

Animal welfare, etológia és tartástechnológia



Animal welfare, ethology and housing systems

Volume 9

Issue 3

Különszám/Special Issue

Gödöllő

2013



BIOSZENZOR ZEBRADÁNIÓ VONAL PAJZSMIRIGY MŰKÖDÉST ZAVARÓ ANYAGOK MONITOROZÁSÁRA

Bakos Katalin¹, Fetter Éva², Csenki Zsolt¹, Kovács Róbert¹, Csepeli Andrea¹, Reining Márta¹, Kovács Balázs¹, Urbányi Béla¹, Stefan Scholtz²

¹Szent István Egyetem, Környezet- és Tájgazdálkodási Intézet, Halgazdálkodási Tanszék
2103 Gödöllő, Páter Károly út 1.

²Department of Bioanalytical Ecotoxicology, UFZ
Permoserstraße 15, 04318 Lipcse, Németország
Bakos.Katalin@mkk.szie.hu

Összefoglaló

A civilizáció fejlődésével egyre többféle vegyi anyag jut a környezetbe, amelyek közül számos vegyület hatását még nem, vagy csak kevéssé ismerjük. Több nagy mennyiségben kijutó, hormonháztartást megzavaró anyag is található közöttük, amelyek egy része káros hatással van a pajzsmirigy működésére (goitrogén). A hormonhatású anyagok csoportja kémiai szempontból meglehetősen diverz, ezért csupán a kémiai szerkezet alapján elég nehéz megjósolni egy anyag valós hatásait. A hormonhatás legjobb megközelítéssel élő szervezetekben mutatható ki. A zebradánió (*Danio rerio*) napjainkban egyre népszerűbb modellállat a toxikológiai vizsgálatok során. Genetikai háttere és élettani folyamatainak nagy része nagy hasonlóságot mutat más gerincesekével, az emlősökkel és az emberrel egyaránt. A zebradánió embriók áttetszőek, ezért a fluorescens fehérjékkel létrehozott transzgenikus vonalak jól használhatók a toxikus anyagok vizsgálatában, különösen ha a fluoreszcens jel megjelenése hormonhatással indukálható.

Munkánk során pajzsmirigy zavaró hormonhatású anyagok kimutatására alkalmas zebradánió vonalak kialakítását tűztük ki célul. A pajzsmirigy vagy annak szabályozásában fontos szerepet betöltő, specifikus expressziót mutató gének közül a nátrium-jodid szimporter (*slc5a5*) és a tireoperoxidáz (*tpo*) géneket választottuk a transzgenikus vonalak kialakításához, mivel azok promóter régiója pajzsmirigy zavaró anyagokkal indukálható. A gének működését molekuláris módszerekkel validáltuk, majd promóter régiójukkal létrehoztuk a vonalak kialakításához szükséges génkonstrukciókat. A génkonstrukciókat 1-2 sejt zebradánió embriókba injektáltuk, majd megkezdtük a fluoreszcens fehérje kifejeződésének vizsgálatát különböző, pajzsmirigy zavaró anyagok hatására.

Kulcsszavak: zebradánió (*Danio rerio*), pajzsmirigy, goitrogén anyag, bioszenzor

Biosensor zebrafish for monitoring thyroid disruption

Abstract

As civilization advances, more and more chemicals are released to the environment. The effect of some of these is unknown or scarcely known. Among the released chemicals some are produced in large amounts and are able to interfere with the hormone system, so can disrupt thyroid functions. The group of endocrine disrupting compounds is chemically highly diverse, so hormonal effect can hardly be told on the basis of chemical structure. One of the best approaches to study these effects is to use model organism-based tests. Zebrafish (*Danio rerio*) is currently



more and more popular in toxicology. Its genetic background and physiological processes are highly similar to those of other vertebrates, mammals and humans. Moreover, zebrafish embryos are transparent, so transgenic fish expressing fluorescent proteins are valuable tools in toxicological studies, especially if the expression of the reporter is inducible by hormonal substances.

The aim of the presented work is to establish zebrafish lines for the detection of thyroid disruptive agents. From the thyroid specific genes important in thyroid functions or their regulation, sodium-iodide symporter (*slc5a5*) and thyroid-peroxidase (*tpo*) were selected for the development of the lines, as their promoter region is inducible by thyroid active substances. The expression of these genes were validated by molecular methods, then gene constructs were built with their promoter regions. Constructs were injected into 1-2 cell zebrafish embryos. Induction of the fluorescent signal was started to be tested by thyroid disruptive chemicals.

