

**Zur Bedeutung der Schadstoffexposition auf die Genexpression und
Reproduktion von *Caenorhabditis elegans***

Vom Promotionsausschuss der
Technischen Universität Hamburg-Harburg
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktorin der Naturwissenschaften
genehmigte Dissertation

von
Dipl. Biol. Anett Matthäi

aus Köln

2009

1. Gutachter: Dr. habil. Wolfgang Ahlf
2. Gutachter: Prof. Dr. Rudolf Müller

Tag der mündlichen Prüfung:
20. Februar 2009

Hamburg liegt zwischen Sylt und Groningen...

...was der eigentliche Anlass war diese Arbeit im Jahr 2004 zu beginnen. Für die Unterstützung und Hilfe während der Anfertigung, die zum erfolgreichen Abschluss geführt haben möchte ich mich bei folgenden Personen bedanken:

Dr. habil. Wolfgang Ahlf, der mich in ein neues Wissensgebiet eingeführt und schnell und mühelos überzeugt hat zu bleiben. Für seine Motivation, das Vertrauen in meine Arbeit, die Offenheit gegenüber neuer Ideen und die Unterstützung während der gesamten Zeit bin ich sehr dankbar.

Kirsten Offermann, Pei-Chi Hsu, Prof. Dr. Susanne Heise, Dr. Carolin Flöter, meinen lieben Kollegen für Ihre Hilfsbereitschaft und Freundschaft, sowie eine schöne Zeit im Labor, Büro, auf Konferenzen, auf der Elbe und am Ententeich.

Den Mitarbeitern des Arbeitsbereiches Umwelttechnik und Energiewirtschaft (zuvor Umweltschutztechnik) für ein kollegiales Verhältnis, sowie den Mitarbeitern des Zentrallabors für die Durchführung der chemischen Analytik.

Prof. Dr. Rudolf Müller für die Übernahme des Koreferats und **Prof. Dr. Dr. h.c. Frerich Keil** für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Birgitt und **Herman Matthäi**, sowie **Felix Matthäi** und **Nora Weber** für Ihren Beistand, besonders in der finalen Phase.

Dr. Katharina Göllner für Ihre Freundschaft und Ihren kompetenten Sachverstand bezüglich molekularbiologischer Fragestellungen, sowie **Dr. Manuela Krakau** für Ihre Freundschaft und Hilfe in logistischen und privaten Bereich.

Andreas Zipperle, ohne den weder der Beginn noch der Abschluss denkbar gewesen wären.

INHALT

I. EINLEITUNG	1
I.1. Hintergrund und Ziel der geplanten Arbeit	1
I.1.1. Der Einfluss der Expositionsbedingungen auf Bioverfügbarkeit, interne Verteilung und Effekte von Schadstoffen	1
I.1.2. Genexpressionsanalysen als Mustererkennung in der ökotoxikologischen Bewertung	3
I.2. Modellorganismus <i>Caenorhabditis elegans</i>	6
I.3. Molekulare Detoxifikation und Fremdstoffmetabolismus	8
I.4. Experimenteller Aufbau und molekularbiologische Methoden	11
I.4.1. Expositionsbedingungen und Bioverfügbarkeit	11
I.4.1.1. Versuchsaufbau	11
I.4.1.2. real-time PCR	13
I.4.1.3. Modellsubstanz Fluoranthren	14
I.4.2. Genexpressionsanalysen als Mustererkennung	15
I.4.2.1. Versuchsaufbau	15
I.4.2.2. Differential Display Polymerase Chain Reaction (DD-PCR)	16
I.5. Erwartung an die Ergebnisse	17
II. MATERIAL und METHODEN	19
II.1. Chemikalien	19
II.2. Geräte	19
II.3. Medien und Reagenzien (alphabetisch geordnet)	19
II.4. Stämme und Kultivierung	22
II.4.1. <i>Escherichia coli</i> (OP50)	22
II.4.2. <i>Caenorhabditis elegans</i> N2 Bristol	22

II.5. Schadstoffinkubation	22
II.5.1. Schadstoffinkubation in Fluoranthen	22
II.5.2. Schadstoffinkubation in Cadmium	23
II.6. Waschen der Nematoden	23
II.7. RNA-Isolation mit Trizol	24
II.8. DNase I-Behandlung	24
II.9. Bestimmung der Konzentration und Reinheit der RNA	24
II.10. Polymerase Chain Reaction (PCR)	25
II.10.1. real-time PCR	25
II.10.1.1. Primer Auswahl für die real-time PCR	25
II.10.1.2. reverse Transkription	26
II.10.1.3. real-time PCR	26
II.10.2. Differential Display PCR	27
II.10.2.1. Primer-Auswahl für die DD-PCR	27
II.10.2.2. reverse Transkription (für Differential Display)	28
II.10.2.3. Differential Display PCR	28
II.10.2.4. Polyacrylamidgelelektrophorese	29
II.10.2.5. Silberfärbung/ Auswertung	30
II.11. Life-cycle test mit <i>C. elegans</i>	30
II.12. Body Burden Fluoranthen	31
II.13. Statistische Auswertung	31
III. ERGEBNISSE	33
III.1. Biomarker für die Bioverfügbarkeit (Cytochrome P₄₅₀ Monooxygenase)	33
III.1.1. Auswahl und Eignung der Primer für die real-time PCR	33
III.1.2. Effekte auf die <i>cyp-35C1</i> -und <i>pqp-3</i> -Expression und chronische Parameter durch Kurzzeitinkubation in Fluoranthen	35

III.1.3. Effekte von Langzeitexposition und Expositionsart auf die Genexpression von <i>cyp-35C1</i> und <i>pgp-3</i> , Reproduktion und Bioakkumulation	40
II.1.4. Bedeutung der ABC-Transporter für die Entgiftung: <i>pgp-3</i> als Membranbarriere der Zelle?	46
III.2. Genexpressionsanalyse durch Differential Display PCR	47
III.2.1. RNA-Isolation und reverse Transkription	48
III.2.2. Optimierung der PCR und Silberfärbung	48
III.2.3. Differential Display zur Identifikation cadmiuminduzierter Gene	49
III.2.4. Auswertung der differentiellen Genexpression nach Cadmium-Behandlung	51
IV. DISKUSSION	53
IV.1. Exposition und Bioverfügbarkeit von Fluoranthen	53
IV.1.1. Genexpression und chronische Toxizität durch Kurzzeitinkubation in Fluoranthen	53
IV.1.2. Einfluss der Nahrung auf Bioverfügbarkeit, Reproduktion und Bioakkumulation	54
IV.1.2.1. Reaktionen am Zielort: Expression von <i>cyp-35C1</i> und <i>pgp-3</i>	54
IV.1.2.2. Nematodentest und chronische Schäden	56
IV.1.2.3. Interne Belastung und das Critical Body Burden Konzept	58
IV.1.3. Bedeutung der ABC-Transporter für die Wirkung von Fluoranthen	60
IV.1.4. Bedeutung molekularer Prozesse für die zukünftige Chemikalienbewertung	62
IV.2. Genexpressionsanalyse durch Differential Display PCR	63
V. SCHLUSSFOLGERUNG und AUSBLICK	67

