

Abwehrgene als Schadstoffindikatoren

Von der Grundlagenforschung zur Anwendung

Durch Belastung mit bestimmten Schadstoffen werden in Zellen von Pflanzen und Tieren verschiedene giftige Sauerstoffderivate gebildet, darunter so genannter Singulett-Sauerstoff. Glücklicherweise besitzen die Zellen meist sehr spezifische molekulare Abwehrmechanismen, die ihnen helfen, mit dieser Gefahr umzugehen. An der EAWAG wird derzeit genauer untersucht, wie sich die einzellige Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* bei Anwesenheit von Singulett-Sauerstoff verhält. Langfristiges Ziel ist es, einen Biosensor zum Nachweis von Singulett-Sauerstoff zu entwickeln und damit indirekt auf die Schadstoffbelastung schliessen zu können.

Molekularer Sauerstoff ist die Grundlage allen höheren Lebens, denn durch die Atmung gewinnen Pflanzen und Tiere die für das Wachstum und den Zellstoffwechsel nötige Energie. Sauerstoff kann aber auch lebensbedrohend sein, dann nämlich, wenn in den Zellen so genannte reaktive Sauerstoffspezies (Kasten und Abb. 1) entstehen, die stark oxidierend wirken [1]. Gelingt es der Zelle nicht, diesen oxidativen Stress abzuwehren, werden lebenswichtige Zellbestandteile wie Lipide, Proteine oder die DNA geschädigt und die Zelle stirbt ab. Beschleunigt wird die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies unter anderem dann, wenn Organismen mit Schwermetallen oder bestimmten organischen Schadstoffen, wie z.B. Herbizide und halogenierte Substanzen, in Kontakt kommen. Dieser Schadstoffeffekt kann zusätzlich verstärkt werden, wenn die Sonneneinstrahlung besonders intensiv ist. Meist haben die Zellen jedoch spezielle Abwehrstrategien gegen die reaktiven Sauerstoffspezies entwickelt [2].

Molekulare Abwehrszenarien

Vereinfacht beschrieben, läuft eine molekulare Abwehrreaktion nach folgendem Schema ab [3]: Die Zelle besitzt Sensoren, mit der sie eine Stresssituation, z.B. die intrazelluläre Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, wahrnehmen kann. Daraufhin werden so genannte Stressgene aktiviert und vom Transkriptionsapparat abgelesen, wobei je nach Aktivierungsstärke mehr oder weniger viele Genkopien (messenger RNA = Boten-

RNA = mRNA) entstehen. Schliesslich kommt es zur Synthese der entsprechenden Stressproteine. Sie haben entweder die Aufgabe, die Stressursache direkt zu entfernen – also im Fall der reaktiven Sauerstoffspezies, diese in unschädliche Sauerstoffspezies umzuwandeln – oder die durch den Stress bereits geschädigten Zellkomponenten zu reparieren. Dabei werden einerseits, unabhängig von der Stressursache, allgemeine Stressproteine gebildet, andererseits aber auch sehr spezifische Stressproteine synthetisiert, die gezielt, schnell und effizient einzelne Stressfaktoren abwehren können [4]. Die genetischen Aktivierungsmuster geben daher oft Aufschluss über die Art und die Stärke eines in der Zelle herrschenden Stresses. Heute wird die Expression (Aktivierungsstärke) spezifischer Gene bereits erfolgreich in biologischen Sensoren zur Bestimmung und Quantifizierung von Schadstoffen in der

Reaktive Sauerstoffspezies

Molekularer, natürlich vorkommender Sauerstoff ist aufgrund seiner Elektronenkonstellation reaktionsträge und daher für Lebewesen unschädlich. Er kann jedoch physikalisch durch Energieübertragung oder chemisch durch Elektronentransfer aktiviert werden. Solche angeregten Sauerstoffmoleküle werden als reaktive Sauerstoffspezies bezeichnet, sie sind sehr reaktionsfreudig. Ihre Bildung kann in aeroben Organismen schon unter normalen physiologischen Bedingungen stattfinden. Durch Transfer von Elektronen, z.B. aus der Atmungskette in den Mitochondrien, entstehen Superoxidradikale, Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikale (Abb. 1) [1]. Wird dagegen Energie, beispielsweise Sonnenenergie, auf molekularen Sauerstoff übertragen, entsteht so genannter Singulett-Sauerstoff (Abb. 1). Singulett-Sauerstoff unterscheidet sich chemisch nicht von molekularem Sauerstoff, sondern nur durch seine veränderte Elektronenkonstellation; er reagiert rasch mit zellulären Bestandteilen und bildet organische Hydroperoxide. Vor allem die ungesättigten Fettsäuren in Membranen reagieren sehr schnell mit Singulett-Sauerstoff, was zur Bildung von Lipidperoxiden und einer Schädigung der Membran führen kann. Eine effiziente und spezifische Abwehr gegen Singulett-Sauerstoff und dadurch verursachte Schäden ist daher äusserst wichtig für alle Organismen.

