



Gen-DarT- ein Vorhersagemodell für die chronische Toxizität durch Analyse veränderter Genexpression in Embryonen des Zebraärlblings (*Danio rerio*)?

Doris Völker, doris.voelker@ufz.de; Christoph Veß, christophv@miltenyibiotec.de; Kristin Schirmer, kristin.schirmer@ufz.de; Stefan Scholz, stefan.scholz@ufz.de alle Leipzig

Abstract

Die toxischen Effekte von Chemikalien auf Organismen lassen sich auf initiale molekulare Interaktionen zurückführen. Veränderungen von Genexpressionsmustern sind Teil dieser molekularen Interaktionen oder werden sekundär – z.B. im Rahmen einer Stressantwort – durch diese hervorgerufen. Veränderte Genexpressionsmuster können daher toxische Effekte anzeigen, bevor eine phänotypische Veränderung sichtbar wird. Ziel dieser Arbeit war es, die Sensitivität des Fischembryotests, der als Ersatzmethode für den akuten Fischtest eingesetzt werden kann, durch die Analyse der Genexpression zu erhöhen und seine Aussagekraft hinsichtlich der Vorhersage potentiell chronischer Effekte zu erweitern. Mit Hilfe der Modellsubstanz 3,4-Dichloranilin wurden durch Mikroarrays und die Analyse ausgewählter Kandidatengene eine Reihe sensibler Gene identifiziert, deren Expression im subakuten Bereich verändert war. Die veränderten Gene (*cyp1a*, *ahr2*, *nfe212*, *maft*, *hmx1* und *fzr1*) im Fischembryo wurden in Konzentrationsbereichen verändert, bei denen in einem chronischen Test (*fish early life stage test*) toxische Effekte beobachtet wurden. Die mit den identifizierten Genen assoziierten Signalwege deuteten auf eine protektive Wirkung, welche durch funktionelle Analysen mit transienter Manipulation der Genexpression bestätigt werden konnte.

Alternativen zum Tierversuch

Für die Zulassung von Chemikalien, Bioziden, Pestiziden und Medikamenten ist in Europa eine Umweltrisikoprüfung vorgeschrieben (Commission of the European Communities 1993 und 1994; CVMP/VICH, 2004; EMEA/CHMP, 2006). Im Rahmen dieser Prüfung werden verschiedene Toxizitätstests durchgeführt, darunter auch akute und chronische Fischtests. Als Konsequenz des neuen Zulassungsverfahrens der Europäischen Union REACH (Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals, Commission of the European Communities, 2003) wird innerhalb der Umweltrisikoprüfung für die nächsten Jahre eine erhebliche Zunahme der Anzahl von Tierversuchen für die Substanztestung erwartet (Bhogal, 2005). Gleichzeitig wächst jedoch auch der öffentliche Druck, Alternativen zu Tierexperimenten zu finden, um deren Zahl zu reduzieren.

Nach geltenden EU-Richtlinien werden Experimente mit nicht-humanen Wirbeltierembryonen als schmerzfreie Alternativen eingestuft und sind daher als Ersatzmethoden zu Tierversuchen akzeptiert. Als Ersatzmethode zum akuten Fischtest (OECD 203, 1992) wird der *Danio rerio* Embryotest (*DarT*, Nagel, 2002) eingesetzt, der in Deutschland im

Rahmen der Untersuchung von Abwässern bereits in eine gesetzliche Regelung integriert ist (Bundesgesetzblatt, 2005). Ersatzmethoden für chronische Fischtests wie zum Beispiel dem *Fish early life stage*-Test (FELST, OECD 210) existieren dagegen derzeit nicht. Im Hinblick auf eine solche Ersatzmethode war das Ziel der hier vorgestellten Arbeit die Erweiterung des Embryotests *DarT* zu einem Gen-*DarT* (Genexpression - *Danio rerio* Embryotest).

