

Vom Kleinen lernen

Ein biologisches Testsystem unter der Lupe

Von Friedrich Jauker und Günter Cleffmann

Ein biologisches Testsystem, ein „Bioassay“, ist ein nützliches Werkzeug des naturwissenschaftlichen Experimentators. Es ist das überschaubare Modell einer unüberschaubar komplexen Wirklichkeit und findet hauptsächlich Anwendung bei der Erprobung von Wirkstoffen. Dennoch ist es nicht so, daß Testsysteme allein zum Zwecke der Risikoabschätzung oder der Erforschung von Wirkungsweisen eingesetzt werden. Vielmehr spielen sie auch in der Grundlagenforschung eine wichtige Rolle, wenn dabei auch die Frage nach der Schädlichkeit von Stoffen hinter anderen Fragen zurücktritt. Insbesondere möchte man hier durch gezielte Manipulationen ein biologisches System zu einer Änderung seines Verhaltens provozieren. Aus der Stärke und der Richtung dieser Änderung erhofft man sich Einblicke in Kausalketten und Reaktionsmechanismen innerhalb biologischer Abläufe.

In der Regel sind Testsysteme keine Universalwerkzeuge, und unsere Erkenntnisse bleiben auch im Prinzip eine Funktion des Wechselspiels zwischen Experimentator, Objekt und Methode. Dennoch gibt es für jede Arbeit ein optimales Werkzeug, und ein solches Werkzeug bereitzustellen, ist ein Wunsch unseres Instituts und ein Ziel seiner Arbeit. Dieses Werkzeug soll sich zur Untersuchung eines Vorgangs eignen, den man zwar anschaulich, aber dennoch wenig präzise die „biologische Antwort“ nennt. Wir verstehen darunter durch Agentien hervorruhbare Änderungen des Zellstoffwechsels, deren stoffliche und dynamische Ursachen uns interessieren.

Unser Zellsystem, das eukaryote Wimpertierchen *Tetrahymena thermophila*, hat ein notwendiges Mindestmaß an Komplexität. Zwar ist er ein einzelliger Organismus (was die Arbeit mit ihm erleichtert), aber dennoch ist jede Zelle ein Individuum mit den integrativen Eigenschaften und dem Reaktionsvermögen eines Tieres, wenn auch eines sehr kleinen. *Tetrahymena* kann unter dem Mikroskop als Klon gezogen oder in Massenkulturen zu Milliarden vermehrt werden. Seine essentiellen Nahrungsbedürfnisse sind ähnlich denen des Menschen und werden in definierter Zusammensetzung angeboten. *Tetrahymena* hat sexuelle Ambitionen, ist kreuzbar, und genetische Effekte lassen sich in klassischer Mendel-Manner aufdecken. Die zweifache Aufgabe des Zellkerns, Regelung der Lebensabläufe und Bewahrung des Erbgutes, verteilt sich bei Wimpertierchen auf zweierlei Kerne, dem Makronukleus, der die Lebensabläufe regelt und dem Mikronukleus, der für die Abläufe bei der geschlechtlichen Fortpflanzung (Konjugation) entscheidend ist. Die sichtbaren Zellstrukturen schließen außer einer festen Gestalt subtile, jedoch leicht darstellbare Feinstrukturen ein, deren Zahl und Anordnung das Resultat gut verstandener morphogenetischer Prozesse sind. Die Zellen sind beweglich, wobei man Schwimgeschwindigkeit und komplexe Bewegungsmuster getrennt prüfen kann. An drei Beispielen soll nun ausgeführt werden, wie dieses System auf die Applikation

bekannter Wirkstoffe reagiert und welche Schlüsse wir aus den zellulären Antworten gezogen haben.

