

## 1. EINLEITUNG

Die Abschätzung des Umweltrisikos von Chemikalien und deren Bewertung gewinnt zunehmend an Bedeutung. Nicht zuletzt durch eine veränderte Gesetzeslage, u.a. durch die EU-Richtlinie von 1993 zur Festlegung von Grundsätzen für die Bewertung der Risiken für Mensch und Umwelt, kommt dabei der wissenschaftlichen Risikoabschätzung (risk assessment), d.h. der Beurteilung des Gefahrenpotenzials von bestehenden, aber auch neuen, vor der Zulassung stehenden umweltrelevanten Chemikalien eine zentrale Stellung zu.

Seit den 60er-Jahren des vergangenen Jahrhunderts sind zahlreiche biologische Testverfahren zur Erfassung und Bewertung toxischer Wirkungen von Chemikalien entwickelt worden (Fent, 2003). Von grundsätzlicher Bedeutung dabei ist die Betrachtung direkter Effekte auf Einzelorganismen, da sich auf dieser Ebene toxische Wirkungen mit standardisierten Methoden erforschen und interpretieren lassen (Kammenga, 1996; Versteeg et al., 1999; Newman et al., 2000). Eine bessere Abschätzung der ökotoxikologischen Wirkung von Chemikalien kann durch den gleichzeitigen Einsatz verschiedener Toxizitätstests mit Organismen unterschiedlicher Trophiestufen und verschiedener taxonomischer Gruppen erreicht werden (Bierkens et al., 1998). Als Parameter werden dabei z.B. in akuten Toxizitätstests die Mortalität oder Überlebensrate herangezogen. Da die chronische und subakute Toxizität von Stoffen auf Grund der verschiedenen Wirkmechanismen nicht unmittelbar aus der akuten Toxizität abzuleiten ist (Davis, 1973; Mount, 1977; Fent, 2003), muss sie mit anderen, empfindlicheren und vielseitigeren Parametern gemessen werden, die schädigende Ereignisse u.a. bereits auf zellulärer und subzellulärer Ebene zeigen.

Hinzu kommt, dass die umweltrelevante Konzentration von Chemikalien häufig so gering ist, dass für die Beurteilung ihrer biologischen Wirkung das Heranziehen von Endpunkten aus Biotests geringerer Rangstufe wie z.B. Mortalität oder Reproduktion nicht ausreichen. Zum Nachweis dieser subakuten Wirkungen können Parameter wie die Veränderung in der Reproduktion, der DNA, des Immunsystems sowie histologische, verhaltensbiologische und biochemische Endpunkte eingesetzt werden.

Ein weiterer molekularer Biomarker ist das Erfassen der durch Umweltchemikalien induzierten Genexpression. Dieser Biomarker wird zunehmend mit Erfolg bei unterschiedlichen Organismen in ökotoxikologischen Untersuchungen eingesetzt.

So konnten Levine und Oris (1999) und McClain et al. (2003) eine Genexpression von CYP1A1 sowie von Vitellogenin und Metallothionein durch Exposition von Regenbogenforellen in PAH und Schwermetall kontaminierten Gewässern nachweisen. Beim amerikanischen Hummer hat Snyder (1998) eine Induktion von CYP45 im Hepatopancreasgewebe durch Phenobarbital und Heptachlor zeigen können. Für Mollusken wiesen Steinert und Pickwell (1993) im Kiemengewebe der Muschel *Mytilus edulis* eine 12fache Induktion von HSP70 durch Aufnahme von mit Tributylzinn assoziierten Braunalgen nach. Bei Ratten konnte eine schadstoffinduzierbare Genexpression bei HSP89 für verschiedene Pestizide durch Bagchi et al. (1996) gezeigt werden.

Ziel dieser Arbeit ist es, die schadstoffinduzierbare Genexpression des Nematoden *Caenorhabditis elegans* als Grundlage für die Entwicklung eines Biomonitor-Tests auf Basis der DNA-Array-Technologie zu nutzen. Dazu sollen ausgewählte, schadstoffinduzierbare Gene auf den so genannten Celegans Toxchip, einen Low-Density cDNA-Array aufgetragen werden.

Freilebende Nematoden stellen in ihren aquatischen und terrestrischen Lebensräumen die häufigste Organismengruppe der Metazoen dar. Sie weisen in der Regel eine hohe Artenzahl und Abundanz auf und sind daher gut geeignet für ökologische und ökotoxikologische Untersuchungen (Traunspurger et al., 1995; Kammenga et al., 1996; Niemann und Debus, 1996). Durch ihre durchlässige Cuticula stehen sie in direktem Kontakt mit dem Porenwasser und den darin gelösten Schadstoffen. Als permanente Bewohner dieses Lebensraumes können sie bei einem Schadstoffeintrag nicht flüchten. Sie sind leicht und routinemäßig zu jeder Jahreszeit zu sammeln und zu isolieren. Die Probenentnahme ist für die untersuchende Lokalität ein relativ geringer Eingriff bzw. eine geringe Störung des Ökosystems.