Keywords: zebrafish: (*Danio rerio*), thyroid, goitrogen, biosensor

Irodalmi áttekintés

A környezetbe kerülő hormonhatású anyagok kémiai szempontból nagy diverzitást mutatnak, így egy környezeti minta kémiai összetétele alapján nem lehet eldönteni, hogy az adott közeg hormonhatású-e. A hatás biztos megállapításához biológiai alapon működő tesztrendszerek szükségesek. Az elmúlt évtizedben számos hormonhatás vizsgálatára alkalmas *in vitro* és *in vivo* tesztrendszert dolgoztak ki. Az *in vivo* tesztrendszerek közül a bioszenzor zebradánió vonalak kiemelkedő fontosságúak. Szerveik és azok működése valamint az egyes folyamatok élettani és molekuláris háttere nagy mértékű hasonlóságot mutat az emlősökével és az emberével. A zebradánió ezért mellett, hogy hatékony modell az ökotoxikológiai vizsgálatokban, segítségével az egyes anyagok vagy minták emberben kialakuló esetleges hatásai is megjósolhatók. A zebradánió embriók áttetszőek, ezért a fluoreszcens fehérjékkel és hormonhatású anyagokra érzékeny promóter régiókkal létrehozott vonalak hatékony bioszenzornak bizonyultak a hormonhatás vizsgálatában (Scholtz és mtsai, 2008).

A pajzsmirigy működése klasszikus neuroendokrin szabályozás alatt áll. A hipotalamusz által termelt tirotróp hormonok hatására tiroid stimuláló hormon (TSH) termelődik, amely a pajzsmirigyben tiroid hormonok (TH) termelődését és szekrécióját idézi elő a pajzsmirigy funkcionális egységeiben, a follikulusokban. A follikulusok a zebradánióban az emlősöktől eltérő módon nem egy jól körülhatárolható szervben, hanem elszórtan helyezkednek el a hasi oldalon, azok szöveti felépítése azonban megegyezik a magasabbrendű gerincesekével. Az aktív tiroid hormonok (tiroxin: T₄, trijódtrionin: T₃) szintén a magasabbrendűektől eltérő módon egy közös prekursorból, a tiroglobulinból (tg) jönnek létre. A hormonszintézis első lépéseként a follikuláris sejtek jódot vesznek fel a nátrium-jodid szimporterén (nis) és a nátriumfüggetlen klór-jód transzporterén (pendrin) keresztül. A bejutott jódot a tireoperoxidáz (tpo) oxidálja, majd két jódzott tirozin összekapcsolódásával T₃ és T₄ jön létre.

Goitrogén anyagok kimutatására Jin és munkatársai a közelmúltban (2012) a pajzsmirigy stimmuláló hormon β alegységével hoztak létre egy transzgenikus zebradánió vonalat (*TSH β :EGFP*), amely hipofízisében zöld fluoreszcens fehérje termelődik. A fluoreszcens jel pajzsmirigyműködést megzavaró anyagok hatására fokozódik, azonban a vonal nem bizonyult elegendően érzékenynek környezeti minták vizsgálatára (Jin és mtsai, 2012).

Munkánk célja goitrogén anyagok kimutatására alkalmas, érzékeny bioszenzor zebradánió vonal(ak) létrehozása volt, amelyhez a pajzsmirigyműködés vagy annak szabályozásában fontos



szerepet betöltő, specifikus expressziót mutató gének közül a tiroglobulin (tg), a nátrium-jodid szimporter (slc5a5) és a tireoperoxidáz (tpo) géneket választottuk.

Anyag és módszer

Felhasznált állatok

A kísérleteket zebradánió (*Danio rerio*) halfaj vad típusú vonalán végeztük.

Embriók kezelése, génkifejeződés vizsgálatok

Az embriókat 0,01; 0,25; 0,5; 0,75 és 1mM metimazollal (MMI) valamint 0,01; 0,25; 0,5; 0,75 és 1 mM kálium-perkloráttal (KClO₄) kezeltük, 48-120 órás korig. Negatív kontrollként izo vizet használtunk, amelynek összetétele megegyezett a haltartó rendszer vizével.

Kezelésként harminc, három független kísérletből származó embrióból trizol módszerrel RNS-t izoláltunk, majd a létrehozott cDNS mintákban kvantitatív valós idejű PCR reakcióval vizsgáltuk a tg, az slc5a5 és a tpo gének kifejeződését, amelyet házztartási gén kifejeződéséhez (gapdh) viszonyítottunk és az eredményeket a PCR reakciók hatékonyságával korrigáltuk. A vizsgálatokat Step-One Plus készülékben végeztük (Applied Biosystems).

