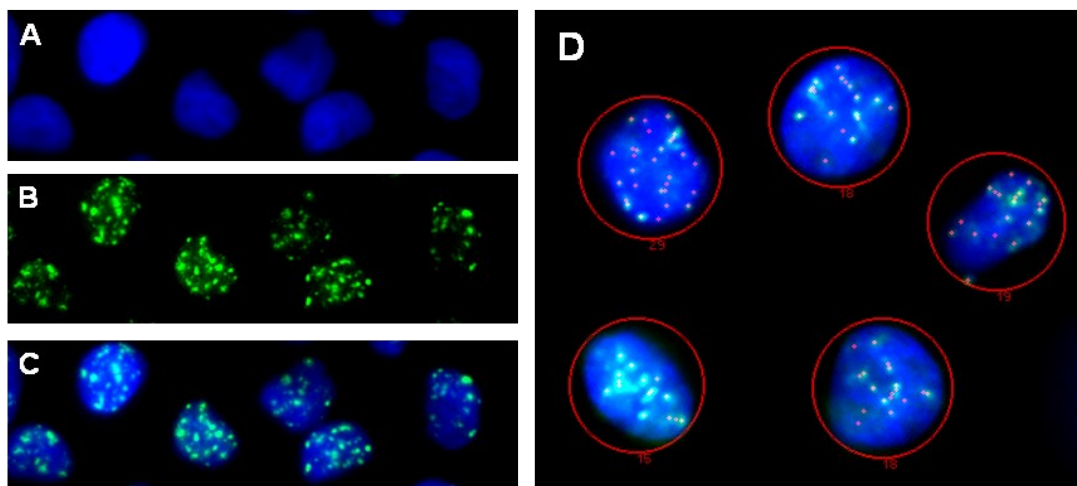
Abbildung 5:
Messung der initialen Foci von PC Cl3 Schilddrüsenzellen bestrahlt mit 1 Gy ^{188}Re .

A: Fokussierung und Zellidentifikation im DAPI-Kanal.

B: Erfassung des Fluoreszenzsignals im FITC-Kanal.

C: Überlagerung beider Fluoreszenzsignale.

D: Analyse der Fociparameter (Runge et al., Int J Radiat Biol, May 2012; 88 (5): 439-447).



Vergrößerter Messbereich der Focibewertung

Durch die automatische Analyse der Foci mit der AKLIDES® Nuk Software vergrößert sich der Messbereich der Methode. In einem Vergleich zwischen manueller und automatischer Auswertung der Foci in PC Cl3 Schilddrüsenzellen zeigt sich eine Limitierung des Messbereichs der manuellen Auswertung ab 6 Gy (Abbildung 6A), während die automatische Zählung der Foci bis 8 Gy möglich ist (Abbildung 6B). Der Messbereich kann unter Berücksichtigung der Intensität sogar auf 10 Gy erweitert werden (Abbildung 6C).

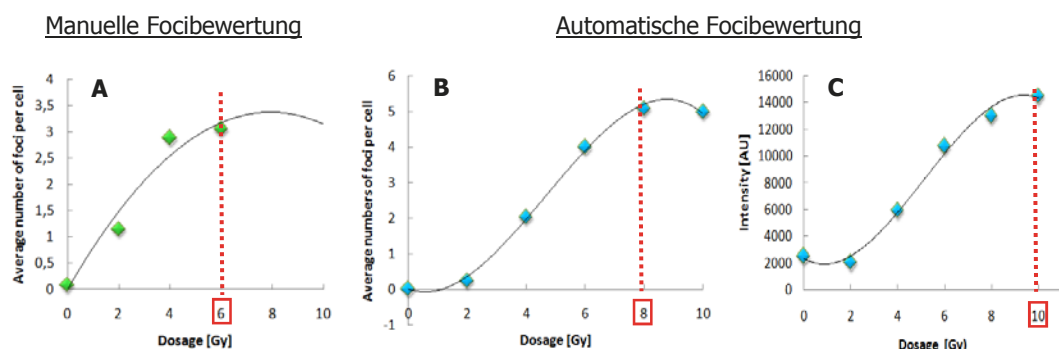


Abbildung 6: Dosis-Wirkungskurven manuell und automatisch ausgewerteter bestrahlter PC PI3 Zellen.

A: Durchschnittliche Anzahl Foci pro Zelle manuell ausgewertet.

B: Durchschnittliche Anzahl Foci pro Zelle automatisch mit AKLIDES® ausgewertet.

C: Gesamtintensität der Foci analysiert mit dem AKLIDES®.