*Caenorhabditis elegans* ist ein ca. 1 mm langer Nematode, der fast weltweit zahlreich in den verschiedensten Böden und Sedimenten vorkommt und sich dort saprobiontisch ernährt. Er kann eine Populationsdichte von bis zu 55 Millionen Individuen pro Quadratmeter erreichen (van Kessel et al., 1989). Zu dem gilt er mittlerweile als das einfachste mehrzellige Tier mit dem Status eines Labormodells (Ankeny, 2001).

*C. elegans* kommt fast ausschließlich als Hermaphrodit vor (Abbildung 1), der Anteil der Männchen in einer Population beträgt nur 0,05 bis 0,5 %. Die Männchen unterscheiden sich dabei von den Hermaphroditen durch ihre geringere Körpergröße und ein verbreitertes Körperende mit Spikula (siehe Abbildung 2).

Das Geschlecht wird durch das Verhältnis von X-Chromosomen zu Autosomen bestimmt (Brenner, 1974), dabei besitzt *C. elegans* fünf homologe autosomale Chromosomenpaare und ein Paar Geschlechtschromosomen (XX bei Zwittern und XO bei Männchen). Die Hermaphroditen können sich durch Selbst- oder Fremdbefruchtung (Männchen) fortpflanzen. Die Männchen weisen dabei die nötigen Strukturen für eine Begattung auf: einen Hoden, einen Ausführungsgang für den Samen (Vas deferens) und eine Spikula zur Befruchtung.

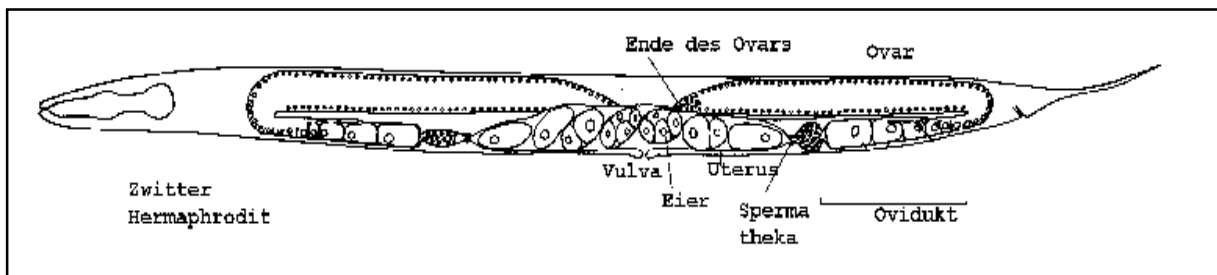


Abb. 1: Schematische Darstellung eines *C. elegans*-Hermaphroditen (Hupfeld, 2002)

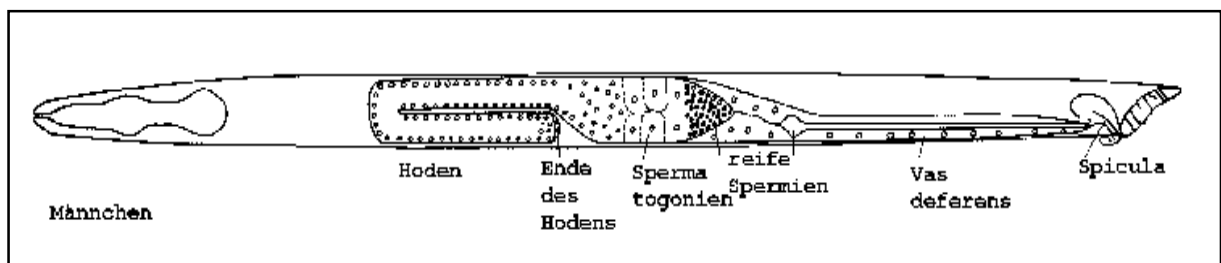


Abb. 2: Schematische Darstellung eines *C. elegans*-Männchens (Hupfeld, 2002)

Bei der Fortpflanzung passiert die reife Oocyte die Spermatheka und wird dabei befruchtet. Bevor bei der Befruchtung der männliche und weibliche Zellkern fusionieren, findet bereits eine unvollständige Furchung statt. Die eigentliche Furchung setzt jedoch erst nach der Verschmelzung der Kerne ein. Die Embryoentwicklung (siehe Abbildung 3) dauert 14 bis 15 Stunden bis zum Schlüpfen (Blaxter, 1998), wobei 131 Zellen durch den programmierten Zelltod (Apoptose) sterben. Die Apoptose ist u.a. auch für die Zellkonstanz der Tiere verantwortlich (Hedgecock et al., 1983).

Die Embryogenese bei *C. elegans* ist ein Beispiel für eine Mosaikentwicklung, da das Schicksal der Zellen bereits im 26-Zell-Stadium festgelegt wird.

