

Diss. ETH N° 20427

Ecotoxicological aspects of multixenobiotic resistance (MXR) in fish

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of
Doctor of Science

Presented by

STEPHAN FISCHER

Diploma in Biochemistry (Martin-Luther-University Halle-Wittenberg)

born on August 12, 1980 in Merseburg
Citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Kristin Schirmer, examiner
Dr. Till Luckenbach, co-examiner
Prof. Dr. Jukka Jokela, co-examiner
Prof. Dr. Susan Cole, co-examiner

Zurich, 2012

Summary

Fish are a crucial part of aquatic ecosystems and represent an important human food source but they may be impacted by the many anthropogenic chemicals released into surface waters through human activities. Fish can, however, be found in polluted waters. Therefore, fish, like other organisms, must possess cellular defense mechanisms to ensure their survival and reproduction. Understanding cellular defense mechanisms is of high (eco)toxicological interest because these mechanisms may explain toxicity thresholds and modes of toxic actions as well as inter-species differences in sensitivity toward chemical exposure. One means of cellular defense are active transport processes, which combat chemical exposure by regulating the chemical's tissue accumulation and excretion.

ATP binding cassette (ABC) multidrug or multixenobiotic resistance (MDR/MXR) transport proteins are an important component of active transport processes. They constitute a cellular defense system that antagonizes the accumulation of a diverse spectrum of endogenous and exogenous compounds in the cell. These toxicologically relevant ABC efflux transporters are well studied in mammals, but comparatively little is known about the presence and function of putative MDR/MXR transporters in fish. It is of great importance to understand such active cellular processes in fish in the context of (eco)toxicology because of their likely influence on a chemical's transport, fate and effect. Thus knowledge on MXR is required to correctly assess the distribution and the toxic potentials of chemicals.

The overall goal of this work was to study components and functional characteristics of the MXR system in fish using two important model systems: zebrafish (*Danio rerio*) embryos (Chapter 2 and 3) and permanent rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cell lines (Chapter 4 and 5). The zebrafish embryo represents a complex organism with different compartments and multiple cell types, therefore offering the possibility to study the presence and functions of the fish MXR system on the organism level. In contrast, permanent rainbow trout cell lines are homogenous cell populations and may be useful to study MXR mechanisms on a clearly defined population of ABC transporters without systemic interferences.

To determine the presence of putative ABC efflux transporters in zebrafish embryos, mRNA expression levels were determined and protein activity analyses were performed. Previously predicted zebrafish ABC transporter cDNA sequences, *abcb4*, *abcb5*, *abcc1*, *abcc3* and *abcc6a*, were verified by cDNA cloning. Interestingly, synteny analyses indicated that zebrafish do not contain a *abcb1* ortholog. Sequence identity, phylogenetic and topology analyses were used to confirm the identities of all cloned cDNA sequences.

Using quantitative polymerase chain reaction (qPCR) method, constitutive mRNA expression levels of all examined ABC transporters from the *abcb*, *abcc* and *abcg* subfamilies were found to be present during the first 48 h of zebrafish development, indicating a high complexity of the transporter system in early life stages. Transcript levels were dependent on the zebrafish embryo stage and differed substantially between transporter sub-types. ABC transporter protein efflux activities were determined by measuring uptake of transporter type specific fluorescent substrates in the presence of specific pharmacologic transporter inhibitors. Fluorescent dye uptake assays indicated a dominant ABCB1-like and barely detectable ABCC-like efflux activity in zebrafish embryos.

Functions of putative ABC efflux proteins as MXR transporters were investigated by morpholino knock-down of *Abcb4*, *Abcb5* and *Abcc2* in zebrafish embryos. Only knock-down of *Abcb4* resulted in an enhanced uptake of fluorescent substrates and enhanced sensitivity of the fish embryos to toxicants. Moreover, the ATPase activity of recombinant zebrafish *Abcb4* was stimulated by the test compounds. These results suggest that zebrafish *Abcb4* recognizes these compounds as substrates and mediates their efflux from the zebrafish embryo. In contrast to the *Abcb4* and *Abcb5*, the morpholino knock-down of *Abcc2* resulted in severe developmental effects, indicating that at least this particular *Abcc* transporter may be important for a normal development of the embryos.

