

Umweltchemikalien und Umweltmutagenese

Genetische Belastung natürlicher Populationen? / Von E. Hahn und W. Köhler

Die Belastung unserer Umwelt durch chemische Produkte wird zu einem immer dringenderen Problem. Nach Angaben der Studie „Global 2000“ liegt die Zahl der allgemein im Gebrauch befindlichen identifizierten Chemikalien bei etwa 4 Millionen, und alljährlich kommen weitere 1000 Substanzen hinzu. Unter diesen Gegebenheiten sah sich der Gesetzgeber der Bundesrepublik Deutschland in den siebziger Jahren veranlaßt, eine neue gesetzliche Regelung vom Schutz vor gefährlichen Stoffen zu erarbeiten, die im Jahre 1980 verabschiedet wurde. Schon vor Verabschiedung des Gesetzes wies der Rat der Sachverständigen für Umweltfragen in einer umfassenden Stellungnahme auf die besonderen „Schwachstellen“ des Entwurfs hin und ging insbesondere auf zwei Bereiche ein.

1. Zum Problem der ökologischen Prüfungen bemerkt der Rat der Sachverständigen für Umweltfragen: „Das Chemikaliengesetz führt den Begriff „Gefährlich für die Umwelt“ ein und zielt darauf ab, Ökosysteme vor solchen Stoffen zu schützen, die Gefahren oder Belastungen mit sich bringen können. Das Gesetz bietet aber kein Verfahren an, das diesen Schutz sicher gewährleisten kann.“ Der Nachweis und die Auswertung veränderter Parameter eines Ökosystems steckt noch in den Anfängen, so daß den bereits vorliegenden Ergebnissen große Zweifel entgegengebracht werden. Um möglichst rasch vergleichbare Daten zu erhalten, hat man begonnen, aus der Vielfalt der Organismen der verschiedenen Ökosysteme, jeweils „typische“ Vertreter, sogenannte Bioindikatoren, für Untersuchungen auszuwählen. Solch typische Vertreter für aquatische Systeme sind die Grünalgen. Im Rahmen einer Diplomarbeit (P. Kau-

risch, Inst. für Pflanzenernährung, 1984) wurde neben der Beeinflussung des Wachstums und des Chlorophyllgehaltes auch die Veränderung des Proteinmusters durch Schwermetalle im aquatischen System an der Grünalge *Chlorella fusca* untersucht. Es zeigten sich deutliche „Ausfälle“ im Bereich hochmolekularer Proteine bei steigenden Cadmiumkonzentrationen (Bild 1). Die Ursachen hierfür können sowohl in einer direkten Blockierung oder in der Modifikation wichtiger Enzyme liegen, aber auch weiterreichend eine genetische Veränderung bedeuten. Alle drei Möglichkeiten stellen eine Belastung des Organismus durch einen chemischen Stoff dar und infolge davon eine Belastung des gesamten betroffenen Ökosystems.

2. Unter Punkt zwei bemängelt der Rat der Sachverständigen für Umweltfragen, daß die vorgeschlagenen Testmethoden veraltet seien: „Die im Entwurf vorgesehenen Prü-

fungen (auf Mutagenität und Teratogenität) sind nicht am Stande der Wissenschaft orientiert.“ Zukünftige Aufgabe muß es sein, diese Mängel zu beheben.