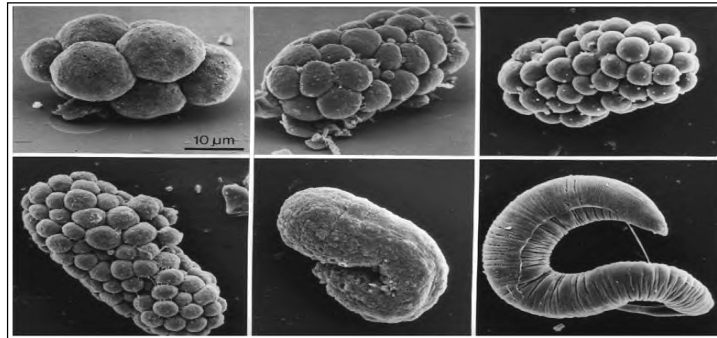


Abb. 3: *C. elegans*-Entwicklung vom Acht-Zell-Stadium zur L1-Larve (Schierenberg und Sassin, Universität Köln)

Der Entwicklungszyklus von *C. elegans* umfasst vier Larvenstadien (siehe Abbildung 4). Der Embryo verlässt nach der Gastrulation den Uterus. Bei einer Hälterungstemperatur von 25°C schlüpft nach 14 Stunden aus dem Embryo die Larve L1, nach weiteren 12 Stunden entwickelt sich die Larve L2. Aus dieser kann sich unter ungünstigen Umweltbedingungen ein Dauerstadium bilden, welches rund vier Monate überlebensfähig ist. Nach weiteren 7 Stunden bei 25°C hat sich aus der L2-Larve die L3-Larve gebildet, welche sich nach 8 Stunden zur L4-Larve weiterentwickelt. Bis zum jungen adulten Stadium dauert es noch weitere 10 Stunden. Drei Tage nach dem Schlüpfen ist *C. elegans* geschlechtsreif und kann im Laufe von acht Tagen bis zu 300 Eier ablegen. Die gesamte Lebensdauer von *C. elegans* beträgt ca. 21 Tage (Brenner, 1974; Sulston und Hodgkins, 1988; Ebstein und Shakes, 1995).

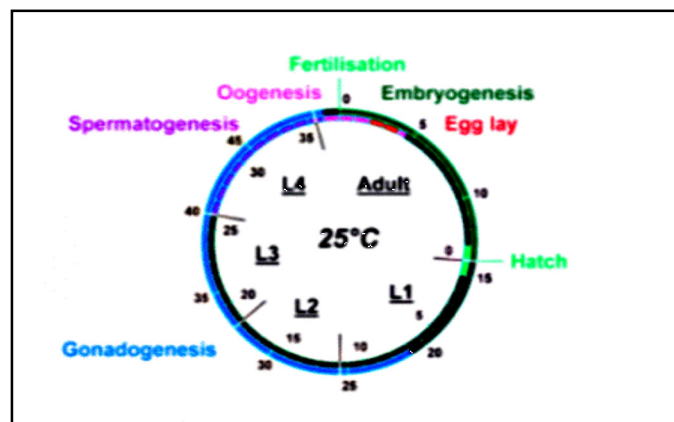


Abb. 4: Entwicklungszyklus von *C. elegans*

Der adulte Hermaphrodit besteht aus 959 somatischen Zellen (darunter 111 Muskelzellen und 302 Nervenzellen) und enthält die wichtigsten Merkmale höherer Organismen. Er besitzt ein einfaches Nervensystem, eine Epidermis, einen Gastrointestinal-Trakt und Gonaden (Jorgensen und Mango, 2002).

Das Verdauungssystem besteht aus dem Pharynx, dem Mitteldarm und dem Enddarm. Das einfach aufgebaute Nervensystem besteht aus einem Schlundganglion, von dem ein dorsaler und ein ventraler Nervenstrang abgehen.

Die leichte Züchtbarkeit und Handhabbarkeit, kurze Generationszeiten und das Vorhandensein einer Vielfalt von Mutantenstämmen lassen *C. elegans* als Testorganismus besonders geeignet erscheinen. Ein weiterer großer Vorteil von *C. elegans* ist die Tatsache, dass sein Genom 1998 als erstes tierisches Genom komplett sequenziert wurde. Es hat eine Größe von ca. 97 Mb (zum Vergleich: Das menschliche Genom umfasst ca. 3000 Mb) mit mehr als 19.000 Genen, von denen bisher aber nur ca. 3000 als essenziell angesehen werden (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998).