VI. ZUSAMMENFASSUNG	70
VI. SUMMARY	71
VII. REFERENZEN	72
VIII. ANHANG	80

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABC-Transporter	ATP-binding-cassette Transporter
<i>act-1</i>	Actin 1 (Gen)
APS	Ammoniumpersulfat
BB	Body Burden
cDNA	Copy DNA (Einzelstrang)
CBB	Critical Body Burden
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CYP	Cytochrom P ₄₅₀ -abhängige Monoxygenase (Protein)
<i>cyp</i>	Cytochrom P ₄₅₀ -abhängige Monoxygenase (Gen)
<i>cyp-35C1</i>	Cytochrom P ₄₅₀ -abhängige Monoxygenase 35C1 (Gen)
DD-PCR	Differential Display Polymerase chain reaction
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC ₂₀	Effect concentration (20%)
EC ₅₀	Effect concentration (50%)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Flu	Fluoranthren
LBB	Lethal Body Burden
LB-Medium	Lysogeny Broth Medium
L1-L4	Juvenilstadien von <i>C. elegans</i>
Log Kow	log Octanol/ Wasser Partitions-Koeffizient
MoA	Mode of Action
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
min	Minuten
<i>mrp</i>	Multidrug Resistance Protein (Gen)
PAK	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PCR	Polymerase chain reaction
<i>pgp-3</i>	P-Glycoprotein 3 (Gen)
<i>pgp-14</i>	P-Glycoprotein 14 (Gen)
RNAi	RNA Interference

rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
TBE	TRIS-Borat-EDTA Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Puffer)
Ü.N.	über Nacht

I. EINLEITUNG

I.1. Hintergrund und Ziel der geplanten Arbeit

I.1.1. Der Einfluss der Expositionsbedingungen auf Bioverfügbarkeit, interne Verteilung und Effekte von Schadstoffen

Schadstoffe gelangen in der Umwelt auf verschiedenen Wegen zu Organismen. Abhängig von den chemischen Eigenschaften der Verbindungen liegen diese entweder frei in der Luft und Wasserphase vor, oder gebunden an Partikel in Sedimenten und Böden. Die Schadstoff-Exposition der Organismen ist somit abhängig von ihrem Lebensraum. Benthisch lebende Organismen können Schadstoffe sowohl durch die freie Wasserphase, das Porenwasser, aber auch durch die Ingestion kontaminierter Partikel oder Nahrung aufnehmen (Ahlf et al., 1991, 2002). Die Exposition über kontaminierte Partikel kann sich maßgeblich auf die Bioverfügbarkeit der Substanzen und damit auch auf ihre Toxizität auswirken (Crommentuijn et al., 1998; Pedersen et al., 2000; Selck et al., 2003).

Obwohl Sedimente in Gewässern eine relevante Kontaminationsquelle darstellen, gibt es in der Praxis vergleichsweise wenige ökotoxikologische Testverfahren (Biotests), die diese Expositionsbedingungen berücksichtigen. Tabelle 1 zeigt eine Auswahl normierter Biotests mit variablen Expositionsbedingungen.

Tabelle 1) Biotests und ihre Anwendungsmöglichkeiten

Test Organismus	Endpunkt	Exposition	Dauer	Standard-Nr.
Bakterien: <i>Arthrobacter globiformis</i>	Enzymatische Aktivität (Dehydrogenase)	Flüssigphase und Sediment	1 h	DIN 38412-48
Nematoden: <i>Caenorhabditis elegans</i>	Mortalität, Reproduktion, Wachstum etc.	Flüssigphase und Sediment	72 h	ISO in Vorbe- reitung
Fische: Fischart: <i>Danio rerio</i>	Letale/ nicht letale Missbildungen	Flüssigphase und Sediment	48 h	DIN 38415- 6

Der größte Teil der in Gesetzen und Richtlinien vorgeschriebenen Biotests, die die Giftigkeit von Chemikalien oder Umweltproben testen, wird bestimmt durch aquatische Testsysteme, wie den Leuchtbakterientest mit *Vibrio fischeri* (DIN EN ISO 11348-2) oder den Immobilisationstest mit *Daphnia magna* (DIN EN ISO 6341). Die

Integration von Biotests mit variablen Expositionsbedingungen in entsprechende Richtlinien ist dringend empfehlenswert (Flöter, 2007).

Ebenso besteht Nachholbedarf bei der Untersuchung zugrunde liegender Mechanismen einer giftigen Wirkung, wie z.B. unterschiedliche Aufnahmewege, welche die Bioverfügbarkeit und die daraus resultierenden Effekte verändern. Es stellt sich konkret die Frage, ob ein Schadstoff, der entweder über die Wasserphase oder über Nahrungspartikel aufgenommen wurde, zu unterschiedlichen negativen Effekten für den Organismus führen kann. Um diese Frage zu beantworten, muss das Verhältnis der biologisch verfügbaren Schadstoffkonzentrationen zu den Effekten im Organismus betrachtet werden. Dabei ist es entscheidend, einen (Bio)-Marker in dem Testorganismus zu wählen, der einen Einblick in die zellulären Mechanismen geben kann. Der Anteil des Schadstoffes, der für die Effekte verantwortlich ist, ist dabei wichtiger als die gesamte Belastung des Organismus.

Neben klassischen ökotoxikologischen Verfahren können hier besonders molekularbiologische Methoden zur Erfassung der Schadstoffeffekte genutzt werden (Roh et al, 2006). Die Bestimmung der Geninduktion oder einer Enzymaktivität eignet sich als Biomarker, um die Exposition von Schadstoffen nachzuweisen, da die zellulären Reaktionen nur durch die biologisch verfügbaren und toxikologisch aktiven Anteile der eindringenden Fremdstoffen ausgelöst werden. Molekulare Mechanismen sollen so identifiziert werden und aufgrund der Reaktionen an den zellulären Zielstrukturen (Targets) können die tatsächlichen Auslöser toxischer Prozesse bewertet und klassifiziert werden. Dabei werden nur die Effekte bewertet, die durch die toxikologisch aktive Substanz am Zielort ausgelöst wird (Toxikodynamik). Die Bewertung der Giftigkeit würde toxikokinetische Prozesse, wie die Aufnahme, Verteilung und Biometabolisierung berücksichtigen, jedoch für den Organismus nicht verfügbare oder inaktive Anteile der Schadstoffe nicht mit einbeziehen.