Im Rahmen der heutigen Diskussion darf man nicht vergessen, daß die Mutationsforschung keine „Erfindung“ der letzten 10 Jahre, sondern fast schon so alt wie die moderne Genetik ist. Bereits 1914 versuchte Morgan – ohne Erfolg – Mutationen bei *Drosophila* mit Alkohol und Äther auszulösen. Einen starken Aufschwung erfuhr sie mit dem Nachweis der chromosomenschädigenden Wirkung von Senfgas und Urethan während des 2. Weltkrieges. In den folgenden Jahren wurden immer mehr mutagene Chemikalien, vor allem im Bereich von Arzneimitteln und Lebensmittelzusatzstoffen, entdeckt. Dennoch bereitet es auch heute noch größere Schwierigkeiten, den Nachweis einer direkten Beziehung zwischen Chemikalieneinwirkung und einer hierdurch möglicherweise verursachten Schädigung des Erbgutes beim Menschen zu erbringen. Dies liegt daran, daß die Zusammenhänge zwischen auslösender Chemikalie und induziertem Mutationsereignis dadurch erschwert werden, daß man die zu erwartenden Mutationsfolgen in ihrer großen Vielfalt nicht sofort erkennt. Dabei sind vor allem „kleine“ Mutationen in Genen (Punktmutationen) angesprochen, die

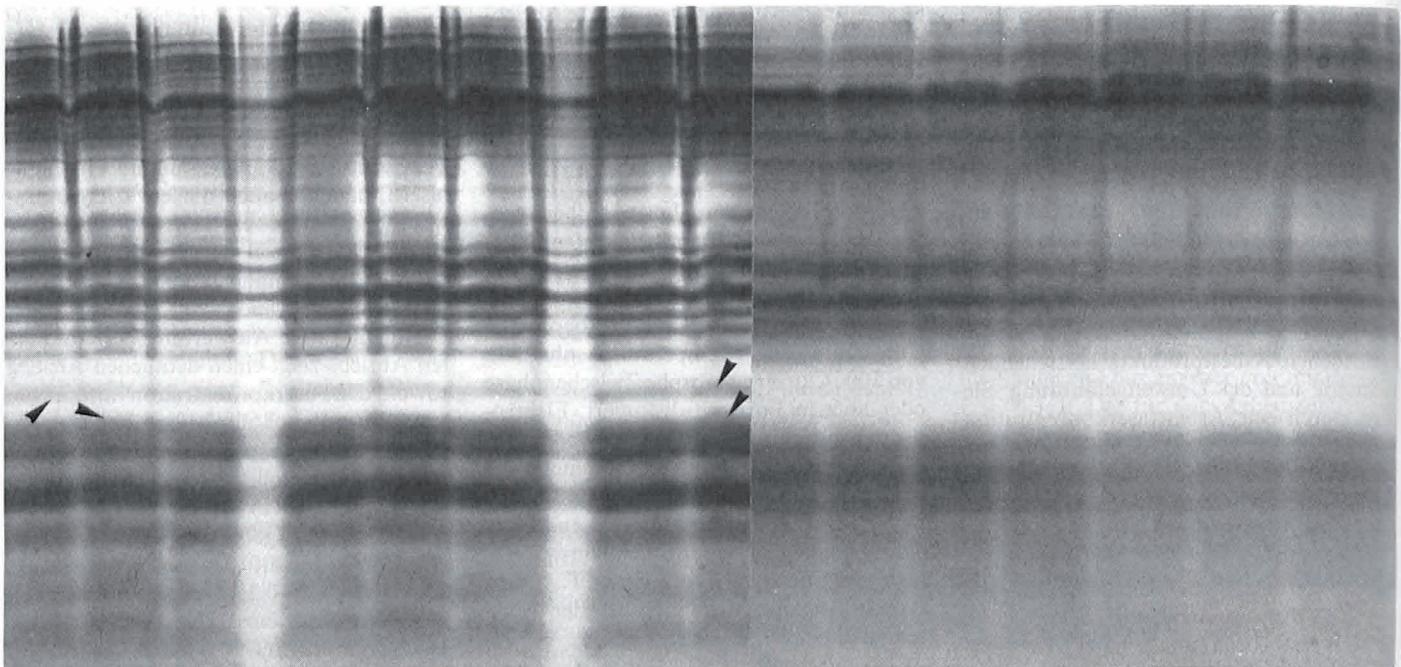


Bild 1: Vergleiche des Proteinmusters der Grünalge *Chlorella fusca* unter normalen Kulturbedingungen (rechts) und unter hoher Schwermetallbelastung (Cadmium, links). Der Pfeil kennzeichnet die fehlende Proteinbande.

z. B. die spezifische Reaktion des Immunsystems oder anderer nicht ständig benötigter Enzyme programmieren. Diese durch Chemikalien induzierten Erbgutschäden, die z. B. auf dem Verlust oder der Veränderung einer einzigen Base in der DNA beruhen können, werden mit dem übrigen Erbgut repliziert und an folgende Generationen weitergegeben.

