

4. DISKUSSION

Viele Xenobiotika, die sich in der Umwelt finden, stehen im Verdacht, negative Auswirkungen auf Menschen und Tiere zu haben. Wegen ihrer oft geringen Konzentration ist es schwierig, Zusammenhänge zwischen ihrem Auftreten und phänotypischen Effekten bei Testorganismen festzustellen, zumal etablierte ökotoxikologische Testsysteme wie Mortalitäts- oder Reproduktionstests hier häufig bei den Freilandkonzentrationen keine klaren Antworten geben können.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob sich die schadstoffinduzierbare Genexpression des Nematoden *C. elegans* als ein neuer Endpunkt für ökotoxikologische Fragestellungen eignet. Dafür wurden zwei Nachweissysteme (ein gesamtgenomischer DNA-Microarray von *C. elegans* sowie ein Low-Density cDNA-Microarray, der so genannte Celegans Toxchip) verwendet. Um einen generellen Überblick über mögliche schadstoffinduzierbare Gene zu erhalten, wurde zunächst eine Untersuchung mit einem gesamtgenomischen DNA-Microarray von *C. elegans* durchgeführt. Untersuchte Xenobiotika waren dabei β -Naphthoflavon, Atrazin, Clofibrat, Diethylstilbestrol und Fluoranthen. Unter Verwendung von Konzentrationen, die sich an der EC10 für die Reproduktion im wässrigen Medium orientierten, konnte eine eindeutige und differenzielle Geninduktion in Abhängigkeit von der Konzentration des verwendeten Schadstoffes detektiert werden.

Zu den induzierbaren Genen gehörten dabei viele, für die bereits bekannt ist, dass sie entweder für Phase I oder II Enzyme des Biotransformationssystems kodieren, vor allem CYP P450 Gene, UDPGTs, GSTs, Carboxylesterasen aber auch Gene, deren Induktion als eine allgemeine Stressantwort gewertet werden kann, wie die HSP Gene. Weitere Gene, wie die Vitellogenine konnten ebenfalls durch die verwendeten Xenobiotika induziert werden.

In einer Studie von Menzel et al. (2001) konnte bereits die Induzierbarkeit von CYP 35 Genen durch PAKs, PCB und weitere Stoffe gezeigt werden. Dieses bestätigte sich in der gesamtgenomischen Untersuchung vor allem für die Xenobiotika β -Naphthoflavon und das Herbizid Atrazin. Zusätzlich konnten eine Induktion des CYP Gens 37B1 durch Fluoranthen sowie von CYP 35B2 durch Atrazin gezeigt werden. Weitere Gene, die sich in der gesamtgenomischen Untersuchung als schadstoffinduzierbar erwiesen haben, konnten auch durch andere Autoren als induzierbar durch Schadstoffe identifiziert werden. So zeigte Tawe et al. (1998) für das Glutathion-S-Transferase Gen *gst-4* eine Induzierbarkeit durch Paraquat. In der

gesamtgenomischen Untersuchung wurde dieses Gen durch DES überexprimiert und durch Atrazin und Fluoranthen reprimiert. Das Glutathion-S-Transferase Gen F56A.4I wurde in Untersuchungen von Custodia et al. (2001) durch Progesteron reprimiert, in der vorliegenden Arbeit durch Clofibrat überexprimiert.

Aus der Gruppe von 61 Genen, die für verschiedene Proteine aus unterschiedlichen Bereichen des Stoffwechsels kodieren, konnte das Metallothionin Gen *mtl-1* in der vorliegenden Arbeit als durch Clofibrat und β -Naphthoflavon induzierbar gezeigt werden. Custodia et al. (2001) konnten eine Induktion von *mtl-1* durch Progesteron und Liao und Freedman (1998) durch Cadmium zeigen.

Für die C-type Lectin und Collagen Gene ist nicht ganz klar, welche physiologische Bedeutung ihre Induktion durch die verwendeten Schadstoffe in dieser Untersuchung hat. Die physiologische Funktion der C-type Lectine steht in Beziehung mit der Immunabwehr von *C. elegans* (Jasmer et al., 2001; Mallo et al., 2002). Eine Aktivierung des Immunabwehrsystems könnte eine Antwort auf das Vorhandensein von Xenobiotika im Kulturmedium sein. Die Collagen Gene sind, neben vielen weiteren Funktionen, in den Aufbauprozess der Cuticula des Wurms involviert. Da die Cuticula eine Barriere zwischen dem Tier und seiner Umwelt bildet (Johnstone, 1994 und 2000; Kramer, 1994) steht eine Induktion dieser Gene durch Xenobiotika eventuell mit der Fähigkeit in Zusammenhang, sich vor Schadstoffen aus der Umgebung zu schützen.

Die beiden Vitellogenin Gene *vit-1* und *vit-6* wurden in der gesamtgenomischen Untersuchung als reprimierbar durch Atrazin und DES gezeigt. Eine Repression von *vit-6* konnte ebenfalls durch Custodia et al. (2001) für Progesteron gezeigt werden, wohingegen in der gleichen Untersuchung *vit-1* durch Progesteron überexprimiert wurde.

Die Ergebnisse der gesamtgenomischen Untersuchungen geben insgesamt bereits eindeutige Hinweise darauf, dass die schadstoffinduzierbare Genexpression von *C. elegans* ein gutes Nachweissystem für Umweltschadstoffe auch bei Konzentrationen darstellt in der die EC50 für Reproduktion und Mortalität nicht erreicht wird.