Die Wirkung toxischer Substanzen entfaltet sich zunächst auf molekularer Ebene und kann Physiologie und Vitalität sowohl auf zellulärer, als auch auf organischer Ebene beeinflussen. Als Folge solcher molekularen Interaktionen treten Veränderungen von Genexpressionsmustern auf, z.B. durch Interaktion von Schadstoffen mit Rezeptoren oder als Teil einer Stressantwort. Veränderungen der Genexpression können toxische Effekte anzeigen, bevor ein phänotypischer Effekt sichtbar wird. Die dieser Arbeit zugrunde liegende Hypothese war daher, dass die Analyse Schadstoff-abhängig exprimierter Gene in Embryonen des *DarT* das toxische Potential einer Substanz bereits bei subakuten Expositionskonzentrationen anzeigt, und so die Sensitivität des konventionellen Embryotests erhöhen kann (Abb. 1). Anders als die üblichen toxischen Endpunkte dieses Tests ermöglicht eine Untersuchung der Genexpression darüber hinaus Einblicke in zelluläre Mechanismen, die durch eine toxische Substanz beeinflusst werden. Als Modellchemikalie für diese Arbeit wurde 3,4-Dichloranilin (3,4-DCA) gewählt, das bereits als Referenzsubstanz im *DarT* eingesetzt wird.

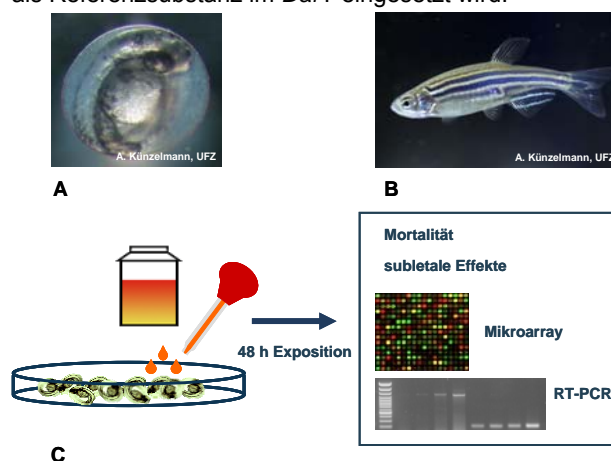


Abb. 1. (→ [Grafik vergrößern](#)) **Forschungshypothese:** Genexpressionsanalysen im *Danio rerio* Embryotest *DarT* erhöhen die Sensitivität und Aussagekraft des Tests und ermöglichen die Vorhersage chronisch toxischer Konzentrationen. A: 48h Stunden alter Zebraärlblingsembryo, B: adulter Zebraärlbling, C: erweiterter *Danio rerio* Embryotest.

Identifizierung Schadstoff-abhängiger Gene im Zebrabärblingsembryo

Um Schadstoff-sensitive, differentiell exprimierte Gene zu identifizieren, wurden Zebrabärblingsembryonen ab dem Zeitpunkt der Befruchtung mit der Modellsubstanz 3,4-DCA exponiert. Nach 48 Stunden Exposition wurde die RNA isoliert und sensitive Gene durch eine Kombination von Mikroarrays und der gezielten Analyse potentiell sensitiver Gene mit RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) identifiziert. Mikroarrays erlauben die simultane Analyse zehntausender Gene durch Hybridisierung der mRNA mit Gen-spezifischen Oligonukleotiden oder cDNAs. Die Ergebnisse der Mikroarray-Analysen wurden durch quantitative RT-PCR in unabhängigen Experimenten (d.h. Experimenten, die nicht für die Mikroarrays verwendet wurden) bestätigt. Zusätzlich wurden mittels RT-PCR solche Gene analysiert, für die eine potentielle Schadstoff-sensitive Antwort angenommen werden konnte, die aber aufgrund der eingeschränkten Größe des Oligonukleotid-Arrays (14000 Sequenzen) nicht auf den Mikroarrays enthalten waren. Durch die Kombination dieser beiden Methoden wurden sechs Konzentrations-abhängig exprimierte Gene, die eine Rolle in Biotransformationsprozessen (*cyp1a*, *ahr2*), zellulären Stressantworten (*nfe212*, *maft*, *hmox1*) und in der Kontrolle des Zellzyklus (*fzr1*) spielen, identifiziert (Voelker et al., 2007a).

