

Mit zellbiologischen Methoden Umweltschadstoffen auf der Spur

Ulrike Kammann (Hamburg)

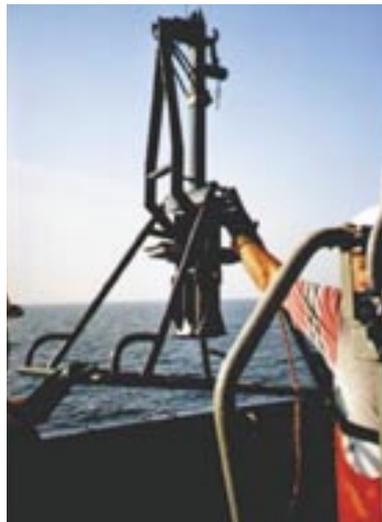
Mit toxikologischen Methoden können Schadstoffe mit erbgutschädigender Wirkung aus der Umwelt untersucht werden. Im Rahmen eines neuen Forschungsprojektes, an dem sich die Bundesforschungsanstalt für Fischerei (BFAFi) beteiligt, wird ein *in-vitro*-Modell mit Fischzellen eingesetzt, das es ermöglicht, den schädlichen Substanzen in marinen Sedimenten auf die Spur zu kommen. Bei dem verwendeten Test (Comet Assay) werden DNA-Fragmente unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. So kann die toxische Wirkung aller in der Probe vorhandenen Stoffe gemeinsam erfasst werden, auch wenn diese Stoffe nicht im einzelnen bekannt sind.

Sedimente

Weil sich Schadstoffe an Schwebteilchen binden, und diese im Meer irgendwann als Sediment zu Boden sinken, sind Sedimente das "Schadstoffdepot" der Meere. Viele Tiere leben im oder auf dem Meeresgrund und stehen daher in direktem Kontakt mit dem Sediment. Das toxische Potential der sedimentgebundenen Schadstoffe ist für bodenlebende Fische und das gesamte marine Ökosystem von Bedeutung und wird daher von der Bundesforschungsanstalt für Fischerei untersucht.

Biologische Effekte

Die Mischung der Schadstoffe in der Nordsee und anderen Meeren ist unüberschaubar und vielfältig. Gezielte chemische Analytik einzelner Substanzen kann immer nur einen kleinen Ausschnitt dieser Mischung erfassen. Entscheidend für die „Gesundheit“ des Fisches ist aber das Zusammenwirken aller Einzelstoffe (und vieler anderer Faktoren) auf den Organismus. Die Wechselwirkungen zwischen Schadstoffen und lebender Natur sind äußerst kompliziert und nur unvollständig bekannt. Es gilt Messgrößen zu suchen,



Kastengreifer bei der Sedimentprobenahme auf See

die eine „Antwort“ des biologischen Systems auf ein komplexes Schadstoffgemisch geben, um mögliche Gefahren frühzeitig zu erkennen. Biochemische Messgrößen sind für diesen Zweck besonders geeignet, weil die Zeit zwischen Ursache (Schadstoff) und Wirkung (biologischer Effekt) kurz ist, und man somit eine schnelle und oftmals auch empfindliche Antwort erhält. Biologische Effekte können *in vivo* (am lebenden Tier) und *in vitro* (im künstlichen System) untersucht werden.

Methode gesucht

Gesucht wurde ein Verfahren, mit dem die toxische Wirkung von Schadstoffen aus marinen Sedimenten erkannt werden kann. Besonderes Augenmerk liegt dabei auf erbgutschädigenden Substanzen, die bei Fischen wie bei Menschen zu Krankheiten führen können, wie beispielsweise zur Bildung eines Tumors. Bevor es zur permanenten Schädigung in der Erbsubstanz (DNA) kommt, entstehen oft reversible Schäden in der DNA, zum Beispiel Strangbrüche.

Ein Verfahren, mit dem sich solche Effekte sichtbar machen lassen, ist unter dem Namen „Comet Assay“ bekannt geworden. Dieser Test wurde am Institut für Fischereiökologie der BFAFi an die hier zu untersuchenden Fragestellungen angepasst.

In vitro Test mit Fischzellen

Für den Comet Assay werden die Extrakte aus Nordseesedimenten *in vitro* mit Fischzellen gemischt. Nach der Inkubationszeit von zwei Stunden werden die Zellen in ein Agarosegel auf einem Objektträger fixiert. Es folgen eine Auflösung der Zellwände, um die Zellkerne mit der sie enthaltenden DNA freizulegen, und das Aufwinden der normalerweise eng geknäulten DNA-Doppelhelix unter alkalischen Bedingungen. Anschließend werden die Zellen in ein elektrisches Feld gebracht, in dem die negativ geladene DNA aus dem Kern heraus wandern kann.

