

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Probennahme und Aufarbeitung der Wasser- und Sedimentproben

#### 2.1.1 Probennahme und -verarbeitung

Die Wasserproben wurden aus den beiden Fließgewässern Krähenbach und Körsch entnommen, in Polyethylenflaschen (PE) abgefüllt und bei -24 °C gelagert. Da die Wasserproben zu einem späteren Zeitpunkt im Biotest getestet wurden, können sie in PE-Flaschen über längere Zeit gelagert werden (Klee, 1993). Glasflaschen (Fa. Schott, Mainz) wurden aufgrund ihres geringen Ausdehnungskoeffizienten und dem großen Materialverlust beim Tiefkühlen (Klee, 1993; Rump & Krist, 1992) nicht verwendet.

Die Sedimentproben wurden den Fließgewässern entnommen und in 1 L PE-Weithalsflaschen abgefüllt. Die Proben wurden unter Kühlung aufbewahrt und sobald wie möglich weiter bearbeitet. Um das Porenwasser der Sedimentproben zu gewinnen, wurden jeweils 50 mL Gesamtsediment in Greiner-Zentrifugenröhrchen (PE) mit 3000 g bei 4 °C über 10 min zentrifugiert und das Porenwasser im Überstand sofort bei -20 °C tiefgefroren (Bufflap & Allen, 1995; Adams, 1994).

#### 2.1.2 Extraktion und Elution der Sedimentproben

Für die Herstellung von Sedimenteluaten und -extrakten wurden etwa 250 mL nasses Sediment in 1 L-Rundkolben (Fa. Schott) überführt, unter Rotation bei -30 °C auf die Glaswand des Kolbens aufgezogen, dabei schockgefroren und anschließend gefriergetrocknet (Beta 1-8 K, Fa. Christ, Mudroch & Bourbonniere, 1994). Die gefriergetrockneten, verschlossenen Proben wurden unter Kühlung bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

#### 2.1.3 Wäßrige Eluate

Die Sedimentproben wurden entsprechend ihrem Trockengewicht mit der zehnfachen Kunstwasser- menge versetzt und 24 h auf dem Rundschüttler geschüttelt oder auf einem Magnetrührer mit 200 Upm bei 18 °C gerührt. Durch Zentrifugation (3000 g bei 4 °C) wurde das wäßrige Eluat von feinen Partikeln befreit. Die Eluate wurden nativ ohne Sterilfiltration in den Biotests auf ihre Wirkung hin untersucht.

2 Ansätze wurden hergestellt:

- (1) Kunstwasser + Sediment;
- (2) Kunstwasser + 0,1 % Tween 80 + Sediment

*Kunstwasser:* 11,76 g  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  auf 1 L mit Aqua bidest. auffüllen  
4,93 g  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  auf 1 L mit Aqua bidest. auffüllen  
2,59 g  $\text{NaHCO}_3$  auf 1 L mit Aqua bidest. auffüllen  
0,23 g  $\text{KCl}$  auf 1 L mit Aqua bidest. auffüllen

aus diesen 4 Lösungen jeweils 25 mL mischen und auf 1 L mit Aqua bidest. auffüllen.

Für die embryotoxikologischen Untersuchungen wurde die Elution der Sedimente und die Verdünnung der einzelnen Konzentrationen mit künstlichem Wasser nach ISO-Standard 7346/3 durchgeführt.

## 2. Material und Methoden

*Künstliches Wasser*:  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  58,8 mg/L,  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  24,6 mg/L,  $\text{NaHCO}_3$  12,6 mg/L, KCL 5,5 mg/L. Die Stammlösung wurde 1:5 mit Aqua bidest. verdünnt. Das Kunstwasser hatte einen pH-Wert von  $7,8 \pm 0,2$  und wurde vor dem Testansatz 24 h belüftet sowie auf  $26^\circ\text{C}$  erwärmt.

### 2.1.4 Soxhlet-Extraktion mit Aceton

Unter einer Extraktion versteht man die Überführung eines Stoffes aus einer Phase, in der er gelöst oder suspendiert ist, in eine andere flüssige Phase. Diese Überführung ist möglich, weil sich der Stoff in einem bestimmten Verhältnis auf die beiden Phasen verteilt (Becker et al., 1988).

Die gefriergetrockneten Sedimentproben wurden durch Aufschütteln gleichmäßig in dem Lagerungsbehälter verteilt (homogenes Verteilen der verschiedenen Korngrößen). 20 g Sediment von Krähenbach und Körsch wurden in jeweils eine Extraktionshülse (50 mL; Fa. Schleicher & Schuell) überführt. Die Extraktion der Proben wurde mit jeweils 200 mL Aceton durchgeführt. Aceton wurde aufgrund seiner hohen Extraktionsleistung bei geringer Umweltschädlichkeit verwendet. Das Soxhlet bestand aus einem Kolben mit 2 Siedesteinen, einem Extraktionsaufsatz und einem Rückflußkühler. Die mit den Sedimentproben und Glaswolle aufgefüllten Hülsen waren bei laufender Extraktion teilweise vollständig vom Lösungsmittel bedeckt. Um die Wärmeabgabe des Rundkolbens und des Steigrohres an die Außenluft gering zu halten, wurden diese mit Aluminiumfolie umwickelt. Die Extraktion erfolgte unter ständiger Wasserkühlung, bei 100 mL Soxhlet mit 12 Zyklen pro Stunde bis 12 h. Die Acetonextrakte wurden mit einem Rotationsverdampfer (400 mbar,  $38^\circ\text{C}$ ) eingengt, mit  $\text{N}_2$  (1,5 - 2 bar) zur Trockne abgeblasen und bei  $-24^\circ\text{C}$  im Tiefkühlfach aufbewahrt. Vor Gebrauch wurden die abgeblasenen Sedimentextrakte mit 750  $\mu\text{L}$  Dimethylsulfoxid rückgelöst und in Biotests auf ihre Wirkung hin untersucht.

### 2.1.5 Zusammensetzung der künstlichen Schadstoffgemische

Es wurden zwei Schadstoffgemische (Tab. 2.1) in Ethanol bzw. DMSO angesetzt, in MEM-Medium auf  $1:5 \times 10^6$  (1-fach),  $1:5 \times 10^5$  (10-fach) und  $1:1 \times 10^5$  (50-fach) verdünnt und für 48 h auf die isolierten Hepatocyten gegeben. Das 1997-Gemisch wurde in Ethanol, das 1998-Gemisch in DMSO angesetzt. Als Kontrollen wurden die entsprechenden Lösungsmittel in einer Verdünnung von  $1:1 \times 10^5$  (50-fach) auf die Zellen gegeben.

Tab. 2.1: Zusammensetzung des 1997- und 1998-Schadstoffgemischs (Lösungsmittel Ethanol bzw. DMSO). Die Konzentrationsangaben entsprechen der 50-fachen Schadstoffgemischkonzentration.

Chemische Verbindung	Konz. (ng/L)	Konz. (ng/L)
	1997- Schadstoffgemisch Ethanol	1998- Schadstoffgemisch DMSO
Lindan	1170	1170
DDT	5	-
DDE	10	-
Pentachlorphenol	32	-
$\alpha$ -Hexachlorbenzol	6	6
Trifluoralin	74	74
PCB 28	12	-

## 2. Material und Methoden

---

PCB 52	9	-
PCB 101	5	-
PCB 153	5	-
PCB 138	3	-
PCB 180	1	-
Naphthalin	2380	-
Acenaphthylen	75	-
Acenaphthen	495	-
Fluoren	78	-
Phenanthren	212	212
Anthracen	42	41,9
Fluoranthren	58	78
Pyren	33	33,4
Benz(a)anthracen	-	4,78
Chrysen	-	5,8
Benzo(b)fluoranthren	-	4,58
Benz(a)pyren	-	3,68

---

### 2.2 Methoden für Zellkultur und Biochemie

#### 2.2.1 Geräte, Chemikalien und Lösungen

##### Geräte

- Sterile Werkbänke (Fa. Gelaire<sup>®</sup> Flow Laboratories und Fa. Nuair<sup>™</sup> NU-969), Sarstedt
- pH-Meter, 761 Calimatic Fa. Knick
- Inversmikroskop mit Phasenkontrast, Fa. Olympus, CK-2, Tokyo, Japan
- Kühlzentrifuge, Fa. Heraeus Sepatech, Biofuge 17RS, Hanau
- Mikrotiterplatten-Spektralphotometer, Fa. SLT, Crailsheim
- Ultraschall-Desintegrator, Fa. Bandelin, Sonoplus D70, Berlin
- Brutschränke mit Kühlung, Fa. Heraeus BK600, Hanau
- Wärmebad, Fa. GFL, Burgwedel