Es bleibt zu klären, ob die Expositionsbedingungen einen Einfluss auf zellulärer Ebene haben, und ob Änderungen der Bioverfügbarkeit durch molekulare Mechanismen nachweisbar sind. Ein Problem bei der Nutzung molekularer Biomarker zur Toxizitätsbestimmung ist die fehlende Übertragbarkeit auf Langzeiteffekte (Forbes et al., 2006). Ein systematischer Vergleich zwischen den Effekten auf die Genexpression und den anschließenden chronischen Wirkungen unter gleichen Expositionsbedingungen könnte einen Zusammenhang zwischen Induktionskapazität

der Expression relevanter Gene und dem Einfluss der Umweltchemikalien auf den Gesamtorganismus beantworten. Es gibt bisher keine bekannten Untersuchungen, die eine Überlastung an der Detoxifikation beteiligter Gene (Biomarker) mit etwaigen Effekten auf chronische Parameter direkt verknüpft. Parameter wie Fertilität, Reproduktion und Wachstum sind zweifelsohne entscheidend für die Vitalität eines Organismus und das Fortbestehen der gesamten Population. Folgende Fragen sollen daher durch Versuche zur Fluoranthren-Exposition mit den benthischen Nematoden *Caenorhabditis elegans* beantwortet werden:

1. Gibt es einen Zusammenhang zwischen der Induktionskapazität ausgewählter Gene (Biomarker) und Auswirkungen auf chronische Parameter durch die Schadstoffbehandlung?
2. Welchen Einfluss haben Expositionszeit und Expositionsart auf die Induktion molekularer Biomarker? Ist es möglich, den Einfluss der Exposition über Nahrungspartikel auf die Toxizität bereits auf zellulärer Ebene nachzuweisen?

I.1.2. Genexpressionsanalysen als Mustererkennung in der ökotoxikologischen Bewertung

Neben der Nutzung ausgesuchter Biomarker wird die Anwendung gesamtgenomischer Microarrays in der Ökotoxikologie immer populärer. Es werden aktuell Microarrays an unterschiedlichen Modellorganismen, wie *Daphnia magna* (Krebstiere), *Caenorhabditis elegans* (Nematoden) oder *Brachydanio rerio* (Fische) unabhängig voneinander getestet, um zelluläre Effekte von Chemikalien nachzuweisen und bewerten zu können (Watanabe et al., 2007, Poynton et al., 2007, Van der Ven, 2005).

In Microarrays oder High density oligonukleotid arrays (Gen-Chips oder DNA-Chips), werden alle Gene bereits sequenzierter Modellorganismen auf einen Chip aufgebracht und mit den behandelten DNA- oder cDNA-Proben abgeglichen.

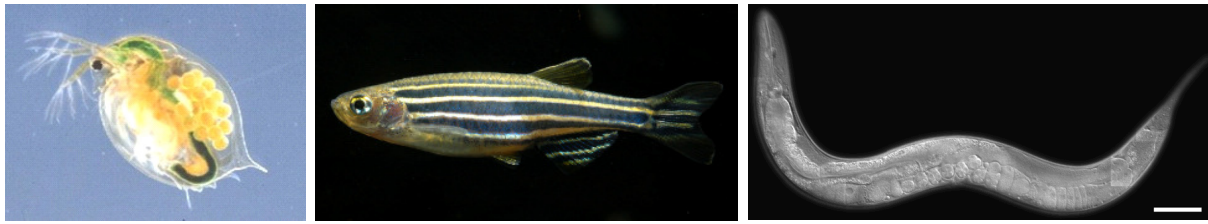


Abbildung I.1. Modellorganismen mit ökotoxikologischer Relevanz, deren Genome vollständig sequenziert wurden (v.l. *D. magna*, *B. rerio*, *C. elegans*).

Anhand eines Fluoreszenzsignals kann die verstärkte bzw. verminderte Expression relevanter Gene abgelesen werden (Cheung et al., 1999; Duggan et al., 1999). Die Methode benötigt nur geringe Probenmengen und ist hochsensitiv. Ein weiterer Vorteil ist die direkte Identifikation der induzierten Gene. Eine gute Einführung in die Methodik bietet das Sonderheft „The Chipping Forecast“ der Zeitschrift Nature Genetics (1999).

Microarrays können im Gegensatz zu der Bestimmung einzelner relevanter Gene (Biomarker) ein nahezu vollständiges Bild der molekularen Reaktionen und der, die Toxizität auslösenden Mechanismen am Zielort bieten. Die Anwendung als Mustererkennungsverfahren für eine verfeinerte Risikobewertung von Chemikalien könnte bei der Identifikation verschiedener Wirkmechanismen oder Modes of Action (MoAs) hilfreich sein. Im Gegensatz zu klassischen Biotests in denen mehrere Organismen unterschiedlicher Trophieebenen, aber auch verschiedener taxonomischer Gruppen kombiniert werden, um die Toxizität von Schadstoffen zu erfassen (Pascoe und Edwards, 1989), könnte in diesem Ansatz ein Testorganismus genügen, dessen Geninduktion repräsentativ die Belastung abbildet. Die Auswahl der Testorganismen in klassischen Biotests folgt empirisch ökologischen Vorgaben, da unterschiedliche Organismen verschieden sensitiv auf die Schadstoffklassen reagieren und so die ökotoxikologische Wirkung besser abgeschätzt werden kann. Durch eine Bestimmung der Effekte, die der toxischen Wirkung zugrunde liegt, wäre die Anwendung kombinierter Testsysteme nicht mehr nötig.

Die Klassifikation nach MoAs bewertet Effekte organischer Schadstoffe nach dem Mechanismus und der zellulären Angriffstelle, der der schädlichen Wirkung zugrunde liegt (Rand et al., 1995). Es wird unterschieden zwischen Basis-Toxizität, welche als unspezifisch und reversibel eingestuft wird; Rezeptor vermittelter Toxizität und Toxizität, die durch die Bildung kovalenter Bindungen durch reaktive (Nukleophile; Elektrophile) Substanzen ausgelöst wird. Abbildung I.2. zeigt die zellulären

Angriffstellen schematisch. Basis-Toxizität wird durch die Einlagerung unspezifisch wirkender Substanzen (Narkotika) in die Zellmembranen beschrieben. Etwa 60% aller industriell hergestellten Chemikalien wirken narkotisch. Narkotisch wirkende Verbindungen sind äußerst inert und ihre Akkumulation in Organismen ist direkt proportional zu ihrer Hydrophobizität (n-Octanol/ Wasser Partitions-Koeffizient $\log K_{ow}$) (Verhaar et al., 1992). Unterschieden werden Narkotika bezüglich ihrer Polarität in MoA1 (unpolar, z.B. Fluoranthen) und MoA2 (polar, z.B. Phenol) Verbindungen. Rezeptorvermittelte Toxizität wird ausgelöst z.B. durch xenöstrogene Substanzen oder durch Organophosphate (Pestizide), die als starke Acetylcholinesterase-Inhibitoren wirken. Irreversible Schädigungen der molekularen Strukturen durch reaktive Verbindungen können z.B. zu Mutationen der DNA führen.

