

FISCH UND UMWELT

Toxische Wirkung von Schadstoffen auf Fischzellen Bestimmung von DNA-Strangbrüchen mit dem Comet-Assay

Ulrike Kammann, Institut für Fischereiökologie

Eine ständig steigende Zahl von chemischen Verbindungen belastet die marine Umwelt. Die Frage nach der toxischen Wirkung dieser Stoffe ist nur ansatzweise geklärt, da Effekte von Schadstoffen auf freilebende Organismen oft schwer festzustellen sind. Manche Effekte, wie die verminderte Reproduktionsfähigkeit einer Population können lange Zeit brauchen, vielleicht Jahre, um sich zu manifestieren. Wenn der Effekt am Ende klar und unübersehbar wird, ist der Prozeß möglicherweise schon weit fortgeschritten und eine Beeinflussung entsprechend schwierig. Solche Szenarien haben die Entwicklung von Frühwarnsystemen ange-regt, die Effekte von Umweltchemikalien auf Organismen schon dann zeigen sollen, wenn diese auf molekularer oder zellulärer Ebene nachweisbar sind. Diese frühen Warnsignale können sowohl an gesamten Organismen (Biomarker) untersucht werden, als auch an einzelnen Zellen (*in vitro* Bioassay).

Ein Beispiel für die Wirkung von Schadstoffen auf Zellen oder Organismen ist die Genotoxizität. Das ist die Wirkung auf die Erbinformation der Zelle, die DNA, die sich in nahezu jeder Körperzelle befindet.

Genotoxische Wirkung

Ist ein Organismus genotoxischen Stoffen ausgesetzt, so kann nacheinander eine Reihe von Reaktionen ausgelöst werden:

1. Es entstehen strukturelle Änderungen in der DNA wie z.B. Strangbrüche.
2. Zelleigene Reparaturmechanismen reparieren die entstandenen Schäden.
3. Ist der Schaden an der DNA zu groß, beginnt die Zelle ihr Selbstzerstörungsprogramm (Apoptose).
4. Wenn die Schutzmechanismen der Zelle versagen, entsteht eine Mutation.
5. Mutationen können schließlich zu Krankheiten führen.

Prinzip und Anwendungen des Comet-Assay

Die genotoxische Wirkung von Umweltschadstoffen auf Organismen oder Zellkulturen kann mit verschiedenen Testsystemen überprüft werden. Ein Beispiel dafür ist der Comet-Assay, der zur Untersuchung von DNA-Schäden einzelner Zellen nach *in-vivo*- oder *in-vitro*-Exposition eingesetzt werden kann. Mit dem Comet-Assay wird die Wanderung von DNA im elektrischen

Feld aus dem Zellkern nach alkalischer Behandlung bestimmt. Der Anteil der aus dem Kern wandernden DNA bzw. die dabei zurückgelegte Strecke ist abhängig von der DNA-Fragmentierung. Der Comet-Assay bietet sich an, um die genotoxische Wirkung von Schadstoffen in Fischblut zu ermitteln. Seit ihrer Einführung im Jahr 1988 ist die Methode als eine schnelle, einfache und empfindliche Technik anerkannt. Sie fand unter anderem Anwendung für den Bestrahlungsnachweis von Lebensmitteln (Cerde 1997), DNA-Schädigungs- und -reparaturuntersuchungen (Tice 1995) sowie für die Messung der Genotoxizität von einzelnen Chemikalien (Belpaeme et al. 1996). In jüngeren Untersuchungen wurde der Comet-Assay auch im Monitoringbereich zur Erfassung von DNA-Strangbrüchen in Fischen eingesetzt (Pandrangi et al. 1995; Tice 1995; Deveaux et al. 1997). Genotoxizität kann auch mit verschiedenen

Toxic Effect of Contaminants on Fish Cells - Determination of DNA Strand Breaks with the Comet Assay

The alkaline comet assay is a method of detecting DNA strand breaks and alkali labile sites in individual cells. The method was used to detect DNA strand breaks in isolated blood cells (leukocytes) of carp (*Cyprinus carpio*). DNA damage have been induced by exposure of the cells to sediment extract. Therefore comet assay can be applied as *in vitro* bioassay for investigations on toxicity of marine sediments.

anderen Techniken bestimmt werden. Einige dieser Methoden wurden bereits erfolgreich an Fischen erprobt (Gagné und Blaise 1995). Der Comet-Assay stellt eine alternative Methode dar, deren Vorteile die geringe benötigte Probenmenge und die Erfassung einzelner Zellen sind.