Die identifizierten Gene geben Einblicke in die molekulare Wirkungsweise von 3,4-DCA, das aufgrund von quantitativen Struktur-Wirkungsbeziehungen (QSAR) als polar narkotisch wirkende Substanz beschrieben wird (Arnold et al., 1990). Die durch 3,4-DCA induzierten Stress-sensitiven Gene spielen primär eine Rolle in der Biotransformation der Phase 1 und 2. CYP1A ist ein Isoenzym der Cytochrom P450 Familie. Seine Expression wird über den Ah-Rezeptor reguliert und durch Polyaromaten, aber auch eine Reihe anderer Substanzen induziert (Bock, 1994; Denison und Heath-Pagliuso, 1998; Waller und McKinney, 1995). Auch für den Transkriptionsfaktor *nfe212* ist eine Regulation durch den Ah-Rezeptor beschrieben (Miao et al., 2005). *NFE212* (*p45 NF-E2 related factor 2*) kontrolliert über weitere Kofaktoren (z.B. kleine maf-Proteine wie das MAFT) die Expression von Phase 2-Enzymen (Motohashi und Yamamoto, 2004; Shen et al., 2004). Da Hitzeschock-Proteine auch über den NFE212-Signalweg reguliert werden (Kwak et al., 2003) könnte dies die Induktion von *hmox1* erklären (Martin et al., 2004). *Hmox1* besitzt in seiner Regulationseinheit typische Hitzeschock-protein-Regulationselemente (Alam et al., 199, Alam et al., 2004) und wird durch sehr verschiedene Stressbedingungen induziert. Hierzu gehören eine Vielzahl von Chemikalien, die oxidativen Stress hervorrufen, aber auch spezifisch wirkende Substanzen, wie Schwermetalle, Endotoxine, inflammatorische Zytokine und Prostaglandine (Alam et al., 2004). Durch seine katalytische Funktion – die Umwandlung von Biliverdin zu Bilirubin – trägt HMOX-1 zur Kompensation von oxidativem Stress durch reaktive Sauerstoff-Spezies bei. Ob

jedoch auch 3,4-DCA zur Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies führt, ist bisher nicht bekannt. Neben der Regulation durch den Ah-Rezeptor ist jedoch auch eine Regulation über den MAPK (*mitogene activated protein kinase*)-Signalweg möglich, da die Aktivierung von NFE212 auch über diesen kontrolliert wird (Shen et al., 2004). Fünf der durch 3,4-DCA regulierten Gene im Zebrabärblingsembryo deuten somit auf ein regulatives Netzwerk, das im Wesentlichen auf der Regulation über den Ah-Rezeptor und/oder den MAPK-Signalweg basiert und auf eine generelle Stress- oder adaptive Antwort deutet, die auch durch andere Chemikalien induziert werden könnte. Eine Ausnahme bildet das durch 3,4-DCA reprimierte Gen für das *fizzy related protein 1* (*fzr1*). FZR1 spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Zellteilung. 3,4-DCA könnte den Zellzyklus durch die Repression der Transkription von *fzr1* beeinflussen und zu einer Unterbrechung der Mitose führen, einem für die Entwicklung des Embryos bedeutenden Vorgang.