Bereits seit längerem wird *C. elegans* erfolgreich für Biotests mit den Endpunkten Mortalität und Reproduktion eingesetzt (Van Kessel, 1988; Bierkens et al., 1998). So wurden z.B. Untersuchungen zur Auswirkung von verschiedenen Schwermetallen in Böden auf *C. elegans* mit dem Endpunkt Mortalität durchgeführt (Donkin und Dusenberry, 1993; Peredney und Williams, 2000). Ura et al. (2002) untersuchten die Toxizität 11 verschiedener Xenobiotika, u.a. Benzo[a]pyrene, Nonylphenol, Bisphenol-A und Cadmiumchlorid mit dem Endpunkt Mortalität. Weiterhin wurde *C. elegans* auch als Testorganismus für Mortalitätsuntersuchungen mit industriellen und städtischen Abwässern eingesetzt (Hitchcock et al., 1997). Traunsburger et al. (1997) und Höss et al. (2001) untersuchten die toxische Wirkung von Cadmium auf *C. elegans* in Flüssigkultur und im Sediment. In einer anderen Studie untersuchten Dhawan et al. (1999) den Effekt von Ethanol auf Mortalität, Reproduktion und Verhalten von *C. elegans*. Tominaga et al. (2003) nutzten die Endpunkte Reproduktion und Fruchtbarkeit bei ihrer Untersuchung der Auswirkung verschiedener Phenole.

Seit neuerer Zeit rückt mehr und mehr die Nutzung der Genexpression als Biomarker bei *C. elegans* in den Fokus ökotoxikologischer Untersuchungen. So entwickelten Candido und Mitarbeiter (1996) einen transgenen *C. elegans* Stamm, der durch Genfusionen zwischen Promoterelementen des *hsp-16* Gens (kodiert für ein kleines

Hitzeschockprotein in *C. elegans*) und dem Reportergen *lacZ* (kodiert für  $\beta$ -Galaktosidase aus *E. coli*) die Tiere selbst zum Stressmonitor werden lässt. Einsetzbar sowohl in aquatischen als auch terrestrischen Umgebungen, wird dabei das Potenzial des *hsp-16* Promotors genutzt, auf eine Vielfalt unterschiedlicher Stressfaktoren (z.B. chemischer Stress, Kälte- oder Hitzestress, Mikrowellen) mit einer starken Induktion der Genexpression zu antworten. Die Steigerung der Genexpression wird durch die verstärkte Expression des Reporterproteins optisch durch Blaufärbung der Tiere sichtbar gemacht und quantitativ erfasst. Jones et al. (1996) setzten diesen transgenen Stamm bei ihren Untersuchungen der Effekte des Fungizids Captan ein und Mutwakil et al. (1997) nutzten ihn als Biomarker zur Untersuchung von mit Schwermetall kontaminierten Wasserproben eines englischen Flusssystemes. Cioci et al. (2000) verwendeten einen weiteren transgenen *C. elegans* Stamm als Biomonitor für Metallkontaminationen. Bei diesem Stamm wurde ein transgenes Konstrukt, bestehend aus dem Promoter des Metallothionein Gens *mtl-2* und aus dem Reportergen *lacZ*, in den Wurm eingeschleust. Lagido et al. (2001) konstruierten biolumineszente *C. elegans* für den Nachweis bioverfügbarer Toxine und ihrer biologischen Effekte. Dazu wurde das Firefly Luciferase Gen hinter einen konstitutiven Promotor geschaltet. Die Luciferase katalysiert die Oxidation von Luciferin, eine Reaktion bei der ATP benötigt und Licht produziert wird. Anhand der Lichtproduktion konnte gezeigt werden, dass sich der ATP-Spiegel unter Stress (bedingt z.B. durch hohe Temperaturen, Exposition von Kupfer, Blei und 3,5-Dichlorophenol) verringert, wobei die Lichtemission sich stetig mit steigender Belastung reduzierte. Interessanterweise konnte auch gezeigt werden, dass *C. elegans* auf die Präsenz von Hormonen (Estradiol-17 $\beta$ ) als auch auf andere endokrine Disruptoren (wie Bisphenol-A, Vincrozin) mit einer massiv verstärkten Expression von Vitellogenin mRNA reagiert (Kohra et al., 1999). In ihrer Untersuchung von verschiedenen Cytochrom P450 Genen von *C. elegans* konnten Menzel et al. (2001) eine Genexpression für verschiedenste Xenobiotika, u.a. Atrazin, Fluoranthen, PCB52 und weitere nachweisen. Custodia et al. (2001) konnten mit Hilfe eines gesamtgenomischen DNA-Microarrays durch die Genexpression von *C. elegans* endokrine Disruptoren im Grundwasser nachweisen.