Die Hauptproblematik bei der Untersuchung mit dem gesamtgenomischen DNA-Microarray von *C. elegans* bestand darin, dass die Datenanalyse in Bezug auf das Projektziel zu aufwendig und umfangreich ist, da sich von den insgesamt fast 18.000 Genen des Chips nur ein kleiner Anteil als schadstoffinduzierbar erwies. Abhilfe bietet hier ein speziell zusammengestellter Low-Density Microarray, der nur solche

Gene enthält, von denen bekannt ist, dass sie schadstoffinduzierbar sind. Ein Beispiel für einen solchen Chip ist der von De Longueville et al. (2003) entwickelte Array, der für die Untersuchung der Wirkung verschiedener Xenobiotika auf die Genexpression von Hepatozyten von Ratten entwickelt wurde. Sie konnten trotz des limitierten Gensets von 59 Genen auf dem Array eindeutige Genexpressionsprofile für die eingesetzten Schadstoffe zeigen.

Für den in dieser Arbeit entwickelten *Caenorhabditis elegans* Toxchip wurde auf Grund der Ergebnisse mit dem gesamtgenomischen DNA-Array von *C. elegans* sowie aus Literaturrecherchen (Thakurta et al., 2002 und Custodia et al., 2001) eine Auswahl von 64 Genen sowie zwei Housekeeping-Genen als interne Kontrollen, zusammengestellt. Anschließend wurde seine Eignung als neues ökotoxikologisches Testsystem unter Einsatz von sieben verschiedenen Xenobiotika in jeweils drei unterschiedlichen Konzentrationen getestet. Die höchsten eingesetzten Xenobiotika-Konzentrationen orientierten sich dabei an der berechneten EC10 im Reproduktionstest. Für die beiden nächst geringeren Konzentrationen wurden Werte gewählt, die bei 80% bzw. bei 60% dieser Konzentration lagen.

Durch die Hybridisierungsexperimente mit dem *Caenorhabditis elegans* Toxchip und den sieben eingesetzten Xenobiotika konnten insgesamt nur 33 der 66 Gene des *Caenorhabditis elegans* Toxchips induziert werden, obwohl diese auf Grund der Voruntersuchung als induzierbar galten. Ein weiterer Unterschied zu den Ergebnissen mit dem gesamtgenomischen Chip ist, dass die auf dem *Caenorhabditis elegans* Toxchip befindlichen Gene teilweise durch andere Schadstoffe induzierbar waren. So wurde z.B. das Collagen Gen *col-38* in der gesamtgenomischen Untersuchung durch Atrazin, Clofibrat und β -Naphthoflavon induziert, in den *Caenorhabditis elegans* Toxchip Experimenten lediglich durch Fluoranthen. Die für Hitzeschock Proteine kodierenden Gene T27E4.3 und F44E5.5 konnten in der gesamtgenomischen Untersuchung nicht induziert werden, wurden jedoch aufgrund von Ergebnissen von Thakurta et al. (2002) mit in den Genkatalog aufgenommen. Sie erwiesen sich in den *Caenorhabditis elegans* Toxchip Experimenten als induzierbar durch β -Naphthoflavon.

Eine Erklärung für die genannten Unterschiede könnte in einer geringen Abweichung in der Kultur der Nematoden und RNA-Präparation sowie im Einsatz unterschiedlicher Xenobiotika-Stammlösungen liegen. Die zeitliche Trennung der beiden Untersuchungen ermöglichte es nicht, dieselben Stammlösungen zu verwenden.

Ein weiterer großer Unterschied zwischen den beiden Systemen liegt in der Datenerhebung und Auswertung. So wurden jeweils Scanner verschiedener Hersteller und auch unterschiedliche Software Pakete zur Auswertung der Daten verwendet. Trotz dieser wahrscheinlich technisch begründeten Abweichungen, konnten mit Hilfe des Celegans Toxchips Gene als Schadstoff induzierbar gezeigt werden, von denen man dieses auch annehmen konnte.

So gehören von den induzierten 33 Genen unter anderem 11 Gene zur Cytochrom P450 Genfamilie, das *vem-1* Gen zur Cytochrom b5 Familie, fünf Gene codieren für Vitellogenine, je drei Gene kodieren für UDP-Glucoronosyltransferasen, für Hitzeschockproteine, Carboxylesterasen und je zwei Gene für Glutathion-S-Transferasen. Weiterhin wurde das Collagen Gen *col-38*, das *sym-1* Gen und das Metallothionin Gen *mtl-1* durch mindestens eines der untersuchten Xenobiotika induziert. Zwei Gene, C29F7.2 und F58H1.2, deren Funktionen im Stoffwechsel noch unbekannt sind, konnten durch je zwei der eingesetzten Xenobiotika induziert werden.

Zur besseren Einschätzung der erhaltenen Expressionsmuster wird im Folgenden kurz auf die Charakteristika der induzierten Gengruppen eingegangen sowie ihre Induktion im Rahmen der Celegans Toxchip Experimente diskutiert.

CYP-Gene

Die Proteine der Cytochrom P450 (CYP) Superfamilie gehören zu den Monooxygenasen, enthalten Häm als prosthetische Gruppe und sind Teil eines MFO (Mixed-Function Oxidase)-Systems. Das Monooxygenasesystem zeichnet sich durch die Eigenschaft aus, ein Atom molekularen Sauerstoffs in ein hydrophobes Substrat einzubringen und das andere Sauerstoff-Atom zu Wasser zu reduzieren. CYPs machen die größte Enzymfamilie aus, die bisher in der Natur entdeckt worden ist (Snyder, 1998). Sie katalysieren viele katabole und anabole Reaktionen wie Entgiftungsprozesse und Biotransformationen und spielen eine wichtige Rolle bei der Lipid-, Cholesterin- und Steroidhormonsynthese (Xu et al., 2001). So katalysieren CYP-Proteine z.B. die Phase I der Biotransformationen, in denen die Polarität des Substrats durch Einführen reaktiver Gruppen erhöht wird (Pemberton und Barrett, 1989; Schuetz, 2001). CYPs aktivieren Sauerstoff, oxidieren das Substrat durch Einfügen eines Atoms molekularen Sauerstoffs und lösen anschließend die Bindung zum Produkt (Guengerich, 2001). Durch die erhöhte Löslichkeit kann der Stoff

leichter vom Körper ausgeschieden werden oder andere Enzyme wandeln ihn in der Phase II des Biotransformationssystems weiter um (Sheweita, 2000). CYPs spielen also eine entscheidende Rolle bei der Detoxifikation von Giften und chemischen Kanzerogenen, können aber auch harmlose Stoffe in gefährlichere umwandeln, indem sie zum Beispiel Prokarzinogene aktivieren (Sueyoshi und Negishi, 2001).