Standardisierte Ergebnisse mittels integrierter Reaktionskontrolle und Intensitätskalibrierung der Geräte

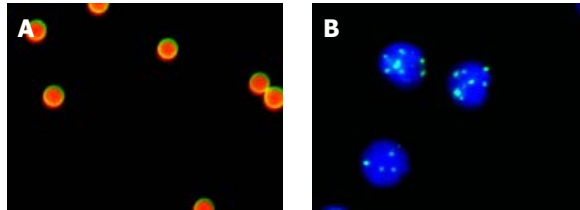
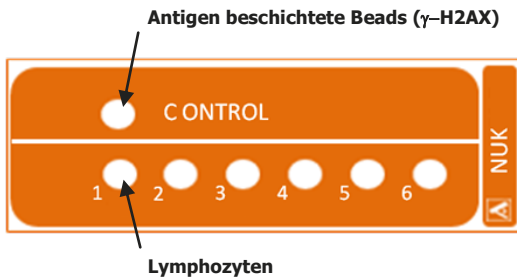


Abbildung 7: Färbeunterschiede zwischen Ansätzen können durch eine integrierte Reaktionskontrolle angepasst werden.
A: Antigen beschichtete Mikropartikel
B: Bestrahlte Lymphozyten

Die Immunfluoreszenzfärbung der Reaktionskontrolle und der Lymphozyten werden auf einem Objektträger durchgeführt, so dass Färbeunterschiede zwischen unterschiedlichen Färbeansätzen angepasst werden können. γ -H2AX beschichtete Mikropartikel dienen als Reaktionskontrolle, die Intensitäten in einem definierten Bereich erzeugen. In Kombination mit der Intensitätskalibrierung der LED Lichtquelle werden standardisierte und zuverlässige Ergebnisse für diesen Parameter erzeugt. Das bedeutet, dass erstmalig der Vergleich von Untersuchungsergebnissen weltweiter Studien möglich ist. Dies ist ein wichtiger Schritt für die klinische Evaluierung von γ -H2AX.

Archivierung und Ergebnisreport

Information über Test und Objektträger, Datum und Institut

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|---|--|-----|-------------------------|--|--|-------------------------|--|--|-------------------------|--|--|-------------------------|--|--|
| | Test OT: OT1 | Lot: | 1/2 | | | | | | | | | | | | |
| Test: 8006_LYMPHO_6_Slide Report date: 2013-07-19 Institute: Medipan GmbH Design: Overall review: | <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">1 ID: NC (CI)</td> <td style="font-size: x-small;"> Result: + (gH2AX) + (53BP1) cells [n]: 110.000 110.000 Int [AU]: 26.673 23.845 foci mvr: 0.273 0.500 foci all [n]: 30.000 55.000 </td> <td style="font-size: x-small;"> cells with foci [n]: 16.000 40.000 damaged cells [%]: 14.545 36.364 cell dia [µm]: 6.377 6.377 foci dia [µm]: 0.256 0.294 </td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">2 ID: NC (CI)</td> <td style="font-size: x-small;"> Result: + (gH2AX) + (53BP1) cells [n]: 101.000 101.000 Int [AU]: 29.242 21.994 foci mvr: 0.248 0.574 foci all [n]: 25.000 58.000 </td> <td style="font-size: x-small;"> cells with foci [n]: 18.000 43.000 damaged cells [%]: 17.822 42.574 cell dia [µm]: 6.108 6.108 foci dia [µm]: 0.266 0.303 </td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">3 ID: NC (CI)</td> <td style="font-size: x-small;"> Result: + (gH2AX) + (53BP1) cells [n]: 100.000 100.000 Int [AU]: 27.573 19.076 foci mvr: 0.240 0.400 foci all [n]: 24.000 40.000 </td> <td style="font-size: x-small;"> cells with foci [n]: 14.000 30.000 damaged cells [%]: 14.000 30.000 cell dia [µm]: 6.183 6.183 foci dia [µm]: 0.284 0.286 </td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">4 ID: 100 ETP</td> <td style="font-size: x-small;"> Result: + (gH2AX) + (53BP1) cells [n]: 103.000 103.000 Int [AU]: 59.696 21.400 foci mvr: 3.981 1.738 foci all [n]: 410.000 179.000 </td> <td style="font-size: x-small;"> cells with foci [n]: 89.000 88.000 damaged cells [%]: 86.408 85.437 cell dia [µm]: 6.384 6.384 foci dia [µm]: 0.309 0.317 </td> </tr> </table> | | | 1 ID: NC (CI) | Result: + (gH2AX) + (53BP1) cells [n]: 110.000 110.000 Int [AU]: 26.673 23.845 foci mvr: 0.273 0.500 foci all [n]: 30.000 55.000 | cells with foci [n]: 16.000 40.000 damaged cells [%]: 14.545 36.364 cell dia [µm]: 6.377 6.377 foci dia [µm]: 0.256 0.294 | 2 ID: NC (CI) | Result: + (gH2AX) + (53BP1) cells [n]: 101.000 101.000 Int [AU]: 29.242 21.994 foci mvr: 0.248 0.574 foci all [n]: 25.000 58.000 | cells with foci [n]: 18.000 43.000 damaged cells [%]: 17.822 42.574 cell dia [µm]: 6.108 6.108 foci dia [µm]: 0.266 0.303 | 3 ID: NC (CI) | Result: + (gH2AX) + (53BP1) cells [n]: 100.000 100.000 Int [AU]: 27.573 19.076 foci mvr: 0.240 0.400 foci all [n]: 24.000 40.000 | cells with foci [n]: 14.000 30.000 damaged cells [%]: 14.000 30.000 cell dia [µm]: 6.183 6.183 foci dia [µm]: 0.284 0.286 | 4 ID: 100 ETP | Result: + (gH2AX) + (53BP1) cells [n]: 103.000 103.000 Int [AU]: 59.696 21.400 foci mvr: 3.981 1.738 foci all [n]: 410.000 179.000 | cells with foci [n]: 89.000 88.000 damaged cells [%]: 86.408 85.437 cell dia [µm]: 6.384 6.384 foci dia [µm]: 0.309 0.317 |
| 1 ID: NC (CI) | Result: + (gH2AX) + (53BP1) cells [n]: 110.000 110.000 Int [AU]: 26.673 23.845 foci mvr: 0.273 0.500 foci all [n]: 30.000 55.000 | cells with foci [n]: 16.000 40.000 damaged cells [%]: 14.545 36.364 cell dia [µm]: 6.377 6.377 foci dia [µm]: 0.256 0.294 | | | | | | | | | | | | | |
| 2 ID: NC (CI) | Result: + (gH2AX) + (53BP1) cells [n]: 101.000 101.000 Int [AU]: 29.242 21.994 foci mvr: 0.248 0.574 foci all [n]: 25.000 58.000 | cells with foci [n]: 18.000 43.000 damaged cells [%]: 17.822 42.574 cell dia [µm]: 6.108 6.108 foci dia [µm]: 0.266 0.303 | | | | | | | | | | | | | |
| 3 ID: NC (CI) | Result: + (gH2AX) + (53BP1) cells [n]: 100.000 100.000 Int [AU]: 27.573 19.076 foci mvr: 0.240 0.400 foci all [n]: 24.000 40.000 | cells with foci [n]: 14.000 30.000 damaged cells [%]: 14.000 30.000 cell dia [µm]: 6.183 6.183 foci dia [µm]: 0.284 0.286 | | | | | | | | | | | | | |
| 4 ID: 100 ETP | Result: + (gH2AX) + (53BP1) cells [n]: 103.000 103.000 Int [AU]: 59.696 21.400 foci mvr: 3.981 1.738 foci all [n]: 410.000 179.000 | cells with foci [n]: 89.000 88.000 damaged cells [%]: 86.408 85.437 cell dia [µm]: 6.384 6.384 foci dia [µm]: 0.309 0.317 | | | | | | | | | | | | | |