Ist die DNA intakt, verbleibt sie innerhalb des Kerns, da die langen Stränge nicht durch die relativ kleinen Poren der Kernwand passen. Liegt sie in Bruchstücken vor, so wandern diese aus dem

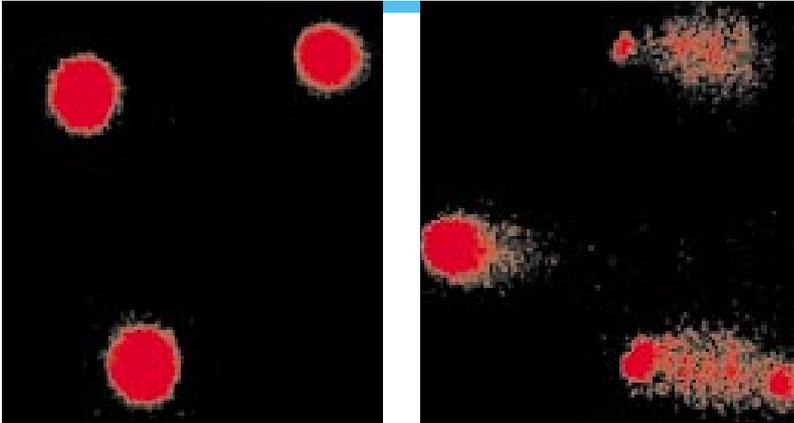


Abb. 1: Zellkern nach Behandlung im Comet-Assay (fluoreszenz-mikroskopisches Bild). Links: ungeschädigte Zellen; rechts: geschädigte Zellen

Zellkern heraus. Dabei ist die im elektrischen Feld zurückgelegte Strecke abhängig vom Grad der Fragmentierung. Geschädigte Zellen sehen unter dem Fluoreszenzmikroskop aus wie kleine Kometen (Abb. 1), daher auch die englische Bezeichnung 'Comet Assay'. Anhand der Größe des Kometenschweifes lässt sich eine Auswertung direkt am Mikroskop vornehmen.

Es können praktisch alle Zellarten, die einen Kern enthalten, für den Comet Assay eingesetzt werden. In unserem Labor wird dafür eine permanente Fischzelllinie verwendet. Dadurch kann auf Material von lebenden Tieren verzichtet werden. Die so genannten EPC-Zellen (*Epitheloma papulosum cyprini*, aus Karpfenhaut) haben, wie viele andere permanente Kulturen, keine nennenswerte Stoffwechsellaktivität, im Gegensatz zum Beispiel zu frisch isolierten Leberzellen. Wir haben daher die Zellen mit aus Fischen isolierten Enzymsystemen ergänzt, um den Schadstoffmetabolismus zu simulieren. Das Ziel ist, eine Reihe von Sedimentproben zeitsparend zu untersuchen und erbgutschädigendes Potential in den Sedimenten zu erkennen – und das ohne die Verwendung von Versuchstieren.

Als Modell geeignet?

Eine Zelle im Labor ist natürlich etwas anderes als der Fisch im Meer. Und es ist auch nicht möglich, direkte Vorhersagen über die Situation im Meer aufgrund der im Labor beobachteten Veränderungen auf zellulärer Ebene zu machen. Trotzdem haben Zellkulturen einen festen Platz in der Toxikologie, weil sie schnell und einfach eingesetzt werden können. Ein möglichst kontrollierbares und reproduzierbar arbeitendes System, wie es ein *in vitro* Test darstellt, kann bei komplexen toxikologischen Problemen helfen, grundlegende Fragen zu klären, und daher von entscheidendem Vorteil sein.

Unser Testsystem, mit dem Extrakte aus marinen Sedimentproben untersucht werden, erfasst den 'schlimmsten Fall', in dem alle sedimentgebundenen Schadstoffe gemeinsam auf die schutzlose Zelle einwirken können. Da das nicht der Situation in der Natur entspricht, müssen weitere Schritte, zum Beispiel Bioverfügbarkeitsstudien für die verdächtigen Substanzen folgen, um das Modell der Natur weiter anzunähern.

Neues Forschungsprojekt

Dieses sind erste Schritte innerhalb eines neuen, vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Verbundvorhabens, an dem neben der Bundesforschungsanstalt für Fischerei die Universität Hamburg sowie das Bundesamt für Seeschifffahrt und Hydrographie beteiligt sind.

Im Projekt sollen chemisch-identifizierende Analytik und Biotests an marinen Sedimentextrakten so kombiniert werden, dass die Ergebnisse der Biotests die chemische Analytik leiten. Die Suche nach einem möglichen Zusammenhang zwischen sedimentgebundenen Schadstoffen und biologischen Effekten steht dabei im Vordergrund.

Die Aufgabe der Bundesforschungsanstalt für Fischerei besteht in der Entwicklung und Anwendung einer Reihe von Biotestsystemen zur Erfassung der verschiedenen spezifischen Wirkungen der Schadstoffe.

Mit dem Comet Assay steht bereits ein Testsystem zur Verfügung, mit dem eine erbgutschädigende Wirkung aufgedeckt werden kann.

Weitere Systeme sollen die Cytotoxizität (zellschädigende Wirkung), Neurotoxizität (nervenschädigende Wirkung) und Embryotoxizität erfassen. ■

Dr. Ulrike Kammann, Bundesforschungsanstalt für Fischerei, Institut für Fischereiökologie, Wüstland 2, 22589 Hamburg



Arbeit am Fluoreszenz-Mikroskop



Zellkulturen im Brutschrank