Für die Aufnahme möglichst vielfältiger Genexpressionsprofile wurde in dieser Arbeit ebenfalls die DNA-Array Technologie verwendet. Die DNA-Array Technologie ist eine relativ neue Methode, mit der Veränderungen in der Genexpression genomweit analysiert werden können. Als Array beziehungsweise Chip wird eine feste Oberfläche bezeichnet, auf der Nukleinsäuren oder auch Peptide in hoher Dichte aufgetragen wurden. Als Substrat wird dabei häufig Glas in Form beschichteter Objektträger oder eine Nylon-Membran verwendet. Im Gegensatz zu den Glasobjektträgern können Nylon-Membranen vier bis fünf mal wieder verwendet werden und für ihre Herstellung wird keine spezielle Ausrüstung benötigt (Murphy, 2002). Glas hingegen besitzt andere Vorteile. Zum einen können hohe Temperaturen und Waschlösungen mit hohen Ionenstärken keinen Schaden anrichten, zum anderen ist Glas nicht porös, sodass kleine Probenvolumina ausreichen und durch seine sehr minimale Eigenfluoreszenz entsteht beim späteren Scannen nur ein geringes Hintergrundsignal (Cheung et al., 1999).

Die Basis eines DNA-Array-Experimentes ist die Hybridisierung der fixierten Proben-DNA mit der komplementären, markierten cDNA (Target-DNA) aus einem bestimmten Organismus oder Gewebe (Phimister, 1999). Dabei erlaubt die Markierung der Target-DNA später eine qualitative und quantitative Auswertung der stattgefundenen Hybridisierungen. DNA-Arrays unterscheiden sich in Art, Anzahl und Volumen der aufgetragenen Nukleinsäuren. Bei Oligonukleotid-Arrays werden 20 bis 25 Basen lange Oligonukleotide entweder direkt auf dem Chip (*in situ*) synthetisiert oder erst nach ihrer Synthese auf dem Chip fixiert. DNA-Arrays enthalten 50 bis 5000 Basen lange cDNAs, die meist durch die Polymerase Kettenreaktion (PCR) hergestellt werden. Je nach Anzahl der aufgebrauchten Proben unterscheidet man Low-Density-Chips, Medium-Density-Chips und High-Density-Chips. Low-Density-Chips beinhalten eine Probenzahl von bis zu 150 verschiedenen Genfragmenten, Medium-Density-Chips enthalten 150 bis 1000 und High-Density-Chips mehr als 1000 unterschiedliche Genfragmente.

Abbildung 5 zeigt ein typisches DNA-Array-Experiment. Dabei werden zunächst die Proben, die auf den Chip gespottet werden sollen ausgewählt, und z.B. mittels PCR amplifiziert. Die zur PCR benötigten Primer werden so gewählt, dass die Amplimere nicht zu groß sind und eine größtmögliche Spezifität aufweisen. Mit Hilfe eines Spotting-Roboters werden die DNAs in definierter Reihenfolge auf ein passendes Substrat gespottet und anschließend immobilisiert. Die zu untersuchende mRNA wird

in einer Reversen Transkription in cDNA umgeschrieben und hierbei mittels Fluoreszenz-markierten Nukleotiden (z.B. Cy3-dUTP) markiert. Parallel dazu wird die gleiche Menge Referenz-mRNA mit einem anderen Farbstoff (z.B. Cy5-dUTP) markiert. Nach Mischung beider markierter Target-cDNAs werden diese auf den Microarray aufgebracht und hybridisiert. Die Target-cDNAs binden entsprechend ihrem Mengenverhältnis an die im Überschuss vorhandenen Matrizen auf dem Array. Nach mehreren Waschschritten zum Entfernen überschüssiger Target-cDNAs werden die hybridisierten Microarrays mit einem Laserscanner gescannt. Mit Hilfe der entsprechenden Software wird über den Computer ein Falschfarbenbild kreiert, bei dem nach internationaler Konvention dem Cy3-Farbstoff eine grüne und dem Cy5-Farbstoff eine rote Farbe zugewiesen wird. Gelbe Spots auf dem Bild zeigen an, dass eine ähnliche Menge an RNA aus beiden Versuchsansätze gebunden wird, rote und grüne Spots zeigen, dass eine RNA stärker gebunden werden konnte und damit auch in einer höheren Konzentration im Organismus vorlag. Die Quantität der Spots wird anschließend mit Hilfe eines Computerprogramms ermittelt.