Empfindlicher Test nötig

Das Bundesministerium für Forschung und Technologie fördert seit ca. 7 Jahren das Projekt „Umweltchemikalien“. Im Rahmen des Teilprojektes „Prüfung von Chemikalien auf Carcinogenität, Mutagenität und Teratogenität“ wird im Fachbereich Agrarwissenschaften ein neues Testsystem zum Nachweis chemisch induzierter Punktmutationen entwickelt.

Die oben genannten Aspekte zeigen schon im Wesentlichen, welche Schwierigkeiten auftreten und welch vielfältiges Aufgabenspektrum für die Mutagenitätsprüfung existiert. Die praktische Mutagenitätsprüfung muß jedoch zur Gewinnung ihrer Ergebnisse auf experimentelle Untersuchungen an besonders geeigneten Testsystemen zurückgreifen, da der Mensch, eigentliches Zielobjekt der Untersuchungen, als Testorganismus im Prinzip ausfällt. Diese Testsysteme müssen nicht nur die Frage nach der Mutagenität beantworten, sondern auch in umfangreichen speziellen Untersuchungen die Metabolismus- und Dosis-Effekt-Probleme klären und verantwortbare Belastungsgrenzen – auch im Hinblick auf künftige Generationen – angeben.

Testpraxis

Die „Test-Praxis“ stellt sich wie folgt dar: Die Hersteller synthetischer Substanzen (bspw. BASF, Bayer, Hoechst) teilen ihre Produkte in 3 Klassen ein: nämlich in Umweltchemikalien, Pflanzenbehandlungsmittel und in Pharmaka. Je nach den Bestimmungen des Zulassungslandes unterliegt eine chemische Substanz entsprechend ihrer Gruppenzugehörigkeit verschiedenen Testsystemen. Für die Staaten der Europäischen Gemeinschaft (EG) ist man z. Zt. noch bestrebt, eine einheitliche Regelung zu treffen. für Pharmaka scheint dies gelungen zu sein. Vier Tests werden gefordert:

1. Ames-Test (Nachweis von Punktmutationen)
2. Zytogenetik an Säugerzellen in vitro
3. Punktmutationstest an Säugerzellen in vitro oder Rezessiv-Letal-Test an *Drosophila melanogaster*
4. Zytogenetik in vivo incl. Mikronucleus-Test.

Die die Pflanzenbehandlungsmittel betreffende Situation stellt sich als sehr schwierig dar. In Betracht kämen die aus den USA