Ein Staubsauger im Mikrokosmos

Im Krankheitsbild der Staublungse offenbart sich die Gefährlichkeit feinen Quarzstaubes für den Menschen. Auch isolierte menschliche Blutzellen lösen sich beim Kontakt mit diesem Agens auf oder verlieren Teile ihres Zellinhalts. Wie reagiert *Tetrahymena*? Der Kontakt mit dem sehr feinen Staub (für *Tetrahymena* von einer Größe wie für uns ein Backstein) stimuliert die Zellen zur raschen Bildung von immer mehr Nahrungsvakuolen. Dies ist an und für sich kein pathologischer Prozeß, sondern die Art und Weise, wie man sich als Partikelfresser im Mikrokosmos ernährt: Am Mundfeld verursacht der Kontakt mit Partikeln deren Aufnahme, Verpackung in membranumschlossene Bläschen und Passage durch den Zelleib (Abb. 1). Bald strotzen die Zellen von staubgefüllten Vakuolen – mikroskopische Staubsauger – was ihren Leib stark anschwellen läßt. Dennoch bleibt dieser Effekt ohne erkennbare Wirkung auf Wachstum und Vermehrung. Selbst die Schwimgeschwindigkeit der dicken Zellen ist die gleiche wie die der normalen schlanken – eigenartig, angesichts der alles überragenden Bedeutung des viskösen Widerstandes von Wasser für den Schwimmer im Mikrokosmos! Mit einiger Verzögerung beginnen die behandelten Zellen, den Staub wieder auszuschleiden. Nach der Passage durch die Zelle verkleben die Partikel zu größeren Ballen und werden nicht ein zweites Mal einverleibt. Dennoch hat die Staubbehandlung eine sehr spezifische Wirkung: Von allen Makromolekülen wird allein die DNA betroffen, deren Menge pro Zelle sich um $\frac{1}{3}$ vermindert (Abb. 1). Obwohl diese DNA alle vegetativen Funktionen der Zelle steuert, gibt es keine Anzeichen für eine Folge dieses Verlustes. Ein solches Anzeichen ist z. B. die Vermehrungsgeschwindigkeit, von der wir glauben, daß sie ein Indiz für Vitalität und Intaktheit der Zellen ist. Aber merk-

würdigerweise bleibt der Verlust von DNA auch hier ohne Wirkung. Die Ursache für diesen Verlust ist schnell gefunden: die Synthesegeschwindigkeit der DNA ist vermindert. Die Zellen scheinen dies auch zu bemerken. Jedenfalls versuchen sie, dem Effekt durch verlängerte Syntheszeiten zu begegnen, wenn auch ohne Erfolg. Für den Biologen stellt sich nun die Frage, was es mit der DNA-Menge auf sich hat: Besitzt die behandelte Zelle zu wenig oder die unbehandelte zu viel? Letzteres ist unwahrscheinlich angesichts des „Preises“ für polymere DNA und angesichts der Tatsache, daß Zellen in Kultur perfekte Optimierer ihres Stoffwechsels bei den gegebenen stofflichen und energetischen Ressourcen sind. Welche DNA Sequenzen sind es, die nun nicht mehr kopiert werden, spezifische oder, zufallsgesteuert, von allen ein Drittel? Aber in jedem Fall – ganz unabhängig von der Frage, ob ein Verlust von DNA schädlich ist – sind spezifisch provozierbare Reaktionen von Zelleistungen von zweifacher Bedeutung für die Biologie, als Instrument unserer Wissensvermehrung und als Werkzeug für gezielte Eingriffe. Ein solcher gezielter Eingriff kann z. B. in der Manipulation der DNA-Mengen bestehen, über deren Rolle für den Zellhaushalt man nur spekulieren könnte, wären willkürliche Änderungen ihres Bestandes unmöglich.

Die häufige Antwort des Biologen: Ja, aber...

Azadirachtin ist ein pflanzlicher Wirkstoff, der vom Neem-Baum produziert wird. Wegen seiner insektiziden Eigenschaften erfährt er zunehmende Beachtung, zumal toxische Effekte bei anderen Tiergruppen als Insekten bisher unbekannt sind. Seine insektizide Wirkung übt Azadirachtin in einer recht komplexen Weise aus, indem es z. B. die Larvalentwicklung stört oder das Freßverhalten der Tiere mit fatalen Folgen verändert (JLU-FORUM Nr. 4/1983). Dagegen ist über seine zelluläre Wirkungsweise wenig bekannt. Wegen seiner Molekülstruktur – Azadirachtin ist ein Steroidkörper – erschien uns seine Wechselwirkung

