

FISCH UND UMWELT

Anwendung von Fischzellkulturen in der Meeresforschung

Ulrike Kammann, Markus Bunke, Institut für Fischereiökologie
Hans Steinhart, Universität Hamburg,
Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie

In der marinen und limnischen Toxikologie finden *in-vitro*-Testsysteme immer mehr Beachtung. Wasser- oder Sedimentproben bzw. deren Extrakte können mit Hilfe von biologischen Testsystemen (z.B. Fischeier, Zellkulturen oder Bakterien) untersucht werden. Häufig gewählte Untersuchungen sind Cytotoxizität (Zelltod) und Genotoxizität (DNA-Schäden). *In-vitro*-Testsysteme können für das Toxizitäts-Screening komplexer Mischungen, die aus Umweltproben extrahierbar sind und für Wirkungsstudien mit isolierten Einzelsubstanzen verwendet werden. Mit einfachen und leicht handhabbaren *in-vitro*-Systemen können die notwendigen Untersuchungen schnell und mit hohem Probendurchsatz durchgeführt werden. Wegen der meist kleinen Testvolumina sind *in-vitro*-Systeme auch für toxizitätsgeleitete Fraktionierungen geeignet, bei denen oft durch die wiederholte Unterteilung jeder Probe nur noch geringe Probenmengen zur Verfügung stehen. *In-vitro*-Testsysteme mit Zellkulturen bieten eine Reihe von Vorteilen. Dazu gehören die Kontrollierbarkeit der Umgebung der Zelle, Eliminierung von systemischen Einflüssen, verminderte Variabilität zwischen den Experimenten und viele praktische Aspekte (Baksi and Frazier 1990). Vom ethischen Standpunkt aus ist es wünschenswert, möglichst viele Tierversuche durch alternative Methoden zu ersetzen.

Fischzellkulturen

Bei Zellkulturen unterscheidet man primäre und permanente Kulturen. Primäre Zellkulturen werden aus frisch isolierten Zellen, z.B. aus einer Fischleber, direkt angezchtet. Diese Zellen besitzen oft noch die volle metabolische Kapazität des Ausgangsorgans und eignen sich daher besonders gut für Metabolismusstudien. Die metabolische Kapazität primärer Zellkulturen ist nicht dauerhaft vorhanden und die Teilungsfähigkeit der Zellen ist begrenzt. Diese Eigenschaften führen dazu, daß primäre Zellkulturen immer wieder frisch angezchtet werden müssen. Die metabolische Kapazität kann von Tier zu Tier deutlich variieren (Nacci *et al.* 1996). Permanente Zellkulturen haben dagegen stabile Eigenschaften und sind gut charakterisiert. Diese Zellen können aus verschiedenen Organen oder aus tumorösem Gewebe stammen. Permanente Kulturen haben vergleichsweise wenig oder keine metabolische Aktivität. Um für diese Zellen den Schadstoffmetabolismus in der Leber nachzustellen, werden die Testsysteme oft um artfremde isolierte Enzymsysteme ergänzt. Diese „aktivieren“ Stoffe wie z. B. polyaromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) zu toxisch wirkenden Substanzen. Ohne eine solche enzymatische Umsetzung haben PAK und ähnliche Stoffe keine große toxische Wirkung auf die Zellkultur.

Tabelle 1 zeigt eine Auswahl an Fischzellkulturen, die bereits Eingang in die aquatische Toxikologie gefunden haben. Zellen mariner Fischarten werden meist als primäre Kulturen eingesetzt (Deveaux *et al.* 1997; Gagné und Blaise 1995).

Application of cultured fish cells in marine research.