##### Chemikalien und Lösungen

###### Chemikalien

1-Chlor-2,4-Dinitrobenzol (CDNB)	Serva, Heidelberg
$\alpha$ -Ketoglutarat	Sigma, Deisenhofen
Benzocain	Sigma
Cacodylsäure-Na-Salz-Trihydrat	Serva
Collagenase H	Roche Diagnostics, Mannheim
Diglycidylether (DER 736)	Serva
Dimethylaminoethanol (DMAE)	Serva

## 2. Material und Methoden

---

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva
Dithioeitrol (DTT)	Serva
EDTA (Ethylendiamin-Tetraessigsäure)	Serva
Glutardialdehyd	Merck, Darmstadt
Glutathion	Serva
HEPES (N-(2-(Hydroxyethyl)-Piperizin-N-2-Ethansulfonsäure)	Serva
Kaliumhexacyanoferrat	Merck
L-Alanin	Serva
L-Glutamin	Serva
Maleimid	Sigma
Mops (Morpholinopropan-Sulfonsäure)	Serva
NADP Na <sub>2</sub> -Salz	Serva
Natrium-Pyruvat	Sigma
Neutralrot (2-Methyl-3-Amino-7-Dimethylaminophenanzin)	Sigma
Nonenylbernsteinsäureanhydrid (NSA)	Serva
o-Nitrophenylacetat	Sigma
Osmiumtetroxid	Paesel & Lorei, Frankfurt
Ovalbumin	Serva
PBS	Biochrom, Berlin
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Serva
Polyvinylpyrrolidon	Serva
Pyridoxalphosphat	Serva
Sibernitrat	Riedel-de-Haen, Seelze
Thiobarbiturat	Serva
Triton X-100	Packard, Illinois
Uranylacetat-Dihydrat	Merck
Vinylcyclohexendioxid (VCD)	Serva

### *Zellkulturmedien und Spüllösungen*

- Minimal Essential Medium (MEM), Eagle-Modifikation mit Earl's Salzen, 20 mM Hepes, 2 mM L-Glutamin, 650 mg/L NaHCO<sub>3</sub>, Fa. Sigma
- Minimal Essential Medium (MEM), Hanks-Modifikation mit 20 mM Hepes, 350 mg/L NaHCO<sub>3</sub>, Fa. Sigma
- DPBS (Dulbecco's Phosphate buffered saline) ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>, Fa. Biochrom, Berlin
  - 8 g NaCl
  - 0,2 g KCl
  - 1,15 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
  - 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
  - ad 1 L Aqua bidest.
- Präperfusionsmedium
  - 136,9 mM NaCl
  - 2,7 mM KCl
  - 23,8 mM NaHCO<sub>3</sub>
  - 6,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
  - 2 mM EDTA

## 2. Material und Methoden

---

auf 1 L mit Aqua bidest. auffüllen, pH-Wert 7,4; Sterilfiltration mit 0,2 µm Filter (Fa. Schleicher & Schuell, Dassel)

### *Medienzusätze*

- Gentamycinsulfat, Fa. Biochrom
- L-Glutamin, 200 mM Stammlösung, Fa. Biochrom
- Penicillin/Streptomycin (10000 E / 10000 µg/mL) in 0,9 % NaCl, Fa. Sigma
- Neomycinsulfat, Fa. Sigma
- Fötales Kälberserum (FKS), Charge 44H3385, Fa. Sigma

### *Dissoziationslösungen*

- 0,05 % Schweine-Trypsin / 0,02 % EDTA-Lösung in Hanks Balance Salt Solution (HBSS), Fa. Sigma

### *Proteinpräparationen*

- Rattenleber-S9-Fraktion aus Phenobarbital / β-Naphtoflavon-induzierten Ratten, Fa. CCR, Roßdorf
- Laktat-Dehydrogenase, E. C. 1.1.1.27, aus Kaninchenmuskel, 642 U/mg; 10 mg/0,72 mL, Fa. Serva
- Collagenase H aus *Clostridium histolyticum*, Roche Diagnostics Mannheim; 14 mg in 10 mL MEM Hanks-Medium ohne Antibiotika vorlösen, sterilfiltrieren und mit Kulturmedium auf 70 mL auffüllen

### *Lösungen und Einbettmedium*

- S9-Puffer
  - 6,9 mg NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
  - 224 mg KCl
  - 294 mg CaCl<sub>2</sub>
  - 203 mg MgCl<sub>2</sub>
  - ad 100 mL Aqua bidest., pH 7,4; für 3 Wochen bei 4 °C haltbar
  - 1,52 mg Glucose-6-Phosphat / mL S9-Mix im Testansatz
  - 3,13 mg NADP / mL S9-Mix im Testansatz,
  - vor Gebrauch mit Sterilfilter (0,2 µm, Fa. Schleicher & Schuell) filtrieren
- Neutralrot-Färbelösung
  - 1 mL 0,4 % Neutralrot (2-Methyl-3-amino-7-dimethylaminophenazin, Fa. Sigma) in Aqua bidest.
  - 79 mL MEM ohne FKS mit Antibiotika
  - 24 h bei 37 °C inkubieren, vor Gebrauch mit Sterilfilter (0,4 µm, Fa. Schleicher & Schuell) filtrieren
- Neutralrot-Waschlösung
  - 10 g Formaldehyd
  - 10 g CaCl<sub>2</sub>
  - ad 1 L Aqua bidest.

## 2. Material und Methoden

---

- Neutralrot-Extraktionslösung
  - 5 mL Eisessig
  - 250 mL Ethanol (99,9 %, p.a.)
  - ad 500 mL Aqua bidest.
- Homogenisationspuffer
  - 12,5 mL 2 M Saccharose
  - 25 mL 20 mM Mops, pH 7,4
  - 10 mL 10 mM 1 % EDTA/Ethanol
  - 0,2 mL 0,1 M Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), in Isopropanol
  - 13 mg  $\epsilon$ -Aminocapronsäure
  - 67 mg 0,3 M Mercaptoethanol
  - 20  $\mu$ L Dithiotreitol (DTT)
  - ad 100 mL Aqua bidest.
- Fixans-Lösung
  - 2,5 % Glutardialdehyd
  - 4 % Polyvinylpyrrolidon
  - 0,05 %  $\text{CaCl}_2$
  - in 0,1 M Cacodylatpuffer; pH-Wert 7,4
- Maleatpuffer
  - Stammlösung 1: 19,69 g Maleinsäureanhydrid, 8 g NaOH auf 1 L mit Aqua bidest. auffüllen
  - Stammlösung 2: 0,2 N NaOH
  - 50 mL Stammlösung 1 und 7,2 mL Stammlösung 2 auf 200 mL mit Aqua bidest auffüllen, pH-Wert 5,2
- Einbettmedium Spurr's Medium
  - 10 g Vinylcyclohexendioxid
  - 5 g Diglycidether (DER 736)
  - 26 g Nonenylbernsteinanhydrid (NSA)
  - 0,4 g Dimethylaminoethanol (DMAE, S1)

### 2.2.2 Herkunft der verwendeten Dauerzelllinie

Die fibroblastenähnliche Zelllinie RTG-2 wurde aus der Gonade der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) gewonnen (Wolf & Quimby, 1962). Die RTG-2-Zellen der 128. Passage wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Helmut Segner, Umweltforschungszentrum Leipzig, zur Verfügung gestellt. Kommerziell sind die Zellen von der American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, Maryland, USA) sowie von der Firma ICN / Flow in Meckenheim zu beziehen.

### 2.2.3 Kulturbedingungen für die Zelllinie RTG-2

Die RTG-2-Zellen werden in Minimal Essential Medium (MEM), Modifikation nach Eagle, mit 20 mM HEPES und Earle's Salzen, 2 mM L-Glutamin, supplementiert mit 850 mg/L Natriumhydrogencarbonat, 10 % fötalem Kälberserum (FKS) und 50 mg/L Neomycinsulfat in 80 cm<sup>3</sup>-Zellkulturflaschen (Nunc, Wiesbaden) bei einer Inkubationstemperatur von 20 °C ohne spezielle Be-gasung gehalten. Nach einer Inkubationsdauer von ca. 4 Tagen bilden die Zellen einen geschlossenen Monolayer und können bis zu 4 Monaten bei 4 °C aufbewahrt werden.