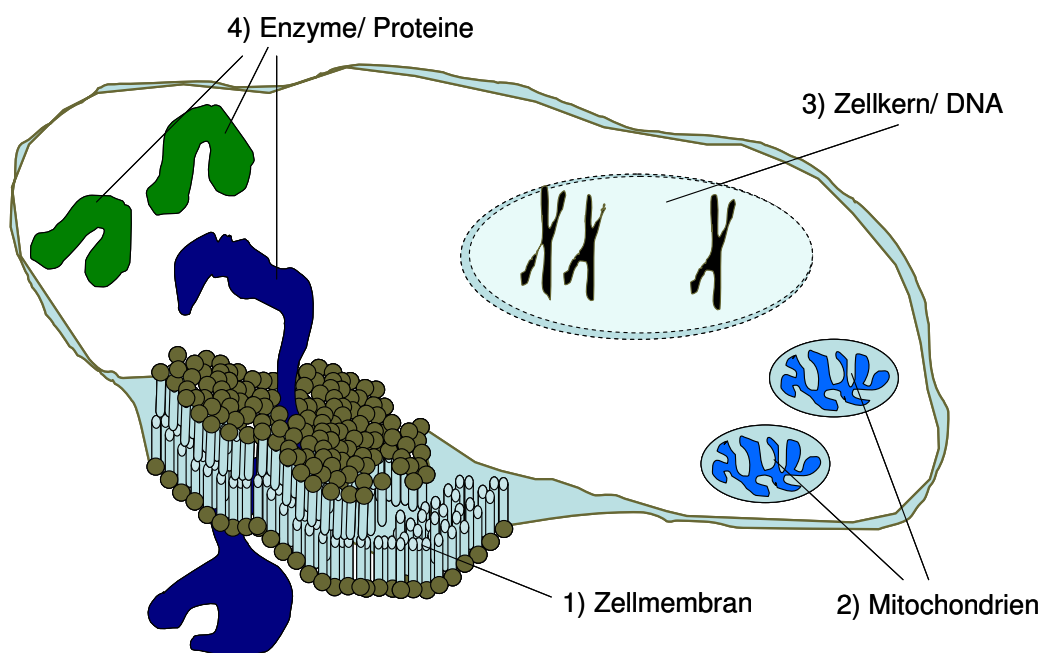


Abbildung I.2. Zelluläre Strukturen als Angriffstellen für Chemikalien. 1) unspezifische Wirkung durch Einlagerung in die Zellmembran (Basis-Toxizität); 2) und 3) reaktive Wirkung durch Bildung kovalenter Bindungen und 4) Rezeptorvermittelte Toxizität durch Interaktion mit Enzymen/ Proteinen.

Vielen Verbindungen können zahlreiche MoAs zugeordnet werden, da die Moleküle mehrere funktionelle Gruppen tragen, die mit zellulären Strukturen wechselwirken können (McCarty et al., 1993; Escher und Hermens, 2002). Diese Besonderheiten

müssen unter anderem beachtet und getestet werden, bevor generelle Modelle zur Risikobewertungen von Chemikalien basierend auf dem MoA-Konzept aufgestellt werden können. Einen viel versprechenden ersten Ansatz bieten hier Escher et al. (2005). Eine Biotestbatterie basierend nicht auf empirisch ausgewählten Testorganismen, sondern auf den MoAs der zu bewertenden Chemikalien wurde genutzt, um die Effekte von pharmazeutischen Substanzen zu bewerten. Dabei wurden Reaktionen an spezifischen (Rezeptoren) und unspezifischen (Zellmembranen) Strukturen, aber auch chemische Veränderungen (DNA-Mutagenese) erfasst. Dieser Bewertungsansatz könnte durch eine Untersuchung der chemikalieninduzierten Genexpression vervollständigt werden. Fraglich ist, ob Schadstoffe, denen die gleiche schädigende zelluläre Wirkung zugrunde liegt, auch gleiche Genexpressionsmuster hervorrufen. In dieser Arbeit sollen zusätzlich zu der Untersuchung einzelner relevanter Gene vollständige Genexpressionsmuster von *C. elegans* erstellt werden, um folgende Frage zu beantworten:

3. Können alternativ zu Microarrays andere Expressionsanalysen (z.B. Differential Display PCR, Proteomanalyse) in der ökotoxikologischen Bewertung eingesetzt werden und als Mustererkennungsverfahren einer toxischen Wirkung auf molekularer Ebene dienen?

I.2. Modellorganismus *Caenorhabditis elegans*

Ein geeigneter Testorganismus für die geplanten Versuche muss, unter anderem, folgende Kriterien erfüllen. Um den Einfluss von Exposition und Bioverfügbarkeit auf die Wirkung von Fluoranthren zu untersuchen, müssen die Aufnahmewege der Substanz klar definierbar sein. Des Weiteren müssen molekularbiologische Methoden anwendbar sein, um chemikalieninduzierte Genexpressionsmuster zu erstellen und sie mit Langzeiteffekten zu vergleichen.

Seit den 1970iger Jahren wird der Nematode *C. elegans* intensiv als Modellorganismus in der Entwicklungs- und Molekularbiologie, sowie in der medizinischen Forschung genutzt (Brenner, 1974; www.wormbase.org). Sein Genom ist komplett entschlüsselt und besteht aus etwa 18 000 bis 20 000 Genen, die auf 12 Chromosomen verteilt sind (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998).

Nematoden sind in aquatischen, terrestrischen und benthischen Habitaten unter den

Metazoen die häufigste Organismengruppe was sowohl Artenzahlen als auch Abundanz betrifft (Traunspurger et al., 1995). Der benthisch lebende Nematode *Caenorhabditis elegans* hat als adultes Tier eine Größe von etwa 1 mm und einen Durchmesser von etwa 0,065 mm (siehe Abbildung I.3.). Er ernährt sich von Bakterien und sein Verdauungssystem besteht aus Pharynx, Mitteldarm und Enddarm. Über die Verdauung und Aufnahme von Stoffen jedoch ist vergleichsweise wenig bekannt (Walker et al, 2005). Er kommt hauptsächlich als Hermaphrodit vor, der sich durch Selbstbefruchtung vermehrt. Es existieren ebenfalls männliche Individuen (0,05 %), die sich sexuell mit den Hermaphroditen paaren und so für genetische Variabilität sorgen.