A large number of chemical pollutants can be found in the marine environment. So it is necessary to obtain informations about the toxic effects of this contaminant mixtures in general and especially on single cell level. We used an organic extract of a marine sediment from the North Sea to investigate its cyto- and genotoxicity with an *in vitro* system, the comet assay or single cell gel electrophoresis (SCGE). The comet assay can be applied for estimating genotoxic effects of chemicals on single cell level. First results confirm the sensitivity of this assay and its applicability in assessing genotoxic load in environmental samples. A permanent cell line, the EPC (*Ephithelioma papulosum cyprini*) was used for the experiments. It was possible to demonstrate the suitability of this *in vitro* test system for assessing genotoxic and cytotoxic effects of marine sediment extracts on EPC cells.

Tabelle 1: Auswahl von permanenten Fischzellkulturen.

Selection of permanent fish cell lines.

Zelllinie	Fischart (Organ)	Quelle
BF-2	Bluegill sunfish, <i>Lepomis macrochirus</i> (Muskel)	Babich und Borenfreund 1987
FHM	Fathead minnow, <i>Pimephales promelas</i> (Haut)	Dierickx und Bredael-Rozen 1996
RTG-2	Regenbogenforelle (Gonade)	Castano <i>et al.</i> 1994
GSF	Goldfisch (Schuppe)	Saito <i>et al.</i> 1993
EPC	Karpfen (Haut)	Parkinson und Agius 1986; Lyons-Alcantara <i>et al.</i> 1996

Fischzellkulturen wurden ursprünglich entwickelt, um Fischviren zu untersuchen. Diese Anwendung hat auch heute noch große Bedeutung. Die meisten bekannten Fischzellkulturen wachsen adhären, d.h. die Zellen heften sich zum Wachsen an den Boden des Kulturgefäßes. Nur wenige Linien werden in Suspension kultiviert. Die verwendeten Nährmedien für Fischzellen entsprechen weitgehend denen, die für Säugetierzellen entwickelt wurden. Auch das Passagieren (Ablösen und Umsetzen für die Vermehrung) erfolgt weitgehend wie für Säugetierzellen üblich. Der größte Unterschied zwischen Fisch- und Säugetierzellen besteht in der Wachstumstemperatur. Die meisten Fischzellkulturen haben ein niedrigeres Temperaturoptimum und wachsen daher auch langsamer als Säugerzellen. Die in unserem Labor verwendeten Fischzellen wachsen von 15 bis 33 °C mit einem Optimum zwischen 20 und 32 °C.

Das Ziel unserer Untersuchungen war es, die Anwendbarkeit einer Fischzelllinie als *in-vitro*-System für zwei toxikologische Endpunkte (Genotoxizität und Cytotoxizität) zu zeigen. Zur Induktion der toxischen Wirkung wurde ein Sedimentextrakt aus der Nordsee ausgewählt, da mit einem ähnlichen Extrakt bereits ein genotoxischer Effekt auf Karpfen-Leukozyten hervorgerufen werden konnte (Kammann 1998).

Material

EPC-Zellen (*Epithelioma papulosum cyprini*)

Die EPC-Zellen stammen von Karpfen, auf deren Haut eine durch Herpesvirus induzierte hyperplastische Läsion (Warze) entstanden ist. Die Zellen haben eine epitheloide (hautzellenähnliche) Form und werden als adhären Kultur in 25-cm²-Zellkulturgefäßen in Standardmedium (Minimal Essential Medium nach Eagle mit 10 % Serum) bei 25 °C und 5 % CO₂ gehalten. Nach dem Ablösen der Zellen vom Gefäßboden und einem Umsetzen von 1:6 in frisches Medium bilden die Zellen nach zwei bis drei Tagen wieder einen geschlossenen Zellrasen (Monolayer) aus.

Sediment

Die für die vorliegende Untersuchung verwendete Sedimentprobe wurde mit einem Kastengreifer genommen

(209. Reise der Walther Herwig III, August 1999, zentrale Nordsee) und bis zur Extraktion bei -20 °C tiefgefroren.