## 2. Material und Methoden

---

Die RTG-2-Zellen einer dichtgewachsenen Kulturflasche werden zur Passage auf zwei neue Flaschen verteilt. Das alte Medium wird aus den Flaschen dekantiert und die Zellen für 20 sec mit 15 mL PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  gewaschen. Nach Dekantieren der PBS-Lösung werden 2 mL 0,05 % Trypsin / 0,02 % EDTA-Lösung zu den Zellen pipettiert. Nach 2 - 3 min lösen sich die festhaftenden Zellen vom Untergrund. Dies kann durch leichtes Klopfen an die Flasche unterstützt werden. Die vereinzelt RTG-2-Zellen werden in 5 mL Medium aufgenommen (dabei wird das Trypsin durch die Protease-Inhibitoren des FKS gehemmt) durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette resuspendiert, zu gleichen Teilen auf zwei 80 cm<sup>3</sup>-Flaschen verteilt und mit 12 mL Medium aufgefüllt.

### 2.2.4 Durchführung des Neutralrottests mit RTG-2-Zellen (Abb. 2.1)

Der Endpunkt Neutralrot wurde in *In vitro*-Cytotoxizitätstests erstmals von Borenfreund & Puerner (1984) an einer Mäusezelllinie beschrieben. Der Test beruht auf einer Aufnahme des wasserlöslichen, leicht basischen Farbstoffes Neutralrot (3-Methyl-3-amino-7-dimethylaminophenazin) in die Lysosomen intakter Zellen. Die Anreicherung des Farbstoffes resultiert aus der Deprotonierung des Farbstoffes im sauren Milieu der Lysosomen oder einer Bindung an saure Moleküle der lysosomalen Matrix (Barile, 1994; Bulychev et al., 1978). Schädigungen der Zellmembran und der lysosomalen Membran resultieren in einer verringerten Farbstoffretention während eines Waschvorganges, die mittels einer photometrischen Messung bestimmt werden kann. Die Neutralrotfärbelösung wird aus einer Stammlösung (0,4 % in Aqua bidest.) durch eine 1:80-Verdünnung in MEM ohne FKS, mit Antibiotika hergestellt, über Nacht bei 20 °C vorinkubiert und zum Entfernen feiner Farbstoffkristalle durch einen 0,2 µm -Sterilfilter (Schleicher & Schuell) filtriert.

Der Neutralrottest wird gemäß dem Verdünnungsschema in Abb. 2.1 durchgeführt. Bei diesem Pipettierschema werden die Spalten 1 und 12 als Blanks benutzt, so daß pro Schadstoffkonzentration 8 Replika getestet werden. Die Zellen werden in einfach konzentriertem MEM in einer Konzentration von  $3 - 4 \times 10^5$  aufgenommen, 100 µL der Zellsuspension in die Wells einer Mikrotiterplatte pipettiert und für 4 h bei 20 °C inkubiert. Die Wasser- und Sediment-Eluat-Proben werden bei Raumtemperatur im Wasserbad aufgetaut und nach mehrmaligem Aufschütteln für 2 h sedimentiert. Nur der Überstand der Proben wird im Test eingesetzt. Die Verdünnungsstufen einer Abwasservorverdünnung (1:1 in doppelt konzentriertem MEM, mit 200 mg/L Neomycinsulfat, 1700 mg/L Natriumhydrogencarbonat und 20 % FKS) werden in sterilen Reagenzgläsern angesetzt. Der pH-Wert der Verdünnungen wird unter der Werkbank mit einem pH-Meter (Schott, CG 838) bestimmt und mit NaOH oder HCl auf  $7,4 \pm 0,3$  eingestellt. Die Platten mit den angewachsenen Zellen werden vorsichtig dekantiert und mit jeweils 200 µL der Abwasserverdünnungen pro Vertiefung der Reihen 4 bis 10 gefüllt. Die Reihen 2 und 11 werden mit MEM als Kontrolle und die Reihe 3 mit 40 mg/L der Referenzchemikalie 3,5-DCP in MEM gefüllt. Die 96-Well Platten werden mit sterilen Folien abgeklebt und für 20 h bei 20 °C inkubiert. Nach dem Dekantieren der Proben werden 100 µL Neutralrot-Lösung zu den Zellen pipettiert und für 3 h im Brutschrank inkubiert. Das Färbemedium wird dekantiert, die Zellen mit 100 µL PBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) gewaschen. Der in den Lysosomen der intakten Zellen zurückgehaltene Farbstoff wird mit 100 µL Elutionslösung (50 % Ethanol; 1 % Essigsäure) unter Schütteln rückgelöst. Die Absorption wird mit einem Mikrotiterplattenreader (SLT, Spectra™) bei einer Wellenlänge von 540 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 690 nm kolorimetrisch bestimmt.

## 2. Material und Methoden

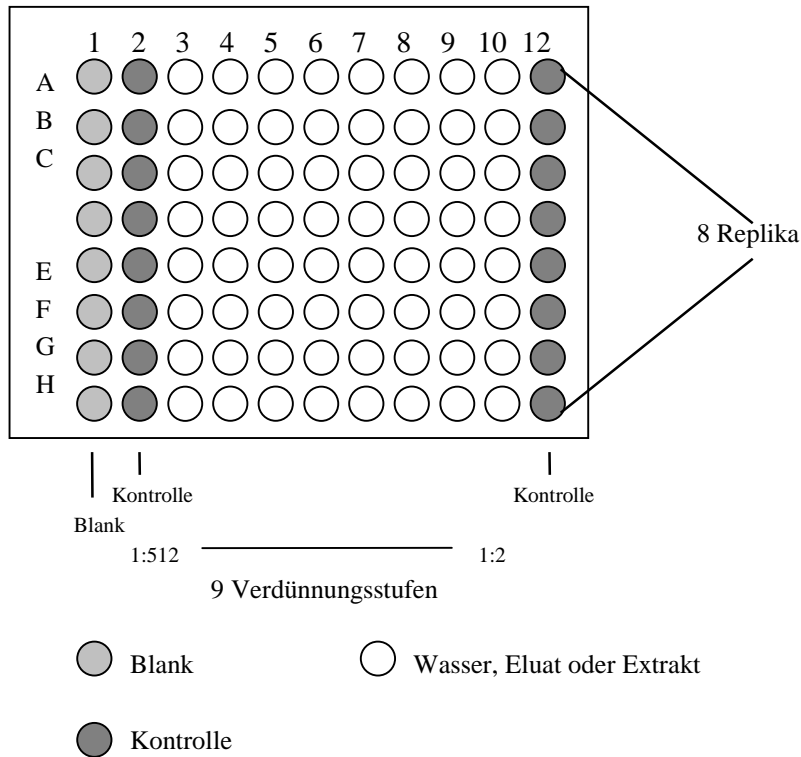


Abb. 2.1: Pipettierschema für Cytotoxizitätstests mit permanenten Zellkulturen.

### 2.2.5 S9-Supplementierung des Neutralrottests

Zur Kompensation der geringen Biotransformationskapazität der permanenten Zelllinie RTG-2 wurden die *In vitro*-Expositionsexperimente auch mit einer S9-Komplementierung durchgeführt. Hierzu wurde ein S9-Mix aus der Leber männlicher Wistar-Ratten, deren Biotransformationssystem durch eine Injektion mit Phenobarbital und  $\beta$ -Naphthoflavon induziert wurde (26,8 mg Protein/mL S9; CCR, Roßdorf) in S9-Puffer (50  $\mu$ L NaHPO<sub>4</sub>, pH 7,4, 30 mM KCl, 20 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM Glucose-6-phosphat, 4 mM NADP) sterilfiltriert und auf eine Proteinkonzentration von 2 mg/mL eingestellt. Jedem Probenansatz von 200  $\mu$ L wurden 20  $\mu$ L S9-Mix zugesetzt.

### 2.2.6 Graphische Auswertung des Neutralrottests

Der Neutralrottest wurde mit Microsoft Excel<sup>®</sup> 5.0 ausgewertet. Von jeder Verdünnungsstufe und der Kontrolle wurden die absoluten Mittelwerte der photometrischen Messung nach Abzug des Blank-Mittelwertes ermittelt. Bezogen auf die Kontrolle (= 100 %) wurden schließlich die relativen Mittelwerte mit Standardabweichungen in Prozent angegeben.

Der EC<sub>50</sub>-Wert (effective concentration) wurde als der Wert angenommen, bei dem 50 % der Zellen geschädigt sind. Dieser wurde graphisch ermittelt.