Umwelt eingesetzt, wie beispielsweise bei dem an der EAWAG entwickelten Arsenbiosensor (siehe Artikel von J.R. van der Meer, S. 12). Ziel des hier beschriebenen Projektes ist die Entwicklung eines entsprechen-

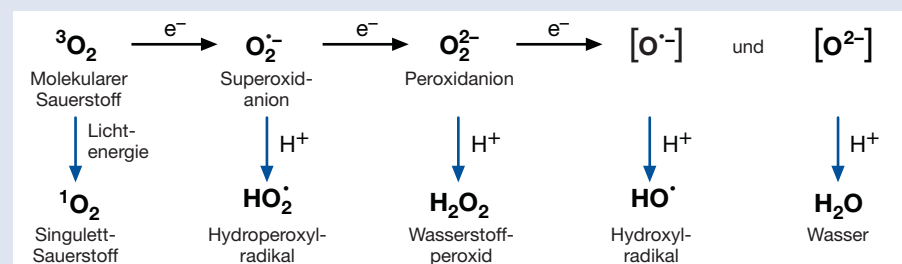


Abb. 1: Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies aus molekularem Sauerstoff durch unvollständige Reduktion oder Übertragung von Lichtenergie. Die in Klammern abgebildeten Sauerstoffspezies sind nicht stabil und gehen sofort über in ihre protonierten Formen.

Zellulärer Stress	Schadstoff	Induktionsfaktor
Wasserstoffperoxid	H ₂ O ₂ (2 mM)	2,8
Superoxidanion	Menadion (5 µM)	6,4
Organische Hydroperoxide	Tert-Butylhydroperoxid (0,1 mM)	4,7
Singulett-Sauerstoff	Bengalrosa im Licht (5 µM)	78,9
Bengalrosa (Kontrolle)	Bengalrosa im Dunkeln (5 µM)	3,1
Inhibition der Photosynthese	DBMIB (Herbizid) (1 µM)	9,5
Hitzeschock	25 °C → 40 °C Wechsel	1,3
Salz/osmotischer Stress	NaCl (200 mM)	1,5

Tab. 1: Aktivierung des *Gpxh*-Gens in *Chlamydomonas* unter verschiedenen Stressbedingungen. 60 Minuten lang wurden *Chlamydomonas*-Kulturen verschiedenen Stressfaktoren ausgesetzt. Induktionsfaktor = *Gpxh*-Expression in der gestressten Kultur dividiert durch *Gpxh*-Expression in der Kontrollkultur. Als Mass für die *Gpxh*-Expression wurde die durch den Transkriptionsapparat gebildete Menge an mRNA bestimmt.

den Biosensors zum Nachweis von Schadstoffen im Wasser, welche in den Zellen die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies auslösen. Da noch sehr wenig über die Abwehrmechanismen gegen Singulett-Sauerstoff (Kasten und Abb. 1) bekannt ist, konzentrieren wir uns auf diese reaktive Sauerstoffspezies.

DNA-Chips liefern erste Hinweise

Photosynthetische Organismen leiden in besonderen Mass unter oxidativem Stress [2], denn der photosynthetische Apparat ist eine wichtige Quelle von reaktiven Sauerstoffspezies. Aus diesem Grund haben wir für unsere Studien einen photosynthetisierenden Modellorganismus ausgewählt, nämlich die einzellige, begeißelte Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*. Diese Grünalge weist den gleichen zellulären Aufbau wie höhere Algen und Pflanzen auf, ist einfach zu kultivieren und gut für die Anwendung molekularer Methoden zugänglich [5]. Ein besonderer Vorteil ist überdies, dass seit kurzem DNA-Chips mit der genetischen Information von *C. reinhardtii* erhältlich sind. Mit Hilfe von DNA-Chips ist es möglich, die Expressionsmuster eines Grossteils der

Gene eines Organismus zu untersuchen [3, 6] und somit wie in unserem Fall noch unbekannte, spezifische Abwehrgene aufzuspüren.