Methoden

Sedimentextraktion

40 g Sediment wurden mit Natriumsulfat verrieben und mit Dichlormethan 6 h lang in einer Schüttelmaschine extrahiert, danach eingedampft und in Dimethylsulfoxid (DMSO) überführt. Die Endkonzentration des Sedimentextraktes betrug 40 g Trockenmasse(TM)/ml DMSO. Der Extrakt wurde mit DMSO verdünnt und dem Testsystem (Zellsuspension) in einer Konzentration von 1% zugesetzt. Zum Einsatz kamen Konzentrationen von 0,04 bis 1,34 g TM/ml Zellsuspension.

Cytotoxizitätstest

Der Test auf Cytotoxizität wurde mit einer Fluoresceindiacetat-Ethidiumbromid-Mischung durchgeführt (Hartmann und Speit 1997). Die Zellsuspension wurde 1 min mit der Mischung inkubiert. Lebende Zellen setzen in dieser Zeit das farblose Fluoresceindiacetat zu grün fluoreszierendem Fluorescein um und erscheinen unter einem Fluoreszenzmikroskop grün. Tote Zellen erhalten durch Ethidiumbromid eine orange-rote Färbung. Pro Ansatz wurden mindestens 100 Zellen ausgewertet. Dieser Test liefert somit eine Aussage über die Lebensfähigkeit der Zellen.

Genotoxizitätstest

Der Comet-Assay kann zur Untersuchung von DNA-Schäden einzelner Zellen nach *in-vitro*-Exposition eingesetzt werden (Braunbeck und Neumüller 1996). 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 wurde nach dem von Singh *et al.* (1988) beschriebenen Protokoll mit kleinen Änderungen durchgeführt: In Phosphatpuffer suspendierte EPC-Zellen werden 20 h lang mit dem Sedimentextrakt in DMSO bzw. DMSO allein (maximale Konzentration 1%) inkubiert. DMSO hat in der verwendeten Kon-

zentration keinen Einfluß auf die DNA der EPC-Zellen. Anschließend werden die Zellen gewaschen, resuspendiert und in eine Agaroseschicht auf einem Objektträger eingebettet. 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 Abhängigkeit von der Schädigung in der Form eines Kometen (Abbildung 1). Für jede Untersuchung wurden mindestens 100 Zellen ausgewertet.

Ergebnisse

Es wurden EPC-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen des Sedimentextraktes behandelt. Die DNA der EPC-Zellen zeigt nach der Behandlung eine konzentrationsabhängige Fragmentierung (Abbildung 2). 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“ (Abbildung 1). Die genotoxische Wirkung wird als „Score“ ausgedrückt, der sich aus der Verteilung der Zellen auf die vier Schadensklassen (Abbildung 2) errechnet. In Abbildung 3 sind typische Ergebnisse einer solchen Auswertung nach Behandlung der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des Sedimentextraktes dargestellt. Der Sedimentextrakt aus der Nordsee zeigt bei der Konzentration von 0,4 g TM/ml einen cytotoxischen Effekt, da die Lebensfähigkeit unter 75 % fällt (Henderson *et al.* 1998). Bei 0,04 g TM/ml ist keine cytotoxische Wirkung (Lebensfähigkeit über 75 %) mehr feststellbar, aber noch eine deutliche DNA-Fragmentierung (Score = 176) im Vergleich zur Kontrolle (Score = 90) erkennbar. Eine DNA-Fragmentierung in Verbindung mit einer unverminderten Lebensfähigkeit (> 90 %) der Zellen entspricht einem genotoxischen Effekt des Sedimentextraktes auf die Zellen.

Diskussion

Die dargestellten Ergebnisse unterstreichen die Möglichkeit, Fischzelllinien für verschiedene toxikologisch relevante Endpunkte einzusetzen. Biomarker werden bisher überwiegend im Freiland angewendet, um schadstoffinduzierte Effekte z.B. an Fischen zu erkennen. Viele Biomarker sind theoretisch auf Zelllinien übertragbar (Hightower und Renfro 1988). Besonders genetisch veränderte Zellen können hierbei von großem Nutzen sein. Darüber hinaus können Zellkulturen verwendet werden, um nach neuen potentiellen Biomarkern zu suchen. Fischzellen können helfen, die Anzahl der Tierversuche zu reduzieren.