C. elegans besitzt ca. 80 P450 Gene (Nelson, 1999), die durch verschiedenste Xenobiotika, wie zum Beispiel PAKs, induziert werden können (Menzel et al., 2001). Von den 10 durch die *C. elegans* Toxchip Experimente als induzierbar gezeigten CYP P450 Genen, wurden vier aus der Unterfamilie 35A sowie die CYP 35B2 und 35C1 durch eine Konzentration von 5 mg/l β -Naphthoflavon induziert. Diese Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen von Menzel et al. (2001) für RT-PCR Untersuchungen an diesen Genen sowie für die Gene CYP 35A1, 2, 3, 4 und 35C1 auch für die gesamtgenomischen Untersuchungen. CYP 35B2 wurde neben β -Naphthoflavon auch durch alle verwendeten TBT Konzentrationen stark induziert. In der gesamtgenomischen Untersuchung konnte 35B2 nur durch Atrazin induziert werden. Endosulfan konnte 14A5 und 34A9 in den Konzentrationen von 1,5 und 0,3 mg/l sowie 34A9 auch mit einer Konzentration von 0,06 mg/l induzieren. Das Gen 35C1 ist das durch Fluoranthen am stärksten induzierte Gen: Das deckt sich mit Ergebnissen, die bereits durch Menzel et al. (2001) mit einem Genfilter und mit den RT-PCR-Untersuchungen erzielt wurden. Weiterhin konnte Fluoranthen das Gen 37B1 bei einer Konzentration von 0,5 mg/l induzieren. Bisher wurde noch keine Induktion dieses Gens durch Fluoranthen nachgewiesen. In der gesamtgenomischen Untersuchung wurde CYP 37B1 nicht durch Fluoranthen, jedoch durch β -Naphthoflavon und Clofibrat induziert. Die Untersuchungen mit einem Genfilter zeigten keine Induktion des Gens bei Exposition mit β -Naphthoflavon (Menzel et al., 2001). Eine Überprüfung durch weitere Hybridisierungsexperimente sowie vergleichende RT-PCR Untersuchungen, erscheint angezeigt. Durch TBT konnte des Weiteren das Gen 35B1 durch die beiden höchsten verwendeten Konzentrationen induziert werden. In der gesamtgenomischen Untersuchung zeigte sich für 35B1 eine Induktion durch Atrazin, die jedoch nicht in den Experimenten mit dem *C. elegans* Toxchip nachweisbar war. Da die P450-Gene bekannt für ihre Beteiligung an Schadstoff-metabolisierenden Prozessen sind, entsprechen die Induktionsergebnisse den Erwartungen. Weiterhin erlauben die genannten Ergebnisse die Annahme, dass

die genannten CYP Genfamilien am Metabolismus der eingesetzten Xenobiotika beteiligt sind.

Das Gen CYP 35A3 wurde durch Atrazin, Clofibrat, Endosulfan und Fluoranthen reprimiert, ebenso wie das Gen CYP 35A5 durch Atrazin und Clofibrat und das Gen CYP 35A1 durch Clofibrat. Dieser Befund deckt sich nicht mit den Untersuchungen des gesamtgenomischen Microarrays von *C. elegans*. Er entspricht auch nicht den Erwartungen, da Menzel et al. (2001) für die Familie CYP 35A in Genfilterexperimenten und in den RT-PCR Untersuchungen eine Induktion mit den Schadstoffen Atrazin und Fluoranthen nachweisen konnte. Weiterhin wurde gezeigt, dass CYP 35A3 auch durch andere PAKs bzw. durch PCB stark induziert werden kann (Menzel et al., 2001). Eine Repression verschiedener CYP Gene ist bis dato für *C. elegans* noch nicht nachgewiesen worden. Jedoch wurde bei Ratten und Mäusen eine Repression von verschiedenen CYP Genen durch Clofibrat, Phenobarbital und dem PAK 3-Methylcholanthren (3MC) nachgewiesen (Gerhold et al., 2001; Cui et al., 2000). Eine Überprüfung der Ergebnisse durch weitere Hybridisierungsexperimente wäre angebracht.

UDPGT-Gene

UDP-Glucuronosyltransferasen (UDPGTs) gehören zu den Phase II Enzymen. Es inaktiviert das Substrat durch Erhöhung der Löslichkeit und erleichtert seine Exkretion (Zhang et al., 1996; Tephly und Burchell, 1990). Lipophile Substrate werden mit Hilfe des Cosubstrats UDP-Glucuronsäure zu hydrophileren Glucuroniden transformiert (Tukey und Strassburg, 2000). Sie katalysieren die Addition der Glykosyl-Gruppe eines Nukleotid-Zuckers an verschiedene endogene und exogene Substanzen, darunter auch viele Xenobiotika wie Benzo(a)pyren (King et al., 2000). Für das Gen C10H11.3 konnte eine Expression durch β -Naphthoflavon sowie durch Endosulfan gezeigt werden. Dieses deckt sich im Fall von β -Naphthoflavon mit den Ergebnissen aus der Untersuchung mit dem gesamtgenomischen Microarray von *C. elegans*. Dagegen konnte C08F11.8 nur durch β -Naphthoflavon überreprimiert werden, während in der gesamtgenomischen Untersuchung C08F11.8 durch Clofibrat und Atrazin, nicht jedoch durch β -Naphthoflavon induziert. C23G10.6 wurde durch Endosulfan überreprimiert und durch Atrazin und Fluoranthen reprimiert. Diese Repression deckt sich nicht mit den gesamtgenomischen Untersuchungen. Es entspricht auch nicht den Erwartungen, da

UDP-Glucuronosyltransferasen einen Beitrag zur Detoxifikation in den Zellen leisten und bereits gezeigt wurde, dass sie durch viele Xenobiotika unter anderem auch durch PAKs induziert werden können (Tukey und Strassburg, 2000). Weitere RT-PCR Analysen und Experimente mit *lacZ*- oder GFP-Fusionskonstrukten könnten zur Bestätigung der Ergebnisse hinzugezogen werden.