mit Chromatin nicht ausgeschlossen, weshalb wir es einem breitgefächerten Versuchsraster mit dem Tetrahymena-System unterwarfen. In der Tat erwies es sich als außerordentlich wirksam, indem es die Zellvermehrung rasch unterbindet. Dieser Effekt ist Dosis-abhängig und tritt bereits bei so kleinen Konzentrationen auf, wie sie für sehr spezifische Hemmstoffe üblich sind. Da von allen Molekülklassen die RNA besonders empfindlich reagiert (die Synthese wird auf $\frac{1}{10}$ der normalen Rate vermindert), vermuten wir hier die stoffliche Ursache für die Teilungshemmung. Zwar erholen sich die Zellen nach einiger Zeit, aber ihre Wachstumsgeschwindigkeit bleibt um 50% hinter der der Kontrolle zurück. Bemerkenswert ist auch die Weise, in der sich die befristete Teilungshemmung einstellt. Wir glauben, daß die Zellen Schritt für Schritt und linear ihren Zellteilungszyklus durchlaufen analog zu der Art, in der ein Mikroprozessor ein Programm abarbeitet. Die Behandlung mit Azadirachtin stoppt diesen linearen Ablauf abrupt, und jede Zelle hält genau bei jenem Schritt ihres „Wachstums und Teilungsprogramms“ inne, an dem die Droge sie erreicht. Nach einer Weile startet sie aufs neue, um ihr Ziel, die Zellteilung zu erreichen – wenn auch mit geringerer Geschwindigkeit. Dieser Ablauf erinnert an eine Uhr, die nach dem Aufziehen dort weiterläuft, wo sie vorher stehen geblieben ist. Das paßt nur schlecht ins allgemein akzeptierte Bild einer zyklusspezifischen Empfindlichkeit von Zellen gegenüber wachstumshemmenden Drogen. Normalerweise ist ein Programmschritt der empfindlichste und eine Zellpopulation häuft solche Stadien an, deren Passage durch eine Droge blockiert wird – eine Tatsache, die man sich bei der Chemotherapie von Tumoren zunutze macht. Vor diesem Hintergrund erscheint die Wirkung von Azadirachtin ungewöhnlich und die Erforschung ihrer Ursachen um so wünschenswerter.

Wenn zwei sich lieben, überlebt nur einer

Im Prinzip können Mutationen sehr leicht ausgelöst werden, und die allgemeine Sorge ist ja auch eher, daß dies nicht mit uns geschehen möge. Die Schwierigkeit besteht jedoch darin, die wenigen mutierten Individuen in der großen Masse der Nicht-Mutierten zu identifizieren. Auch wäre es in der Mutationsforschung und bei Mutagenitätsprüfungen von Wirkstoffen wünschenswert, rezessive Mutationen zu erfassen. Daß solche rezessiven Mutationen de novo und im reinerbigen Zustand auftreten, nämlich einmal pro Allel, ist von astronomischer Unwahrscheinlichkeit. Im Tierversuch lassen sich zwar homozygote (reinerbi-

ge) Merkmalsträger in Kreuzungsversuchen erzeugen, aber Zellen in Kultur paaren sich leider nicht. Oder doch? Tetrahymena ist zwar eine Zelle, aber gleichzeitig ein Tier mit experimentell provozierbarer Paarungsbereitschaft. Die sexuellen Praktiken von Wimpertierchen sind recht exotischer Natur, aber sie lassen sich nutzen, „Reinkulturen“ von homozygoten Individuen zu züchten. Hierzu benutzen wir zwei Elternstämme, den Elternteil ChxIV, der mutagenisiert wird, und den Partner A*III. Bei der Paarung zwischen ChxIV und A*III bilden sich durch Reifeteilung aus einem diploiden Mikronukleus zwei haploide Kerne, deren einer mit dem Sexualpartner getauscht wird. Beim Elternteil A*III ist jedoch die vorangehende Reifeteilung nicht vollständig (abortiv), so daß er zwar im Paarungsverlauf einen haploiden Kern erhält, aber selbst keinen spendet. Daher erhält keiner der beiden Partner zwei Kerne, die verschmelzen können, aus dem normalerweise der vegetative Makronukleus entsteht, und beide Partner dieser folgenreichen Zweierbeziehung müßten zugrunde gehen. Das tun sie aber nicht, da bei Tetrahymena aus haploiden Kernen nach Verdopplung der DNA und „Selbstung“ funk-

tionsfähige Synkarion entstehen können. Sie sind alle vom Typ ChxIV, dem Sender, sind alle homozygot und veranschaulichen den seltenen Fall einer vollkommenen Selbstaufgabe eines Partners (des A*III-Elternteils), der im Geschlechtsakt die Identität des anderen annimmt.

Antibiotika-„Therapie“

Man kann sie leicht von den nicht gepaarten Eltern unterscheiden, weil der ChxIV-Elternteil mischerbig ein rezessives Gen für Cycloheximid-Resistenz trägt, das die erfolgreichen Geschlechtspartner nun homozygot ablesen. (Cycloheximid ist ein Antibiotikum, das normalerweise Zellen in Kultur hemmt und z. B. bei der Tumorbekämpfung eingesetzt wird.) Nur sie überleben eine Behandlung mit dieser Droge. Ob unter dieser Nachkommenschaft vermehrt Mutationen auftreten (z. B. nach Anwendung eines Agens mit vermuteter mutagener Wirkung), kann an dem Eukaryon Tetrahymena in ähnlicher Weise und mit ähnlicher Einfachheit wie an Bakterien geprüft werden, indem man als Merkmal für Mutation eine neu erworbene Eigenschaft benutzt: die Resistenz gegenüber einer Droge, die den