Sensitivität des Gen-DarTs

Signifikante Veränderungen der Genexpression durch 3,4-DCA wurden bereits bei Expositionskonzentrationen 2-16fach unterhalb der LOEC (*lowest observed effect concentration*, Endpunkte Überleben und Entwicklungsanomalien) von 12,4 µM beobachtet (Abb. 2). In Bezug auf subletal chronische Effekte von 3,4-DCA im FELST mit einem LOEC von 0,11 µM liegt die Sensitivität des Gen-DarT deutlich über der akuten Toxizität und nahe des im FELST beobachteten LOEC für chronische Toxizität (Abb. 2). Die höchste Empfindlichkeit wurde für die Genexpression von *cyp1a* (0,78 µM) nachgewiesen. Die hohe Sensitivität der Genexpression konnte durch die Untersuchung der durch 3,4-DCA veränderten Gene für 12 weitere Testsubstanzen bestätigt werden. Für die meisten der untersuchten Substanzen konnten signifikante Änderungen der Genexpression deutlich unterhalb der akuten Wirkkonzentrationen und im gleichen Konzentrationsbereich wie toxische Effekte im *fish early life stage test* beobachtet werden (Weil et al., unveröffentlichte Daten).

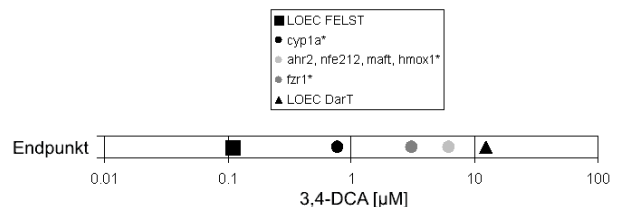


Abb. 2. (→ [Grafik vergrößern](#)) Sensitivität des Gen-DarTs (Genexpressions-Danio rerio-Embryotest) im Vergleich zu Effektkonzentrationen von 3,4-DCA (= LOEC, *lowest observed effect concentration*) im Zebrabärblings-Fischembryotest (DarT) und *fish early life stage tests* (FELST) für die Testsubstanz 3,4-Dichloranilin. Gezeigt sind die LOECs für die Genexpression von *cyp1a*, *ahr2*, *nfe212*, *maft*, *hmox1* und *fzr1* im Embryo (* = signifikant veränderte Genexpression im DarT). Genexpressionsanalysen sind bis zu 16fach sensitiver als die konventionellen toxischen Endpunkte des DarT.

Die Identifikation der hier betrachteten Gene erfolgte mit nur einer Modellsubstanz. Durch Verwendung weiterer Modellsubstanzen und Durchführung weiterer Microarrays kann mit der Identifizierung weiterer Gene und ggf. einer erhöhten Sensitivität gerechnet werden. Daher erfolgen in unserer Arbeitsgruppe zurzeit Untersuchungen mit weiteren Modellsubstanzen.

Relevanz Schadstoff-abhängig veränderter Gene

Die in ihrer Expression veränderten Gene können – über die entsprechenden Genprodukte – sowohl eine protektive Wirkung gegenüber dem Schadstoff haben als auch die toxischen Effekte vermitteln. Um Informationen über die funktionelle Bedeutung der Gene im Zusammenhang mit der Toxizität von 3,4-DCA zu erhalten, wurde die Expression in 3,4-DCA-exponierten Embryonen durch Injektion von siRNA (Repression, Tuschl, 2001) oder mRNA (Überexpression) in das embryonale Ein-Zell-Stadium manipuliert. Hierzu wurden die Gene *cyp1a* und *hmx1* ausgewählt, da diese die höchste Sensitivität für eine differentielle Expression bei fast allen untersuchten Testsubstanzen aufwiesen. Der Effekt dieser Manipulation auf die Toxizität von 3,4-DCA (d.h. auf die Häufigkeit von Embryonen mit typischen Entwicklungsanomalien nach 48 Stunden Exposition) wurde untersucht. Die Überexpression der Gene *cyp1a* oder *hmx1* hatte eine verringerte Anzahl Entwicklungsstörungen zur Folge, während die Injektion von siRNA der gleichen Gene zu einer Erhöhung der Entwicklungsstörungen führte. Die beobachteten gegensätzlichen Auswirkungen der siRNA- und mRNA-Injektion auf die Toxizität von 3,4-DCA deuten auf eine protektive Wirkung der veränderten Genexpression (Voelker et al., 2007b).