Projektname, Objektträger- und Chargennummer

Ergebnisparameter der Probe bzw. Auftragsstelle



Die Detailansicht eines Ergebnisreports zeigt die Informationsangaben, die eine Archivierung und Anlage einer Ergebnisdatenbank ermöglichen.

Übersicht Teste

AKLIDES®Nuk* Human Lymphocyte Complete

Bestellnummer 4162

- Enthält alle Reagenzien zum Nachweis von γ -H2AX Foci
- 10 Objektträger für 30 Doppel- oder 60 Einzelbestimmungen

AKLIDES®Nuk* Human Lymphocyte Complete Combi

Bestellnummer 4268

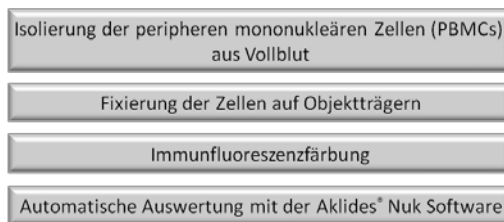
- Enthält alle Reagenzien zum gleichzeitigen Nachweis von γ -H2AX und 53BP1 Foci
- 10 Objektträger für 30 Doppel- oder 60 Einzelbestimmungen

AKLIDES®Nuk* Human Lymphocyte Isolation

Bestellnummer 4278

- Enthält alle Reagenzien zur Isolierung von PBMCs aus Vollblut
- 10 Objektträger für 30 Doppel- oder 60 Einzelbestimmungen

Alle Teste enthalten ein standardisiertes Protokoll zur Isolierung von Lymphozyten und zum Nachweis von Foci



⇒ Eine MTA kann in 8 Stunden 5 Patientenproben abarbeiten

Lagerung von Lymphozyten

- Sofortige Abarbeitung von mindestens 3 ml Venenblut aus einem 6 ml EDTA Röhrchen
- Lagerung von fixierten Lymphozyten ist wie folgt möglich:
 - Fixierung von Lymphozyten auf dem Objektträger und Lagerung bei 4 °C
 - Einfrieren von Lymphozyten in einem Spezialmedium und Lagerung in flüssigem Stickstoff

Servicebestimmung

Isolierte und auf Objektträgern fixierte Lymphozyten können zur Analyse an die MEDIPAN GMBH geschickt werden.

* Nuk = nuclear cell damage