The presence and activity of putative ABC efflux transporters was further explored in seven permanent rainbow trout cell lines derived from liver (RTL-W1; R1) and liver hepatoma (RTH-149), gill (RTgill-W1), gonad (RTG-2), gut (RTgutGC) and brain (RTbrain). Potential cDNA sequences of yet unidentified MXR transporters were obtained by sequencing of products from reverse transcription-PCR (RT-PCR) and rapid amplification of cDNA ends (RACE). So far, unknown full length and partial ABC transporter cDNA sequences of *abcb1b*, *abcc1*, *abcc3*, *abcc4* and *abcc5* were obtained and further analyzed. Quantification of rainbow trout ABC transporter transcripts revealed that mRNA of all examined ABC transporter genes was constitutively expressed with similar high *abcc* and low *abcb* or *abcg2* mRNA abundances in all investigated cell lines. Analyses of ABC transporter efflux activities, using fluorescent dye uptake assays, showed similar activity profiles in all seven cell lines with predominant *Abcc*-like efflux activity and low *Abcb1*-, *Abcg2*- and *Abcb11*-like activities. These results indicated that the cellular “background” efflux activities are determined by factors of cell cultivation. Thus, cell culture medium additives likely act as transporter substrates and therefore induce expression and activity.

Overall, this dissertation shows that potentially MXR relevant ABC efflux transporters are constitutively expressed and active in two major (eco)toxicological models, rainbow trout cell lines and zebrafish embryos. The main outcomes and implications of this work are:

1. Zebrafish *Abcb4* efflux activity causes a "multidrug resistance" like phenomenon in zebrafish embryos and therefore determines sensitivity of zebrafish embryos to toxicants by effluxing them out of the embryo. This means that *Abcb4* also is a sensitive target for so called "chemosensitizers", i.e., chemicals capable of blocking activity of this protein. Blocking of *Abcb4* efflux activity would lead to an increased accumulation of toxic compounds and thus increased toxicity towards the embryo. Therefore, the *Abcb4* protein activity should be considered when zebrafish embryos are used for toxicity and bioaccumulation assessments of chemicals.
2. As demonstrated at least for *Abcc2*, *Abcc* transporters may have important functions in the teleost embryo development and only a minor role in conferring MXR to zebrafish embryos.
3. *Abcb*, *Abcc* and *Abcg* transporter expression and activity patterns in rainbow trout cell lines are irrespective of their tissue of origin but appear to be determined by factors of cell cultivation. Specifically, the comparatively high activity of *Abcc* transporters appears to be a general phenomenon of cell lines. This cellular "background" efflux activity may influence the processes of uptake, retention and extrusion of physiological and potentially xenobiotic compounds and their metabolites, and therefore is an important consideration in toxicological experiments.
4. The little differentiated transporter transcription and activity pattern in the rainbow trout cell lines means that individual transporters cannot be studied in the native cell lines. However, given the apparent responsiveness of the cells to the surrounding medium, the cell lines comprise a valuable experimental system to develop lines overexpressing certain MXR transporter types.

Zusammenfassung

Fische sind ein wichtiger Bestandteil aquatischer Ökosysteme und stellen eine bedeutende menschliche Nahrungsquelle dar. Allerdings können sie durch den Einfluss zahlreicher anthropogener Chemikalien, welche durch menschliche Aktivitäten in Oberflächengewässer gelangen, beeinträchtigt werden. Trotzdem findet man Fische auch in belasteten Gewässern. Dementsprechend müssen Fische, wie auch andere Organismen, verschiedene zelluläre Abwehrmechanismen besitzen, um ihr Überleben und ihre Reproduktion zu gewährleisten. Das Verstehen dieser Abwehrmechanismen ist von hoher (öko)toxikologischer Bedeutung, da sie möglicherweise sowohl Toxizitätsschwellen und Wirkmechanismen als auch Artenunterschiede hinsichtlich der Sensitivität gegenüber Chemikalien erklären. Eine Möglichkeit der zellulären Abwehr stellen aktive Transportmechanismen dar, welche Chemikalienexpositionen entgegenwirken, indem sie die Gewebe Anreicherung und Ausscheidung der Chemikalien aus Geweben regulieren.

ATP binding cassette (ABC) -multidrug oder -multixenobiotic resistance (MDR/MXR) -Transportproteine sind ein bedeutender Bestandteil aktiver Transportprozesse. Sie bilden ein zelluläres Abwehrsystem, welches der Akkumulation einer großen Bandbreite von endogenen und exogenen Substanzen entgegenwirkt. Diese toxikologisch relevanten ABC-Efflux-Transporter sind in Säugetieren gut untersucht. Über die Präsenz und Funktion mutmaßlicher MDR/MXR Transporter in Fischen und deren Embryonen ist hingegen vergleichsweise wenig bekannt. Es ist von grosser Bedeutung diese aktiven zellulären Prozesse in Fischen im Kontext der Ökotoxikologie zu verstehen, da sie möglicherweise Transport, Schicksal und Effekt von Chemikalien beeinflussen. Deshalb sind Kenntnisse über MXR erforderlich, um die Verteilung und das toxische Potential von Chemikalien richtig beurteilen zu können.

