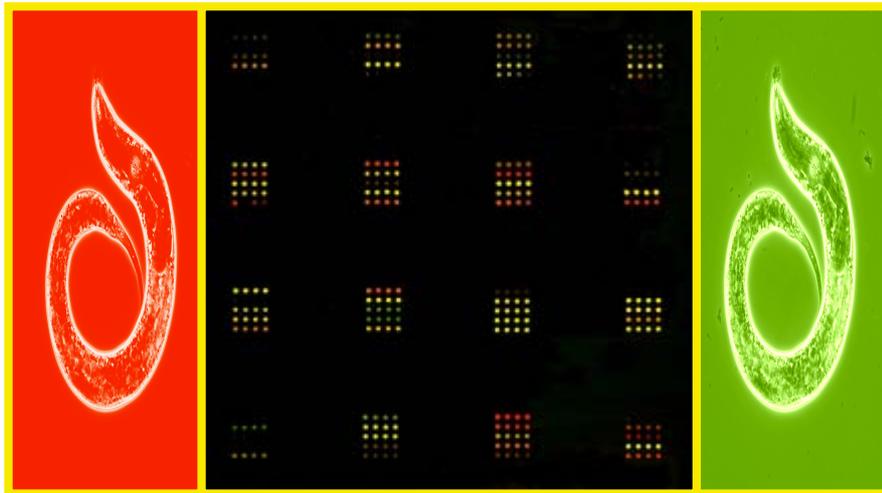


## Der CELEGANS TOXCHIP:

# Entwicklung und Validierung eines Biomonitor-Tests auf Grundlage der schadstoffinduzierbaren Genexpression von *Caenorhabditis elegans*



Inaugural Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde des Fachbereichs Biologie, Chemie, Pharmazie

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Kerstin Reichert**

Berlin 2004

1. Gutachter: Prof. Dr. RUDOLF K. ACHAZI

2. Gutachter: Prof. Dr. MONIKA HILKER

Datum der Disputation: 24.05.2004

Diese Arbeit wurde durch das Umweltbundesamt gefördert:

Förderkennzeichen (UFOPLAN) **201 67 428**

## INHALT

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Anhangsverzeichnis</b>  | <b>3</b>  |
| <b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b>   | <b>4</b>  |
| <b>Abkürzungsverzeichnis</b>   | <b>6</b>  |
| <b>1. EINLEITUNG</b>   | <b>8</b>  |
| <b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>  | <b>21</b> |
| <b>2.1. Nematoden</b>  | <b>21</b> |
| 2.1.1. Stammkonserven  | 21        |
| 2.1.2. Vorkultur auf Agar-Platten  | 21        |
| 2.1.3. Synchron-Flüssigkultur und Ernte der Kulturen   | 22        |
| <b>2.2. Bakterien</b>  | <b>24</b> |
| <b>2.3. Xenobiotika</b>  | <b>25</b> |
| <b>2.4. Gesamtgenomischer DNA-Microarray von <i>C. elegans</i></b>   | <b>28</b> |
| 2.4.1. RNA-Präparation   | 28        |
| 2.4.2. mRNA-Präparation  | 30        |
| 2.4.3. Bestimmung der RNA- und mRNA-Konzentration  | 31        |
| 2.4.4. Reverse Transkription und Hybridisierung  | 32        |
| 2.4.5. Datengewinnung und Auswertung   | 35        |
| <b>2.5. Celegans Toxchip</b>   | <b>35</b> |
| 2.5.1. Die Gene des Celegans Toxchips  | 36        |
| 2.5.1.1. Genselektion und Auswahl von Kontrollen für den Celegans Toxchip  | 36        |
| 2.5.1.2. Genamplifikation  | 37        |
| 2.5.1.3. Primerdesign  | 37        |
| 2.5.1.4. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)  | 38        |
| 2.5.1.5. Gelelektrophorese   | 40        |
| 2.5.1.6. Klonierung  | 41        |
| 2.5.1.7. Testspaltung  | 44        |
| 2.5.1.8. Reinigung der Genfragmente  | 45        |
| 2.5.1.9. Konzentrationsbestimmung der Genfragmente   | 46        |
| 2.5.2. Herstellung des Celegans Toxchips   | 47        |
| 2.5.2.1. Beschichtung der Objektträger mit Poly-L-Lysin-Lösung   | 47        |
| 2.5.2.2. Spotten der Arrays  | 47        |
| 2.5.2.3. Nachbehandlung der Arrays   | 48        |
| 2.5.3. RNA Präparation   | 48        |
| 2.5.4. Reverse Transkription und Hybridisierung  | 49        |
| 2.5.5. Datengewinnung und Auswertung   | 50        |
| <b>2.6. Verwendete Medien</b>  | <b>52</b> |
| <b>3. ERGEBNISSE</b>   | <b>57</b> |
| <b>3.1. Nachweis Xenobiotika-induzierbarer Gene durch den<br/>gesamtgenomischen DNA-Microarray von <i>C. elegans</i></b> | <b>57</b> |
| <b>3.2. Celegans Toxchip</b>   | <b>63</b> |
| 3.2.1. Genselektion für den Celegans Toxchip   | 63        |
| 3.2.2. Qualitätsprüfung der auf den Celegans Toxchip aufgebrachten Gene  | 65        |
| 3.2.3. Überprüfung der Funktionsfähigkeit des Celegans Toxchips  | 67        |
| 3.2.3.1. $\beta$ -Naphthoflavon  | 69        |
| 3.2.3.2. Atrazin   | 71        |
| 3.2.3.3. Endosulfan  | 72        |

