

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines Biotestsystems mit dem es möglich ist, die biologische Wirkung von Umweltchemikalien wie zyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, polyhalogenierte Biphenyle, Steroide, Pflanzenschutzmittel und Pharmazeutika in umweltrelevanten Konzentrationen in den Medien Wasser und Boden abzuschätzen.

Als Testsystem wurde die schadstoffinduzierbare Genexpression auf ihre Verwendbarkeit als neuer ökotoxikologischer Biomarker überprüft. Der Bodennematode *Caenorhabditis elegans* wurde als Testorganismus ausgewählt, da von ihm einerseits die gesamte Erbinformation entschlüsselt ist und er andererseits schon seit Jahren erfolgreich in ökotoxikologischen Studien eingesetzt wurde. Die Aufnahme der Genexpression erfolgte mit Hilfe der DNA-Array Technologie. Als bevorzugte Targetgene dienten Gene, die sich durch die obengenannten Substanzgruppen induzieren lassen, insbesondere Phase I und II Gene der Biotransformation. Darüber hinaus sollten noch weitere Gene mit einem hohen, Schadstoff spezifischen Induktionspotenzial eingesetzt werden.

Die Auswahl der auf dem Celegans Toxchip zu verwendenden Gene wurde durch Untersuchungen mit einem gesamtgenomischen DNA-Microarray von *C. elegans* vorgenommen. Dabei wurden als Repräsentanten der obengenannten Schadstoffgruppen z.B.  $\beta$ -Naphthoflavon, Atrazin, Clofibrat, Diethylstilbestrol und Fluoranthen eingesetzt. Durch diese Untersuchungen konnten 66 relevante Gene identifiziert werden, die die Grundlage für die Entwicklung des Celegans Toxchips bildeten.

Der Celegans Toxchip ist ein neues Biotestsystem, mit der Expressionszustand einer Reihe von ausgewählten, Xenobiotika induzierbaren Genen parallel untersucht werden kann. Nach der Auswahl der Gene wurden entsprechende cDNA-Fragmente durch RT-PCR bzw. Klonierungen hergestellt, überprüft, gereinigt und damit der eigentliche Celegans Toxchip, ein Low-Density DNA-Array, hergestellt.

Die Einsatzfähigkeit und Sensitivität als ökotoxikologisches Testsystem wurde mit Hilfe von sieben verschiedenen Xenobiotika in jeweils drei unterschiedlichen Konzentrationen getestet.

Durch die Hybridisierungsexperimente mit dem Celegans Toxchip und den eingesetzten sieben Xenobiotika  $\beta$ -Naphthoflavon, Atrazin, Endosulfan, Fluoranthen, Clofibrat, Diethylstilbestrol und Tributylzinnchlorid konnten 33 der 66 Gene des

Celegans Toxchips konzentrationsabhängig induziert werden. Zu diesen induzierten Genen gehören unter anderem 11 Gene der Cytochrom P450 Genfamilie an. Fünf Gene kodieren für Vitellogenine, jeweils drei Gene für Carboxylesterasen, UDP-Glucuronosyltransferasen und Hitzeschockproteine sowie je zwei Gene für Glutathion-S-Transferasen. Weiterhin wurde das Cytochrom b5 Gen *vem-1*, das Collagen Gen *col-38*, das *sym-1* Gen und das Metallothionin Gen *mtl-1* durch mindestens eines der verwendeten 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.

Die Sensitivität des neuen Biotests erwies sich um bis zu über 200fach höher als der im gleichen Medium durchgeführte Reproduktionstest.

Damit ist der Celegans Toxchip prinzipiell für die vorgesehenen Aufgaben geeignet.

Vor einem routinemäßigen Einsatz des Celegans Toxchips müssen jedoch noch eine Reihe von Fragen beantwortet und technische Probleme gelöst werden.

Zu den offenen Fragen zählen:

- Warum konnten im Vergleich zu den Ergebnissen mit dem gesamtgenomischen DNA-Array von *C. elegans* nur 33 der 66 Gene des Celegans Toxchips induziert werden, obwohl diese auf Grund der Voruntersuchung als induzierbar galten?
- Wieso wurden im Vergleich zu den Ergebnissen mit dem gesamtgenomischen Chip die auf dem Celegans Toxchip befindlichen Gene teilweise durch andere Schadstoffe induziert?
- Kann aus den Genexpressionsmustern auf eine bestimmte Stoffgruppe geschlossen werden?
- Lässt sich der Biotest auch mit Bodenmaterial durchführen?

