

Krebstest ohne Tierversuch

Mehr als 70 Prozent aller Krebserkrankungen beim Menschen werden durch äußere Faktoren ausgelöst. Neben Strahlung bergen Chemikalien dabei das größte Risiko. Forscher um **JÜRGEN KUHLMANN** vom **MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR MOLEKULARE PHYSIOLOGIE** in Dortmund haben ein leistungsfähiges Testsystem entwickelt, das Stoffe als Krebs erregend identifiziert, dabei eine deutlich höhere Empfindlichkeit erreicht als die konventionellen Verfahren – und ohne Tierversuche auskommt.

Im Jahr 1761 erkannte erstmals ein englischer Arzt, dass bestimmte Stoffe Krebs erregend wirken. Er stellte fest, dass übermäßiger Gebrauch von Schnupftabak zu Krebs der Nasenschleimhaut führen kann. Heute gelten mehrere Dutzend Chemikalien und Chemikaliengemische als eindeutig kanzerogen. Im Vergleich zur Gesamtzahl aller bekannten chemischen Verbindungen erscheint diese Zahl erstaunlich klein. Darin spiegelt sich jedoch lediglich die Tatsache wider, dass für die meisten Chemikalien keine genauen Daten zur Verfügung stehen. Denn will man die Frage nach der Giftigkeit einer Substanz beantworten, benötigt man in der Regel aufwändige Tests.

Zunächst wird die Wirkung in Zellkulturen analysiert. Allein diese Arbeiten können mehrere Monate oder sogar länger dauern. Erweist sich eine Substanz dabei als Krebs erregend, heißt das noch lange nicht, dass sie diese Wirkung auch im menschlichen Körper entfaltet. Meist versuchen Wissenschaftler, das anhand von Tierversuchen zu klären.



Vom Schlachthof kommt das Ausgangsmaterial für das neue Verfahren: Harnblasen von Schweinen. Auf deren Innenseite sitzen die Epithelzellen – das Testmaterial für kanzerogene Stoffe.

Kompliziert wird die Sache auch, weil Krebs keine einheitliche Erkrankung, sondern ein Oberbegriff für mehr als 100 verschiedene Krankheitsbilder ist. Er kann sich in fast allen Körperzellen entwickeln. Was sich dabei auf molekularer Ebene abspielt, wissen die Forscher trotz jahrzehntelanger Krebsforschung in den meisten Fällen nicht.

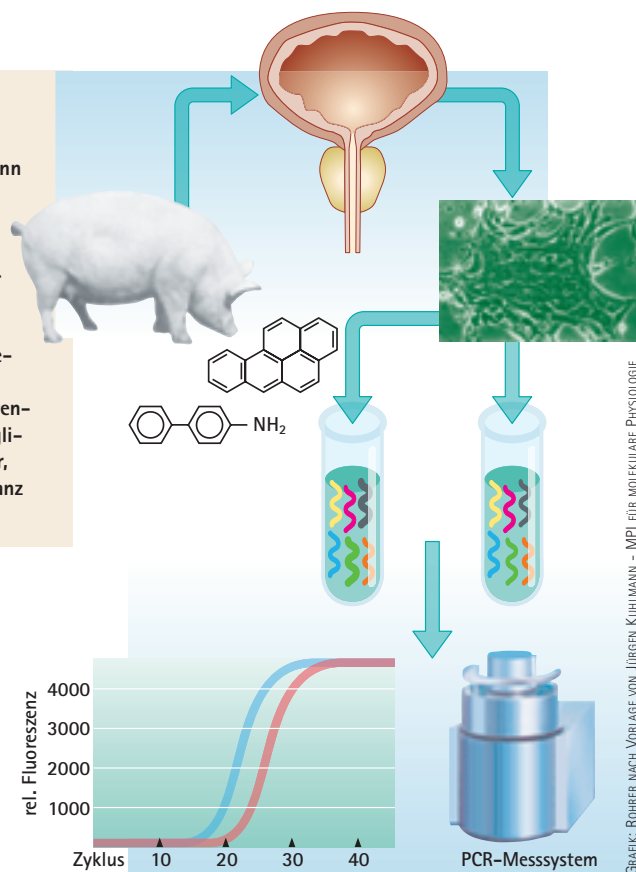
Eine Gruppe um Jürgen Kuhlmann vom Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie und Forscher aus dem Institut für Arbeitsphysiologie um Hermann M. Bolt und Wolfram Föllmann in Dortmund haben nun in einem Kooperationsprojekt ein neues Testverfahren entwickelt. „Wir brauchen dazu keine Versuchstiere, son-

dern verwenden Zellen aus Schlachthausmaterial. Und wir erreichen damit eine deutlich höhere Empfindlichkeit als mit den meisten anderen Tests“, beschreibt Jürgen Kuhlmann die Vorteile des neuen Verfahrens.

