

# Geht uns im FET ein Licht auf? Leuchtende Fischembryos spüren vasotoxische Schadstoffwirkung auf

Vera Delov <sup>1,2,\*</sup> • Elke Muth-Köhne <sup>1</sup> • Viktoria Schiller <sup>1,2</sup> • Arne Wichmann <sup>1</sup> • Christoph Schäfers <sup>3</sup> • Martina Fenske <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie IME, Forckenbeckstr. 6, 52074 Aachen, Germany

<sup>2</sup> Institute for Molecular Biology, RWTH Aachen University, Worringerweg 1, 52074 Aachen, Germany

<sup>3</sup> Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie, Auf dem Aberg 1, 57392 Schmallenberg, Germany  
vera.delov@rwth-aachen.de

## Einleitung

Der Fischembryotest FET wird in der Ökotoxikologie seit Jahren als vielversprechende Tierversuchs-Alternativmethode diskutiert. Bisher wurde der Einsatzschwerpunkt des FETs ausschließlich bei der Ermittlung akuter Toxizitätsdaten von Chemikalien angesehen, doch wird ihm mittlerweile ein großes Potential bei der Bewertung toxikologischer Wirkungen von Chemikalien zugesprochen, die weit über die akute Toxizität hinausgehen (Scholz et al., 2008). Bislang fehlen jedoch geeignete zusätzliche morphologische und submorphologische Endpunkte für eine standardisierte Untersuchung von spezifischen und chronischen Schadstoffeffekten. Um einen höheren Durchsatz bei der Testung mit dem FET zu ermöglichen, muss neben der Verfeinerung der Testendpunkte eine automatisierte, vom Auswerter unabhängige Testauswertung entwickelt werden. Genexpressionsmarker könnten eine bessere und schnellere Auswertung sowie eine Verfeinerung der toxikologischen Endpunkte im FET ermöglichen.

In diesem Projekt wird die transgene Zebrafischlinie *Tg(fli1:EGFP)<sup>y1</sup>* auf ihre Anwendbarkeit im FET für die Testung von vaskulär wirksamen Substanzen geprüft. Die Linie exprimiert in den Blutgefäßen *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) unter der Kontrolle des *fli1* Promotors (Weinstein et al., 2002). *Fli1* gehört in die Familie der ETS-Transkriptionsfaktoren und ist essentiell für die Entwicklung des Gefäßsystems und des Blutkreislaufs und könnte so ein wertvoller Marker für die Detektion vaskulärer Schädelfekte sein.

## Material und Methoden

- 48 h FET in Anlehnung an DIN 38415-6 und OECD Draft TG (2006) mit Zebrafischembryos (*Danio rerio*) der transgenen Linie *Tg(fli1:EGFP)<sup>y1</sup>*
- Hellfeldmikroskopische Auswertung: Aufnahme der letalen und subletalen Effekte (Braunbeck et al., 2005) und EC<sub>50</sub>-Bestimmung
- Fluoreszenzmikroskopische Auswertung: Längenmessung der intersegmentalen Blutgefäße (ISV) von 48 hpf (*hours post fertilisation*)-Embryos der Linie *Tg(fli1:EGFP)<sup>y1</sup>* (Abb. 1) anhand von Vollfokusbildern. Prozessierung von Z-Stapel-aufnahmen mittels ImageJ Plugin. Anhand der Vollfokusbilder erfolgte zudem die Effektbewertung und EC<sub>50</sub>-Bestimmung.

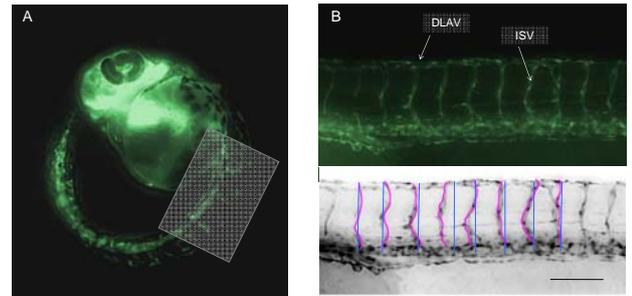


Abb. 1: Zebrafischembryo der transgenen Linie *Tg(fli1:GFP)<sup>y1</sup>* 48 hpf. (A) Unbehandelter Embryo im Choron 48 hpf; Rechteck kennzeichnet den Ausschnitt dargestellt in (B). (B) Oben: EGFP-Expression in den Blutgefäßen des Embryonums; DLAV= dorsal laterale Veine, ISV= intersegmentales Gefäß. Unten: ISV-Längenmessung in ImageJ. Die blaue Linie kennzeichnet die Somitenlänge, die rote Linie die ISV-Länge. Laterale Ansicht, anterior links, dorsal oben. Maßstab= 100 µm.