Auf den von uns verwendeten DNA-Chips waren insgesamt 2792 Gene von *C. reinhardtii* fixiert. Um spezifische, gegen Singulett-Sauerstoff gerichtete Abwehrgene von unspezifischen Genen gegen oxidativen Stress zu unterscheiden, wurden die Experimente mit DNA-Chips entweder mit Singulett-Sauerstoff oder mit H₂O₂, einer weit verbreiteten reaktiven Sauerstoffspezies, durchgeführt. Ein Vergleich der beiden Expressionsmuster ergab deutliche Unterschiede, es konnten einige Gene gefunden werden, die durch Singulett-Sauerstoff, nicht aber durch H₂O₂ aktiviert werden (siehe Abbildung eines DNA-Chips auf der Titelseite: jeder Punkt entspricht einem *Chlamydomonas*-Gen; induzierte Gene sind rot, reprimierte Gene grün und Gene mit unveränderter Expression gelb eingefärbt).

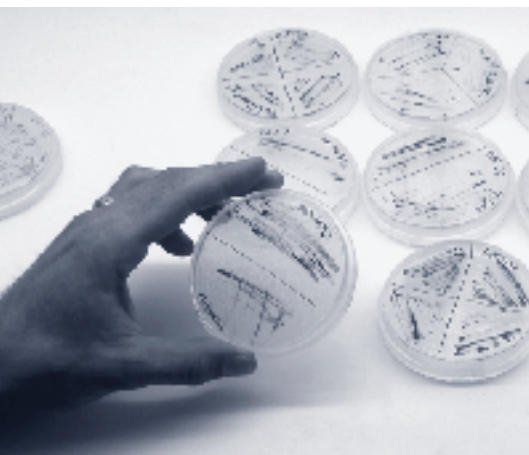
Spezifische Induktion durch Singulett-Sauerstoff

Die am stärksten und spezifischsten durch Singulett-Sauerstoff induzierten Gene wurden weiter auf ihre mögliche Expression

und Funktion in anderen Stresssituationen untersucht. Dabei stellte sich ein Gen als besonders interessant heraus: Es handelt sich um ein Glutathion-Peroxidase-homologes Gen (*Gpxh*), dessen verwandte Gene in anderen Organismen am Abbau von organischen Hydroperoxiden beteiligt sind [7]. Obwohl das *Gpxh*-Gen auch durch andere reaktive Sauerstoffspezies induziert wird, ist die Expression bei Stress durch Singulett-Sauerstoff am stärksten (Tab. 1) [8]. Dies deutet darauf hin, dass Singulett-Sauerstoff in *Chlamydomonas* durch einen spezifischen Rezeptor wahrgenommen wird und es in der Folge zur gezielten Aktivierung spezifischer Abwehrgene gegen Singulett-Sauerstoff kommt.

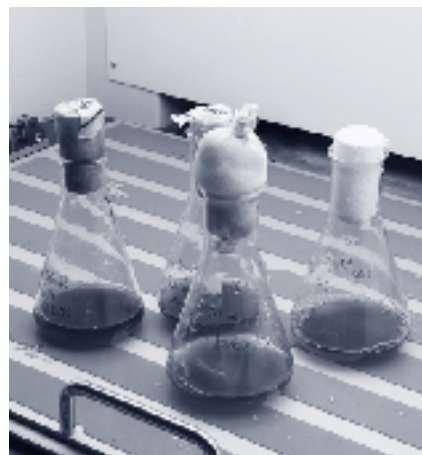
Der *Gpxh*-Promoter unter der Lupe

Um eine klarere Vorstellung vom Induktionsmechanismus des *Gpxh*-Gens zu erhalten, nehmen wir derzeit die Promotorregion dieses Gens genauer unter die Lupe. Der Promotor ist der DNA-Abschnitt vor der eigentlichen kodierenden Sequenz, der die Expression des jeweiligen Gens kontrolliert. Er enthält spezielle Regulationselemente, an die so genannte Transkriptionsfaktoren