## Inhalt

---

|                                    |            |
|------------------------------------|------------|
| 3.2.3.4. Fluoranthen               | 73         |
| 3.2.3.5. Clofibrat                 | 74         |
| 3.2.3.6. Diethylstilbestrol (DES)  | 75         |
| 3.2.3.7. Tributylzinnchlorid (TBT) | 76         |
| <b>4. DISKUSSION</b>               | <b>77</b>  |
| <b>5. ZUSAMMENFASSUNG/ SUMMARY</b> | <b>94</b>  |
| <b>6. LITERATUR</b>                | <b>98</b>  |
| <b>ANHANG</b>                      | <b>110</b> |

## ANHANGSVERZEICHNIS

|            |   |     |
|------------|---|-----|
| Anhang 1:  | Tabellarische Übersicht über die Produktlänge in Basenpaaren (Bp) der durch die spezifischen Primer gebildeten Genfragmente, sowie die Sequenz der Primer_____                        | 110 |
| Anhang 2:  | Tabellarische Aufstellung von Genen unbekannter Funktion, die in den Hybridisierungsexperimenten mit dem gesamtgenomischen DNA-Microarray von <i>C. elegans</i> induziert wurden_____ | 111 |
| Anhang 3:  | Tabellarische Aufstellung von Genen unbekannter Funktion, die in den Hybridisierungsexperimenten mit dem gesamtgenomischen DNA-Microarray von <i>C. elegans</i> induziert wurden_____ | 113 |
| Anhang 4:  | Rohdaten der Celegans Toxchip Experimente mit $\beta$ -Naphthoflavon_   | 115 |
| Anhang 5:  | Rohdaten der Celegans Toxchip Experimente mit Atrazin_____  | 119 |
| Anhang 6:  | Rohdaten der Celegans Toxchip Experimente mit Endosulfan_____   | 123 |
| Anhang 7:  | Rohdaten der Celegans Toxchip Experimente mit Fluoranthen_____  | 127 |
| Anhang 8:  | Rohdaten der Celegans Toxchip Experimente mit Clofibrat_____  | 131 |
| Anhang 9:  | Rohdaten der Celegans Toxchip Experimente mit DES_____  | 135 |
| Anhang 10: | Rohdaten der Celegans Toxchip Experimente mit TBT_____  | 139 |
| Lebenslauf | _____   | 143 |
| Danksagung | _____   | 145 |
| Erklärung  | _____   | 146 |