Eine Möglichkeit, den Comet-Assay einzusetzen, ist ein *in-vitro*-Toxizitätstest z.B. von Sedimentextrakten. Damit wird der Comet-Assay als Bioassay eingesetzt mit dem Ziel, das genotoxische Potential von Sedimentextrakten zu untersuchen. Ein Vorteil dieser Herangehensweise ist, daß auch Fraktionen der Extrakte für den Test eingesetzt werden können. Es besteht damit prinzipiell die Möglichkeit, die für den Effekt verantwortlichen Substanzen einzugrenzen oder zu identifizieren.

Material und Methoden

Leukozyten wurden aus einer kleinen Menge frisch entnommenen Karpfenblutes (200 µl) nach der Methode von Singh et al. (1994) isoliert. Danach wurden die Zellen in physiologischem Medium resuspendiert und für die Expositionsversuche mit Sedimentextrakten inkubiert. Die Sedimentextrakte wurden durch Extraktion von 5 g Sediment mit 10 ml Dichlormethan über 30 min im Ultraschallbad hergestellt und in Dimethylsulfoxid überführt.

Der Comet-Assay wurde nach dem von Singh (1988) beschriebenen Protokoll mit kleinen Änderungen durchgeführt: Suspensierte Zellen werden in eine Agarose-schicht auf einem beschichteten Objektträger fixiert. Die

Zellwände werden mit hoher Salzkonzentration und Detergentien lysiert. Die bei pH 13 aufgewundene DNA wird dann einer Elektrophorese unterzogen. Danach wird die DNA angefärbt und erscheint unter dem Fluoreszenzmikroskop in der Form eines Kometen (Abb. 1). Für jede Untersuchung werden 100 Zellen ausgewertet. Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde mit Trypan-Blau-Ausschluß bestimmt.

Ergebnisse

Die DNA der Leukozyten zeigt nach der Behandlung mit Sedimentextrakten eine deutliche Fragmentierung im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 1). Die Auswertung erfolgte direkt am Fluoreszenzmikroskop durch die visuelle Klassifizierung der Zellen, die sich an der Verteilung der DNA im Kometen orientiert (Anderson et al. 1994). Bei geschädigten Zellen befindet sich der überwiegende Anteil der DNA im Kometenschweif. Die Einteilung der Kometen reicht von „ungeschädigt“ bis „stark geschädigt“ (Klassen 1 bis 4). In Abbildung 2 sind typische Ergebnisse einer solchen Auswertung nach Behandlung der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der Sedimentextrakte dargestellt.

Der Extrakt aus der Probe KS11 (Deutsche Bucht) zeigt ein bei einer 1:100-Verdünnung ein größeres toxisches Potential als der Extrakt aus dem Sediment UE74 (Atlantik). Bei einer größeren Verdünnung sind keine Unterschiede in der Wirkung der Extrakte mehr nachweisbar (Abb. 2). Zur Unterscheidung der Genotoxizität von anderen Einflüssen muß hierbei die Lebensfähigkeit der Zellen berücksichtigt werden.