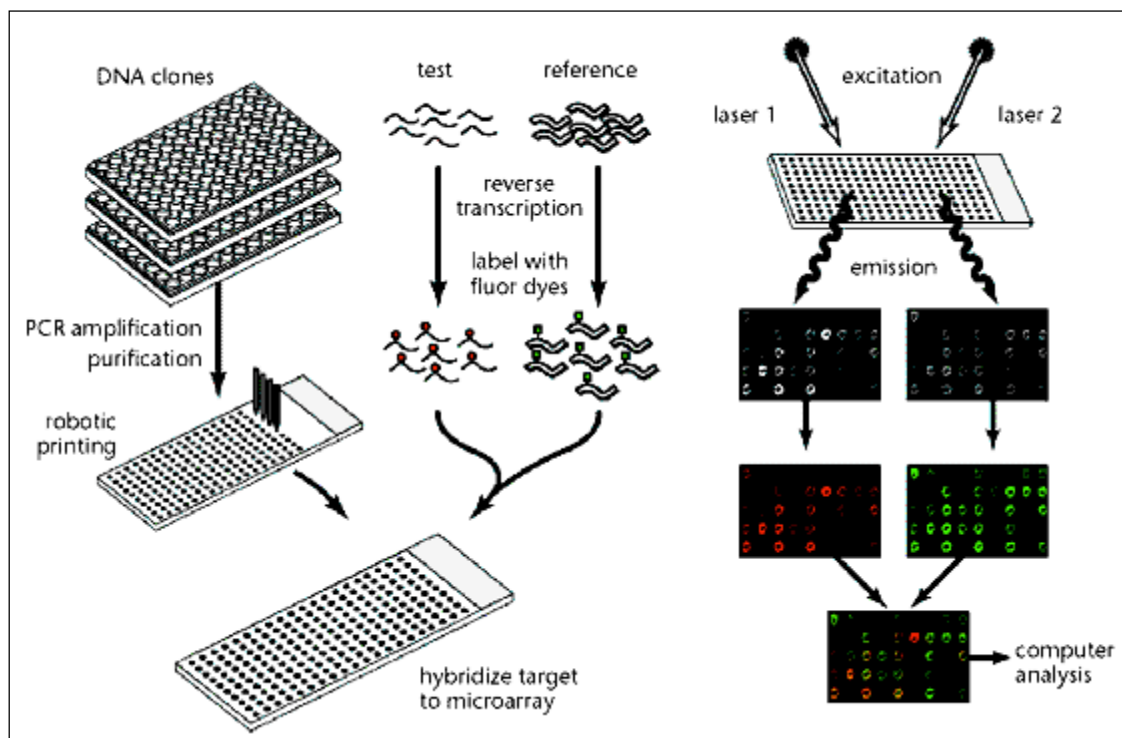


Abb. 5: Darstellung eines cDNA-Array Experiments (Duggan, 1999)

Durch die Fluoreszenzmarkierung mit zwei verschiedenen Fluorophoren ist ein direkter Vergleich der Proben auf demselben Chip möglich. Eine Alternative ist die Markierung mit radioaktiven Markern (z.B.  $^{32}\text{P}$ ). Diese Technologie ist jedoch recht aufwendig, da ein entsprechendes Isotopenlabor eingerichtet sein muss.



Außerdem hat sie den Nachteil das verschiedene RNAs (z.B. Kontrolle und zu untersuchende RNA) nicht kompetitiv auf dem Chip hybridisiert werden können. Allerdings reicht für die radioaktive Detektion 0,1 µg Gesamt-RNA aus, für die Fluoreszenzdetektion hingegen wird mindestens 10 µg RNA benötigt. Sofern genügend RNA zur Verfügung steht, ist die Fluoreszenzmarkierung vorzuziehen (Murphy, 2002).

Mit Nutzung dieser Technologie besteht heute die Möglichkeit, toxikologische Fragestellungen sehr viel umfassender zu bearbeiten (Debouck und Goodfellow, 1999; Nuwaysir et al., 1999; Bartosiewicz et al., 2001 und 2002). Veränderungen in der Genexpression in einer Zellpopulation, einem Gewebe oder einem ganzen Tier können zum Beispiel abhängig sein vom physiologischen Status, der ontogenetischen Entwicklung, umweltbedingten Belastungen, als auch pathologischen Veränderungen. Solche Veränderungen können nun mit Hilfe von DNA-Arrays aufgezeigt werden (Sabatti, 2002; Schena, 1998; DeRisi et al., 1997). Die Analyse des Expressionsstatus tausender Gene parallel in einem Versuch erlaubt dem Experimentator das Ansprechen biologischer Fragestellungen, wie sie bei der Nutzung herkömmlicher Methoden (Northern Blot, *in-situ* Hybridisierung, RNase protection assay) nicht möglich wäre. So können DNA-Arrays sowohl zum Nachweis der Wirkung einzelner toxischer Substanzen in noch sehr geringen Konzentrationen, als auch von Stoffgemischen eingesetzt werden, was vor allem für die pharmakologische Forschung sehr interessant ist (Afshari et al., 1999; Braxton und Bedilion, 1998). Weiterhin können sie sowohl zur Aufnahme von molekularen Signaturen für einzelne Stoffe bzw. Stoffklassen, zum Biomonitoring als auch für vergleichende Effektuntersuchungen geringkonzentriert *versus* hochkonzentriert eingesetzter Wirkstoffe dienen. Basierend auf der bestehenden Homologie einer Vielzahl von Genen von auch weiter entfernt verwandten Organismen besteht darüber hinaus die Möglichkeit, die für eine Art erhaltenen Ergebnisse auf andere Arten zu extrapolieren. So ist z.B. bekannt, dass für eine Reihe von therapeutischen Targets im Menschen homologe Gene in *C. elegans* existieren (Aboobaker und Blaxter, 2000; Culetto und Satelle, 2000). Hier eröffnen sich in Zukunft möglicherweise Einsatzgebiete, die heute ausschließlich mittels Zellkulturen bzw. Säugetierexperimenten bearbeitet werden können.