GST-Gene

Glutathion-S-Transferasen (GSTs) sind eine große Familie von cytosolisch und membrangebundenen Phase II Enzymen, die mit Hilfe von Glutathion Karzinogene, Medikamente und Produkte der Phase I Transformation metabolisieren (Board et al., 2001; Vondracek et al., 2002). Sie inaktivieren toxische und karzinogene Substanzen, indem sie die Bildung von Glutathion-Konjugaten katalysieren (Sheweita, 2000). Dadurch werden die Stoffe hydrophiler und können leichter eliminiert werden (Suzuki et al., 2001). Weiterhin spielen sie eine Rolle beim Transport von Hormonen und endogenen Metaboliten. GSTs werden unter anderem durch Schwermetalle und PAKs induziert.

In den Celegans Toxchip Experimenten konnte das Gen Y48E1B10 durch Atrazin in den Konzentrationen von 25 mg/ l und 5 mg/ l sowie das Gen R03D7.6 durch β -Naphthoflavon bei einer Konzentration von 5 mg/ l induziert werden. Diese Ergebnisse entsprechen den Erwartungen. In der gesamtgenomischen Untersuchung wurde das Gen Y48E1B10 zusätzlich noch durch β -Naphthoflavon und Clofibrat und R03D7.6 durch Atrazin induziert.

In den Celegans Toxchip Experimenten wurde das Gen R03D7.6 durch den Einsatz von Clofibrat in einer Konzentration von 10 mg/ l reprimiert. Eine Repression von GST Genen bei Ratten konnte durch Gerhold et al. (2001) gezeigt werden, wobei die Bedeutung dieser Repression noch unklar bleibt.

Carboxylesterasen

Carboxylesterasen gehören zu einer Multigenfamilie, deren Produkte im Endoplasmatischen Retikulum vieler Säugergewebe zu finden sind. Sie katalysieren die Hydrolyse von einem großen Spektrum von Chemikalien, die Ester- und Amidverbindungen enthalten. Weiterhin sind sie involviert in die Detoxifikation und metabolische Aktivierung verschiedener Pharmazeutika, Umweltschadstoffe und Karzinogene (Sato und Hosokawa, 1998). Carboxylesterasen können u.a. durch

PAKs (Nousiainen et al., 1984) und Clofibrat (Ashour et al., 1987; Hosokawa et al., 1988; Mentlein et al., 1986) induziert werden.

In den *Caenorhabditis elegans* Toxchip Hybridisierungsexperimenten konnte eine Induktion der beiden für Carboxylesterasen kodierenden Gene B0238.13 und F13H6.3 gezeigt werden, wobei beide durch β -Naphthoflavin in einer Konzentration von 5 mg/ l überexprimiert wurden. Dieses korrespondiert mit den Ergebnissen von Nousiainen et al. (1984) und entspricht den Erwartungen. Für das Gen B0238.13 konnte zusätzlich eine Induktion durch Endosulfan in den Konzentrationen 1,5 mg/ l und 0,3 mg/ l gezeigt werden. Das Gen C17H12.4 zeigte bei einer Konzentration von 10 mg/ l Clofibrat eine Repression. Dieses widerspricht jedoch den Ergebnissen aus der Untersuchung mit dem gesamtgenomischen Microarray von *C. elegans*, bei der für alle drei genannten Gene eine eindeutige Induktion durch Clofibrat gezeigt werden konnte. Hier sollten weitere Hybridisierungsexperimente mit dem *Caenorhabditis elegans* Toxchip zur Überprüfung dieser Ergebnisse durchgeführt werden.

HSP-Gene

HSP-Gene kodieren für Hitzeschock-Proteine, die in allen Lebewesen hoch konserviert sind. Als Induktoren wirken beschädigte und falsch gefaltete zelluläre Proteine, welche durch Stress entstehen. Die Genexpression wird durch HSTFs (Hitze Schock Transkriptions Faktoren) reguliert, welche nach Stresseinwirkung (und daraus resultierenden beschädigten Proteinen) ihre Konformation ändern, an den HSP-Promotor binden und dann die Expression der HSP-Gene induzieren (Thakurta et al., 2002). Einige HSPs werden ständig expremiert, andere nur unter bestimmten Bedingungen. HSPs dienen als molekulare Chaperone, um bei der Proteinfaltung zu assistieren (Snyder et al., 2001; Köhler et al., 1998) und beim Proteintransport zu helfen (Power et al., 1998). Die HSPs werden nach ihrem Molekulargewicht in fünf Gruppen eingeteilt (David et al., 2003). Bei diesen Gruppen handelt es sich um die HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 und die Familien der kleinen HSP12-40.

Die *Caenorhabditis elegans* Toxchip Experimente wiesen Induktionen für HSP70- und HSP16-Gene nach. HSP70-Gene sind bekannt für ihre Induzierbarkeit durch extreme Temperaturen, osmotischen Schock, Schwermetalle oder organische Toxine (Hassanein et al., 1999). HSP16-Gene können durch extreme Temperaturen, H₂O₂, Ozon und pH-Wert-Schwankungen induziert werden (Link et al., 1999).