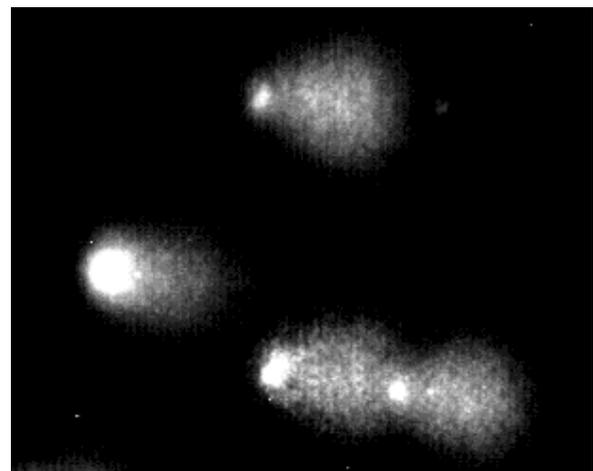
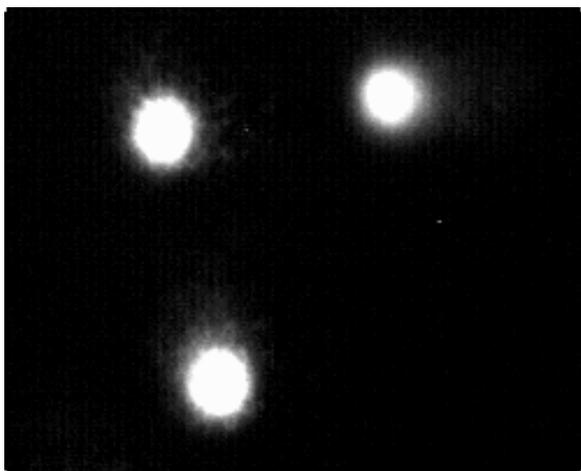


Abb. 1: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Karpfen-Blutzellen nach Anwendung des Comet-Assay. Links: ungeschädigte Zellen. Rechts: mittel bis stark geschädigte Zellen.

Fluorescence microscopy image of carp blood cells after application of the comet assay. Left: undamaged cells. Right: moderately to highly damaged cells.

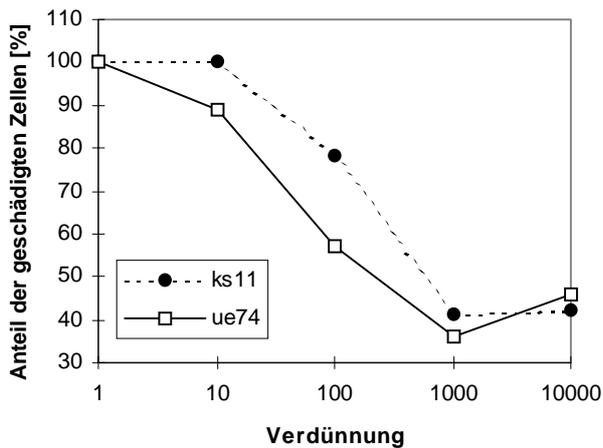


Abb. 2: Karpfen-Leukozyten nach der Behandlung mit Sedimentextrakten (KS11, UE74: siehe Text), Anteil der geschädigten Zellen relativ zur eingesetzten Verdünnung.

Carp leucocytes after treatment with sediment extracts (KS11, UE74 compare text), amount of damaged cells in relation to dilution factor.

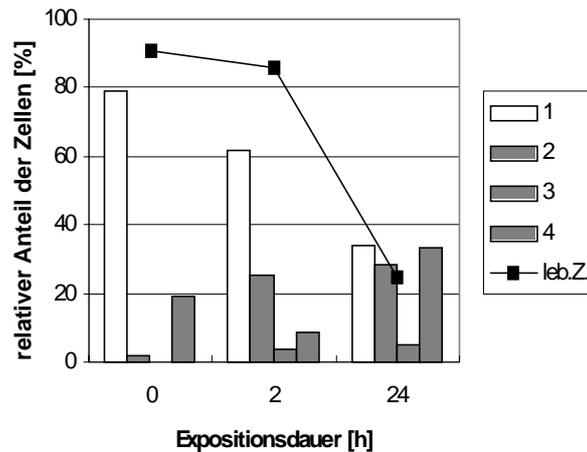


Abb. 3: Karpfen-Leukozyten behandelt mit Sedimentextrakt KS 11; Comet-Klassen 1 bis 4 („keine“ bis „starke“ DNA Schäden); „leb. Z.“: Anteil lebender Zellen.

Carp leucocytes after treatment with sediment extract KS 11; comet classes 1 to 4 (“no” to “high” DNA damage); “leb. Z.”: amount of living cells.