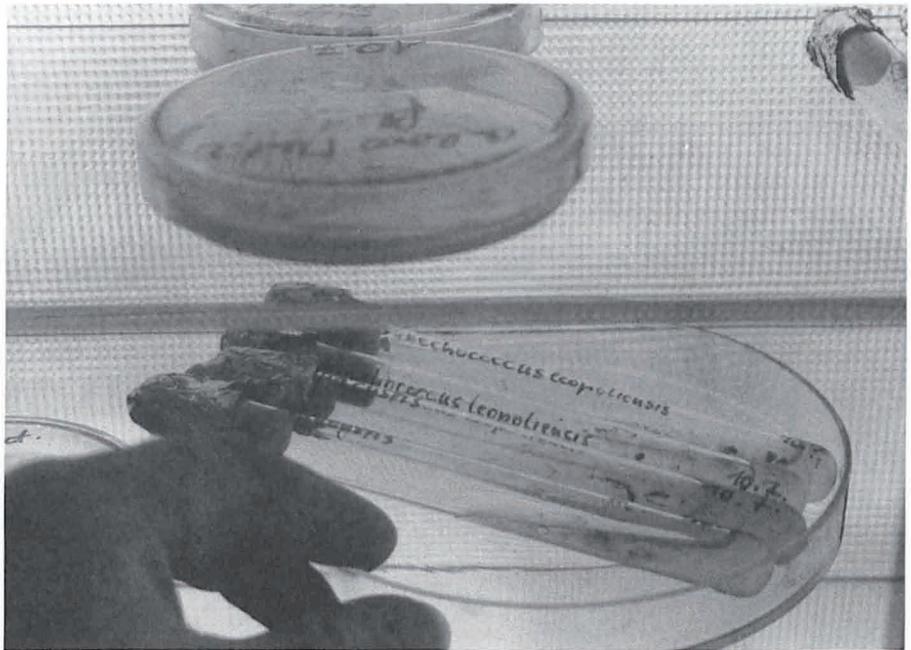


Photo: Gyntner Neumann

stammenden strengen Richtlinien der Environmental Protection Agency (EPA). Diese unterscheiden sich in zwei Aspekten grundlegend von der EG-Strategie. Man verlangt in den USA mindestens 8 Tests statt nur 4 in der EG, wovon 3 auf Punktmutationen prüfen sollen. Dem Nachweis von Punktmutationen wird in den Richtlinien der EPA mit Recht ein besonderes Gewicht verliehen.

Aufgrund des bereits oben angesprochenen breiten Spektrums und der Irreversibilität

der Schädigungen für den Organismus bedeutet die Punktmutation eine ständige Quelle vielfältiger neuer Erkrankungen. Es darf daher keine durch chemische Mutagene induzierte Zunahme von Punktmutationen toleriert werden.

Die Notwendigkeit empfindlicher Tests zum Nachweis der Mutagenität sowohl bei neuen als auch bei bereits im Handel befindlichen Chemikalien ist also dringend gegeben. Die von uns zur Überprüfung und Weiterentwicklung vorgeschlagene Test-

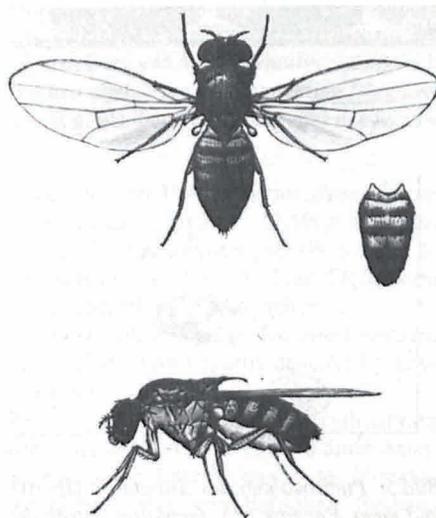


Bild 2: Weibchen der Taufliege *Drosophila melanogaster* und Abdomen des Männchens einer der bekanntesten Versuchstiere der Genetiker, das schon seit Anfang dieses Jahrhunderts im Labor gehalten wird. Im Herbst können sie diese Tiere in großen Anzahlen an faulendem Obst sehen.

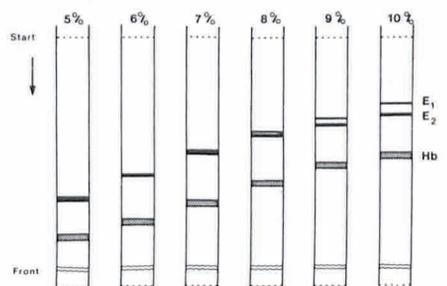


Bild 3: Schemazeichnung der Veränderung des Enzymmusters im elektrischen Feld bei unterschiedlichen Gelkonzentrationen (Porengröße). Während die „Front“ in allen Konzentrationen gleichmäßig weit läuft, ist dies für das Standardprotein Hämoglobin (Hb) und die beiden Enzymvarianten (E_1 , E_2) nicht der Fall. Sie unterscheiden sich in ihrer Beweglichkeit aufgrund ihrer Struktur und ihrer elektrischen Ladung. Diese Unterschiede in den Varianten E_1 und E_2 sind hier nur bei hohen Konzentrationen deutlich zu erkennen.

methode zum Nachweis chemisch induzierter Punktmutationen eignet sich nach unserer Meinung zur langfristigen Trenderkennung der Schadstoffbelastung und der daraus möglicherweise resultierenden Gesundheitsschädigung.

Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die den Tests zugrunde liegende Methode wurde bereits vor einigen Jahren in den USA entwickelt, allerdings mit einer anderen Zielvorstellung aus dem Bereich der Populationsgenetik. Mittels Elektrophorese wurden Enzym polymorphismen in natürlichen Populationen nachgewiesen. Es ist möglich, selbst aus komplexen Extrakten eines Tieres oder einer Pflanze ein bestimmtes Enzym durch die Darstellung seiner Aktivität bezüglich eines enzymbespezifischen Substrates in einem Gel nachzuweisen. Durch den Vergleich der Beweglichkeit im elektrischen Feld auf Stärke- oder Polyacrylamid-Gelen wurden bei verschiedenen Tier-, Pflanzen- und Insektenarten, und auch beim Menschen, eine Vielzahl von Enzymvarianten entdeckt.

Die Methode der hochauflösenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Johnson versetzt uns in die Lage, an ausgewählten Enzymloci die Rate der chemisch induzierten Varianten bezüglich Ladung und Struktur (Punktmutation) zu analysieren.

Objekt Drosophila

Als Versuchstier verwenden wir die Taufliege *Drosophila melanogaster* (Bild 2). Sie ist als Objekt für diese Untersuchung besonders geeignet, da sie genetisch leicht manipulierbar ist, eine kurze Entwicklungsdauer von etwa neun Tagen und eine große Nachkommenzahl hat. Zudem können wir zum Vergleich mit der Häufigkeit der Punktmutationen (Enzymvarianten) die induzierte Letalfaktorrate an denselben Tieren mit dem Standardtest (Nr. 3) bestimmen. Als mutagene „Modellsubstanz“, die im wesentlichen Punktmutationen hervorruft, wird EMS (Ethylmethansulfonsäureester) an genetisch identischen Männchen einer isogenen Linie von *Drosophila melanogaster* verfüttert. Die Nachkommen dieser Tiere werden auf mögliche genetische Veränderungen (Letalfaktoren, Punktmutationen) untersucht. Nach den notwendigen Kreuzungen werden dazu mindestens 10 Tiere einer zu untersuchenden Population homogenisiert und in Polyacrylamid-Rundgelen aufgetrennt. Abweichend von den üblichen Elektrophoresen benutzen wir nicht eine einzige Acrylamidkonzentration, sondern arbeiten mit 6 verschiedenen Kon-

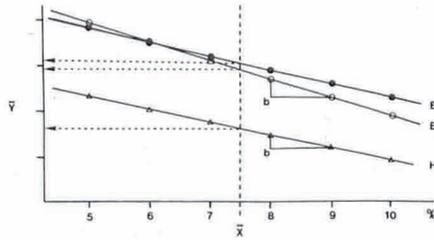


Bild 4: Die relative Beweglichkeit wird mit Hilfe eines Scanners ausgewertet und in Abhängigkeit von der Konzentration im logarithmischen Maßstab aufgetragen. Man erhält verschiedene Geraden, von denen man die Steigung b und die mittlere Laufstrecke \bar{y} ermittelt. Jedes Protein ist somit durch ein \bar{y} und ein b charakterisiert.