Tabelle 1: Ausgewählte vasotoxische Substanzen unterschiedlicher Substanzklassen. Die Substanzen wurden auf Grund ihres Wirkmechanismus und der daraus abzuleitenden potentiellen vasotoxischen Wirkung gewählt. SU4312 diente in der Testreihe als Positivkontrolle (Tran et al. 2007).

Substanz	Substanzklasse	Mode of Action
SU4312	Small molecule	Tyrosinkinase Inhibitor, antiangiogenetische Wirkung (Peterson et al., 2000)
Triclosan	Desinfektions- und Konservierungsmittel	Enolyl-ACP-Reduktase Inhibitor, Verdacht auf anticarcinogene Wirkung
Genistein	Phytohormon	Tyrosinkinase Inhibitor, antiangiogenetische Wirkung (Kälin et al., 2009)
Fenazaquin	Insektizid	Inhibitor des mitochondrialen Elektronen Transports

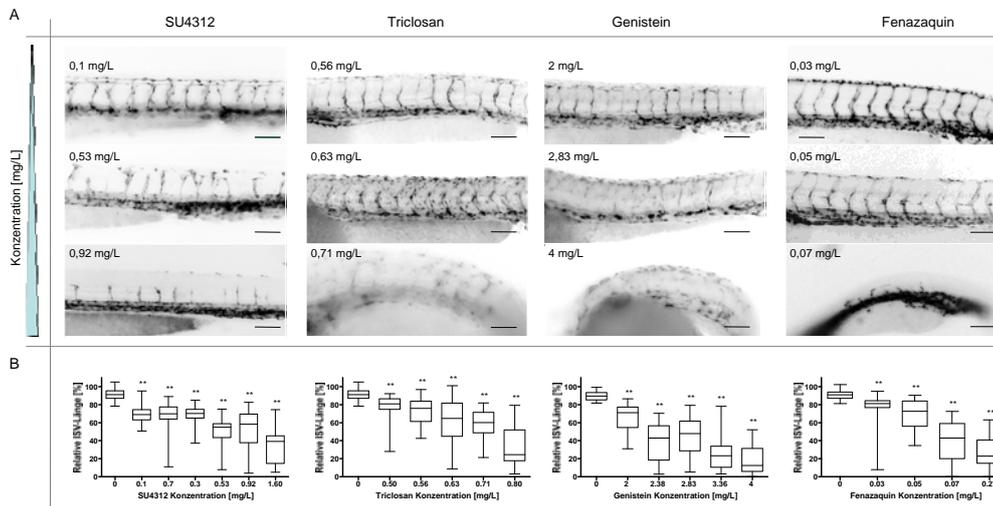


Abb. 2: Intersegmentale Blutgefäße (ISV) behandelter *Tg(fli1:GFP)<sup>y1</sup>* Zebrafischembryos 48 hpf. (A) Fluoreszenzbilder von mit SU4312, Triclosan, Genistein und Fenazaquin behandelten 48 hpf Zebrafischembryos. Embryos wurden dechorioniert, mit 4% Paraformaldehyd fixiert und mikroskopisch (Leica DMI/AF6000) analysiert. (B) Relative ISV-Länge (%) bei unterschiedlichen Substanzkonzentrationen (mg/L). Signifikante Unterschiede zur Negativkontrolle sind mit Sternchen indiziert (\*\*: p < 0,01; One way ANOVA und Dunnetts multiple comparison test). Maßstab= 100 µm.