Die Behandlung von Karpfen Leukozyten mit Sedimentextrakt schädigt bereits nach 2 h die DNA, ohne daß die Lebensfähigkeit der Zellen deutlich abnimmt (Abb.3). Wir interpretieren dieses Ergebnis als genotoxische Wirkung des Sedimentextraktes. Nach 24 h ist die Lebensfähigkeit der Zellen bereits stark durch das Sedimentextrakt beeinträchtigt. In diesem Fall sind die DNA-Strangbrüche, die mit dem Comet-Assay nachgewiesen werden, vermutlich (auch) auf eine cytotoxische Wirkung des Sedimentextraktes zurückzuführen. In einem Kontrollversuch mit ‘unbelastetem’ Sediment, war keine Schädigung der DNA zu beobachten.

Diskussion

Einzelstrangbrüche in der DNA von Karpfen-Leukozyten können durch die Exposition der Zellen mit Sedimentextrakten erzeugt und mit dem Comet-Assay erfaßt werden. Die Schädigung ist von der Herkunft des verwendeten Sediments abhängig, so daß mit dieser *in-vitro*-Methode möglicherweise eine Aussage über das genotoxische Potential von marinen Sedimenten gemacht werden kann.

Die Ergebnisse aus Untersuchungen von Biomarkern an freilebenden Organismen sind oft schwierig zu interpretieren. Natürliche Einflüsse oder biologische Zyklen können unter Umständen einen größeren Einfluß auf den Organismus haben als eine Schadstoffexposition (Lange et al. 1995). Für die Betrachtung von Einzelstrangbrüchen in der DNA kommt hinzu, daß diese

Schäden von zelleigenen Reparaturmechanismen z.T. innerhalb von Stunden wieder repariert werden können (Kammann 1997; Olive 1991). Daher erscheint es schwierig, schadstoffinduzierte DNA-Schädigung an freilebenden Organismen nachzuweisen. Darüber hinaus kann nicht ausgeschlossen werden, daß Streß oder körperliche Aktivität in Fischen die DNA-Strangbruchrate erhöht, wie es für den Menschen bekannt ist (Hartmann et al. 1994), so daß ein Einfluß der Probenahme auf die DNA-Integrität naheliegend ist. Veränderungen im Sauerstoffgehalt des Wassers können bei Fischen ebenfalls zu DNA-Strangbrüchen führen (Liepelt et al. 1995). Irreversible Effekte wie DNA-Addukte (Pfohl-Leschkovicz et al. 1993) oder Apoptose (Piechotta et al. 1998; 1997) könnten geeignete Endpunkte für Untersuchungen an freilebenden Organismen sein. Die Entwicklung aussagefähiger Biomarker für den Einsatz im biologischen Effektmonitoring hängt von einer grundlegenden Charakterisierung und dem Verständnis des Mechanismus und der Regulation der biochemischen Meßgröße ab. Dazu können *in-vitro*-Experimente an isolierten Zellen einen wichtigen Beitrag leisten.

Die Verwendung von isolierten Zellen für Toxizitätstests ist abstrakter als die Untersuchung des gesamten Organismus, z.B. in einem Tierversuch. Die Übertragbarkeit solcher Ergebnisse auf die Situation in der Natur kann daher schwierig sein. Dennoch sehen wir durch die Verwendung von Bioassays an isolierten Zellen eine Chance, einerseits Tierversuche zu ersetzen und andererseits eine neue Herangehensweise an die Bewertung von Schadstoffbelastungen zu gewinnen.

Die Sedimentproben wurden freundlicherweise von Dr. N. Theobald, Bundesamt für Seeschifffahrt und Hydrographie, Hamburg, zur Verfügung gestellt.

Literatur

Anderson, D.; Yu, T.W.; Phillips, B.J.; Schmerzer, P.: The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the comet assay. *Mutat. Res.*, 307: 261-271, 1994.

Belpaeme, K.; Delbke, K.; Zhu, L.; Kirsch-Volders, M.: Cytogenetic studies of PCB77 on brown trout (*Salmo trutta fario*) using the micronucleus test and the alkaline comet assay. *Mutagenesis*, 11: 458-492, 1996.

Cerda, H.; Delinceé, H.; Haine, H.; Rupp, H.: The DNA 'comet assay' as rapid screening technique to control irradiated food. *Mutat. Res.*, 375: 167-181, 1997.