Das übergreifende Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung von Komponenten und funktionellen Charakteristiken des MXR-Systems in Fischen unter Verwendung zweier bedeutender Modellsysteme: Embryonen des Zebraärbblings (*Danio rerio*) (Kapitel 2 und 3) und permanente Zelllinien der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) (Kapitel 4 und 5). Embryonen des Zebraärbblings repräsentieren einen komplexen Organismus mit verschiedenen Kompartimenten und multiplen Zelltypen. Sie bieten daher die Möglichkeit, die Präsenz und Funktion des Fisch-MXR-Systems auf Organismenebene zu untersuchen. Im Gegensatz dazu bilden permanente Zelllinien der Regenbogenforelle homogene Zellpopulationen und könnten dazu verwendet werden, MXR-Mechanismen an einer klar definierten Population von ABC-Transportern ohne systemische Interferenzen zu bestimmen.

Für den Nachweis der Anwesenheit mutmaßlicher ABC Effluxtransporter im Zebraärbblingsembryo wurden mRNA-Expressions- und Proteinaktivitätsanalysen

durchgeführt. Zuvor vorhergesagte Zebrabärblings ABC-Transporter cDNA-Sequenzen von *abcb4*, *abcb5*, *abcc1*, *abcc3* und *abcc6a* wurden mit Hilfe von cDNA-Klonierung verifiziert. Interessanterweise wiesen Syntenyanalysen auf die Abwesenheit von *abcb1*-Orthologes im Zebrabärbling hin. Sequenzidentitäts-, phylogenetische und topologische Analysen wurden angewandt, um die Identitäten aller geklonten cDNA-Sequenzen zu bestätigen.

Unter Verwendung von quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) wurde eine konstitutive mRNA-Expression aller untersuchten ABC-Transporter der *abcb*-, *abcc*- und *abcg*- Unterfamilien während der ersten 48 h der Zebrabärblingsentwicklung gefunden, was auf eine hohe Komplexität des Transportersystems in frühen Lebensstadien hinweist. Transkript-Abundanzen waren abhängig vom Stadium des Zebrabärblingsembryos und schwankten sehr zwischen Transporter-Untertypen. Die Efflux-Aktivitäten der ABC Transportproteine wurden durch Messung der Aufnahme von Transportertyp-spezifischen fluoreszierenden Farbstoffen in Anwesenheit spezieller pharmakologischer Transporter-Aktivitätsinhibitoren bestimmt. Die Ergebnisse dieser Fluoreszenzfarbstoff-Aufnahmeanalysen deuteten auf eine dominante ABCB1-ähnliche, und eine geringe ABCC-ähnliche Efflux-Aktivität in Zebrabärblingsembryonen hin.

Die Funktion mutmaßlicher ABC-Efflux-Proteine als MXR-Transporter wurde mittels Morpholino *knock-down* von *Abcb4*, *Abcb5* und *Abcc2* in Zebrabärblingsembryonen untersucht. Einzig der *knock-down* von *Abcb4* führte zu erhöhter Aufnahme fluoreszierender Substrate und gesteigerter toxischer Sensitivität der Fischembryonen gegenüber den toxischen Substraten. Desweiteren wurde die ATPase-Aktivität von rekombinantem *Abcb4* durch die Testsubstanzen stimuliert. Diese Ergebnisse zeigen, dass Zebrabärblings-*Abcb4* diese Substanzen als Substrate erkennt und deren Efflux aus dem Embryo vermittelt. Im Gegensatz zu den *Abcb4*- und *Abcb5*-Morpholino *knock-downs*, zeigte der *Abcc2-knock-down* verschiedene Effekte auf die Entwicklung. Dies deutet darauf hin, dass zumindest dieser *Abcc*-Transporter bedeutend für die Aufrechterhaltung der physiologischen Homöostase des Embryos sein könnte.