In der Tat beziehen die Dortmunder Forscher das Ausgangsmaterial für ihre Zellkulturen in regelmäßigen Abständen beim Schlachter. Es handelt sich dabei um Harnblasen des Hausschweins, die nach dem Zerlegen der Tiere normalerweise im Müll oder in der Tierfuttermittelverarbeitung landen. Ihre Verwendung bringt gleich mehrere Vorteile mit sich: Weil sie ein Abfallprodukt der Fleischverarbeitung sind, muss kein Tier für wissenschaftliche Versuchs-

DER TEST IM SCHEMA

Geschlachteten Schweinen entnehmen die Wissenschaftler um Jürgen Kuhlmann Harnblasen, von deren Innenwand Epithelzellen gewonnen und in Nährlösung kultiviert werden. Teilen diese Kultur setzen die Forscher dann gesondert die Substanzen zu, deren karzino-genes Potenzial es zu prüfen gilt. Aus diesen Proben wird anschließend die gesamte Boten-RNA isoliert, mittels PCR analysiert und mit dem Muster der Boten-RNA der ursprünglichen Zellkultur verglichen. Das gibt dann Aufschluss darüber, welche Reaktionen die fragliche Substanz in den Testzellen ausgelöst hat.



GRAFIK: ROHREK NACH VORLAGE VON JÜRGEN KUHLMANN - MPI FÜR MOLEKULARE PHYSIOLOGIE

zwecke sterben. Darüber hinaus ist das Hausschwein genetisch betrachtet mit dem Menschen viel enger verwandt als die für toxikologische Versuche meistens eingesetzten Nager wie Mäuse und Ratten, wodurch die Testergebnisse für den Menschen eine höhere Aussagekraft besitzen. „Und wir arbeiten mit einem Zellmodell, das von einem gesunden Organismus stammt“, sagt Jürgen Kuhlmann.

Andere Wissenschaftler verwenden für toxikologische Untersuchungen dagegen Zelllinien, die im Labor unsterblich gemacht wurden. Für viele Experimente ist dies äußerst praktisch – die Zellkulturen teilen sich fortwährend und lassen sich deshalb schier unendlich lange nutzen. Diese Eigenschaft beruht aber auf Zellschäden, durch die der natürliche Alterungsprozess außer Kraft gesetzt ist. Genau das charakterisiert aber auch Krebs: die unkontrollierte Teilung von Zellen, die weder altern noch sterben. Der Einsatz von Zellen, in denen diese regulären Mechanismen nach wie vor ablaufen, sollte für toxikologische Tests daher Vorzüge bieten.

Die Dortmunder Wissenschaftler fahren deshalb regelmäßig zum Schlachthof. Eisgekühlt transportieren sie die Schweineharnblasen zurück in ihr Labor. Dort schaben sie von der Innen-

seite des von Muskeln umspannten Organs so genannte Epithelzellen ab und legen diese sofort in eine geeignete Nährlösung. „Dabei muss man darauf achten, dass keine anderen Zelltypen mitgeschleppt werden“, sagt Kuhlmann. Nach wenigen Tagen sind die Zellen dann bereit für die toxikologischen Tests.

RNA-MUSTER ALS FRÜHWARNSYSTEM

Zunächst werden sie mit der zu untersuchenden Substanz kultiviert; dabei testen die Forscher verschiedene Konzentrationen ebenso wie unterschiedliche Kontaktzeiten. Danach isolieren sie aus jeder Probe die gesamte Boten-RNA (mRNA). Und weil jede Boten-RNA ein bestimmtes Protein kodiert, liefert die Entschlüsselung der Erbsubstanz-Sequenzen den Wissenschaftlern präzise Auskunft darüber, welche Proteine die Zellmaschinerie unter den gewählten Versuchsbedingungen produziert – und dies gibt wiederum Hinweise auf das karzinogene Potenzial der Testsubstanz.