### 2.3 Hälterung der Spender-Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*)

Die erforderlichen Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) wurden vom Forellenzuchtbetrieb Mack, Firma Juraquell (Wellheim) bezogen und zu jeweils 40 Tieren in 600 L-Fiberglasbecken ge-



## 2. Material und Methoden

---

halten. Die permanent belüfteten Tanks befanden sich in einer Durchflußanlage mit einer Austauschrate von 50 L/h. Das Wasser wurde auf  $16 \pm 1$  °C temperiert und besaß eine Gesamthärte von 325 mg/L  $\text{CaCO}_3$ , der pH-Wert betrug  $7,1 \pm 0,1$  und der Ammoniumgehalt war  $< 0,01$  mg/L.

Die Fütterung erfolgte einmal täglich mit handelsüblichem Futter (49 % Rohprotein, 2,9 % Lysin, 10,5 % Rohfett, 2 % Rohfaser, 9,3 % Rohasche; Ringfutter, Raiffeisen).

Zum Zeitpunkt der Hepatocyten-Isolierung besaßen die zwei bis drei Jahre alten Forellen ein durchschnittliches Gewicht von 300 -400 g.

### 2.3.1 Isolierung der Hepatocyten

Die Regenbogenforelle wurden mit einem Netz aus den Becken gefangen und mit einem Schlag auf das Nachhirn getötet. Nach Abwiegen und äußerlicher Desinfektion mit 70 %-igem Ethanol wurde der Fisch unter eine sterile Werkbank überführt. Die Leibeshöhle wurde mit einer Schere vom Anus beginnend ventral, lateral sowie opercular eröffnet, so daß die inneren Organe frei zugänglich waren. In die Leberpfortader wurde eine Flügelkanüle (äußerer  $\varnothing$  0,8 mm, innerer  $\varnothing$  0,6 mm) eingeführt und mit zwei Arterienklemmen gesichert. Mit einer  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -freien Präperfusionslösung (Durchflußgeschwindigkeit ca. 7 mL/min) wurde das Blut aus der Leber für 8 min gespült. Zuvor wurde der Sinus venosus angeschnitten, um den Austritt des Blutes und der Präperfusionslösung zu ermöglichen. Währenddessen wurde die Leber völlig freipräpariert und mit einer Kunststoff-Arterienklemme an einem Stativ aufgehängt. Danach wurde die Leber im Kreislauf mit ca. 70 mL MEM-Hanks-Medium mit 0,02 % Collagenase H aus *Clostridium histolyticum* (Roche Diagnostics, Mannheim) für 30 min (5,5 mL/min für 15 min und anschließend 7 mL/min für 15 min) gespült. Schließlich wurde die Leber in eine sterile Petrischale mit 10 ml Kulturmedium überführt, von der Gallenblase befreit und mit einer Rasierklinge angeschnitten und die Zellen mit einem Glasstab vereinzelt. Die milchige Hepatocytensuspension wurde zunächst durch ein Netz mit 250  $\mu\text{m}$ , dann durch ein Netz mit 70  $\mu\text{m}$  Maschenweite gefiltert. Die Suspension wurde in 50 ml Falconröhrchen zur Entfernung der Collagenase und zerstörter Zellen dreimal gewaschen und mit 50 g für 5 min zentrifugiert. Die Pellets wurden schließlich in 30 mL Kulturmedium mit jeweils 1 %-iger Penicillin/Streptomycin und Gentamycin-Lösung resuspendiert. Mit einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt und auf  $1,6 \times 10^6$  Zellen/mL eingestellt.

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden jeweils 2 mL Zellsuspension auf Thermanoxplättchen (Nunc, Wiesbaden) in 24-Well-Platten (Nunc) gebracht und bei 14 °C bei 100 % Luftfeuchtigkeit und ohne  $\text{O}_2/\text{CO}_2$ -Begasung kultiviert. Für die biochemischen Untersuchungen wurden jeweils 2 mL Zellsuspension in 24-Well-Platten gebracht und ebenfalls bei 14 °C kultiviert. Einen Tag nach der Isolierung wurde die Hälfte des Mediums durch frisches ersetzt.

### 2.3.2 Durchführung der *In vitro*-Experimente

Für die Toxizitätstests wurden das native Wasser, das Porenwasser, die Kunstwasser-Sediment-Eluate und Kunstwasser/Tween 80-Sediment-Extrakte bei Raumtemperatur im Wasserbad aufgetaut und mit doppelt konzentriertem MEM-Hanks-Kulturmedium verdünnt. Der acetonische Sedimentextrakt wurde nach dem Lösungsmitteltausch in DMSO auf 0,1 % mit MEM-Hanks-Medium verdünnt. Für die elektronenmikroskopischen und biochemischen Untersuchungen wurden jeweils 2 mL Zellsuspension auf Thermanoxplättchen (Nunc) in 24-Well-Platten gebracht, und bei 14 °C bei 100 % Luftfeuchtig

## 2. Material und Methoden

---

keit und ohne O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>-Begasung kultiviert. Einen Tag nach der Isolierung wurden die isolierten Hepatocyten nativem Wasser, Kunstwasser-Sediment-Eluaten, Kunstwasser/Tween 80-Extrakten und Porenwasserproben in Verdünnungen von 1:4 und 1:3 für 2 d ausgesetzt. Die acetonischen Sedimentextrakte wurden in Verdünnungen von 1:4 und 1:2 für 2 Tage auf die Zellen ausgebracht. Die 1:2 Verdünnung entspricht einer 0,1 % Konzentration der acetonischen Sedimentextrakte nach Lösungsmitteltausch in DMSO. Die 1:4 Verdünnung der Sedimenteluat bzw. acetonischen Sedimentextrakte entspricht einem Sedimenttrockengewicht von 25 mg bzw. 13,3 mg auf 1 mL Testansatz.

### 2.3.3 Aufarbeitung der Proben für die Ultrastruktur

Die Hepatocyten auf den Thermanoxplättchen wurden vorsichtig mit 2,5 % Glutardialdehyd in Cacodylatpuffer (0,1 %; pH 7,6) mit 4 % Polyvinylpyrrolidon und 0,05 M CaCl<sub>2</sub> fixiert und bei 4 °C aufbewahrt. Der nächste Schritt bestand aus einem dreimaligen Spülen mit 0,1 M Cacodylatpuffer zu jeweils 10 min. Schließlich wurden die Proben für 2 Stunden in reduziertes Osmium (1:1 Gemisch aus 2 % OsO<sub>4</sub> und K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], 4 °C, Karnovsky, 1971) überführt. Danach wurde dreimal für jeweils 10 min mit 0,1 M Cacodylatpuffer und anschließend mit 0,05 Maleatpuffer (pH 5,2) bei 4 °C gespült. Nach einer Über-Nacht-Kontrastierung mit 1 % Uranylacetat in 0,05 Maleatpuffer bei 4 °C wurden die Proben schrittweise über eine aufsteigende Alkoholreihe mit 75, 85, 95 und 100 % Ethanol entwässert und für 24 Stunden in einen 1:1-Gemisch von Spurr (Spurr, 1969) und 100 % Ethanol inkubiert. Danach wurden sie für mindestens 6 h in ein 2:1 Gemisch und anschließend für mindestens 12 Stunden in reines Spurr überführt. Zur Einbettung wurden Beemkapseln mit Spurr's Medium gefüllt und die Thermanoxplättchen mit den Zellen nach unten auf die Beemkapseln gelegt. Nach der Polymerisation konnten die Plättchen mit flüssigem Stickstoff leicht abgesprengt werden. Mit Hilfe eines Reichert OM-U 2 Ultramikrotoms wurden Semi- und Ultradünnschnitte von 200 bzw. 60 - 90 nm Dicke angefertigt und mit alkalischem Bleicitrat (Reynolds, 1963) 1 - 2 min lang kontrastiert und mit Hilfe eines Zeiss EM 10 Elektronenmikroskops untersucht.

### 2.3.4 Aufarbeitung der Proben für die Biochemie

Mit einer Pipette wurden die isolierten Hepatocyten von der Oberfläche abgelöst und bei 200 g für 3 min (14 °C) abzentrifugiert. Das Pellet wurde in Homogenisationspuffer (12,5 mL 2 M Sucrose, 25 mL 20 mM Mops, pH 7,4, 10 mL 10 mM 1 % EDTA/Ethanol, 0,2 mL 0,1 M Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) in Isopropanol, 1 mM ε-Aminocaprinsäure, 67 mg 0,3 M Mercaptoethanol, 20 µL Dithiothreitol (DTT) ad 100 mL Aqua bidest.) aufgenommen und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Bei -70 °C ist eine Aufbewahrung bis zu drei Wochen möglich. Der Überstand wurde zur Messung der freigesetzten Laktatdehydrogenase separat eingefroren. Vor den Enzymmessungen wurden die Zellen mit dem Ultraschall-Desintegrator (Sonoplus D70, Fa. Bandelin) unter Kühlung im Eisbad mit 5 s dauernden Zyklen (50 % der Maximalleistung) in Homogenisationspuffer homogenisiert und bis zu den Messungen auf Eis aufbewahrt.