Dennoch bietet der Celegans Toxchip der Ökotoxikologie bereits jetzt eine Vielzahl von Vorteilen. Zum einen können durch die relativ kurze Testdauer schnell Ergebnisse erzielt werden, zum anderen ermöglicht die Biologie von *C. elegans*, dass Untersuchungen zunächst im Substrat Wasser, später eventuell jedoch auch im Boden durchgeführt werden können. Im Vergleich mit etablierten ökotoxikologischen Testsystemen wie dem Reproduktionstest konnte nachgewiesen werden, dass der Celegans Toxchip eine sehr viel sensitivere Detektion der Wirkung 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.

## SUMMARY

The aim of this work was the development of a new ecotoxicological test system which allows the assessment of the ecotoxicological relevance of contaminants in environmental relevant concentrations for e.g. cyclic aromatic hydrocarbons, polyhalogenated biphenyle, steroids, herbizids and pharmaceuticals. As the screening system quantification of xenobiotically induced gene expression was performed using two different types of DNA-Arrays. The soil nematode *Caenorhabditis elegans* was selected as the test organism, because it has been used successfully in ecotoxicological tests in the last decades and its whole genome is sequenced.

For the gene expression screen phase I and II genes of the biotransformation system were the favoured genes. In addition further genes with a high xenobiotic specific induction potential (e.g. coding for heat shock proteins or vitellogenins) were selected. The selection of these xenobiotic inducible genes based on whole genome *C. elegans* DNA-Microarray experiments. The evaluation of the data of these experiments revealed 64 genes as inducible through the applied xenobiotics  $\beta$ -Naphthoflavone, Atrazine, Clofibrate, Diethylstilbestrol and Fluoranthene.

After the selection of relevant genes, a matching gene fragment for each gene was produced by PCR. The quality and quantity of the fragments was checked, the fragments were purified and afterwards spotted as a low density DNA array. The so called Celegans Toxchip is a new system to investigate the gene expression of several xenobiotic inducible genes in one experiment. The Celegans Toxchip hybridisation experiments were performed with  $\beta$ -Naphthoflavone, Atrazine, Endosulfan, Fluoranthene, Clofibrate, Diethylstilbestrol and Tributyltinchlorid

The experiments for the used xenobiotics revealed an induction of 33 genes of total 66 genes on the Celegans Toxchip. From the induced genes belong 11 to the CYP gene family. Five genes are coding for vitellogenines, each three for UDP-Glucuronosyltransferases, heatshock proteins, carboxylesterases and two for glutathione S-transferases. Further five genes, the cytochrom b5 gene *vem-1*, the gene *col-38* coding for collagene, the gene *mtl-1* coding for metallothionine and the two genes C29F7.2 and F58H1.2, coding for proteins with unknown function were as well induced through the applied xenobiotics.

The sensitivity of this new ecotoxicological testsystem was up to 200 times higher as a reproduction test in liquid medium.

Before using the Celegans Toxchip in routine there are still some questions to answer and some technical problems, which have to be solved.

- Why are only nearly the half of genes of the Celegans Toxchip have found to be reproducible inducible through the applied xenobiotics in comparison to the results of the whole genome experiments?
- Why are some genes in the Celegans Toxchip experiments induced through other xenobiotics than in case of the whole genome experiments?
- Is it possible to determine substance class specific effects based on the gene expression pattern, determined in response to the xenobiotic substance class used for treatment?
- Is it possible to use this biotest as well with soil material?

The Celegans Toxchips provides even now several advantages for using in ecotoxicological studies. With this system it is possible to test several genes in parallel and to get a concentration and substance depending gene expression of the selected marker genes within a short time. The biology of *C. elegans* makes it possible to examine water samples and later on maybe soil material.

The results of this study show very clear that the xenobiotically induced gene expression of the nematode *C. elegans* is a very sensitive new endpoint for the detection of biological active substances in the environment. In comparison with a reproduction test it becomes obvious that the Celegans Toxchip is much more sensitive.