Denn sobald Fremdstoffe in eine Zelle eindringen, startet diese in der Regel mehrere Reaktionskaskaden mit dem Ziel, die Stoffe so schnell wie möglich wieder loszuwerden, gegebenenfalls die durch sie bereits verursachten Schäden zu reparieren. Dazu werden verschiedene Enzyme, also spezielle Proteine, benötigt. Meist gilt: Je ausgeprägter der Fremdstoffkontakt und je mehr Zellschäden, desto intensiver die Reparaturmechanismen, desto höher also auch die Konzentrationen der daran beteiligten Enzyme. Und genau diese Konzentrationen können die Dortmunder Max-Planck-Forscher indirekt durch die Analyse der Boten-RNA ermitteln. „Indem wir das Boten-RNA-Muster der Zelle analysieren, sehen wir Zellschäden außerdem in einem viel früheren Stadium als mit herkömmlichen zytologischen Tests, die aufwändiger sind und nur massive Schäden am Erbgut der Zellen anzeigen“, erklärt Jürgen Kuhlmann. Schließlich erfasst das Dortmunder Verfahren Zellveränderungen bei wesentlich geringeren Schadstoffkonzentrationen.

All dies erreichen Kuhlmann und sein Team mit der Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (Echtzeit PCR). Hierbei wird Boten-RNA zunächst in DNA überführt. In aufeinander folgenden Reaktionszyklen werden die einzelnen DNA-Stränge jeweils dupliziert. Für die im Visier der Forscher stehenden Sequenzen befinden sich Fluoreszenzmarker im Reaktionsgefäß, die sich in die gebildeten DNA-Doppelstränge einlagern. Je höher der Gehalt an entsprechender Boten-RNA, umso weniger Reaktionszyklen sind notwendig, um ein vorgegebenes Mindestsignal für die Fluoreszenz zu erreichen.

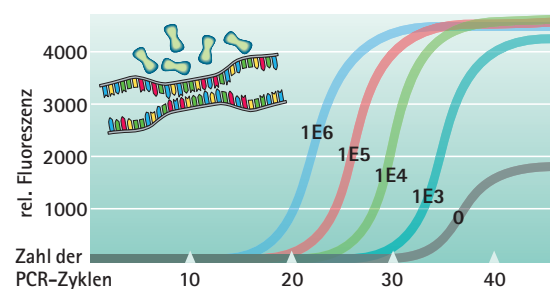
Zu den ersten Substanzen, welche die Wissenschaftler mit dem neuen Testsystem untersucht haben, gehören Bestandteile des Tabakrauchs. Als besonders schädlich gelten polyzyklische Kohlenwasserstoffe, aromatische Amine, Nitrosamine und Epoxide. „Die detaillierten Wirkmechanismen sind in den meisten Fällen noch un-

klar“, sagt Kuhlmann. Fest steht dagegen, dass die Gifte – nachdem sie über das Lungengewebe in den Körper eingedrungen sind – zunächst in wasserlösliche Moleküle überführt werden müssen; erst danach können sie über den Harnweg wieder ausgeschieden werden.

Dazu werden diverse Enzyme aktiviert, die zuerst für eine Oxidation der Stoffe sorgen. An diese Zwischenprodukte werden in einem zweiten Schritt wasserlösliche Atomgruppen gekoppelt. Damit können die Fremdstoffe dann mit dem Urin aus dem Körper gespült werden. Ein großer Teil dieser Entgiftungsprozedur verläuft in der Leber; in geringem Ausmaß findet sie aber auch in den Epithelzellen der menschlichen Harnblase statt – also genau in jenen Zellen, welche die Dortmunder Wissenschaftler (allerdings mit Schweinen als Organspendern) für ihre toxikologischen Tests verwenden.

„Für die Untersuchung von Tabakrauch eignet sich unser System besonders gut. Rauchen ist nämlich eine der Hauptursachen für Blasenkrebs beim Menschen“, stellt Kuhlmann fest. Damit sind die Tests aussagekräftiger als solche, die mit anderen Zellarten ausgeführt werden. Als Verursacher von Krebs gelten übrigens nur zum Teil die ursprünglich im Tabakrauch enthaltenen Stoffe. Vielmehr entstehen während ihres Abbaus im Körper reaktive Zwischenprodukte, welche die Erbsubstanz der Körperzellen schädigen können – wenn sie nicht schnell genug zu ungiftigen Stoffen weiterverarbeitet werden.