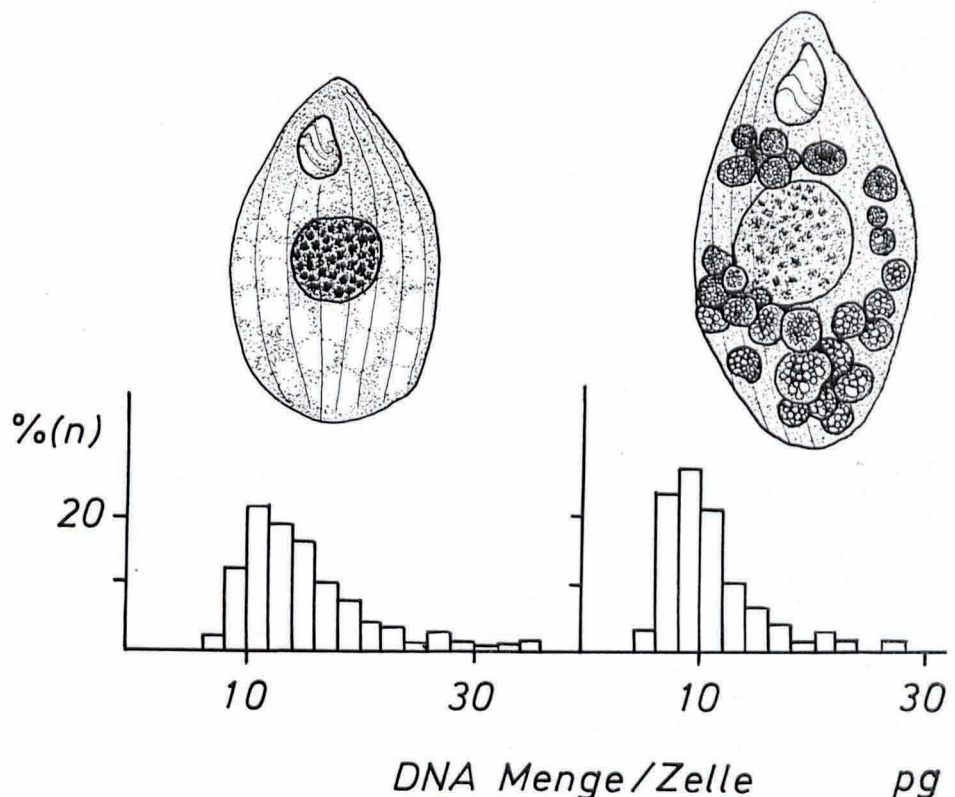


Abb. 1: Die Wirkung von Quarzstaub auf Tetrahymena. Behandelte Zellen (rechts) erkennt man an ihrer Größe und an zahlreichen Zelleinschlüssen. Als einzige sichtbare Wirkung tritt eine Verminderung des DNA-Gehaltes dieser Zellen auf: Wie das Histogramm zeigt, fehlen die großen Gehalte, während kleine häufiger werden. Biochemischen Analysen zufolge, geht ein Drittel der DNA verloren, ohne daß sich irgendwelche Folgen einstellen.

Wildtyp abtötet. Wir haben zu diesem Zweck das Antibiotikum Paramomycin benutzt, das für nicht mutierte Tetrahymenzellen tödlich wirkt, für mutierte nicht. Auf diese Weise war es uns möglich, aktuelle Mutationsraten eines Gens zu ermitteln, das ist die Anzahl der mutierten Zellen in Prozent der Lebenden.

An isolierten Zellen von Säugern sind solche Messungen nicht durchführbar, da man nicht zwischen Zell- und Genotoxizität unterscheiden kann. Man braucht also ganze Tiere oder muß mit Bakterien arbeiten, die zwar einfach zu handhaben, aber nicht diploid sind. Abbildung 2 zeigt, daß auch „Schwimmverhalten“ ein empfindliches Kriterium für genetische und cytologische Effekte sein kann. Hierzu tragen auch winzige morphologische Veränderungen bei, die sich erst beim Schwimmen hydrodynamisch auswirken und zu völlig abweichenden Spuren führen. Ganz sicher ist unser Tetrahymena-System kein Ideal-System. Seine Schwäche hat viel mit einem der ernstesten Probleme der Biologie zu tun, dem Reduktionismus. Das bezieht sich im geschilderten Zusammenhang besonders auf die Frage, ob aus den teils drastischen Wirkungen von Stoffen auf Zelleistungen auf eine Gefährdung des Menschen beim Kontakt mit eben diesen Stoffen geschlossen werden darf. Seine Stärke ist ein hinreichender, doch überschaubarer Grad an Komplexität und vor allem unsere genaue Kenntnis seiner zellbiologischen Eigenschaften. Ähnlich wie wir das Normale erst als normal würdigen können, nachdem wir es verändert haben, so möchten wir aus vielschichtigen Zelleistungen durch unsere Eingriffe solche herausfiltern, die als Glieder von Kausalketten bisher nicht aufgefallen sind.