## 2.4 Biochemische Methoden

### 2.4.1 Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

Als Vergleich wurden 5 Proteinstandards mit Hühner-Ovalbumin angesetzt (0,4 mg/L; 0,2 mg/L; 0,1 mg/L; 0,5 mg/L; 0,025 mg/L). Zu den jeweiligen Proben (8 µL) wurden 250 µL Bradford-Reagenz

## 2. Material und Methoden

---

pipettiert. Nach 10 min erfolgte die Messung bei einer Wellenlänge von 595 nm in einem Spectra Mikrotiterplattenreader (SLT, Spectra, Crailsheim).

*Bradford-Reagenz*: 100 mg Coomassie-Brilliant-Blue G-250 in 50 mL 95 % Ethanol lösen, 100 mL 85 % Phosphorsäure dazupipettieren und auf 1 L mit Aqua bidest. auffüllen.

### 2.4.2 Laktatdehydrogenase nach Weishaar et al. (1975) und Mitchell (1980)

Zu den einzelnen Proben (10  $\mu\text{L}$ ) wurden 250  $\mu\text{L}$  Reaktionsmix pipettiert und der Reaktionsstart erfolgte durch die Zugabe von 25  $\mu\text{L}$  Na-Pyruvat (bei 25  $^{\circ}\text{C}$ ). Die Extinktionsveränderung wurde bei 340 nm für 3 min verfolgt.

*Reaktionsmix*: 60 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,4; 2 mM NADH.

*Molarer Extinktionskoeffizient für NADH*:  $6,2 \mu\text{Mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ .

### 2.4.3 Alanin-Amino-Transferase nach Morgens & Rey (1970)

Zu den Proben (20  $\mu\text{L}$ ) wurden 250  $\mu\text{L}$  Reaktionsmix gegeben und die Reaktion mit 25  $\mu\text{L}$  10 mM  $\alpha$ -Ketoglutarat gestartet. Die Messung erfolgte über 3 min bei 340 nm (bei 25  $^{\circ}\text{C}$ ).

*Reaktionsmix*: 0,05 M Hepes-Puffer, pH 7,5; 0,12 mM NADH; 200 mM L-Alanin; 0,025 mM Pyridoxalphosphat; 10 Units/Probe Laktatdehydrogenase.

*Molarer Extinktionskoeffizient für NADH*:  $6,2 \mu\text{Mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ .

### 2.4.4 Katalase nach Baudhuin et al. (1964)

Zu 50  $\mu\text{L}$  Triton X-100 in Eppendorf-Reaktionsgefäßen wurden 30  $\mu\text{L}$  Probe gegeben. Die Reaktion wurde mit 500  $\mu\text{L}$  eiskühlem Reaktionsmix gestartet, nach 15 min Inkubation im Eisbad mit Titanium-Reagenz (6,8 g  $\text{TiOSO}_4$  in 1 L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  kochen und nach Filtration mit dem halben Volumen 1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  verdünnen) gestoppt. Nach einer Inkubationspause von 10 min wurden 250  $\mu\text{L}$  pro Ansatz in eine Mikrotiterplatte überführt. Die Absorption des Titansulfat-Peroxides wurde bei 415 nm bestimmt.

*Reaktionsmix*: 10 mL 10 mM Imidazol-HCl-Puffer, pH 7,2; 100 mg 0,1 % Rinderserum-Albumin ad 100 mL Aqua bidest.; 35  $\mu\text{L}$  30 %  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

*Molarer Extinktionskoeffizient für Titansulfat-Peroxid*:  $19,1 \mu\text{Mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ .

### 2.4.5 Esterase nach Beaufay et al. (1974)

Zu den einzelnen Proben (30  $\mu\text{L}$ ) wurden 250  $\mu\text{L}$  Reaktionsmix pipettiert. Nach einem Vorlauf auf Eis (10 min) wurde 25  $\mu\text{L}$  *o*-Nitrophenylacetat als Substrat zugegeben. Die Messung erfolgte bei 415 nm über 10 min (bei 25  $^{\circ}\text{C}$ ).

*Reaktionsmix*: 40  $\mu\text{L}$  0,5 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer, 10  $\mu\text{L}$  10 % Triton X-100, 10  $\mu\text{L}$  0,1 M EDTA, 940  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$ , pH 7,4).

*Substrat*: 6 mg *o*-Nitrophenylacetat in 1 mL Methanol lösen und 1:5 mit  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer verdünnen.

*Molarer Extinktionskoeffizient für o-Nitrophenol*:  $3,06 \mu\text{Mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ .

### 2.4.6 Glutathion S-Transferase nach Habig et al. (1974)

Zu den Proben (20  $\mu\text{L}$ ) wurden 250  $\mu\text{L}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer (pH 6,5) und 10  $\mu\text{L}$  25 mM 1-Chlor-2,4-Dinitrobenzol (CDNB) gegeben. Die Reaktion wurde mit 25  $\mu\text{L}$  reduziertem 11,4 mM Glutathion gestartet und über 5 min bei einer Wellenlänge von 340 nm (bei 24  $^{\circ}\text{C}$ ) gemessen.

## 2. Material und Methoden

*Molarer Extinktionskoeffizient für CDNB:*  $9,6 \mu\text{Mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ .

### 2.4.7 Saure Phosphatase nach Moss (1983)

Zu den verschiedenen Proben (5  $\mu\text{L}$ ) wurden 50  $\mu\text{L}$  7,6 mM 4-Nitrophenylphosphat gegeben und für 30 min inkubiert (25 °C). Nach Zugabe von 200  $\mu\text{L}$  0,1 M NaOH wurde die Reaktion abgestoppt und die Extinktion der Proben bei 415 nm gemessen. Zu jeder Probe wurde eine Kontrolle gemessen, bei der 5  $\mu\text{L}$  Probe und 50  $\mu\text{L}$  Substrat sofort mit 0,1 M NaOH abgestoppt wurden.

Substrat: 7,6 mM 4-Nitrophenylphosphat in 50 mM Citratpuffer, pH 4,9.

*Molarer Extinktionskoeffizient für p-Nitrophenol:*  $18,8 \mu\text{Mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ .

### 2.4.8 Lipidperoxidation nach Buege & Aust (1978)

Zu den Proben (10  $\mu\text{L}$ ) wurden 250  $\mu\text{L}$  Reaktionsmix pipettiert, kräftig geschüttelt und 10 min in kochendem Wasser inkubiert, auf Eis abgekühlt und bei 1000 g für 10 min zentrifugiert. Je 250  $\mu\text{L}$  des Überstandes wurden bei einer Wellenlänge von 550 nm gemessen.

*Reaktionsmix:* 15 % Trichloressigsäure; 0,375 % Thiobarbiturat; 0,25 N HCl.

*Molarer Extinktionskoeffizient:*  $1,56 \mu\text{Mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ .

## 2.5 Berechnung der Enzymaktivitäten

Die Einheit der Enzymaktivität wird für alle untersuchten Enzyme mit Ausnahme der Katalase gleich definiert:

1 Unit (U) = Enzymaktivität, die der Umsetzung von 1  $\mu\text{Mol}$  des Substrates in 1 min entspricht.

$$b = \Delta E * V * 1000 / e * d * \Delta t * v * C_{\text{Protein}}$$

Die Enzymaktivitäten (U/g Protein oder U/L) wurden mit dieser Gleichung berechnet, jeweils auf den Proteingehalt der Proben bezogen und als spezifische Aktivität (U/mg, mU/mg,  $\mu\text{U}/\text{mg}$  Protein) oder als relative Aktivität (Aktivität in Prozent der Aktivität von unbelasteten Kontrollzellen) angegeben.

*Zeichenerklärung:* b = Enzymaktivität,  $\Delta E$  = Extinktionsänderung, V = Gesamtvolumen, e = molarer Extinktionskoeffizient, d = Schichtdicke,  $\Delta t$  = Meßintervall, v = Probevolumen im Test, C = Proteinkonzentration der Meßproben.