Das Xenobiotikum β -Naphthoflavon induzierte in der Konzentration von 5 mg/ l drei HSP-Gene des *Caenorhabditis elegans* Toxchips, dabei gehören T27E4.2 und T27E4.3 zu den HSP16 Genen und F44E5.5 zu den HSP70 Genen. T27E4.3 und F44E5.5 konnten in der gesamtgenomischen Untersuchung nicht induziert werden. Ihre Auswahl für den Genkatalog des *Caenorhabditis elegans* Toxchip erfolgte auf Grund von Ergebnissen von Thakurta et al. (2002), die eine starke Induktion der beiden Gene bedingt durch Hitzestress zeigen konnten. Für F44E5.5 konnten Custodia et al. (2001) eine Induktion durch Progesteron nachweisen. Die Induktion dieser Gene lässt darauf schließen, dass β -Naphthoflavon als PAK eventuell einen allgemeinen Stress auslöst, der sich dann durch die Überexpression dieser Gene manifestiert.

Metallothionine

Metallothionine (MTs) sind cytosolische, nichtenzymatische Proteine mit geringem Molekulargewicht. Sie zeichnen sich durch große Hitzestabilität, hohen Cysteingehalt und durch das Fehlen von aromatischen Aminosäuren aus. Sie binden sowohl toxische als auch nicht toxische Metallionen, wie Zink, Kupfer, Silber, Cadmium und Quecksilber (Hamza-Chaffai et al., 1996). Die wichtigsten Funktionen der Metallothionine sind Schutz vor Cadmium, Speicher für Zink und Kupfer und das Einfangen von Radikalen. Anhand von Strukturmerkmalen werden sie in die drei Klassen I, II und III eingeteilt (Klaassen et al., 1999).

Das in dieser Untersuchung durch β -Naphthoflavon und Fluoranthren induzierbare *mtl-1* Genprodukt wirkt bei der Metalldetoxifikation und Stress-Adaptation mit und wird in allen *C. elegans* Stadien bei Cadmiumzufuhr oder Hitzestress in den Darmzellen induziert (<http://wormbase.org/>). In drei Zellen des Pharynx wurde zudem eine konstitutive Expression beobachtet, indem ein *mtl-1::lacZ*-Fusionskonstrukt transgen expremiert wurde (Freedman et al., 1993). Zusätzlich zu den Beobachtungen, dass die Expression durch Schwermetalle induzierbar und zellspezifisch ist, wurde gezeigt, dass sie auch abhängig vom Entwicklungsstadium ist. In jungen Larvenstadien wird das Gen stärker expremiert als in adulten Nematoden. Das Gen *mtl-1* besitzt viele Wiederholungen von GATA Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen, an die sich der Transkriptionsfaktor *elt-2* binden kann. Es wurde vermutet, dass *elt-2* die Expression von *mtl-1* stetig induziert. Ein zweiter Metall-sensitiver Faktor sorgt möglicherweise für die Repression der *mtl-1* Transkription.

Obwohl β -Naphthoflavon und Fluoranthen keine Metalleigenschaften besitzen und nicht von Metallothioninen gebunden werden können, wird das *mtl-1* Gen durch sie induziert. Eventuell bewirken die beiden Xenobiotika durch Proteinschädigungen einen Stresszustand in den Zellen. Sofern der reprimierende Faktor existiert, ist es wahrscheinlich, dass er durch β -Naphthoflavon und Fluoranthen inaktiviert wird. Um jedoch Näheres darüber zu erfahren, müssten die Auswirkungen beider Xenobiotika auf die Zelle und die einzelnen Proteine studiert werden.

Vitellogenine

Vitellogenine (VTGs) werden auch in *C. elegans* durch Östrogene bzw. östrogenartig wirkende Substanzen (Endokrine Disruptoren) induziert (Custodia et al., 2001). Vitellogenine sind Eidotter-Proteine, die hauptsächlich in weiblichen Tieren zu finden sind (Kohra et al., 1999). Sie wurden bereits in vielen Versuchsreihen als Biomarker eingesetzt, da sie durch Umwelthormone auch bei Männchen induziert werden. In *C. elegans* kommen sie in den Hermaphroditen vor. Die Expression findet insbesondere in den Zellen des Darmtraktes in jungen adulten Tieren statt (MacMorris und Blumenthal, 1993). Eine signifikant verstärkte Produktion der VTGs lässt darauf schließen, dass die eingesetzte Substanz Östrogenaktivität aufweist. In der Umwelt können solche Stoffe zur Störung Hormon gesteuerter Abläufe im Körper führen und eine „Verweiblichung“ von männlichen Tieren auslösen. Da eine große Ähnlichkeit zwischen Vertebraten- und Nematoden-Vitellogeninen gefunden worden ist, können die durch Nematoden erhaltenen Ergebnisse auch für die humane Forschung von Bedeutung sein (Spieth et al., 1985).

In den *C. elegans* Toxchip Experimenten konnte für das Vitellogenin Gen *vit-3*, welches in dieser Untersuchung gleichzeitig auch den Genen *vit-4* und *vit-5* entspricht, eine Induktion durch β -Naphthoflavon in einer Konzentration von 5 mg/l sowie eine Repression durch Fluoranthen in einer Konzentration von 0,5 mg/l nachgewiesen werden. Eine Induktion des Gens konnte bereits in den Untersuchungen mit dem gesamtgenomischen *C. elegans* DNA-Microarray für Fluoranthen gezeigt werden. Eine Untersuchung der entsprechenden Transkriptionsfaktoren könnte Aufschluss über die Art und Wirkung von PAKs auf die Vitellogenin Geninduktion geben und legt gleichzeitig die Vermutung nahe, dass PAKs Östrogenaktivität besitzen.