Gen-DarT als Ersatzmethode zum Tierversuch

Die hier vorgestellten Untersuchungen veranschaulichen das Potential Schadstoff-abhängig exprimierter Gene zur Risikoanalyse von Schadstoffen. Genexpressionsanalysen wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurden, sind geeignet die Aussagekraft des konventionellen Embryotests zu verbessern und können möglicherweise als Vorhersagemodell für chronische Toxizität eingesetzt werden. Die Sensitivität der in dieser Arbeit gezeigten 3,4-DCA-abhängigen Genexpression liegt relativ nahe am Konzentrationsbereich chronischer Effekte im FELST. Für 12 weitere Substanzen konnte mit den gleichen Genen ein ähnliches Ergebnis erzielt werden. Gene, wie die hier vorgestellten, könnten daher die Anzahl von Tierversuchen für die Untersuchung der chronischen Toxizität reduzieren und zusätzliche mechanistische Informationen vermitteln. Durch Identifizierung weiterer Gene und Untersuchung zusätzlicher Chemikalien soll die Analyse der Genexpression in Zebrafischembryonen zu einem Vorhersagemodell für chronische Toxizität optimiert werden. Da zurzeit keine alternativen experimentellen Modelle für den Ersatz chronischer Fischtests zur Verfügung stehen, besitzt die Analyse der Genexpression bei weiterer Optimierung ein

hohes Potential zur Entwicklung einer Ersatzmethode. In Kombination mit funktionellen Genanalysen zeigen die Ergebnisse darüber hinaus, dass der Zebrafischembryo auch zur Bewertung der Relevanz differentieller Genexpression – adaptive Funktion oder Vermittlung der Toxizität - eingesetzt werden kann.

Danksagung

Das Projekt „Gen-DarT - Entwicklung eines Fischembryotests als Alternative für verlängerte und chronische Fischtests“ wurde vom Bundesministerium für Bildung und Forschung im Rahmen des Programms ‚Biotechnologie – Alternativen zu Tierversuchen‘ gefördert (FKZ: PTJ-BIO/ 0313015-17).

Literatur

- Alam J., Stewart D., Touchard C., Boinapally S., Choi A.M. und Cook J.L. (1999) Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene. *J Biol Chem*, 274, 26071-8
- Alam J., Igarashi K., Immenschuh S., Shibahara S. und Tyrrell R.M. (2004) Regulation of heme oxygenase-1 gene transcription: recent advances and highlights from the International Conference (Uppsala, 2003) on Heme Oxygenase. *Antioxid Redox Signal*, 6, 924-33
- Arnold L.M., Lin D.T. und Schultz T.W. (1990) QSAR for methyl- and/or chloro-substituted anilines and the polar narcosis mechanism of toxicity. *Chemosphere*, 21, 183-191
- Bhogal N. (2005) The EU REACH system: blessing in disguise or wolf in wolf's clothing? *Altern Lab Anim*, 33, 81-2
- Bock, K.W. (1994) Aryl hydrocarbon or dioxin receptor: biologic and toxic responses. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 125: 1-42.
- Bundesgesetzblatt (2005) Bekanntmachung der Neufassung des Abwasserabgabengesetzes vom 18. Januar 2005. Jahrgang 2005 Teil I Nr. 5, ausgegeben zu Bonn am 25.01.2005
- Commission of the European Communities (1993) Council Regulation 793/93/EEC of 23 March 1993 on the evaluation and control of risks of existing substances. *Official Journal of the European Communities L84/1*
- Commission of the European Communities (1994) Regulation 1488/94/EEC of 28 June 1994, laying down the principles for the assessment of risks to man and the environment of existing substances in accordance with Council Regulation 793/93/EEC. *Official Journal of the European Communities L161/3*
- Commission of the European Communities (2003) Proposal for a regulation of the European parliament and of the council concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency and amending Directive 1999/45/EC and Regulation (EC) on Persistent Organic Pollutants.