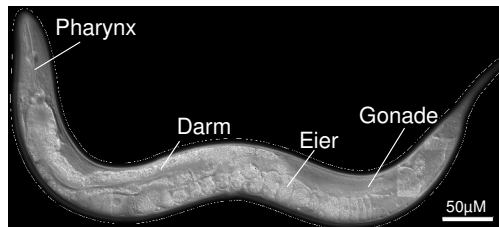


Abbildung I.3. *Caenorhabditis elegans* (adult) (Photo:www.[biology.queensu.ca/~chinsang](http://www.biology.queensu.ca/~chinsang))

Die Generationszeit von *C. elegans* beträgt bei 25 °C etwa 72 Stunden. Nach dem Schlüpfen der L1-Larve folgen drei weitere Larvenstadien (L2 bis L4) bis zur Entwicklung zum geschlechtsreifen Tier nach drei Tagen. Unter schlechten Umweltbedingungen kann die L1-Larve in ein Dauerstadium übergehen, in welchem sie drei bis vier Monate überlebensfähig ist. In diesem Stadium werden die Nematoden im Labor kultiviert. Die gesamte Lebensdauer von *C. elegans* beträgt etwa 3 Wochen (Sulston und Hodgins, 1988, Schierenberg 1986). Die einfache Kultivierung im Labor auf Agarplatten mit *Escherichia coli* (*E. coli*) als Nahrungsquelle, seine Durchsichtigkeit, die kurze Generationsdauer und die komplette Sequenzierung des Genoms haben ihn in den vergangenen Jahren in weiteren wissenschaftlichen Disziplinen zum beliebten Modellorganismus gemacht.

In der Ökotoxikologie wird *C. elegans* seit den 1980iger Jahren zur Erfassung der schädlichen Wirkung von organischen und anorganischen Chemikalien benutzt (Van Kessel, 1988, Donkin und Dusenbery, 1993, Traunspurger et al., 1997). Seine Lebensweise erlaubt es, sowohl Flüssigphasen als auch Festphasen wie Sedimente auf ihre Toxizität zu untersuchen. Eine relative kurze Reproduktionszeit von 72 Stunden erleichtert es, auch Langzeiteffekte zu untersuchen. Dabei wird in einem

Lebenszyklustest der Einfluss von Schadstoffen auf die Reproduktion, das Größenwachstum und die Fertilität bestimmt. Ein entsprechender Test steht kurz vor der ISO-Normierung (ISO/CD 10872).

Auch molekularbiologische und biochemische Untersuchungen an *C. elegans* zur Bestimmung und Bewertung von Umweltkontaminationen wurden seit Anfang dieses Jahrtausends vermehrt durchgeführt. Dabei konnte eine hohe Übereinstimmung mit den Mechanismen der Detoxifikation bei Vertebraten nachgewiesen werden (Custodia et al., 2001). *C. elegans* scheint gut geeignet für molekularbiologische, ökotoxikologische Untersuchungen. Es wurden transgene Reporterorganismen zur Detektion von allgemeinen Stress- und Abwehrreaktionen konstruiert (David et al., 2003) und auch universelle schadstoffinduzierbare Gene identifiziert, die in Vertebraten bereits seit langem als Biomarker für Kontaminationen durch polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) benutzt werden (Tawe et al., 1998; Menzel et al., 2001). Auf gesamtgenomischer Basis wurden durch Chemikalien verursachte, generelle Veränderungen der Genexpression untersucht (Reichert et al., 2005).

I.3. Molekulare Detoxifikation und Fremdstoffmetabolismus

Die zellulären Schutzmechanismen gegenüber anorganischen sowie organischen Stoffen sind vielfältig. Schwermetalle zum Beispiel können durch metallbindende Proteine (Metallothionine) festgesetzt werden, was ihre Bioverfügbarkeit und Giftigkeit mindert. Auch können Schwermetalle in die Lysosomen verfrachtet werden, um auf diesem Wege aus der Zelle eliminiert zu werden (Fent, 2007).

Die Entgiftung organischer Fremdstoffe wird in nahezu allen Organismen durch die gleichen Biotransformationen erreicht. In der Regel werden lipophile Umweltchemikalien durch metabolische Umwandlung zu wasserlöslichen Produkten, um so aus dem Körper ausgeschieden zu werden. Die große Anzahl der Reaktionen lässt sich in zwei sukzessive Phasen einteilen. Durch Phase-I-Enzyme werden die Schadstoffe umgebaut und teilweise festgelegt. Phase-II-Enzyme, wie Glutathion-S-transferase (GST), binden die Stoffe an meist hydrophile, zelluläre Makromoleküle, um sie als wasserlösliche Konjugate zu eliminieren (Fent, 2007). Zu den Phase-I-Enzymen zählen die streng konservierten Cytochrom P₄₅₀-abhängige Monoxygenasen (CYPs), die bei praktisch allen Organismen vorkommen. Sie enthalten

Häm als prosthetische Gruppe und katalysieren neben Entgiftungsprozessen viele metabolische Reaktionen, wie Lipid- und Cholesterinsynthese (Xu et al., 2001). Bei der enzymatischen Reaktion wird ein Atom molekularer Sauerstoff in das jeweilige Substrat eingebracht. Die Enzyme finden sich bei Vertebraten im Endoplasmatischen Retikulum (ER) fast aller Organe, kommen konzentriert jedoch in der Leber vor (Gibson und Skett, 2001). Reguliert wird die Induktion der Genexpression der CYPs durch verschiedene Kern-Rezeptoren (nuclear-receptors, NR, Aryl-hydrocarbon-receptors AHR). NR/AHR sind ligandengesteuert und werden aktiviert durch die Bindung von endogenen oder exogenen Substanzen. Trifft eine Substanz, z.B. Fluoranthen auf einen der Rezeptoren bildet sich ein Ligand-Rezeptor-Komplex, der zum Zellkern wandert und dort die Transkription der Phase-I- und II-Gene startet, was zur enzymatischen Entgiftung der Substanz führt (Nebert et al., 2004; Lindblom und Dodd, 2006).