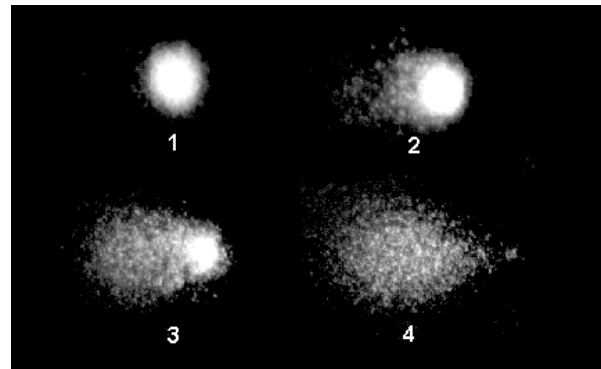


Abbildung 1: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von EPC-Zellen nach Anwendung des Comet-Assay. Schädigungsklassen 1 (ungeschädigt) bis 4 (maximal geschädigt).

Fluorescence microscopy images of EPC cells processed with the comet assay. Damage classes 1 (undamaged) to 4 (maximally damaged).

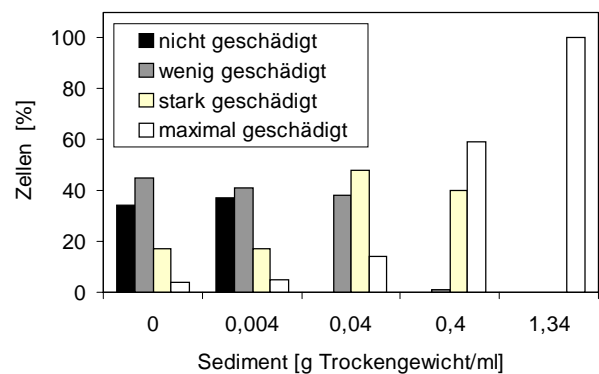


Abbildung 2: DNA-Schäden von EPC-Zellen nach der Behandlung mit Sedimentextrakt. Balken von links nach rechts: Schädigungsklassen 1 (ungeschädigt) bis 4 (maximal geschädigt).

DNA damage of EPC cells treated with sediment extract. Bars from left to right represent DNA damage classes 1 (undamaged) to 4 (maximally damaged).

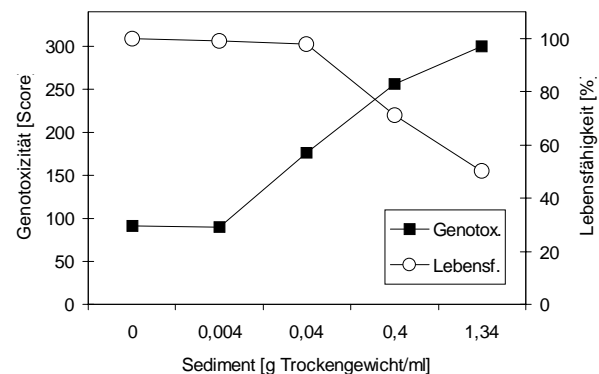


Abbildung 3: DNA-Schäden (Genotoxizität, „Score“) und Lebensfähigkeit von EPC-Zellen nach der Behandlung mit Sedimentextrakt.

DNA damage (genotoxicity, „score“) and amount of living cells of EPC cells treated with sediment extract.