Ferner wurde die Präsenz und Aktivität mutmaßlicher ABC-Efflux-Transporter in sieben permanenten Zelllinien der Regenbogenforelle erforscht, welche aus Leber (RTL-W1; R1) und Leber-Hepatom (RTH-149), Kiemen (RTgill-W1), Gonaden (RTG-2), Darm (RTgutGC) und Gehirn (RTbrain) hervorgegangen waren. Potentielle cDNA-Sequenzen von bisher nicht identifizierten MXR-Transportern wurden mittels Sequenzierung der Produkte von Reverser-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) und *rapid amplification of cDNA ends* (RACE-PCR) ermittelt. Bislang unbekannte, vollständige und partielle ABC-

Transporter cDNA-Sequenzen von *abcb1b*, *abcc1*, *abcc3*, *abcc4* und *abcc5* wurden erhalten und weiter analysiert. Die Quantifizierung von ABC-Transportertranskripten der Regenbogenforelle zeigte, dass mRNA aller untersuchten ABC-Transportergene in allen untersuchten Zelllinien konstitutiv und mit vergleichbar hoher *abcc* und niedriger *abcb* oder *abcg2*-mRNA-Abundanzen, exprimiert war. Analysen der ABC-Transporter Efflux-Aktivität, unter Verwendung Fluoreszenzfarbstoff-Aufnahmeanalysen, offenbarten vergleichbare Aktivitätsprofile in allen sieben Zelllinien mit vorherrschender *Abcc*-ähnlicher Efflux-Aktivität und niedriger *Abcb1*-, *Abcg2*- und *Abcb11*-ähnlicher Aktivität. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass diese zelluläre „Hintergrund“-Efflux-Aktivität durch Faktoren der Zellkultivierung reguliert wird. Additive von Zellkulturmedien wirken wahrscheinlich als Transportersubstrate und induzieren deren Expression.

Insgesamt zeigt diese Dissertation, dass potentielle MXR-relevante ABC-Efflux-Transporter in zwei bedeutenden (öko)toxikologischen Modellen, Zebrafischembryonen und Zelllinien der Regenbogenforelle, konstitutiv exprimiert und aktiv sind. Die wichtigsten Resultate und Schlussfolgerungen dieser Arbeit können wie folgt zusammengefasst werden:

1. Diese *Abcb4*-Efflux-Aktivität bewirkt ein „multidrug resistance“-ähnliches Phänomen in Embryonen des Zebrafischs und bestimmt so die Sensitivität von Zebrafischembryonen gegenüber toxischen Substanzen, indem diese aus dem Embryo ausgeschieden werden. Dies bedeutet wiederum, dass *Abcb4* auch ein sensibles Angriffsziel für sogenannte „Chemosensitizer“ darstellt, also Chemikalien, welche imstande sind die Aktivität dieses Proteins zu blockieren. Eine Beeinträchtigung der *Abcb4* Efflux-Aktivität würde zu erhöhter Akkumulation toxischer Substanzen und daraus folgender erhöhter Toxizität im Embryo führen. Daher sollte die *Abcb4*-Proteinaktivität berücksichtigt werden, wenn Zebrafischembryonen für Toxizitäts- und Bioakkumulationsbewertungen von Chemikalien verwendet werden.
2. Wie zumindest für *Abcc2* demonstriert wurde, könnten *Abcc*-Transporter eine entscheidende Funktion in der Embryonalentwicklung von Knochenfischen spielen und haben wahrscheinlich nur eine untergeordnete Rolle in der Vermittlung von MXR in Zebrafischembryonen.
3. Die Expressions- und Aktivitätsmuster von *Abcb*-, *Abcc*- und *Abcg*-Transportern in Zelllinien der Regenbogenforelle sind unabhängig von Gewebeherkunft und vielmehr durch Faktoren der Zellkultivierung bestimmt. Insbesondere die vergleichsweise hohe Aktivität von *Abcc*-Transportern scheint ein generelles Phänomen in den Zelllinien

darzustellen. Diese zelluläre „Hintergrund“-Efflux-Aktivität könnte die Dynamik von Aufnahme, Retention und Abgabe von physiologischen und potentiell von xenobiotischen Substanzen und deren Metaboliten beeinflussen und sollte daher besondere Berücksichtigung bei der Durchführung toxikologischer Experimente finden.

4. Durch die gering differenzierte Transporter-Transkription und Aktivität in den Zelllinien der Regenbogenforelle ist es nicht möglich, individuelle Transporter in den nativen Zelllinien zu untersuchen. Wenn man allerdings die Reaktionsfähigkeit der Zellen gegenüber ihrem umgebenden Medium bedenkt, stellen die Zelllinien ein wertvolles experimentelles System für die Überexprimierung bestimmter MXR-Transportertypen dar.