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

|          |   |    |
|----------|---|----|
| Abb. 1:  | Schematische Darstellung eines <i>C. elegans</i> -Hermaphroditen                              | 10 |
| Abb. 2:  | Schematische Darstellung eines <i>C. elegans</i> -Männchens                                   | 10 |
| Abb. 3:  | <i>C. elegans</i> -Entwicklung vom Acht-Zell-Stadium zur L1-Larve                             | 11 |
| Abb. 4:  | Entwicklungszyklus von <i>C. elegans</i>  | 11 |
| Abb. 5:  | Darstellung eines cDNA-Array Experiments  | 15 |
| Tab.1:   | Auswahl zu testender Schadstoffe und ihre ökotoxikologische Relevanz                          | 19 |
| Abb. 6:  | Schematische Darstellung der Reversen Transkription   | 32 |
| Abb. 7:  | Hybridisierungskammer   | 34 |
| Tab. 2:  | Zusammensetzung der Waschpuffer   | 34 |
| Tab. 3:  | Auf den Celegans Toxchip aufgespottete Hybridisierungskontrollen                              | 36 |
| Abb. 8:  | Restriktionsanalyse des Gens K09D9.2  | 44 |
| Abb. 9:  | Spottingroboter MicroGrid II von BioRobotics  | 48 |
| Abb. 10: | Isolierte RNA aufgetragen auf ein 0,7%iges Agarose-Gel  | 49 |
| Tab. 4:  | Zusammensetzung der Waschpuffer   | 50 |
| Abb. 11: | Agilent Microarray Scanner  | 50 |
| Abb. 12: | Übersicht über die einzelnen Entwicklungsphasen des Celegans Toxchips                         | 57 |
| Tab. 5:  | Induktion von Genen des Biotransformationssystems durch die verwendeten Xenobiotika           | 58 |
| Tab. 6:  | Induktion von Genen mit unterschiedlicher Funktion  | 59 |
| Tab. 7:  | Gene unbekannter Funktion, die durch mehr als ein eingesetztes Xenobiotikum induzierbar waren | 60 |
| Tab. 8a: | Induktion von Collagen Genen durch die verwendeten Xenobiotika                                | 60 |
| Tab. 8a: | Induktion von C-type Lectin Genen durch die verwendeten Xenobiotika                           | 61 |
| Tab. 9:  | Gene mit bekannter Funktion, die durch die eingesetzten Xenobiotika reprimiert wurden         | 62 |
| Tab. 10: | Genauswahl für den Celegans Toxchip   | 64 |
| Abb. 13: | Gereinigte Genfragmente der Gene 1–27   | 65 |
| Abb. 14: | Gereinigte Genfragmente der Gene 27–71  | 66 |

|          |   |    |
|----------|---|----|
| Abb. 15: | Zuordnung der Genidentitäten (GenID) zu den Spots der Scannerfotos  | 68 |
| Abb. 16: | Scannerfotos der Experimente mit dem Celegans Toxchip für $\beta$ -Naphthoflavon                              | 69 |
| Tab. 11: | Zusammenfassung der durch $\beta$ -Naphthoflavon induzierten Gene des Celegans Toxchip                        | 70 |
| Abb. 17: | Scannerfotos der Experimente mit dem Celegans Toxchip für Atrazin   | 71 |
| Tab. 12: | Zusammenfassung der durch Atrazin induzierten Gene des Celegans Toxchip                                       | 71 |
| Abb. 18: | Scannerfotos der Experimente mit dem Celegans Toxchip für Endosulfan  | 72 |
| Tab. 13: | Zusammenfassung der durch Endosulfan induzierten Gene des Celegans Toxchip                                    | 72 |
| Abb. 19: | Scannerfotos der Experimente mit dem Celegans Toxchip für Fluoranthen   | 73 |
| Tab. 14: | Zusammenfassung der durch Fluoranthen induzierten Gene des Celegans Toxchip                                   | 73 |
| Abb. 20: | Scannerfotos der Experimente mit dem Celegans Toxchip für Clofibrat   | 74 |
| Tab. 15: | Zusammenfassung der durch Clofibrat induzierten Gene des Celegans Toxchip                                     | 74 |
| Abb. 21: | Scannerfotos der Hybridisierungsexperimente mit dem Celegans Toxchip für DES                                  | 75 |
| Tab. 16: | Zusammenfassung der durch DES induzierten Gene des Celegans Toxchip   | 75 |
| Abb. 22: | Scannerfotos der Hybridisierungsexperimente mit dem Celegans Toxchip für TBT                                  | 76 |
| Tab. 17: | Zusammenfassung der durch TBT induzierten Gene des Celegans Toxchip   | 76 |
| Tab. 18: | Vergleich der Sensitivität von Reproduktion (EC50) und der Genexpression aufgenommen mit dem Celegans Toxchip | 90 |