In *C. elegans* wurden bisher etwa 80 *cyp*-Gene identifiziert, die hauptsächlich in den Intestinalzellen lokalisiert werden konnten. Sequenzanalysen haben Homologien zu den Vertebraten *cyp*-Genfamilien 2, 3 und 4 ergeben (Gotoh, 1998). In einer speziellen Untersuchung aller Cytochrom P₄₅₀-abhängigen Monooxygenasen, sowie in gesamtgenomischen Microarray-Experimenten von *C. elegans* konnte gezeigt werden, dass die Expression der *cyp*-Gene durch eine Vielzahl organischer Verbindungen, wie Fluoranthen, Benz(a)Pyren oder PCB52 induziert wird, was sie zu idealen Biomarkern für die Exposition von organischen Schadstoffen macht (Menzel et al., 2001; Reichert et al., 2005). Besonders die Unterfamilie *cyp-35* zeigte sich stark durch verschiedene PAKs induzierbar. Unklar ist bislang, ob die codierten CYP-Proteine/ Enzyme ebenfalls an der Biometabolisierung von Fremdstoffen beteiligt sind. Die biologische Funktion der *cyp-35* Familie in *C. elegans* ist noch unbekannt. Es konnte eine Beteiligung am Fettstoffwechsel und der Lipidspeicherung für CYP-Enzyme nachgewiesen werden (Ashrafi et al., 2003). Es ist weiterhin wahrscheinlich, dass *C. elegans* CYPs ebenfalls als Phase-I-Enzyme in den Fremdstoffmetabolismus involviert sind, jedoch fehlt bislang der Beweis. Dennoch werden sie in der Literatur dem molekularen Detoxifikationssystem zugeordnet. Die Regulation auf Transkriptionsebene ist ebenfalls noch nicht aufgeklärt. Obwohl in *C. elegans* ein Homolog zu dem ligandengesteuerten Rezeptor der Vertebraten entdeckt (*ahr-1*) wurde, werden durch diesen ursprünglichere Prozesse wie Zelldifferenzierung gesteuert (Powell-Coffman et al., 1998; Huang et al., 2004). Es konnte ebenfalls gezeigt

werden, dass bestimmte *C. elegans* cyps unabhängig von AHR-Rezeptoren induziert werden (Menzel et al., 2005).

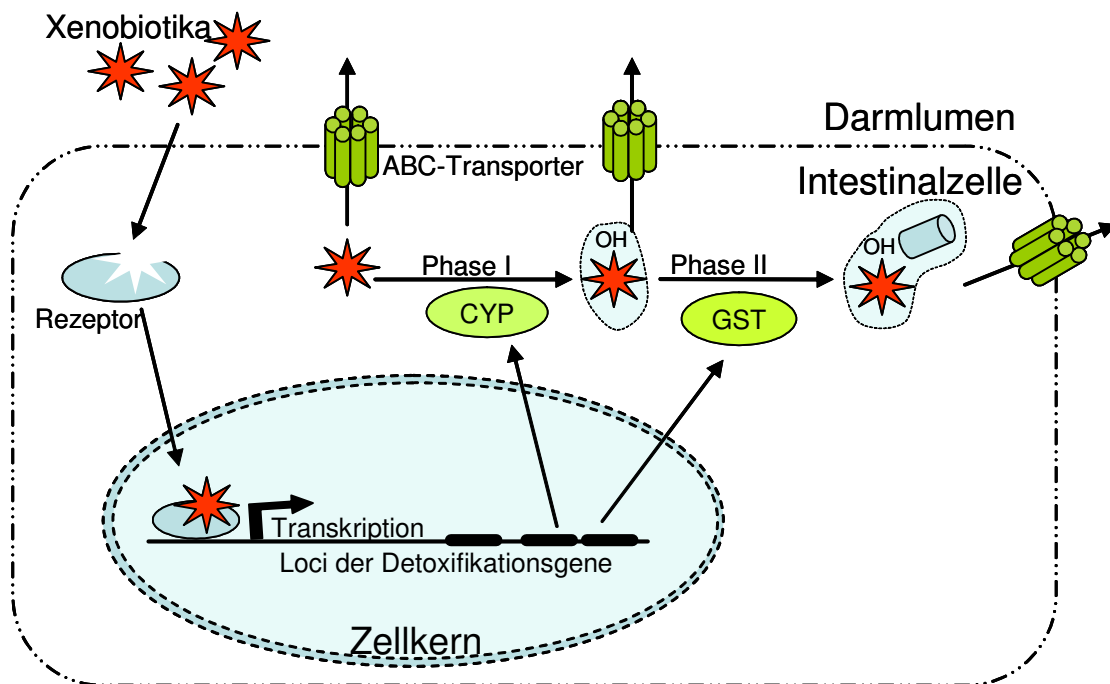


Abbildung I.4. Schematische Darstellung möglicher Detoxifikationsprozesse in einer Intestinalzelle von *C. elegans*. Der organische Fremdstoff gelangt in die Darmzelle und bindet an einen Kernrezeptor. Dieser Ligand-Rezeptor-Komplex wandert in den Zellkern und aktiviert die Transkription der Phase-I- und -II-Enzyme (CYP = Cytochrome P₄₅₀-abhängige Monooxygenase und GST= Gluthathion-S-Transferase), die daraufhin den Fremdstoff metabolisieren. Exkretiert wird die Substanz durch ABC-Transporter (z.B. pgp). Nicht sicher ist, ob die Transkription der Detoxifikationsgene und der ABC-Transporter auf diese Weise induziert wird (Frei nach Lindblom und Dodd, 2006).

Eine weitere Genfamilie, nicht zugehörig zu Phase-I- und II-Metabolismus, scheint bedeutsam für die Entgiftung des Organismus von organischen Substanzen. Die ABC-Transporter (ATP-Binding-Cassette-Transporter) bilden eine große, ebenfalls streng konservierte Genfamilie, die möglicherweise durch gleiche Mechanismen wie Phase-I- und II-Enzyme reguliert werden (Staudinger et al., 2003). ABC-Transporter werden als intrinsische Membranproteine beschrieben, die unter ATP-Verbrauch hydrophobe Moleküle aus der Zelle transportieren. Ihre Substratspezifität ist recht niedrig, was bedeutet, dass sie eine Vielzahl von ähnlichen Substanzen als Substrat

erkennen und eliminieren können. Als multi drug resistance (MDR) Proteine in (humanen) Tumor-Zellen sind ABC-Transporter verantwortlich für die Elimination von Chemotherapeutika, was eine große Herausforderung für die Krebsforschung bedeutet (Chang, 2003).