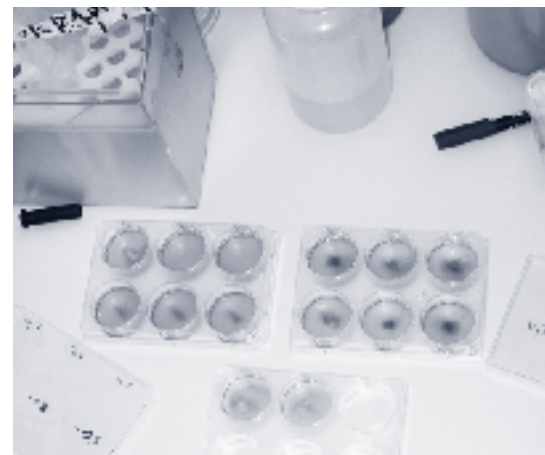


Fotos: M. Bauchrowitz, EAWAG

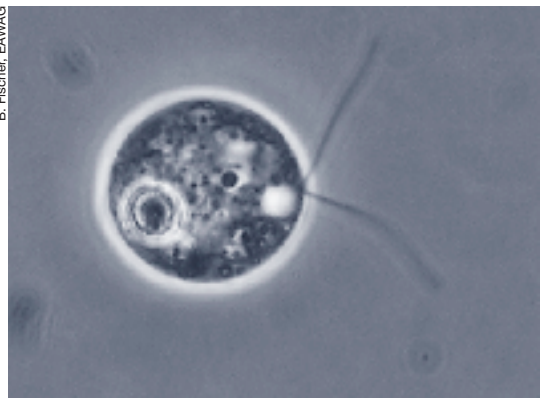
Kultivierung von *Chlamydomonas* auf festem Nährmedium in Petrischalen ...



... oder in flüssigem Nährmedium bei konstanten Temperatur- und Lichtbedingungen.



Für die Induktionsexperimente werden die Algenzellen auf Zellkulturplatten überführt.



Die zweigeisslige Alge *Chlamydomonas reinhardtii* unter dem Mikroskop (100fache Vergrößerung).

binden können, was eine Aktivierung des Gens zur Folge hat. Diese Regulationselemente besitzen eine genaue Basenabfolge, die nur durch den dazugehörigen Transkriptionsfaktor erkannt werden (Abb. 2). Auch in der *Gpxh*-Promotorregion wurde durch Sequenzvergleich mit anderen Genen ein solches Regulationselement gefunden. Einen ersten Hinweis darauf, dass dieses Element eine wichtige Rolle bei der Induktion durch Singulett-Sauerstoff spielt, erhielten wir durch ein Experiment, bei dem wir das *Gpxh*-Regulationselement aus der Promoterregion entfernten. Das so veränderte Gen war anschliessend nicht mehr durch Singulett-Sauerstoff aktivierbar [8]. In einem zweiten Schritt wollten wir herausfinden, was passiert, wenn das *Gpxh*-Regulationselement in die Promotorregion eines anderen Gens eingebaut wird, welches normalerweise nicht durch Singulett-Sauerstoff induziert wird. Zu diesem Zweck wurde das β -Tubulingen von *Chlamydomonas* verwendet; es kodiert für das Strukturprotein Tubulin, das in der Geissel vieler Mikroalgen und auch bei *Chlamydomonas* vorkommt. Und

tatsächlich war das transgene β -Tubulingen, in dessen Promotorregion wir das *Gpxh*-Regulationselement eingeschleust hatten, schwach durch Singulett-Sauerstoff induzierbar. Diese beiden Experimente deuten auf eine tragende Rolle des *Gpxh*-Regulationselement in der Genaktivierung durch Singulett-Sauerstoff hin. Obwohl das Element starke Homologie zu zwei bekannten und gut charakterisierten Elementen in Säugern aufweist, konnte es trotz intensiver Analyse noch nicht eindeutig einem dieser beiden Elemente zugeordnet werden. Möglicherweise sind die Sequenzelemente zwischen Säugern und Algen nicht vollständig konserviert oder es handelt sich beim *Gpxh*-Regulationselement um ein neues, bisher unbekanntes Regulationselement. Erst wenn der entsprechende Transkriptionsfaktor isoliert und charakterisiert ist, kann diese Frage eindeutig beantwortet werden. Weitere Forschung ist auch nötig, um sorgfältiger abzuklären, ob in *Chlamydomonas* ein spezifischer Mechanismus für die Induktion von *Gpxh* durch Singulett-Sauerstoff

existiert. Ist dies der Fall, könnte das *Gpxh*-Regulationselement als Bestandteil eines molekularen Schadstoffindikators zur Anwendung kommen. Mit einem solchen Biosensor wäre es möglich diejenigen Schadstoffe nachzuweisen, die in der Zelle die Bildung von Singulett-Sauerstoff auslösen.