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

|            |   |
|------------|---|
| Abb.:      | Abbildung                                     |
| A.bidest.: | bidestilliertes Wasser                        |
| A.dest.:   | destilliertes Wasser                          |
| Bp:        | Basenpaare                                    |
| cDNA:      | copy DNA                                      |
| CYP:       | Cytochrom P450 Gene                           |
| DEPC:      | Diethyl Pyrocarbonat                          |
| DES:       | Diethylstilbestrol                            |
| DMSO:      | Dimethylsulfoxid                              |
| DNA:       | Desoxyribonukleinsäure                        |
| DNA-Konz.: | DNA-Konzentration                             |
| dNTPs:     | Desoxyribonukleotide                          |
| EU:        | Europäische Union                             |
| Fla:       | Fluoranthen                                   |
| g:         | gravity                                       |
| GenID:     | Gen Identität                                 |
| GST:       | Glutathion-S-Transferase                      |
| HCl:       | Salzsäure                                     |
| HSP:       | Hitzeschock Protein                           |
| Konz.:     | Konzentration                                 |
| L1:        | Larvenstadium 1                               |
| L2:        | Larvenstadium 2                               |
| L3:        | Larvenstadium 3                               |
| L4:        | Larvenstadium 4                               |
| LB:        | Luria-Bertani Medium                          |
| lfd. Nr.:  | laufende Nummer                               |
| MPI:       | Max-Planck Institut                           |
| mRNA:      | Boten Ribonukleinsäure                        |
| MT:        | Metallothionin                                |
| NaOH:      | Natronlauge                                   |
| NCBI:      | National Center for Biotechnology Information |
| NGM:       | Nutrition growth medium                       |
| OD:        | optische Dichte                               |

|                |  |
|----------------|--|
| PAK:           | Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe |
| PCB:           | Polychlorierte Biphenyle                     |
| PCR:           | Polymerase Kettenreaktion                    |
| PVP:           | Probenverdünnungspuffer                      |
| RNA:           | Ribonukleinsäure                             |
| RNAi:          | RNA-Interferenz                              |
| rpm:           | rounds per minute                            |
| RT:            | Reverse Transkription                        |
| SDS:           | Sodiumdodecylsulfat                          |
| SEM:           | Standardfehler des Mittelwertes              |
| SMD:           | Stanford Microarray Datenbank                |
| SSC:           | Sodiumdodecylsulfat                          |
| Tab.:          | Tabelle                                      |
| TBT:           | Tributylzinnchlorid                          |
| TGB- $\beta$ : | transforming growth factor- $\beta$          |
| tRNA:          | transfer RNA                                 |
| UDPGT:         | UDP-Glucuronosyltransferase                  |
| UV:            | ultraviolett                                 |
| Verd.:         | Verdünnung                                   |
| VTG:           | Vitellogenin                                 |
| $\beta$ -NF:   | $\beta$ -Naphthoflavon                       |