In *C. elegans* sind etwa 60 ABC-Transporter bekannt. Zur Unterfamilie der p-Glycoproteine (pgp) zählen 15 Gene (*pgp-1* bis *15*), die in Intestinal-, Exkretions- und Pharynx-Zellen lokalisiert und am Efflux organischer Substanzen beteiligt sind (Sheps, 2004). Broeks et al. (1995) konnten zeigen, dass *pgp-1* und *pgp-3* den Nematoden vor dem Einfluss toxischer Substanzen wie Schwermetalle und organischer Moleküle schützen. Aber nicht nur für *C.elegans* konnte eine Beteiligung der PGP-Proteine an der Detoxifikation gezeigt werden. In der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* wurde die Induktion der *pgps* nach Behandlung mit PAKs nachgewiesen (Vache et al., 2006). Ein Zusammenhang der Entgiftung durch Phase-I- und II-Enzyme und durch ABC-Transporter wurde bisher nur ansatzweise untersucht. Hier scheint besonders die Lokalisation der Enzyme im Darm oder Pharynx von Bedeutung, da bei der Schadstoffaufnahme der erste Kontakt mit der Substanz im Pharynx geschieht, bevor die kontaminierte Nahrung in den Darm entlassen wird. Versuche an *C. elegans* zur Hemmung der ABC-Transporter mit Verapamil zeigten eine Anreicherung eines organischen Giftstoffes im Pharynx des Nematoden (Meyer, 2000). Unterschiede in der Entgiftung, abhängig von der Exposition, könnten so anhand der Genexpression der *C.elegans cyps* und *pgps* aufgedeckt werden.

I.4. Experimenteller Aufbau und molekularbiologische Methoden

I.4.1. Expositionsbedingungen und Bioverfügbarkeit

I.4.1.1. Versuchsaufbau

Die Methode der Echtzeit-PCR (real-time PCR) soll hier genutzt werden, um die akuten Effekte der Schadstoffbehandlung mit Fluoranthen auf ausgesuchte Gene des Nematoden *Caenorhabditis elegans* nachzuweisen und die Bedeutung der Exposition des Schadstoffes über Nahrungspartikel (*Escherichia coli*) zu testen. Repräsentativ für schadstoffinduzierbare Gene werden hauptsächlich eine Monooxygenase (*cyp-35C1*) und ein ABC-Transporter (*pgp-3*) getestet. In einer

abschließenden Untersuchung wird die Induktion eines weiteren *pgps* bestimmt (*pgp-14*). Cytochrom P₄₅₀-abhängige Monooyxgenasen (*cyps*) gehören in Vertebraten zu den Phase-I-Detoxifikationsenzymen, wohingegen ABC-Transporter als intrinsische Membranproteine am Efflux hydrophober Substanzen beteiligt sind. Um eine Übertragbarkeit der Genexpression auf die chronische Wirkung herauszufinden, soll ein modifizierter Nematodentest durchgeführt werden (Nach Traunspurger et al., 1997). Die Würmer werden in dem schadstoffbelasteten Medium inkubiert und anschließend gewaschen. Zehn der so behandelten juvenilen Nematoden (L1) werden in M9-Medium gesetzt und mit Zusatz von *E. coli* als Nahrungsquelle für 96 Stunden inkubiert. Nach dieser Erholungszeit werden die Würmer abgetötet und die aus der Vorbehandlung resultierende Hemmung von Reproduktion, Wachstum und Fertilität im Vergleich zu einer Kontrolle bestimmt. Schließlich wird noch die Fluoranthen-Gesamtbelastung des Nematoden nach der Inkubation mit und ohne Bakterien analysiert, um auch hier einen möglichen Einfluss der Exposition über die Nahrung nachzuweisen. Abbildung I.5. zeigt den geplanten Versuchsaufbau schematisch.

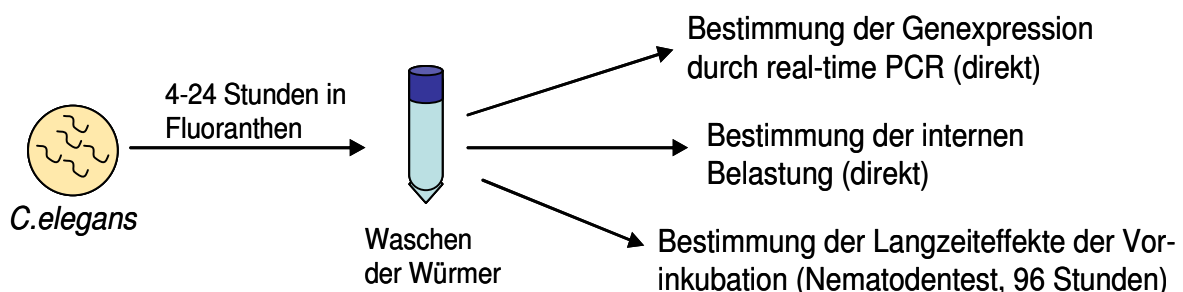


Abbildung I.5. Geplanter Versuchsaufbau zum direkten Vergleich unterschiedlicher Exposition auf die Genexpression und auf Reproduktion, Wachstum und Fertilität.

Für die geplanten Experimente müssen die Faktoren Schadstoffkonzentration, Expositionsdauer und Expositionsart systematisch variiert werden. Die Dosis-Wirkungsbeziehung bei kurzfristiger Exposition soll anzeigen, bei welcher Konzentration molekulare Mechanismen überlastet werden und ob ein direkter Zusammenhang zu Effekten im weiteren Lebenszyklus besteht. D.h. ob eine Schwellenkonzentration für nichtreversible Effekte existiert, die durch die Auslastung des zellulären Systems bestimmt wird. Die Dosis-Wirkungsbeziehung bei langfristiger Exposition soll zusätzliche Informationen zum Zusammenhang von Expositions-

bedingungen, Bioverfügbarkeit und unterschiedlichen Effekten liefern.