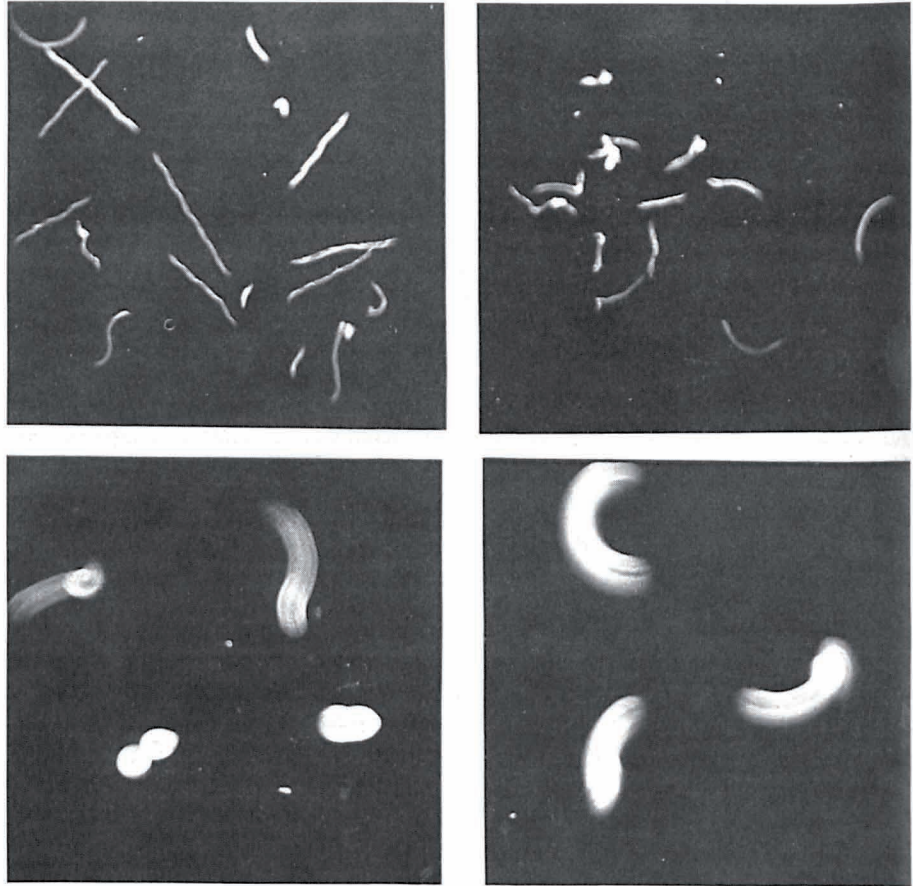


Abb. 2: Eine Studie der Schwimmstile im Reagenzglas. Diese photographische Aufzeichnung beschreibt den Weg, den Zellen in einer Sekunde zurückgelegt haben. Im Durchschnitt sind das 500 μm oder 10 Zelllängen. Schwächere Vergrößerungen (oben) zeigen die majestätischen Muster von normalen Langstrecken-Schwimmern (links) oder planloses Taumeln und Stillstand (rechts), wie sie bei Mutanten oder behandelten Zellen auftreten können. Stärkere Vergrößerungen (unten) enthüllen, daß Bewegungslosigkeit auch honorige Motive haben kann: die Zellteilung.

Zu den Autoren: Professor Dr. Günter Cleffmann ist der geschäftsführende Direktor des Instituts für Tierphysiologie, Privatdozent Dr. Fritz Jauker wissenschaftlicher Bediensteter am selben Institut. Als beide Wissenschaftler 1970 das Institutsgebäude übernahmen, hatte es eine Kapazität von 12 Praktikumsplätzen. Dank der Neubauten und einer großzügigen räumlichen Umverteilung können heute über 100 Studenten betreut werden. Die wissenschaftliche Arbeit des Instituts befaßt sich mit Problemen des Zellwachstums und der Zellteilung. Dem Institut ist eine eigenständige Abteilung mit der Arbeitsrichtung Sinnesphysiologie angegliedert.

JUSTUS-LIEBIG-

T UNIVERSITÄT
GIESSEN