GRAFIK: ROHREK NACH VORLAGE VON JÜRGEN KUHLMANN - MPI FÜR MOLEKULARE PHYSIOLOGIE



Je mehr von einer bestimmten Boten-RNA in den Zellproben vorliegt, umso weniger PCR-Zyklen sind erforderlich, um ein Fluoreszenzsignal der entsprechenden DNA zu erhalten.

Diese komplexen Prozesse nehmen die Forscher unter die Lupe. Sie behandeln dazu die Epithelzellen der Schweineharnblasen zunächst mit Lösungen, die einzelne Tabakrauchbestandteile enthalten, welche erwiesenermaßen Krebs auslösen. „Wir konzentrieren uns zunächst auf Einzelbestandteile und binäre Mischungen; später wollen wir auch komplexere Gemische testen“, sagt Jürgen Kuhlmann. Nach einigen Stunden isolieren die Wissenschaftler die gesamte Boten-RNA der Proben.

SENSOR SUCHT NACH GENABSCHRIFTEN

Durch den Vergleich mit unbehandelten Proben können sie feststellen, welche Gene unter Einwirkung der Fremdstoffe vor allem häufiger abgelesen werden. Das schlägt sich in einer Veränderung der Konzentration der entsprechenden Boten-RNA nieder. Proteine, deren Bauanleitungen in diesen Erbgutabschnitten stecken, wirken dann vermutlich an der Verarbeitung der krebserregenden Substanzen mit. Gelingt es den Forschern, die einzelnen Eiweißmoleküle zu identifizieren, haben sie damit wertvolle Informationen über den Metabolismus dieser Stoffe in der Hand.

Im zweiten Schritt konzentrieren sich die Dortmunder Wissenschaftler auf einzelne Gene, für die sie die größten Veränderungen festgestellt haben. Sie generieren die passenden Fluoreszenzsonden und messen damit den Boten-RNA-Gehalt von behandelten Harnblasenzellen mittels Echtzeit-PCR. Unter anderem vergleichen sie die Bildungsgeschwindigkeit der RNA in einem Zeitraum von fünf bis 30 Stunden. „Unser Ziel ist es, einen Sensor zu entwickeln, der mehrere Sonden für die relevanten Genabschriften enthält. Diese sollen dann parallel ausgelesen werden können“, sagt Kuhlmann.

Dabei gehen die Wissenschaftler davon aus, dass solche Karzinogene,

die in den Epithelzellen nach demselben Mechanismus verarbeitet werden, auch ähnliche Boten-RNA-Muster erzeugen. Der geplante Sensor könnte dazu dienen, Substanzen vergleichsweise schnell auf ihr Potenzial als Krebsauslöser zu untersuchen.

Obwohl das Projekt noch in einer relativ frühen Phase steckt, haben die beiden Dortmunder Gruppen bereits eine gängige Lehrmeinung in Frage gestellt: Bisher nahmen die Experten an, dass vor allem die aromatischen Amine im Tabakrauch Krebs erzeugen. „Wir konnten zeigen, dass diese Substanzklasse alleine keine massiven Schäden hervorruft“, berichtet Kuhlmann. Erst wenn zusätzlich polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe auf die Zellen einwirken, werden auch die Amine zur Gefahr. Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe alleine erzeugen zwar auch Zellschäden, aber sie aktivieren vor allem die Zellen; diesen gelingt es dann, Fremdstoffe effizient zu verarbeiten. Insgesamt also gibt es eine Kaskade aus sich selbst verstärkenden Schädigungen.

Kuhlmanns Fazit: Solche synergistische Effekte müssen viel stärker als bisher erforscht werden. „In der Vergangenheit wurden viele Studien mit Einzelbestandteilen des Tabakrauchs oder mit dem gesamten Kondensat durchgeführt, aber kaum mit Gemischen aus nur wenigen Stoffen“, bemängelt der Max-Planck-Forscher. Dies soll deshalb eines der Gebiete sein, auf dem das neue, leistungsfähige Testsystem zum Einsatz kommen wird. Und noch etwas betont Jürgen Kuhlmann: „Wir haben hier auch ein ausgezeichnetes Beispiel für eine fruchtbare Kooperation regionaler Arbeitsgruppen, bei der sich die fachliche Expertise der beteiligten Institute höchst produktiv ergänzt.“



Setzt viel Hoffnung auf das neue Testverfahren: Jürgen Kuhlmann vom Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie.

FOTO: MPI FÜR MOLEKULARE PHYSIOLOGIE

UTE HÄNSLER