Für das Gen *vit-6* konnte eine eindeutige Induktion für alle drei eingesetzten DES Konzentrationen gezeigt werden. Katchamart et al. (2002) wiesen durch Einsatz von DES eine deutliche Steigerung des Plasma-Vitellogenin-Spiegels bei der Regenbogenforelle nach. TBT in einer Konzentration von 0,06 mg/ l bewirkte eine eindeutige Induktion des Vitellogenin Gens *vit-2*. TBT wird genauso wie DES als endokriner Disruptor angesehen (Alzieu, 2000; Fent, 2003). Endokrine Disruptoren ähneln in ihrem chemischen Aufbau sehr stark körpereigenen Hormonen und können durch unterschiedliche Wirkweisen in den körpereigenen Hormonhaushalt eingreifen und nachfolgend zu erheblichen Störungen führen. Alzieu (2000) formulierte die Vermutung, dass bereits TBT Konzentrationen unterhalb von 1 ng/ l bei vielen weiblichen Gastropoden zur Ausprägung männlicher Geschlechtsmerkmale führen können. Konzentrationen über 1 ng/ l können Effekte auf die Reproduktion von Muscheln und Fischen haben. Die Induktion von Vitellogenin Genen durch DES und TBT unterstreicht ihr Potenzial als Endokrine Disruptoren auch für *C. elegans*.

Collagene

Die Collagene bilden eine Proteingruppe, die vor allem am Aufbau der Kutikula beteiligt sind. Das Gen *col-38* (F54C9.4) gehört zu dieser Collagen Genfamilie und sein Produkt zeichnet sich durch 20 Kollagen-Tripel-Helix Wiederholungen aus. Durch RNAi-Versuche wurde festgestellt, dass das Gen essenziell für eine normale Körper-Morphologie ist. Ein Ausschalten des Gens führte zu einem *dpy*(dumpy=untersetzt)-Phänotyp. Durch Microarray-Analysen wurde ermittelt, dass das Gen ohne Schadstoffinduktion erst ab dem dritten Larvenstadium abgelesen wird (Hill et al., 2000). Das Protein ist Bestandteil der Kutikula von *C. elegans* und erhöht wahrscheinlich die Stabilität und Flexibilität der Kutikula. Es sind jedoch keine Ergebnisse zur Regulation der Genexpression veröffentlicht.

Die Induktion des Gens *col-38* durch Fluoranthen in den *C. elegans* Toxchip Experimenten sowie durch Atrazin, Clofibrat und β -Naphthoflavon in der gesamtgenomischen Untersuchung, könnte bedeuten, dass das Gen möglicherweise indirekt durch den Schadstoff-Metabolismus induziert wird. Diese Vermutung wird bestärkt durch die Ähnlichkeit des kodierten Proteins mit einem *S. cerevisiae* HSP40 Protein. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die gefundene Induktion könnte sein, dass die Kutikula durch vermehrten Einbau des Proteins gestärkt werden soll, um weniger durchlässig für den Schadstoff zu sein.

sym-1

Das Gen *sym-1* (*sym* steht für synthetisch letal mit *mec-8*) kodiert für ein Protein mit 15 benachbarten Leucin-reichen Wiederholungen und einer Signalsequenz. RNA Interferenz (RNAi) ohne Schadstoffinduktion zeigt keine Auswirkungen, es wurde jedoch eine funktionale Überlappung mit dem *mec-8* Gen entdeckt, welches für einen Regulator des alternativen RNA-Splicings kodiert (Yochem et al., 2001). Bei einer *mec-8* loss-of-function Mutation zeigte sich kein auffallender Phänotyp. Zusammen mit einer Nonsense-Mutation in *sym-1* entstanden jedoch letale Phänotypen mit einer Störung in der Bindung zwischen Muskeln und extrazellulärer Kutikula (Kari et al., 2000). Aufgrund von GFP-Reporter-Gen-Assays und Northern Blots wurde die Hypothese aufgestellt, dass das *sym-1*-Protein zur Muskelbindung an die Epidermis benötigt wird. Dieselbe Funktion besitzt vermutlich auch ein Protein, das durch alternatives Splicing entsteht. Wenn beide Proteine fehlen, entsteht der beobachtete Phänotyp (Spike et al., 1999).

Das Gen *sym-1* wurde durch 0,5 mg/ l Fluoranthen reprimiert. Eine Möglichkeit der Erklärung dieser Repression könnte sein, dass Fluoranthen Schäden an Transkriptionsfaktoren verursacht, die zur Expression von *sym-1* beitragen. Eine andere Möglichkeit wäre, dass Inhibitoren der Transkription durch Biotransformationsprozesse aktiviert werden. Anhand der bisher publizierten Ergebnisse kann jedoch der wirkliche Grund nicht ermittelt werden. In der gesamtgenomischen Untersuchung wurde *sym-1* durch die Xenobiotika β -Naphthoflavon, Clofibrat und Atrazin induziert.

Durch Promotordeletionskonstrukte könnte der für die Expression verantwortliche Promotorbereich identifiziert werden. Sequenzanalysen könnten Rückschlüsse auf den Transkriptionsfaktor zulassen. Durch gezielte Deletion der Gene der Transkriptionsfaktoren und einer anschließenden Northern Blot Analyse könnte der korrekte Transkriptionsfaktor auffindig gemacht werden, der die Expression von *sym-1* beeinflusst.

C29F7.2

Die Funktion des Gens *C29F7.2* ist bislang nicht bekannt. Seine Induktion durch 5 mg/ l β -Naphthoflavon, 0,5 mg/ l Fluoranthen und DES in allen drei eingesetzten Konzentrationen in den *Celegans* Toxchip Experimenten sowie durch β -Naphthoflavon und Clofibrat in der gesamtgenomischen Untersuchung, weisen auf

eine Beteiligung am Prozess des Schadstoffmetabolismus hin. Leider liegen derzeit noch keine Ergebnisse aus RNAi-, Microarray- oder anderen aussagekräftigen Analysen vor, die diese Vermutung untermauern oder widerlegen würden.