Die Berechnung der Katalase-Aktivität erfolgt nach Baudhuin et al. (1964) und wird in Milli-Beaufay-Units/mg Protein (mBU/mg) angegeben.

$$b = ((\log E_{\text{Probe}} - \log E_{\text{Blank}}) * V_{\text{Gesamt}} * 1000) / (V_{\text{Probe}} * \Delta t * \text{BF} * C_{\text{Protein}})$$

*Zeichenerklärung:* b = Katalase-Aktivität in mBU/mg Protein,  $E_{\text{Probe}}$  = Extinktion der Probe,  $E_{\text{Blank}}$  = Extinktion des Blanks,  $V_{\text{Gesamt}}$  = Gesamtvolumen,  $V_{\text{Probe}}$  = Volumen der Probe,  $\Delta t$  = Zeitintervall in min,  $C_{\text{Protein}}$  = Proteinkonzentration, BF = Beaufay-Faktor (= 50).

## 2. Material und Methoden

---

### 2.6 Statistik

Die Signifikanz der biochemischen Daten wurde mit dem t-Test nach Student und dem Mann-Whitney-Rangsummen-Test mit Hilfe des Computerprogramms Sigma-Stat Statistical Analysis System, Version 2.01 (Jandel-SPSS, Erkrath) überprüft. Die Signifikanzniveaus lagen bei:  $p < 0,001$  hoch signifikant \*\*\*,  $p < 0,01$  signifikant \*\*,  $p < 0,05$  schwach signifikant \*.

### 2.7. Gentoxizität

#### 2.7.1 Durchführung der *In vitro*-Experimente

Für die Gentoxizitätsversuche wurden isolierte Hepatocyten der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) verwendet. Die Isolierung der Zellen und die Belastung mit Sedimentproben wurde nach gleichem Schema wie in 2.3.1 und 2.3.2 beschrieben durchgeführt.

Einen Tag nach der Isolierung wurden die isolierten Hepatocyten für 20 Stunden acetonischen Sedimentextrakten in Verdünnungen von 1:4 und 1:2 ausgesetzt. Die 1:2 Verdünnung entspricht einer 0,1 % Konzentration der acetonischen Sedimentextrakte nach Lösungsmitteltausch in DMSO.

#### 2.7.2 Aufbereitung der Zellen

Die belasteten Primärhepatocyten wurden in den 24-Well-Platten im Medium aufgeschwemmt und in Eppendorfcups abgefüllt. Danach wurden die Zellen bei 80 g und 15 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen und das Pellet in 150 µL Medium resuspendiert. Für den Comet Assay wurden pro Konzentration in zwei Eppendorfküvetten 30 µL von den resuspendierten Zellen abgefüllt. Die belasteten, isolierten Hepatocyten wurden dann im Comet-Assay auf DNA-Strangbrüche untersucht.

#### 2.7.3 Comet Assay (Single Cell Gel Elektrophoresis)

##### Reagentien für den Comet-Assay

- Agar
  - 1 % NMA (Normal Melting Agar) - 250 mg in 25 mL PBS
  - 0,5 % NMA - 75 mg in mL PBS
  - 0,7 % LMA (Low Melting Agar) - 105 mg in 15 mL PBS
- Lyse-Stammlösung
  - 146,5 g NaCl
  - 37,2 g EDTA
  - 1,2 g Tris
  - in 700 mL Aqua bidest lösen, mit ca. 11 g NaOH einen pH-Wert von 10 einstellen, 10 g Na-Sarcosinat zugeben, auf 890 mL mit Aqua bidest. auffüllen
- Elektrophoresepuffer
  - 24 g NaOH
  - 0,74 g EDTA
  - in 2 L Aqua bidest lösen, bei 4 °C kalt stellen

## 2. Material und Methoden

---

- Lyse-Lösung
  - 178 mL Stammlösung
  - 2 mL Triton X-100
  - 20 mL DMSO
  - rühren, bei 4 °C kalt stellen
- Tris-Puffer (0,4 M)
  - 48,5 g/L Tris in Aqua bidest.
  - mit 25 % iger HCl auf pH 7,5 einstellen

### Testprotokoll

In Abb. 2.2 sind die einzelnen Schritte des Comet-Assays dargestellt. Alle Arbeitsschritte werden mit puderfreien Latexhandschuhen durchgeführt, da Puderreste die Auswertung beeinträchtigen können.

Die angerauhten Objektträger werden zunächst mit einem Diamantschreiber beschriftet und in 99 % Ethanol entfettet, da die Haftung der Gele auf den Objektträgern von entscheidender Bedeutung für die Auswertung ist.

Nach Entnahme der Objektträger aus dem 99 % Alkohol wurden sie auf Zellstoff getrocknet. Währenddessen wurden 1 % NMA (Normal Temperature Melting Agarose, Seakem Gold™, FMC Bioproducts, Rockland, USA) in PBS (Dulbecco's Phosphate Buffer Saline) auf einer Heizplatte bei 300 °C aufgeköcht und auf einer weiteren Heizplatte bei 150 °C schwach siedend gehalten. Zunächst wurden auf jeden Objektträger 700 µL NMA aufgebracht, durch ein Deckglas (Sondergröße 24 x 70 mm, Langenbrink, Emmendingen) gleichmäßig verteilt und für ca. 10 min in einem Trockenschrank bei 37 °C angetrocknet.

Danach wurde diese Gelschicht mit einem Objektträger wieder abgestreift und die Objektträger im Wärmeschrank ganz getrocknet, um die Haftung der folgenden drei Gelschichten, die auf dem Objektträger verbleiben, zu verbessern. Die erste bleibende Gelschicht besteht aus 0,5 % NMA, der wie oben aufgeköcht und siedend gehalten wurde. Davon wurden 200 µL NMA auf den Objektträger gegeben und mit einem Deckglas blasenfrei verteilt, für 3 min auf eine eisgekühlte Metallplatte aufgelegt, um das Gel zu härten. Die Objektträger wurden schließlich in einer Färbebox auf PBS-getränktem Tuch im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt, bis die zweite Gelschicht, welche die Zellen enthielt, aufgetragen wurde. Zuletzt wurde der 0,7 % LMA (Low Temperature Melting Agarose, Seakem Gold™, FMC Bioproducts) in PBS bei 300 °C aufgeköcht und in einem geschlossenen Wasserbad, das vor Verdunstung und somit Konzentrationsänderung des Agars schützt, bei 30 °C flüssig gehalten. Danach wurden die belasteten Hepatocyten zu je 30 µL portioniert und die Objektträger mit der vorbereiteten ersten Gelschicht im Trockenschrank bei 30 °C erwärmt, um ein gleichmäßiges Verteilen der zweiten Gelschicht zu ermöglichen. Das Deckglas eines Objektträgers wurde dann abgezogen, und 90 µL LMA wurden mit den in Eppendorf-Tubes portionierten 30 µL Zellsuspension durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette gemischt, um schließlich 90 µL auf dem Objektträger mit einem Deckglas blasenfrei zu verteilen. Dann wurde das Gel für 3 min auf Eis gehärtet und wieder für 5 min in den Wärmeschrank (30 °C) gelegt. Die dritte Gelschicht aus 0,7 % LMA wurde nach dem Abziehen des Deckglases zu 90 µL auf die Objektträger aufgetragen, blasenfrei mit einem Deckglas verteilt und wie oben auf Eis gehärtet und im Trockenschrank wieder auf 30 °C angewärmt.