Beat Fischer, Molekularbiologe und Doktorand in der Abteilung «Umwelt-Mikrobiologie und molekulare Ökotoxikologie»

Koautor: Rik Eggen

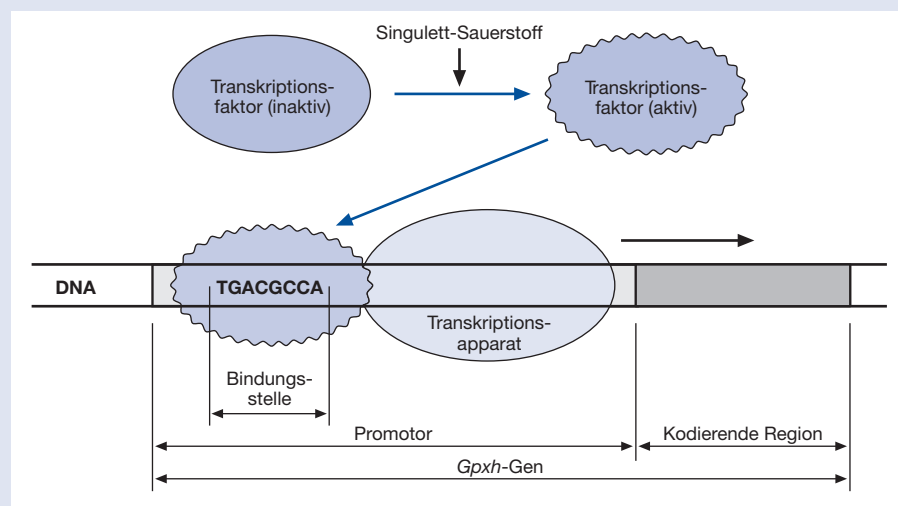


Abb. 2: Hypothetischer Aktivierungsweg des *Gpxh*-Gens durch Singulett-Sauerstoff. Bei Anwesenheit von Singulett-Sauerstoff in der Zelle geht die inaktive Form des Transkriptionsfaktors über in die aktive Form und bindet an das *Gpxh*-Regulationselement. Erst dann kann sich der Transkriptionsapparat anlagern und das *Gpxh*-Gen ablesen.

[1] Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1999): Free radicals in biology and medicine. Oxford science publications, 3rd edition. Clarendon Press, Oxford, New York, 968 p.

[2] Mendez-Alvarez S., Leisinger U., Eggen R.I.L. (1999): Adaptive responses in *Chlamydomonas reinhardtii*. International Microbiology 2, 15–22.

[3] Eggen R.I.L. (2001): Biologische Tracer in der Ökotoxikologie. EAWG news 52, 8–9.

[4] Gille G., Sigler K. (1995): Oxidative stress and living cells. Folia Microbiologica 40, 131–52.

[5] Rochaix J.-D., Michel G.-C., Sabeeha M. (1998): The molecular biology of chloroplasts and mitochondria in *Chlamydomonas*. Advances in photosynthesis, Vol. 7. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 760 p.

[6] Rockett J.C., Dix D.J. (2000): DNA arrays: technology, options and toxicological applications. Xenobiotica 30, 155–177.

[7] Leisinger U., Rüfenacht K., Zehnder A.J.B., Eggen R.I.L. (1999): Structure of a glutathione peroxidase homologous gene involved in the oxidative stress response in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Science 149, 139–149.

[8] Leisinger U., Rüfenacht K., Fischer B., Pesaro M., Spengler A., Zehnder A.J.B., Eggen R.I.L. (2001): The glutathione peroxidase homologous gene from *Chlamydomonas reinhardtii* is transcriptionally up-regulated by singlet oxygen. Plant Molecular Biology 46, 395–408.