F58H1.2

Die Funktion des Gens F58H1.2 ist bislang nicht ermittelt worden. Der RNAi-Phänotyp zeigt keine Störungen. Die bisher durchgeführten, entwicklungsabhängigen Microarray-Analysen zeigten, dass das Gen in den L1- bis L4-Larven stetig expremiert wird (Hill et al., 2000). Die hohe Übereinstimmung (75,8%) mit dem Transkriptionsfaktor COE2 des Menschen und der Maus (*Mus musculus*) legt die Vermutung nahe, dass es sich auch hier um einen Transkriptionsfaktor handelt. Das Gen wurde bei Atrazin Konzentrationen von 5 mg/ l und 1 mg/ l, bei einer Fluoranthen Konzentration von 0,5 mg/ l und den beiden höchsten verwendeten Clofibrat Konzentrationen repremiert. In der gesamtgenomischen Untersuchung wurde F58H1.2 durch β -Naphthoflavon und Clofibrat induziert. Wenn es sich tatsächlich um einen Transkriptionsfaktor handelt, so könnte er an der Expression einer der zuvor beschriebenen Gene beteiligt sein. Das könnte mit einer loss-of-function Mutation oder RNAi und anschließender cDNA-Microarray Analyse überprüft werden. Ein Northern Blot wäre zur abschließenden Absicherung sinnvoll.

Vergleich Reproduktionstest und Celegans Toxchip

Im Folgenden sollen die EC50 Werte der Reproduktion sowie die Ergebnisse aus den Genexpressionsuntersuchungen mit dem Celegans Toxchip für die untersuchten Schadstoffe in Bezug auf die Sensitivität der beiden Systeme einander gegenübergestellt werden (für einen Überblick siehe auch Tabelle 18).

Für das PAK β -Naphthoflavon wies Rödel (2002) einen EC50 Wert von 18,94 mg/ l nach. Eine schadstoffinduzierte Genexpression konnte durch die Experimente mit dem Celegans Toxchip noch für eine Konzentration von 5 mg/ l nachgewiesen werden. Die Detektion der Auswirkung von β -Naphthoflavon auf *C. elegans* mit Hilfe des Celegans Toxchips ist somit fast viermal sensitiver.

Für das Herbizid Atrazin ist das Ergebnis zugunsten des Celegans Toxchips noch deutlicher. So konnten bereits bei einer Konzentration von 1 mg/ l Geninduktionen in den Celegans Toxchip Experimenten durch Atrazin gezeigt werden, wohingegen Rödel (2002) eine EC50 der Reproduktion bei 86,64 mg/ l feststellte.

Für Endosulfan zeigte Rödel (2002) eine EC50 bei 6,83 mg/ l, in den *Caenorhabditis elegans* Toxchip Experimenten konnte durch Endosulfan bereits eine Genexpression bei einer Konzentration von 0,06 mg/ l gezeigt werden. Das entspricht einer 100fach sensitiveren Detektion.

Das aus Steinkohlenteer gewonnene Fluoranthren erwies sich im Reproduktionstest als relativ stark wirksam. Die EC50 betrug hier 0,90 mg/ l (Rödel, 2002). Für die Induktion der Genexpression reichte in den *Caenorhabditis elegans* Toxchip Experimenten bereits eine Konzentration von 0,02 mg/ l.

Das Pharmazeutikum Clofibrat war im Reproduktionstest das auf *C. elegans* am schwächsten wirkende Xenobiotikum (Rödel, 2002). Der EC50 Wert lag in der Untersuchung von Rödel (2002) bei 103,67 mg/ l. Bei den *Caenorhabditis elegans* Toxchip Experimenten reichte eine Konzentration von 0,4 mg/ l bereits für die Induktion der Genexpression aus. Damit reagierte sie fast 250 Mal sensitiver. Zu den stärksten im Reproduktionstest wirkenden Xenobiotika gehörte Tributylzinnchlorid (Rödel, 2002). Der EC50 Wert wurde zu 0,22 mg/ l bestimmt (Rödel, 2002), liegt jedoch damit immer noch über 90 Mal höher als die Konzentration, die im Rahmen der *Caenorhabditis elegans* Toxchip Experimente ausreichend war, um eine Genexpression durch Tributylzinnchlorid zu induzieren.

Diese Ergebnisse zeigen sehr deutlich, dass die schadstoffinduzierbare Genexpression von *Caenorhabditis elegans*, ermittelt mit Hilfe des *Caenorhabditis elegans* Toxchip, eine erheblich sensitivere Nachweismethode für verschiedene Schadstoffe ist, als der von Rödel (2002) etablierte Reproduktionstest für *C. elegans* im Flüssigmedium.

Tab. 18: Vergleich der Sensitivität von Reproduktion (EC50) und der Genexpression aufgenommen mit dem *Caenorhabditis elegans* Toxchip

Substanz	EC50 [mg/ l] der Reproduktion	Konzentration bei der die Genexpression induziert wurde [mg/ l]	Faktor, um den die Genexpression sensitiver ist
β-Naphthoflavon	18,94	5	3,8
Atrazin	86,64	1	86,6
Clofibrat	103,67	0,4	259,2
Endosulfan	6,83	0,06	113,8
Fluoranthren	0,90	0,02	45
Tributylzinnchlorid	0,22	0,0024	91,7