## 2. Material und Methoden

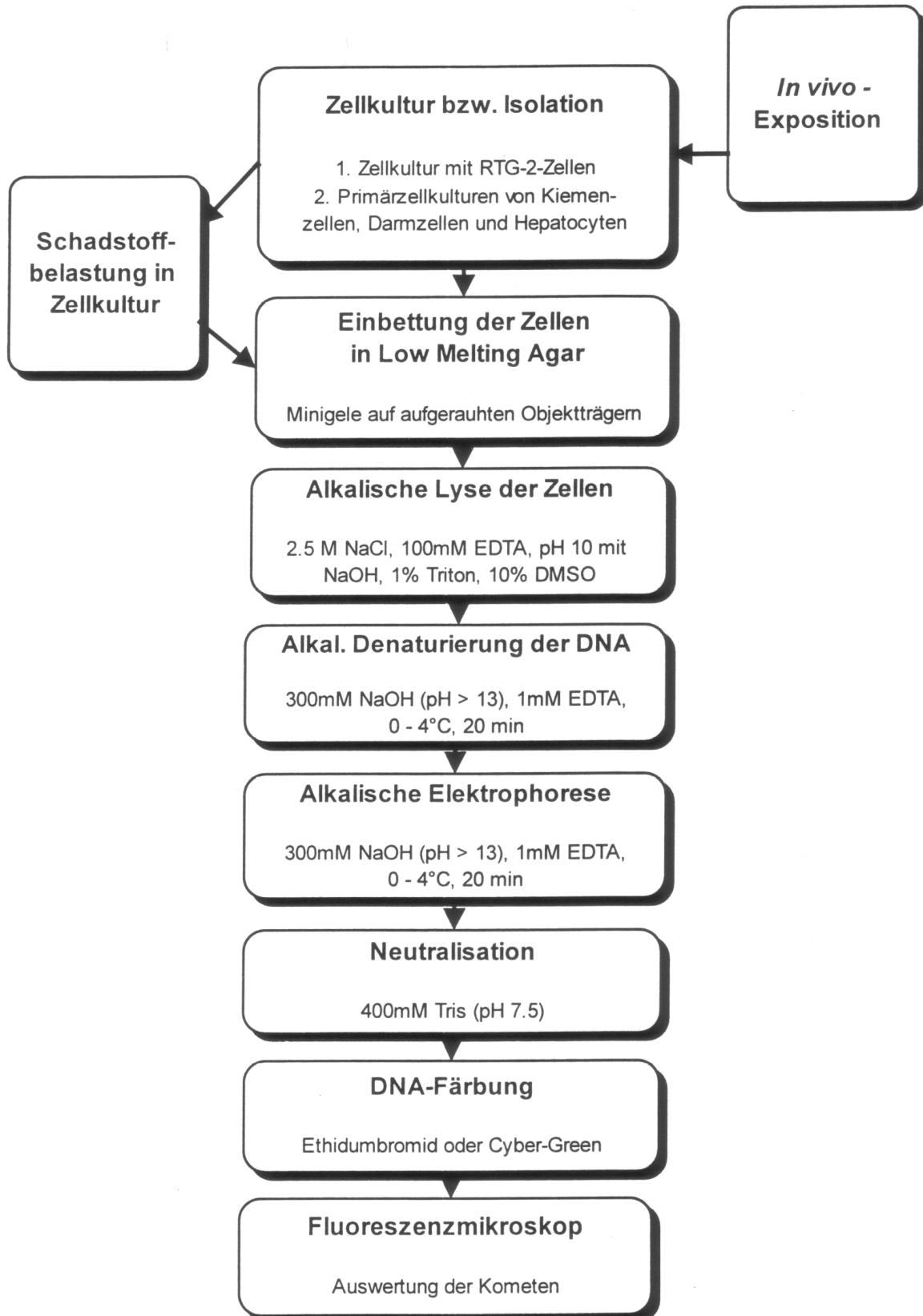


Abb. 2.2 Schematisches Protokoll des Comet-Assay (aus Schnurstein et al., 1998).

## 2. Material und Methoden

---

Die Gelschicht mit den Zellen wird also von zwei weiteren Gelschichten sandwichartig umschlossen. Die erste Gelschicht stellt dabei die Verbindung zum Objektträger her und schafft durch ihre Dicke Abstand von diesem, was die Schärfenebene bei der Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop vom rauhen Untergrund abhebt. Die dritte Gelschicht sorgt für mechanischen Schutz der zweiten in den weiteren Bearbeitungsschritten und verhindert, daß die DNA eventuell nicht ganz eingeschlossener Zellen während der Lyse aus dem Gel diffundiert. Schließlich wurden die Deckgläser abgezogen und die Objektträger in 4 °C kalter Lyselösung für mindestens 1,5 Stunden (auch über Nacht) im Kühlschrank inkubiert. Die Lyse der Zellen erfolgte mit starken Detergentien bei hoher Salzkonzentration (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, pH 10, Komplettierung mit 1 % Triton X-100 und 10 % DMSO) vor Versuchsbeginn zur Zerstörung der Membranen unter stark alkalischen Bedingungen sowie zur Extraktion der Kernproteine. Kälte und Dunkelheit schützen die DNA vor Autolyse und UV-Schäden. Nach der Lyse ist die DNA völlig ungeschützt, weshalb alle darauffolgenden Versuchsschritte in der Dunkelkammer durchgeführt wurden.

Im Anschluß an die Lyse folgten Denaturierung und Elektrophorese der DNA. Dazu wurden die Objektträger in der Elektrophoresekammer, die waagrecht auf Eis ausgerichtet war, nebeneinander angeordnet (pro Kammer 21 Objektträger), mit 4 °C gekühltem Elektrophoresepuffer (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH < 13) überschichtet und für 20 min inkubiert.

Dann erfolgte die Elektrophorese bei 25 V und 300 mA für 20 Minuten (Power Supply Model 200/2.0, Bio-Rad, Richmond, USA). Dabei wird durch Schadstoffeinfluß fragmentierte DNA zu Kometen (Schweif) auseinandergezogen, die mit steigendem Fragmentierungsgrad der Moleküle immer länger werden (Singh et al., 1988; Tice et al., 1990).

Nach der Elektrophorese wurden die Objektträger für 2 min in Tris-Puffer (0,4 M, pH 7,5) getaucht; im neutralen Umfeld spiralisiert sich die DNA wieder und kann so mit Ethidiumbromid (2 µM in Aqua bidest.; Interkalation) angefärbt werden. Ab diesem Zeitpunkt können die Gele bis zu zwei Wochen auf PBS-getränktem Tuch im Kühlschrank gelagert werden.

### 2.7.4 Auswertung des Comet-Assays

Für die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop (Leitz Aristoplan) wurde die DNA mit Ethidiumbromidlösung (2 µM in Aqua demin.) angefärbt: Pro Gel wurden 75 µL der Färbelösung aufgetragen und mit einem Deckglas blasenfrei verteilt. Zuvor wurden die Objektträger in einer Metallbox auf PBS-getränktem Tuch lichtgeschützt aufbewahrt. Bei 340-facher Vergrößerung und einer Anregungswellenlänge von 518 nm wurden die Kometen mit einem Bildanalysesystem der Firma Optilas (München), bestehend aus einer Graustufen-CCD-Kamera (Pulnix TM-765E Kinetic), einem angeschlossenen PC mit zwei Monitoren und der Auswertungssoftware Comet 3.0<sup>TM</sup> (Kinetic Images, Liverpool, UK), vermessen.

Folgende Parameter wurden unter anderem erhoben:

1. Länge des Kometenschweifes (*Tail Length*)
2. Verteilung der Fluoreszenzintensität auf Kopf und Schweif
3. das *Tail Moment* als Produkt von *Tail Length* und Fluoreszenzintensität im Schweif und Kopf



## 2. Material und Methoden

---

Pro Konzentration wurden 100 Zellen vermessen (50 zufällig ausgewählte Kometen je Gel). Die Darstellung der nachfolgenden Befunde erfolgt entweder als *Tail Length* (Grundlagenuntersuchungen) oder (standardmäßig) als *Tail Moment*.

### 2.7.5 Der Fluoresceindiacetat (FDA)-Assay

Mit der simultanen Zweifach-Färbung von Zellen in Suspension mit Fluorescein-Diacetat (FDA) und Ethidiumbromid läßt sich schnell die Vitalität von Zellen bestimmen (Jones & Senft, 1985; Strauss, 1991).

Fluoresceindiacetat, als unpolarer Ester, passiert Zellmembranen und wird von cytosolischen Esterasen in Fluorescein und zwei Säuren gespalten. Da Fluorescein aufgrund seiner Polarität aktive Zellmembranen nur langsam passieren kann, akkumuliert es in vitalen Zellen, so daß diese bei einer Wellenlänge von 435 nm leuchtend grün erscheinen. Die gleichzeitige Färbung mit Ethidiumbromid im selben Ansatz bewirkt einen leuchtend roten Kern in nicht-vitalen Zellen, da Ethidiumbromid nur geschädigte Zellmembranen durchdringen kann und in diesen Zellen in die DNA interkaliert.

Für den Ansatz der Färbelösung wurden 960 µL PBS mit 6 µL Fluoresceindiacetat-Stammlösung (5 mg/mL, Sigma) und 40 µL Ethidiumbromid-Stammlösung (200 µg/mL) versetzt. 25 µL von der Färbelösung wurden mit 25 µL der Zellsuspension der einzelnen Konzentrationen aus dem Comet-Assay gemischt, für 30 s inkubiert und auf einen Objektträger aufgetragen. Bei der Auswertung eines Versuches wurde immer nur ein Objektträger wie oben beschrieben angefertigt und sofort ausgewertet. Im Anschluß erfolgte die Färbung der Zellsuspension der nächsten Versuchsreihe.

Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop mit 340-facher Vergrößerung bei einer Anregungswellenlänge von 435 nm. Ausgewertet wurden mindestens 250 Zellen, woraus die relative Überlebensrate (Kontrolle = 100 %) berechnet wurde.

### 2.7.6 Statistik

Alle Meßparameter wurden von der Software Comet 3.0™ automatisch gespeichert. Ein von Kinetic Images beigefügtes Excel™-Makro für Excel™ 5.0 (Microsoft, Richmond, USA) greift auf diese Rohdaten zu und berechnet den gewünschten Parameter, das *Tail Moment*. Dies ist eine häufig verwendete Methode, da sie die beiden wichtigsten Variablen, nämlich Länge des Schweifes und Anteil der DNA im Schweif zu einem Vergleichswert umrechnet. Zusätzlich erstellt das Programm ein 3D-Diagramm der Auswertung.

Die *Tail Moment*-Daten wurden aus der Excel-Datei herauskopiert und mit Sigma Stat™ 2.0 (SPSS-Jandel Scientific, Erkrath) statistisch ausgewertet. Dabei vergleicht der Test *ONE WAY ANOVA on ranks* (nach Kruskal-Wallis in Kombination mit der Dunnett's Methode) Gruppen nicht numerisch verteilter Zahlen unter Zuhilfenahme der Medianwerte. Sind statistisch signifikante Unterschiede feststellbar ( $p < 0,05$ ), wurden die Gruppen nach der *Dunnett*-Methode mit der Kontrolle verglichen und nach dem Grad ihrer Abweichung geordnet. Diese Methode beschreibt nicht, ob die *Tail Moments* größer oder kleiner waren als die der Kontrolle, so daß zusätzlich die 25 %- und 75 %-Percentilen zur Beurteilung herangezogen wurden. Neben dem 3D-Diagramm wurden die Ergebnisse graphisch mit Sigma Plot™ 3.0 (SPSS-Jandel Scientific) als Box Plot dargestellt. Der Box Plot umfaßt die Werte der 25 % und 75 %-Percentile und den Median jeder Konzentration; die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Werte an.

### 2.8. Embryotoxizität

#### 2.8.1 Hälterung der adulten Zebrabärblinge (*Danio rerio*)

Die adulten Zebrabärblinge wurden in 25 - 150 L Vollglas- und Rahmenaquarien gehalten, die an eine Durchflußanlage angeschlossen waren mit einem stündlichen Durchfluß von 10 - 20 L Wasser. Das Wasser der Durchflußanlage bestand aus einem Gemisch von Trink-, entmineralisiertem sowie Brauchwasser aus dem universitätseigenen Brunnen. Dieses wurde in einem Kunststoffbehälter aufgefangen, mit Heizstäben auf  $27 \pm 1$  °C erwärmt und belüftet, bevor es den Aquarien zugeführt wurde. Die Messung der Temperatur und des pH-Wertes ( $7,2 \pm 0,2$ ) erfolgte kontinuierlich (Selzle HSL RE 1155 und RE 1255). Die Sauerstoffsättigung betrug  $95 \pm 5$  %, die Gesamthärte 24 °dH, die Carbonathärte 14 °dH, der Ammoniumgehalt 0 - 0,25 mg/L und der Nitratgehalt  $10 \pm 3$  mg/L. Die Raumtemperatur war weitgehend konstant  $23 \pm 1$  °C. Die Tiere wurden mit handelsüblichem Flockenfutter Tetra Min (Tetra Werke, Melle) und ergänzend mit Nauplien von *Artemia salina* täglich vormittags und nachmittags gefüttert. Die Steuerung der Beleuchtung der Becken und des Aquarienraumes erfolgte durch eine Zeitschaltuhr mit einer Tagesphase von 14 h. Eine Beeinflussung dieser Periodik durch das Tageslicht wurde durch Abdunkeln des Raumes ausgeschlossen.

#### 2.8.2 Eigewinnung und Versuchsdurchführung

Der Zuchtansatz zur Eigewinnung erfolgte nach der Methode von Nagel (1986).

Balz und Eiablage fanden innerhalb einer halben Stunde nach Beleuchtungsbeginn statt. Dazu wurden die Elterntiere nach einem festen Schema zum Ablachen stimuliert. Die Ablachkästen bestanden aus 26 x 16 x 16 cm und 6,5 L fassenden Kunststoffaquarien mit einem Boden aus Edeldstahlgitter (Maschenweite 1,25 mm). Diese wurden in 12 L Kunststoffbecken (33 x 18 x 20 cm) eingehängt und auf eine dunkle Unterlage gestellt. Eine Laichgruppe bestand aus einem laichbereitem Weibchen und zwei Männchen von ungefähr gleicher Körpergröße. Die Tiere wurden mit einem Netz gefangen und in die Laichbecken eingesetzt. Zur Stimulierung des Ablachens war es erforderlich, in die Becken künstliche Pflanzen einzubringen. Die ca. 1 mm großen Eier waren auf der dunklen Unterlage gut zu erkennen. Die Elterntiere wurden mit den Laichkästen aus den Aquarien entfernt und die Eier mit Hilfe eines Plastikrohres mit nachfolgendem Siliconschlauch abgesaugt. Diese wurden in großen, flachen Glasschalen aufgefangen. Nach der Auszählung und Trennung von den nicht befruchteten Eiern wurden die befruchteten Eier Sedimenteluat und -extrakt beider Fließgewässer exponiert. Je Konzentrationsstufe wurden 20 befruchtete Eier einzeln in je 2 mL Testlösung in 24-Well Platten (Nunc) exponiert. In die verbleibenden vier Wells der 24-Well Platten wurde Verdünnungswasser pipettiert und je ein Ei als interne Kontrolle überführt. Die 24-Well Platten wurden mit einem Deckel verschlossen und bei 26 °C und einem Hell-/Dunkelrhythmus von 12/12 Stunden inkubiert. Nach 48 h wurden die Testlösungen erneuert. Die Untersuchung der Embryonen und Larven sowie die Protokollierung der Effekte erfolgte nach 24, 48, 72 und 96 h mittels eines Inversmikroskops mit Phasenkontrast (Fa. Olympus). Protokolliert wurde die Anzahl der koagulierten Eier bzw. abgestorbener Embryonen und Larven, die Anlage der Somiten, die Ablösung des Schwanzes vom Dotter, der Herzschlag (Anzahl der Herzschläge in 60 s), die Entwicklung des Blutkreislaufs, die Schlüpftrate, die Ausbildung von Oedemen und Deformationen oder Veränderungen der Wirbelsäule.

Die Zebrabärblingseier wurden im doppelten Ansatz mit wäßrigem Sedimenteluat (pur und 1:2, 1:4 Verdünnungen) und acetonischem Sedimentextrakt (0,1; 0,05; 0,025; 0,0125; 0,00625 %) beider

## 2. Material und Methoden

---

Fließgewässer (Krähenbach und Körsch) belastet. Die Eluat- und Extrakt-Kontrollen bestanden aus künstlichem Verdünnungswasser, der Extrakt-Kontrolle wurde zusätzlich 0,1 % DMSO dazugegeben.

### 2.8.3 Fixierung für die Elektronenmikroskopie

Für die Fixierung wurden die Larven aus den 24-Wellplatten entnommen und in eine Petrischale mit einer Benzocain (Ethyl-4-aminobenzoat)-Lösung überführt und betäubt. Danach wurden die Tiere für 24 h in verschließbare Glasbehälter mit Fixans (2,5 % Glutardialdehyd, 4 % Polyvinylpyrrolidon, 0,05 %  $\text{CaCl}_2$  in 0,1 M Cacodylatpuffer, pH 7,6) eingebracht und bei 4 °C aufbewahrt. Zur besseren Wirkung des Fixans wurde ihnen die Schwanzregion mit einer scharfen Rasierklinge abgenommen. Die Einbettung der Larven erfolgte nach dem bereits für isolierte Hepatocyten (vgl. 2.3.3) beschriebenen Schema. Im Gegensatz zu den Primärhepatocyten wurden die Tiere einzeln in Spurr eingebettet. Von den Larven wurden anschließend mit Hilfe eines Reichert OM-U 2 Ultramikrotoms Ultradünnschnitte von 40 nm Dicke angefertigt, die Schnitte für ca. 3 min mit Bleicitrat kontrastiert und mit einem Zeiss EM 10 Elektronenmikroskop ausgewertet.

## 2. Material und Methoden

---