Deveaux, A.; Pesonen, M.; Monod, G.: Alkaline comet assay in rainbow trout hepatocytes. *Toxicol. in Vitro*, 11: 71-79, 1997.

Gagné, F.; Blaise, C.: Evaluation of the genotoxicity of environmental contaminants in sediments to rainbow trout hepatocytes. *Environ. Toxicol. Water Qual.*, 10: 217-229, 1995.

Hartmann, A.; Plappert, U.; Raddatz, K.; Grünert-Fuchs, M.; Speit, G.: Does physical activity induce DNA damage? *Mutagenesis*, 9: 269-272, 1994.

Kammann, U.: Comet Assay - application in environmental monitoring. in: Müller, W.E.G. (ed.) *Sitzungsberichte der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Klasse, Akademie gemeinnütziger Wissenschaften zu Erfurt*, 8: 105-109, 1997.

Lange, U.; Saborowski, R.; Karbe, L.; Siebers, D.: A Model for the Prediction of Basal EROD-Activity Levels. *ICES C.M. (E7)*, 1995.

Liepelt, A.; Karbe, L.; Westendorf, J.: Induction of DNA strand breaks

in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* under hypoxic and hyperoxic conditions. *Aquat. Toxicol.*, 33: 177-181.

Olive, P.L.; Wlodek, D.; Banáth, J.P.: DNA double strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis. *Cancer Res.*, 51: 4671-4676, 1991.

Pandurangi, R.; Petras, M.; Ralph, S.; Vrzoc, M.: Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. *Environ. Mol. Mutagen.*, 26: 345-356, 1995.

Pfohl-Leszko, A.; Weber-Lotfi, F.; Masfaraud, J.F.; Devaux, A.; Laouedj, A.; Guillemaut, P.; Malaveille, C.; Rether, B.; Monod, G.; Dirheimer, G.: DNA adduct detection: some applications in monitoring exposure to environmental genotoxic chemicals. In: Phillips, D.H.; Castegnaro, M.; Bartsch, H. (eds.) *Postlabelling Methods for Detection of DNA Adducts, International Agency for Research on Cancer IARC*, 372-378, 1993.

Piechotta, G.; Lang, T.; Kammann, U.; Jenke, H.-S.; Steinhart, H.: Cadmium induces Apoptosis in dab (*Limanda limanda*) liver. in: Müller, W.E.G. (ed.) *Sitzungsberichte der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Klasse, Akademie gemeinnütziger Wissenschaften zu Erfurt*, 8: 97-99, 1997.

Piechotta, G.; Lacorn, M.; Kammann, U.; Simat, T.; Jenke, H.-S.; Steinhart, H.: Apoptosis in dab (*Limanda limanda*) as possible new biomarker for anthropogenic stress. *Ecotox. Environ. Safety*, in press, 1998.

Singh, N.P.; McCoy, M.T.; Tice, R.R.; Schneider, E.L.: A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, 175: 184-191, 1988.

Singh, N.P.; Stephens, R.E.; Schneider, E.L.: Modifications of alkaline microgel electrophoresis for sensitive detection of DNA damage. *Int. J. Radiat. Biol.*, 66: 23-28, 1994.

Tice, R.R.: Applications of the single cell gel assay to environmental biomonitoring for genotoxic pollutants. In: Butterworth, F.M. (ed) *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*, Plenum Press, New York, 1995.

Wichtige Informationen für Fischwirtschaft, Forschung und Fischerei- verwaltung in:

- ◆ Aquatic Sciences and Fisheries Abstracts (Verlag CSA)
- ◆ Archive of Fishery and Marine Research (Verlag Gustav Fischer)
- ◆ Jahresbericht über die deutsche Fischwirtschaft (BMELF)
- ◆ Informationen für die Fischwirtschaft
- ◆ Literaturlisten der Informations- und Dokumentationsstelle
- ◆ Jahresbericht der Bundesforschungsanstalt für Fischerei
- ◆ Schriften der Bundesforschungsanstalt für Fischerei

Informations- & Dokumentationsstelle der BFA Fischerei