Ausblick und Verwertbarkeit des Celegans Toxchip in der Ökotoxikologie

Durch die Experimente mit dem gesamtgenomischen DNA-Array von *Celegans* sowie den Experimenten mit dem *Celegans* Toxchip ist deutlich geworden, dass die schadstoffinduzierbare Genexpression von *Celegans* ein hohes Potenzial als möglicher Biomarker in *C. elegans* und darüber hinaus besitzt. Im Vergleich mit weiteren Methoden zur Ermittlung der Genexpression wie RT-PCR musste jedoch festgestellt werden, dass die RT-PCR die noch deutlich sensitivere Methode ist. Dieses wurde ebenfalls von Vondracek et al. (2002) und Wu et al. (2001) festgestellt und kann u.a. auch daran liegen, dass hier eine Amplifizierung der Genprodukte stattfindet. Diese Amplifizierung bildet jedoch auch eine mögliche Fehlerquelle, die bei der Arraytechnologie nicht vorhanden ist. Im weiteren Vergleich zur RT-PCR bietet die Arraytechnologie den Vorteil, dass viele Gene gleichzeitig und in einem Experiment analysiert werden können. So ist die Erstellung differenzieller Genexpressionsprofile in Abhängigkeit des verwendeten Schadstoffs möglich. Das wäre vor allem für einen späteren Einsatz bei der Untersuchung von Umweltproben unbekannter Zusammensetzung wichtig. Die Untersuchung der Genexpression mit dem *Celegans* Toxchip zeigte im Ganzen gesehen zwar nicht die erwartete Vielfalt bei der Induktion von Genen vor allem im Vergleich zur gesamtgenomischen Untersuchung, was jedoch vor allem technisch bedingt zu sein scheint. So ist ein kritischer Faktor das Einsetzen genau definierter RNA-Konzentrationen. Die Bestimmung der RNA-Konzentrationen erfolgte durch Herstellen entsprechender Verdünnungen und einer anschließenden Messung dieser mit Hilfe eines Fotometers. Das mehrmalige Messen der Konzentrationen brachte dabei Geräte bedingt bereits Abweichungen, die zusätzlich durch das Herstellen neuer Verdünnungen deutlich erhöht wurden. Des Weiteren könnte auch die Applikation der Schadstoffe vor allem in den teilweise sehr geringen Konzentrationen durch technische Fehler, wie durch das Pipettieren ein Problem darstellen. Hier könnte z.B. Abhilfe durch veränderte Konzentrationen der Xenobiotika Stammlösungen geschafft werden. Möglicherweise muss auch noch an der Reinheit der RNA-Proben gearbeitet werden, welche besonders bei der Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen sehr wichtig ist. Verunreinigungen wie Proteine oder Lipide können zu unspezifischen Bindungen der markierten cDNA an die Matrix-Oberfläche führen (Murphy, 2002). Dennoch bietet der *Celegans* Toxchip für die Ökotoxikologie eine Vielzahl von Vorteilen. Im Vergleich mit etablierten ökotoxikologischen Testsystemen wie dem

Reproduktionstest, ist deutlich zu erkennen, dass der *Caenorhabditis elegans* Toxchip eine sehr viel sensitivere Detektion der Auswirkung von Schadstoffen auf biologischer Ebene ermöglicht. Durch eine gezielte Auswahl an schadstoffinduzierbaren Genen kann ein breites Spektrum an Umweltchemikalien erfasst und bereits in geringen Konzentrationen nachgewiesen werden.

Weiterhin können durch die relativ kurze Testdauer sehr schnell Ergebnisse erzielt werden. Die Biologie von *C. elegans* ermöglicht es zu dem, dass Untersuchungen in dem Substrat Wasser und später eventuell auch im Boden durchgeführt werden können.

Da die Auswirkungen einer Umweltchemikalie hier jedoch nur auf Transkriptionsebene beobachtet werden kann, oftmals aber auch erst die Translation durch bestimmte Stoffe beeinflusst wird, bzw. auf eine Transkription nicht zwingend eine Translation folgen muss, lassen die durch den *Caenorhabditis elegans* Toxchip nachgewiesenen Veränderungen des RNA-Spiegels nur bedingt Rückschlüsse auf Veränderungen auf Proteinebene zu (Debouck und Goodfellow, 1999). Zusätzliche Western Blots oder ELISA-Tests könnten hier jedoch die Aussagekraft der Methode verbessern. Zusätzlich parallel laufende etablierte ökotoxikologische Testsysteme wie der Reproduktionstest könnten helfen, die Bedeutung der Schadstoffauswirkung auf biologischer Ebene abzusichern. Eine Möglichkeit wäre hier mit der EC50 der Reproduktion für einen spezifischen Schadstoff gleichzeitig mit dem *Caenorhabditis elegans* Toxchip das entsprechende Genexpressionsmuster aufzunehmen und dann die Konzentration in weiteren *Caenorhabditis elegans* Toxchip Experimenten soweit herunterzufahren, bis keine Veränderung der Expression durch den verwendeten Schadstoff mehr nachzuweisen ist. Diese Vorgehensweise könnte auch dabei nützlich sein, bisherige Schadstoff-Grenzwerte für eine Substanz neu zu überdenken.

Natürlich könnte der Toxchip auch in der Pharmazie zur Medikamentenentwicklung herangezogen werden. Untersuchungen haben bereits gezeigt, dass fast 65% der menschlichen Krankheitsgene einen Gegenpart in *C. elegans* haben (Baumeister, 2002). Auf dieser Grundlage könnten Pharmazeutika hinsichtlich ihres Potenzials, einen Stresszustand in den Zellen hervorzurufen, untersucht werden und ihre Nebenwirkungen besser eingeschätzt werden. Ebenso ließen sich Wechselwirkungen verschiedener Medikamente auf molekularer Ebene analysieren.

Abschließend bleibt festzustellen, dass die induzierbare Genexpression ein signifikant sensitiverer Marker für den biologischen Nachweis der verwendeten Schadstoffe war als im Vergleich verwendete Reproduktionstest. Sie sollte deshalb als ein zusätzlicher Biomarker im Bereich der Ökotoxikologie eine stärkere Anwendung finden. So könnten Umweltproben mit seiner Hilfe auf ihre Induktionswirkung in einer Art Vorscreening getestet werden. Darüber hinaus könnte ein optimierter *Celegans* Toxchip in begrenztem Umfang auch Hinweise auf die Art der Belastung geben. Weiterhin ist vorstellbar, dass mit Hilfe von Genexpressionstests Grenzwerte für Schadstoffbelastungen daraufhin überprüft werden, ob diese möglicherweise doch bereits eine Stressantwort auf molekularer Ebene induzieren.