Der Einsatz von DNA-Arrays in der *C. elegans* Forschung beschränkt sich bisher mit Ausnahme der Arbeiten von Custodia et al. (2001) auf Gebiete der

Grundlagenforschung. So entwickelten Kim und Mitarbeiter (2001) einen gesamtgenomischen DNA-Array von *C. elegans* mit dessen Hilfe sie verschiedenen Genexpressionsprofile aufnehmen konnten. Reinke et al. (2000) identifizierten Gene, die eine Keimbahn-spezifische Expression zeigen und Jiang et al. (2001) untersuchten entwicklungs-spezifische Genexpressionsprofile. Hill und Mitarbeiter (2000) untersuchten Gene, die im Verlauf der Ontogenese differenziell expremiert werden und Mochii et al. (1999) waren in der Lage, Gene zu identifizieren, die über TGB- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) reguliert werden.

Für die Auswahl der für den Celegans Toxchip in Frage kommenden Gene liegt ein Hauptaugenmerk auf Phase I und II Enzymen des Biotransformationssystems. Eine Vielzahl von vor allem lipophilen, nicht aus der Natur stammenden Chemikalien wird von Organismen aufgenommen. Diese können sich zu toxischen Konzentrationen akkumulieren, wenn sie nicht zu wasserlöslichen Verbindungen umgewandelt werden. Die Phase I und II Enzyme des Biotransformationssystems stellen dabei wichtige Schlüsselenzyme der Detoxifikation dar, wobei es in der ersten Phase zu einer primären Oxidation des Substrats durch Monooxygenasen kommt. Die nunmehr oxidierten Verbindungen können in der anschließenden zweiten Phase durch eine Vielzahl von Reaktionen weiter metabolisiert werden und in eine wasserlösliche Form überführt und damit vom Organismus leichter ausgeschieden werden.

Die wichtigsten Vertreter der Phase I stellen Cytochrom P450 Proteine. Sie bilden die im Organismenreich größte bekannte Multigenfamilie und kommen ubiquitär in Bakterien, Pflanzen, Pilzen und Tieren vor (Nelson et al., 1998). Durch die Einführung von molekularem Sauerstoff mittels einer Monooxygenasereaktion katalysieren diese Enzyme den ersten Schritt der Xenobiotika-Biotransformation. Neben der Vielzahl von Detoxifikationen werden einzelne Xenobiotika durch P450 Formen jedoch auch erst zu potenziell mutagenen, kanzerogenen oder toxischen Verbindungen umgebaut und so aktiviert (Bioaktivierung).

Typische Vertreter von Phase II Enzymen sind Glutathion-S-Transferasen und UDP-Glucuronosyltransferasen. In beiden Fällen wird durch die Anlagerung von Glutathion bzw. Glucuronsäure an das Substrat eine signifikante Erhöhung der Wasserlöslichkeit erreicht. Dies ist die Voraussetzung für ein anschließendes Ausscheiden bzw. den weiteren Abbau der Verbindungen.

Cytochrom P450 Proteine, welche Xenobiotika metabolisieren, als auch Phase II Enzyme sind im Allgemeinen nur in sehr niedriger Konzentration in den Zellen vorhanden, können aber massiv als Antwort auf die Präsenz von xenobiotischen Induktoren induziert werden. Soweit bisher bekannt ist, erfolgt die Induktion fast ausschließlich auf Transkriptionsebene (Whitlock, 1986; Nebert und Gonzales, 1987; Gonzales, 1989). Damit sind sowohl die P450 Formen als auch die vergleichbar regulierten Phase II Gene gut für ein Monitoring der differentiellen Genexpression geeignet.