A gének kifejeződésének helyét whole mount in situ hibridizációval vizsgáltuk, *Thysse és Thysse* (2008) zebradánió embriókra kidolgozott protokollja szerint. A tg esetén egy 914 bp, az slc5a5 génnél egy 595 bp, a tpo esetén pedig egy 730 bp hosszúságú próbát használtunk.

Transzgén konstrukciók létrehozása, injektálása, tranziens expressziós vizsgálatok

A génkonstrukciók létrehozásához a tpo és az slc5a5 géneket választottuk, amelyek feltételezett promóter régióját (~ 3500 bp) felszorzoztuk. A szakaszokat Gateway technikával donor vektorokba, majd a végső, Tol2 karokat hordozó célvektorba klónoztuk. A célvektor korábbi kísérletek eredményeként már hordozta a fluoreszcens fehérjét kódoló szakaszt (mCherry). A létrehozott konstrukciókat transzpozáz mRNS-sel együtt mikroinjektálással 1-2 sejtes zebradánió embriók szikállományába juttatuk. Az embriókat 1-10 napos (dpf: days post fertilization) korig 1mM KClO₄ és MMI oldatokkal kezeltük. A fluoreszcens jel megjelenését 4, 5, 6 és 10 napos korban vizsgáltuk mCherry szűrő alkalmazásával (LEICA MZ16FA).

Eredmények

A goitrogén anyagokra érzékeny bioszenzor vonal létrehozásához kiválasztott gének kifejeződését a génkonstrukciók megtervezése előtt két módszerrel ellenőriztük kontroll és a tpo és a nis gének működését gátló anyagok teratogén hatást kiváltó koncentrációk alá eső oldataival kezelt zebradánió lárvákban. A funkció gátlását a szervezet az adott gén működésének fokozásával igyekszik kompenzálni. Mind a három vizsgált gén esetében koncentrációfüggő módon nőtt a génkifejeződés mértéke (*I. ábra*), amelyek alapján két gén, az slc5a5 és a tpo tűnt megfelelőnek a konstrukció létrehozásához.

1. ábra: A nátrium-jodid szpormter (slc5a5), a tireoperoxidáz (tpo) és a tiroglobulin gén (tg) kifejeződésének vizsgálata különböző koncentrációjú metimazol és kálium-perklorát hatására.