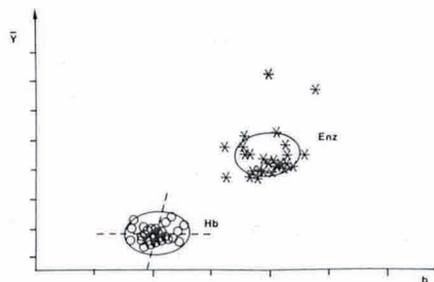
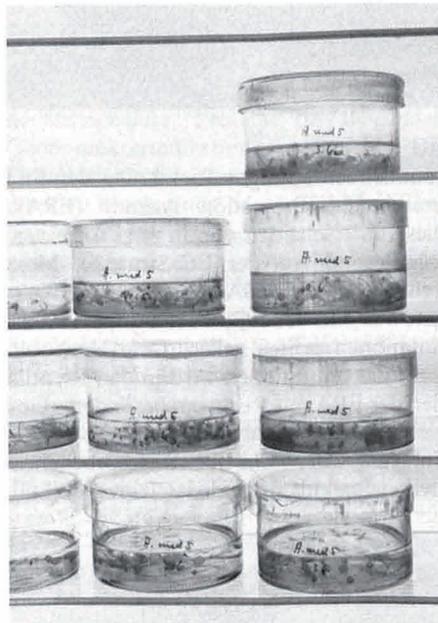


Bild 5: Punktwolken des Standards Hb (0) und eines Enzyms (*). Geplottet wurde die mittlere Laufstrecke in Abhängigkeit von b . Die deutlich aus der 95% Vertrauensellipse herausfallenden Punkte bei Enz zeigen, daß in den mit einer Chemikalie behandelten Tieren Punktmutationen aufgetreten sind.

zentrationen (Bild 3). In der Apparatur einer Rundgelelektrophorese ist es möglich, daß pro Kammer jede Konzentration doppelt vorhanden ist. Neben der Probe (Homogenat) läuft als zusätzliche Kontrolle das Standardprotein Rinderhämoglobin (Hb) mit.

Enzym polymorphismen

Die Auswertung erfolgt mittels des FER-GUSON-Plot, wobei die Gelgesamtlänge, die Laufstrecke des Hb und die des angefärbten Enzyms gemessen werden und daraus die relative Beweglichkeit (Rf-Werte) sowohl für das Enzym als auch für Hb errechnet wird. Es ist danach möglich, die Rf-Werte des Hb logarithmisch aufzutragen (Bild 4). Ergeben dabei die 6 Werte der 6 verschiedenen Gelkonzentrationen eine Gerade, erhält man zusätzlich einen „Beurteilungsmaßstab“ für einen möglichen Analysefehler. Aus den Geraden ermitteln wir die Steigung und die mittlere Laufstrecke \bar{y} bei der theoretischen Gelkonzentration von 7,5%. Diese werden in einem neuen Koordinatensystem gegeneinander aufgetragen und bilden eine Punktwolke (Abb. 5). Um die Punktwolke des Standards Hb wird eine 95% Vertrauensellipse (VE) errechnet. Nach Übertragung dieser Ellipse, die jegliche methodisch bedingte Variation enthält, auf die Enzymdaten ist es möglich, die außerhalb der VE liegenden Punkte als Punktmutationen an dem betreffenden Enzymlocus zu erkennen. Diese allerdings sehr vereinfachte Darstellung der Auswertung der gewonnenen Daten erfolgt mit Hilfe eines Fortranprogrammes am Großrechner des Hochschulrechenzentrums (HRZ). Auch die Zeichnungen werden durch ein am HRZ vorhandenes Graphiksystem (EGS) erstellt (Bild 5).

Die Abbildungen zeigen sehr gut, daß bei dem gezeigten Enzym bereits Punktmutationen nachgewiesen werden konnten. Die verhältnismäßig hohe Rate an nachgewiesenen Enzym polymorphismen wird zur Zeit durch die Aufstellung einer Dosis-Wirkungs-Beziehung überprüft. Parallel dazu erfolgt eine Übertragung der Testmethode auf andere Organismen, um an natürlichen Populationen (Indikatororganismen) aus unserer Umwelt das Ausmaß der möglichen genetischen Belastung zu analysieren.