Das Genom des Nematoden *C. elegans* besteht aus mehr als 19.000 Genen (The *C.elegans* Sequencing Consortium, 1998; Hodgkin, 2001), 80 von ihnen konnten dabei durch Sequenzvergleiche als P450 Gene identifiziert werden (Nelson et al., 1999). Bis auf eine Ausnahme konnten alle P450 Gene als nahe verwandt mit drei bekannten P450 Familien von Säugetieren (CYP 2, 3 und 4) eingeordnet werden (Gotoh, 1998). Das Auffinden von den zu Säugern homologen Proteinen AHR (Aryl hydrocarbon receptor) and ARNT (AHR nuclear transporter) (Powell-Coffmann et al., 1998) sowie die Induzierbarkeit von *C. elegans* P450 Formen durch eine Reihe von Xenobiotika (Menzel et al., 2001) lassen es darüber hinaus als sehr wahrscheinlich erscheinen, dass auch homologe P450 Formen zu der Familie CYP 1 in *C. elegans* existieren. Es konnte festgestellt werden, dass im menschlichen Organismus fast ausschließlich die Vertreter der Familien CYP 1-3 (und partiell 4) für den P450-spezifischen Teil des Xenobiotikametabolismus verantwortlich sind (Bock et al., 1990; Lock und Reed, 1998; Sheweita, 2000; Sueyoshi und Negishi, 2001; Schuetz, 2001). Die nahe Verwandtschaft der *C. elegans* P450 gerade zu diesen CYP Familien (Gotoh, 1998) legt die Vermutung nahe, dass auch die Nematoden P450 am Katabolismus oder Anabolismus von Xenobiotika beteiligt sind. Offensichtlich hat sich eine so große Anzahl von unterschiedlichen Isoenzymen entwickelt, um eine Vielzahl chemischer Reaktionen katalysieren und sich somit an die hohe Variabilität der Umweltbedingungen anpassen zu können. Eine ähnlich hohe Zahl an Isoenzymen gibt es auch für Proteinfamilien der Phase II, wie den Glutathion-S-Transferasen, UDP-Glucuronosyltransferasen und Sulfotransferasen. Hier konnten durch Homologiestudien 48, 66 bzw. fünf Enzymformen in *C. elegans* gefunden werden. Auch diese Enzymgruppen gelten auf Transkriptionsebene als induzierbar (Bock et al., 1990, Schrenk, 1998).

## Ziele der vorliegenden Arbeit

Viele der konventionellen ökotoxikologischen Testverfahren wie Reproduktionstests oder Mortalitätstests sind langwierig oder wenig sensitiv und geben keine Auskunft über die der Wirkung zugrunde liegenden molekularen Mechanismen (Ermantraut, 1999; Gerhold et al., 2001). Auf Grundlage der schadstoffinduzierbaren Genexpression des Nematoden *C. elegans* soll als alternative und ergänzende Methode ein Low-Density cDNA-Array mit Genfragmenten von *C. elegans* zur Detektion dieser Veränderung entwickelt und getestet werden. Als bevorzugte Targetgene werden Phase I und II Gene der Biotransformation dienen, darüber hinaus sollen jedoch auch weitere Gene mit einem hohen Induktionspotenzial (z.B. kodierend für Hitzeschockproteine oder Vitellogenine) eingesetzt werden.

Um später einen möglichst vielfältigen Anwendungsbereich des *C. elegans* Toxchips zu gewährleisten, sind für die Entwicklung und Testung Xenobiotika aus sechs verschiedenen Stoffgruppen von Interesse. Die nachfolgende Tabelle 1 gibt einen Überblick über die interessierenden Schadstoffe und ihre ökotoxikologische Relevanz.

Tab. 1: Auswahl zu testender Schadstoffe und ihre ökotoxikologische Relevanz

Stoffklasse	Substanz	Kurzbeschreibung	Ökotoxikologische Relevanz
<b>PAK</b>	β-Naphthoflavon	Farbstoff	
	Fluoranthen	eingesetzt zur Herstellung von Fluoreszenzfarbstoffen und Pharmaka	Akkumulation in aquatischen Tieren, sowie in Boden-invertebraten
<b>Arznei-mittel</b>	Clofibrat	Lipidsenker	Peroxisomenproliferation, Krebs bei Nagern
<b>Endokrine Substanz</b>	Diethylstilbestrol	Synthetische Substanz, früher zur Hormonbehandlung bei Frauen eingesetzt (in der BRD nicht mehr zugelassen), unerlaubterweise auch als Masthilfe eingesetzt	stark östrogen wirksam, schwer abbaubar, kanzerogen, cytotoxisch
<b>Herbizid</b>	Atrazin	Vertreter der 1,3,5-Triazine, selektives Bodenherbizid (in der BRD nicht mehr zugelassen)	Schwer abbaubar, östrogene Wirkung wahrscheinlich
<b>Fungizid Molluskizid</b>	Tributylzinn	Vertreter der Alkylzinn-Verbindungen, u.a. Bestandteil von Holzschutz- und Farbmitteln	Steroidwirksam auf Schnecken
<b>Insektizid</b>	Endosulfan	Chlorierter Kohlenwasserstoff, eingesetzt gegen beißende und saugende Insekten (in der BRD zugelassen)	Stark toxisch für Fische

Überblick über die einzelnen Arbeitsschritte:

- 1.) Entwicklung eines *Caenorhabditis elegans* Biomonitoringtests auf DNA-Ebene (Transkriptionsebene)
  - a. Selektion relevanter Gene
  - b. Auswahl des entsprechenden Array-Systems
  - c. Herstellung des *Caenorhabditis elegans* Toxichips
  
- 2.) Validierung des *Caenorhabditis elegans* Toxichip
  - a. Einsatz verschiedener Xenobiotika in drei Konzentrationen
  - b. Vergleich mit Daten aus Reproduktionstests in Flüssigkultur (Rödel, 2002)