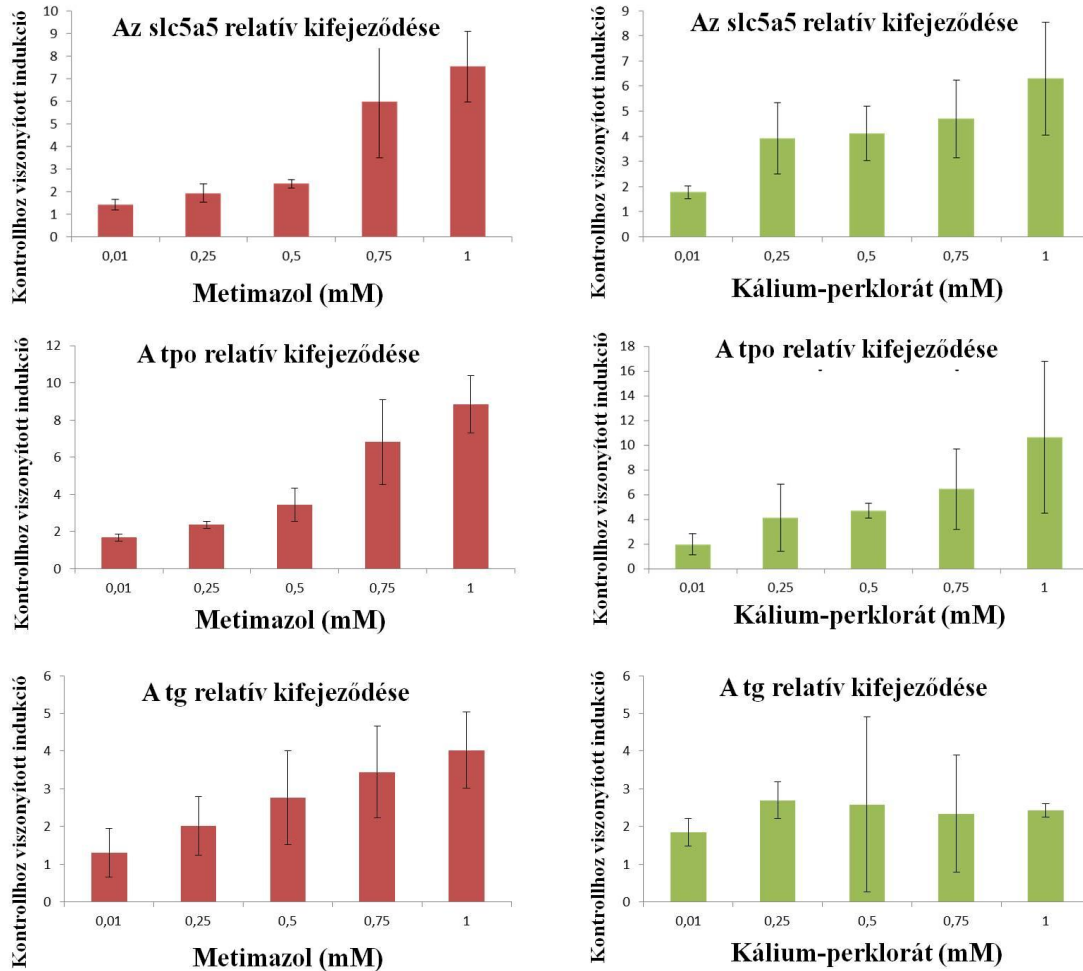


Figure 1. Relative expression of the sodium-iodide symporter (slc5a5), thyreoperoxidase (tpo) and thyroglobuline (tg) following methimazole and potassium perchlorate treatment.

A kiválasztott génjelöltek indukálhatósága mellett a kifejeződés helyét is vizsgálnunk kellett, hogy azt később összevethessük a fluoreszcens jel kifejeződési helyével a génkonstrukciókkal injektált halakban. A whole-mount in situ hibridizáció eredményei alapján megállapítottuk, hogy a három vizsgált gén kifejeződési területe átfed, és kifejeződésük indukálható (2. ábra).

2. ábra: Az slc5a5, tpo és tg gének kifejeződése 5 napos kezeletlen (A) és 1mM kálium-perkloráttal kezelt (B és C) zebradánió embriókban.

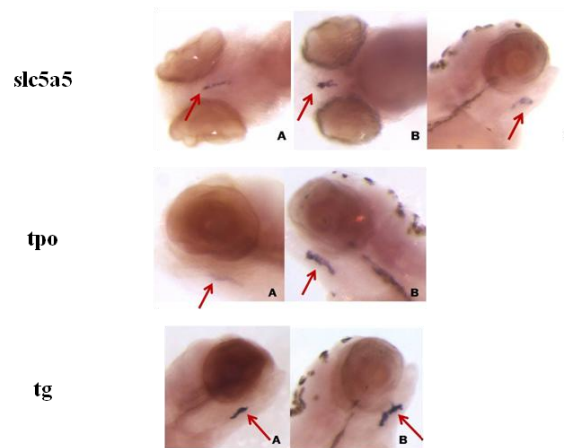


Figure 2. Expression pattern of slc5a5, tpo and tg in 5 dpf (days post fertilization) control (A) and 1mM potassium-perchlorate treated (B and C) zebrafish embryos.

Az eredmények alapján látható volt, hogy a tg alapszintű kifejeződése jóval erősebb és kevésbé indukálható, mint a másik két gén, ezért kevésbé alkalmas a transzgenikus vonal létrehozásához. A génkonstrukciókba a tpo és az slc5a5 gének feltételezett promóter régióját építettük. A konstrukciókat vad típusú zebradánió embriókba injektáltuk, majd a transzgén expresszióját indukáltuk. A tpo esetében csak nagyon gyenge tranzienst jelet figyeltünk meg, az slc5a5 esetén azonban meglehetősen erős tranzienst jelet kaptunk mindhárom anyaggal végzett indukciót követően, azonos területen, a máj fölött. Néhány 4 napos lárvában pajzsmirigy jellegű, pontszerű expressziót is megfigyeltünk.

A máj fölötti expressziót mutató terület azonosítása folyamatban van, de elképzelhető, hogy a szignál a későbbi fejlődési stádiumokban vagy generációkban már nem lesz megfigyelhető.

Köszönetnyilvánítás

A munka Magyar-Német Projektalapú Kutatócserék (DAAD 29836) és Kutató Kari Kiválósági Támogatás– Research Centre of Excellence- 17586-4/2013/TUDPOL pályázatok támogatásával készül.

Irodalomjegyzék

- Ji, C., Jin, X., He, J., Yin, Z. (2012): Use of TSH β :EGFP transgenic zebrafish as a rapid in vivo model for assessing thyroid-disrupting chemicals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 262. 2. 149-155.
- 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.
- Thyssen C., Thyssen B. (2008): High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nature Protocols*, 3. 1. 59-69.