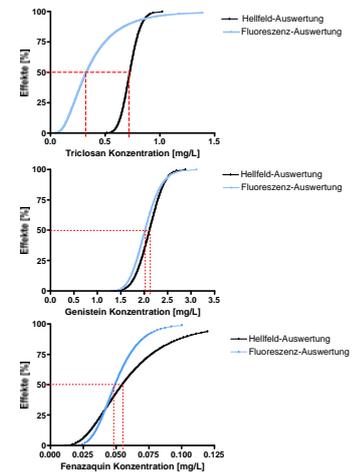


Abb. 3: Dosis-Wirkungskurven der Hellfeld- und Fluoreszenz-Auswertung im Vergleich. Letale und subletale Effekte nach 48 h Substanzexposition, die zum einen mittels Hellfeld- (schwarze Linie) und zum anderen mittels Fluoreszenzmikroskopie (blaue Linie) detektiert wurden.

## Ergebnisse

- SU4312, Triclosan, Genistein und Fenazaquin inhibieren die Angiogenese in Zebrafischembryos
- Alle behandelten Embryos zeigen signifikante ISV-Längen-Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle
- In der Hellfeld-Auswertung nicht sichtbare Effekte auf Herz und Blutkreislauf konnten in der Fluoreszenz-Auswertung eindeutig nachgewiesen werden
- Die Fluoreszenz-Auswertung scheint sensitiver als die der Hellfeld-Auswertung (EC<sub>50</sub> kleiner)

- ➔ Auch bei Substanz ohne bisherig bekannte vasotoxische Wirkung konnte Effekte auf das Blutkreislaufsystem nachgewiesen werden (Triclosan, Fenazaquin)
- ➔ Mittels Fluoreszenz-Auswertung sind Effekte früher detektierbar

## Schlussfolgerung

Die *Tg(fli1:GFP)<sup>y1</sup>* Zebrafischlinie erweist sich als sehr vielversprechend beim Einsatz im FET und lässt eine deutliche Erhöhung der Sensitivität des Tests gegenüber vasotoxischer Substanzen vermuten.

## Ausblick

- Fluoreszenz-Auswertung nach 24 hpf zur Untersuchung von bereits nach 24 h erkennbarer schadstoffspezifischer Effekte
- Verwendung spezifischer Antikörper für Immunfärbungen zur Verifizierung der gewonnenen Ergebnisse
- Automatisierte Bildanalyse mit ImageJ

## Referenzen

DIN 2001: DIN-Norm 38415-6: Toxikologische Testverfahren (Gruppe 7), Teil 6: Ötlichkeit gegenüber Fischen. Bestimmung der nicht akut giftigen Wirkung von Abwasser auf die Entwicklung von Fischen über Verdünnungsstufen (T6). Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammanalyse.  
Braunbeck T., Böttcher M., Hollert H., Köneke T., Lammer E., Leist E., Rudolf M., Seitz N., 2005: Towards an alternative for the acute fish LC50 test in chemical assessment of the fish embryo toxicity test (ges multi-species - an update). ALTEX 22(2005) 87-102.  
Kälin R., Bänziger-Tobler N., Detmar M., Brandt A., 2009: An in vivo chemical library screen in *Xenopus* tadpoles reveals novel pathways involved in angiogenesis and lymphangiogenesis. BLOOD Vol 114 No 5.  
OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, 2006: Draft proposal for new guideline: Fish Embryo Toxicity Test. Draft Guideline May 30, 2006 1st Version. Paris, France, Organisation for Economic Cooperation and Development.

Peterson R., Link B., Dowling J., Schreiber S., 2000: Small molecule developmental screens reveal the logic and timing of vertebrate development. PNAS Vol 97 No 24, 12965-12969.  
Scholz S., Fischer S., Gündel U., Küster E., Luckenbach T., Voelker D., 2008: The zebrafish embryo model in environmental risk assessment: applications beyond acute toxicity testing. Environ Sci Pollut Res 15:394-404.  
Tran C., Sheel B., Hasker J., Blavo D., White A., Ayejonan T., Baranowski T., Rubinstein A., Doan T., Dingeldine R., Sandberg E., 2007: Automated, Quantitative Screening Assay for Angiogenic Compounds Using Transgenic Zebrafish. Cancer Res 67:23.  
Weinstein B., Lawson N., 2002: In Vivo Imaging of Embryonic Vascular Development Using Transgenic Zebrafish. Dev Biol 248, 307-318.