Die Verwendung von Fischzellkulturen in der marinen Forschung ist ein relativ neues Gebiet. Ein Grund dafür ist wahrscheinlich, dass das Schutzgut – das Ökosystem – sehr weit von den Vorgängen in vereinfachten *in-vitro*-Systemen entfernt ist. Es ist sicher nicht möglich, die Entwicklung eines Ökosystems aufgrund Veränderungen auf zellulärer Ebene vorherzusagen. Trotzdem haben zelluläre Systeme bereits jetzt einen festen Platz in der aquatischen Toxikologie eingenommen (Segner 1998). Ein möglichst einfaches und kontrolliertes System, wie es ein *in-vitro*-Test darstellt, kann bei komplexen toxikologischen Fragestellungen helfen, grundlegende Fragen zu klären, und daher von entscheidendem Vorteil sein. Chronische Schadstoffexposition und niedrige Konzentrationen sind typisch für die marine Umwelt. Die Wissenschaft ist aufgerufen, Methoden zu entwickeln, die die entsprechend geringen Effekte erfassen bzw. Ursache-Wirkungs-Beziehungen klären können. Dabei werden *in-vitro*-Methoden auch in Zukunft unentbehrlich sein.

Zitierte 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.
- Babich, H.; Borenfreund, E.: *In vitro* cytotoxicity of organic pollutants to bluegill sunfish (BF-2) cells. *Environ. Res.* 42: 229–237, 1987.
- Baksi, S.M.; Frazier, J.M.: Isolated fish hepatocytes-model systems for toxicology research. *Aquat. Toxicol.* 16: 229–256, 1990.
- Braunbeck, T.; Neumüller, D.: The comet assay in permanent and primary fish cell cultures – a novel system to detect genotoxicity. *In vitro Cell. Dev. Biol.* 32: 61–62, 1996.
- Castano, A.; Vega, M.; Blazquez, T.; Tarazona, J.V.: Biological alternatives to chemical identification for the ecotoxicological assessment of industrial effluents: the RTG-2 *in vitro* cytotoxicity test. *Environ. Toxicol. Chem.* 13: 1607–1611, 1994.
- Deveaux, A.; Pesonen, M.; Monod, G.: Alkaline comet assay in rainbow trout hepatocytes. *Toxicol. in vitro* 11: 71–79, 1997.
- Dierickx, P.J.; Bredael-Rozen, E.: Correlation between the *in vitro* cytotoxicity of inorganic metal compounds to cultured fathead minnow fish cells and the toxicity to daphnia magna. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 46: 649–653, 1996.
- 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.; Speit, G.: The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). *Toxicol. Lett.* 90: 183–188, 1997.
- Henderson, L.; Wolfreys, A.; Fedyk J.; Bourner C.; Windbank, S.: The ability of the comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins. *Mutagenesis* 13: 89–94, 1998.
- Hightower, L.E.; Renfro, J.L.: Recent applications of fish cell culture to biomedical research. *J. Exp. Zool.* 248: 290–302, 1988.
- Kammann, U.: Toxische Wirkung von Schadstoffen auf Fischzellen. Bestimmung von DNA-Strangbrüchen mit dem Comet Assay. *Inf. Fischwirtsch.* 45: 109–112, 1998.
- Lyons-Alcantara, M.; Tarazona, J.V.; Mothersill, C.: The differential effects of cadmium exposure on the growth and survival of primary and established cells from fish and mammals. *Cell. Biol. Toxicol.* 12: 29–38, 1996.
- Nacci, D.E.; Cayula, S.; Jackim, E.: Detection of DNA damage in individual cells. *Aquat. Toxicol.* 35: 197–210, 1996.
- Parkinson, C.; Agius, C.: Acute toxicity of DDT to fish cells *in vitro*. *Food Chem. Toxicol.* 24: 591, 1986.
- Saito, H.; Koyasu, J.; Yoshida, K.; Shigeoka, T.; Koike, S.: Cytotoxicity of 109 chemicals to goldfish GFS cells in relationship with 1-octanol/water partition coefficients. *Chemosphere* 26: 1015–1028, 1993.
- Segner, H.: Fish cell lines as a tool in aquatic toxicology. In: Braunbeck, T.; Hinton, D.E.; Streit, B. (eds.): *Fish Ecotoxicology*. Basel: Birkhäuser, p. 1–38, 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.