- CVMP/VICH (2004) Environmental impact assessment for veterinary medicinal products. Phase II guidance. *VICH Topic GL 38 (Ecotoxicity Phase II) Step 7 (CVMP/VICH/790/03-Final)*
- Denison, M.S. und Heath-Pagliuso, S. (1998) The Ah receptor: a regulator of the biochemical and toxicological actions of structurally diverse chemicals. *Bull Environ Contam Toxicol*, 61(5): 557-68.
- EMA/CHMP (2006) Guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for human use. *Doc. Ref. EMA/CHMP/SWP/4447/00*
- Kwak, M. K., Wakabayashi, N., Itoh, K., Motohashi, H., Yamamoto, M., und Kensler, T. W. (2003) Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones through the Keap1-Nrf2 pathway. Identification of novel gene clusters for cell survival. *J Biol Chem* 278, 8135-8145.
- Martin, D., Rojo, A. I., Salinas, M., Diaz, R., Gallardo, G., Alam, J., de Galarreta, C. M. R., und Cuadrado, A. (2004) Regulation of heme oxygenase-1 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and the Nrf2 transcription factor in response to the antioxidant phytochemical carnosol. *J Biol Chem* 279, 8919-8929.
- Miao W., Hu L., Scrivens P.J. und Batist G. (2005) Transcriptional regulation of NRF2 expression by the AHR-XRE signaling pathway: Direct cross-talk between phase I and II drug-metabolizing enzymes. *J Biol Chem*, 280, 20340-20348
- Motohashi, H. und Yamamoto, M. (2004) Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol Med*, 10(11): 549-57.
- Nagel R. (2002) DarT: The embryo test with the Zebrafish *Danio rerio*—a general model in ecotoxicology and toxicology. *Altex*, 19 Suppl 1, 38-48
- OECD 203 (1992) OECD guideline for testing of chemicals. Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test.
- OECD 210 (1992) OECD guideline for testing of chemicals. Test No. 210: Fish, early life stage toxicity test.
- Shen, G., Hebbbar, V., Nair, S., Xu, C., Li, W., Lin, W., Keum, Y. S., Han, J., Gallo, M. A., und Kong, A. N. (2004) Regulation of Nrf2 transactivation domain activity. The differential effects of mitogen-activated protein kinase cascades and synergistic stimulatory effect of Raf and CREB-binding protein. *J Biol Chem* 279, 23052-23060.
- Tuschl T. (2001) RNA interference and small interfering RNAs. *Chembiochem*, 2, 239-45
- Voelker D., Vess C., Tillmann M., Nagel R., Otto G.W., Geisler R., Schirmer K. und Scholz S. (2007a) Differential gene expression as a toxicant-sensitive endpoint in zebrafish embryos and larvae. *Aquatic Toxicology*, 81(4): 355-64.
- Voelker D., Stetefeld, N., Schirmer, K. und Scholz, S. (2007b). The role of *cyp1a* and heme oxygenase-1 gene expression for the toxicity of 3,4-dichloroaniline in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Aquatic Toxicology*, doi:10.1016/j.aquatox.2007.10.007, im Druck.
- Waller, C.L. und McKinney, J.D. (1995) Three-dimensional quantitative structure-activity relationships of dioxins and dioxin-like compounds: model validation and Ah receptor characterization. *Chem Res Toxicol*, 8(6): 847-58.

Korrespondenzadresse:

Dr. Doris Völker
 Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung – UFZ
 Department für Zelltoxikologie
 Permoser Str. 15
 04318 Leipzig
 Tel: 0341-2352928
 Fax: 03341-2352434