I.4.1.2. real-time PCR

Die Methode der real-time PCR wurde ausgewählt, um repräsentative Gene der Schadstoffabwehr unter unterschiedlichen Bedingungen zu untersuchen. In der real-time PCR wird die Expression einzelner, bekannter Gene des Testorganismus nach verschiedenen Schadstoffexpositionen quantifiziert. Hierzu wird die gesamte mRNA isoliert, durch reverse Transkription in einzelsträngige cDNA umgeschrieben und die zu untersuchenden Expressionsprodukte mit spezifischen Primern in der real-time PCR amplifiziert. Über Fluoreszenzmessungen kann eine kontinuierliche Bestimmung der Amplifikatmenge und so eine einfache Bestimmung der Templatemenge erreicht werden. Die Anzahl von PCR-Zyklen zur Erlangung einer bestimmten Produktmenge verhält sich über weite Bereiche proportional zur Menge des Ausgangsmaterials (Bustin, 2000). Die Menge der Transkriptionsrate kann durch eine absolute oder relative Quantifizierung bestimmt werden. Bei der in dieser Arbeit verwendeten, relativen Quantifizierung werden nicht die absoluten Startkopienzahlen oder -konzentrationen bestimmt, sondern das Verhältnis zwischen der Menge des Zielgens (Target-Gen) und des so genannten endogenen Referenzgens (Housekeeping-Gen). Die Expression des Housekeeping-Gens wird nicht durch die Behandlung mit Fluoranthren beeinflusst. Als Housekeeping-Gen ausgewählt wurde Actin1 (*act-1*). Die Amplifikation des Ziel- und Referenzgens erfolgt aus derselben Probe. Die Vorteile der Normalisierung liegen in der Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse, da Gewebefeffekte, Unterschiede in der RNA-Menge der einzelnen Proben, sowie Fehler bei der reversen Transkription innerhalb einer experimentellen Probe gleichermaßen das Zielgen und das Housekeeping-Gen betreffen. Um die beiden Amplifikationsraten miteinander vergleichen zu können, müssen zunächst die Amplifikationseffizienzen auf ihre Vergleichbarkeit getestet werden. Entsprechen sie einander, kann mittels der so genannten $\Delta\Delta C_T$ -Methode eine relative Quantifizierung vorgenommen werden (Pfaffl, 2001). Um die Zielgene zu quantifizieren wird der SYBR-GreenTM Farbstoff benutzt. Dieser Farbstoff fluoresziert nur nach der Bindung an doppelsträngige DNA. Die Zunahme der Intensität des Fluoreszenz-Signals wird pro Zyklus detektiert und ermöglicht so die Quantifizierung der ausgesuchten Gene. Die real-time PCR ist eine verlässliche

Methode, um tendenzielle Unterschiede nachzuweisen. Jedoch sollten Ergebnisse nicht als absolute Zahlen betrachtet werden, da die Ergebnisse abhängig vom Versuchslabor oder dem Experimentator variieren (Bustin, 2000).

I.4.1.3. Modellsubstanz Fluoranthren

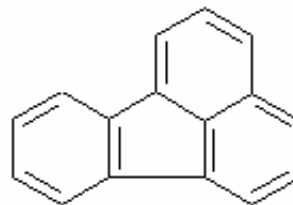
Für die Hauptversuche zur Induktionskapazität molekularer Biomarker und der Faktoren, die die Bioverfügbarkeit beeinflussen wurde der, im Folgenden beschriebene, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoff (PAK) Fluoranthren (Flu) ausgewählt:

Fluoranthren (CAS-Nr. 206-44-0)

Molekulargewicht: 202,25 g/Mol

Chemische Formel: C₁₆H₁₀

Wassergefährdungsklasse: 2



Flu ist eine unpolare Verbindung und als Hauptwirkungsmechanismus wird ihr daher der Mode of Action 1 (MoA1) zugeordnet, auch wenn eine Wechselwirkung mit zellulären Rezeptoren in mehreren Organismen nachgewiesen werden konnte (s.o.) Die Substanz steht auf der Liste für prioritäre Substanzen der Wasser-rahmenrichtlinie der Europäischen Union und hat einen log Kow von 5,16 (EG 2000/60). Der EC₂₀ Wert für Fluoranthren liegt für die Reproduktion von *C. elegans* bei 0,19 mg/L, der EC₅₀ bei 0,9 mg/L (Menzel, 2005). Wasserunlösliche Verbindungen wie Fluoranthren werden im Körper in bipolare Zellmembranen und in unpolare Fettzellen eingelagert. Dabei hat die Akkumulation in den Fettzellen (bei *C. elegans* Lipidtröpfchen in den Intestinalzellen) wohl keinen toxischen Effekt auf den Organismus. Die Effekte der Substanzen resultieren hauptsächlich aus der Einlagerung in die Membranen und sind für MoA1-Substanzen definiert als unspezifische und reversible Störungen der Membranfunktionalität. Die Einlagerung in die Zellmembranen kann über verminderte Aktivität des Organismus bis hin zum Tod führen (van Wezel und Opperhuizen, 1995). Die Monooxygenase *cyp-35C1* und der ABC-Transporter *pgp-3* werden durch Fluoranthren und andere Narkotika induziert (*C.elegans* Microarray Data Menzel et al., 2001: <http://smd.stanford.edu/>).

I.4.2. Genexpressionsanalysen als Mustererkennung

I.4.2.1. Versuchsaufbau

Um eine kostengünstige Alternative zur Genexpressionsanalyse durch Microarrays zu testen, soll die Methode der Differential Display PCR (DD-PCR) etabliert werden (Liang und Pardee, 1992). Dabei sollten die spezifischen Genprodukte untersucht werden, die durch verschiedene Chemikalien induziert werden. Anschließend sollten Chemikalien, die gleiche Genprodukte induzierten, in gleiche Effektklassen eingeordnet werden. Anhand dieses Mustervergleichs könnten bestehende Klassifizierungen, wie die Einordnung von Chemikalien nach ihrem MoA auf ihre molekulare Grundlage überprüft werden. Die gestörten zellulären Prozesse sind universell für viele Spezies, daher bietet die entsprechende Einteilung der Schadstoffe nach ihrem Wirkungsort die Möglichkeit, Vorhersagen bzw. Modelle der toxischen Wirkungsart und Stärke zu entwickeln, die nicht auf einzelne Organismen beschränkt sind. Abgesehen von speziellen zellulären Prozessen, wie der Photosynthese, die ausschließlich in pflanzlichen Zellen stattfindet, sind die zellulären Schutz- und Abwehrmechanismen vieler Organismen vergleichbar, auch wenn sie nicht zu gleichen Resultaten führen. Um die methodische Eignung der DD-PCR für die Zielsetzung zu überprüfen, werden die Expressionsmuster von Nematoden in Kontrollmedium mit denen von Nematoden aus gering (5 μM) und hoch (50 μM) konzentrierten Cadmium-Lösungen verglichen. Cadmium wurde zur Etablierung der Methode ausgewählt, da cadmiuminduzierte Gene bereits mit der Methode der DD-PCR nachgewiesen und identifiziert werden konnten (Liao und Freedman, 1998; Liao et al., 2002). Das Schwermetall Cadmium wird laut Wasserrahmenrichtlinie der Europäischen Union als prioritär gefährliche Substanz eingestuft (EG 2000/60). Nach der Etablierung sollen Chemikalien verschiedener MoAs einzeln und in Kombination getestet werden. Als erste soll die, als unspezifisch klassifizierte Substanz Fluoranthen getestet werden. Des Weiteren Verbindungen, deren toxische Wirkung durch Rezeptoren-Bindung (z.B. Estradiol) und reaktive Substanzen (z.B. ungesättigte aliphatische Chorkohlenwasserstoffe) vermittelt werden.

I.4.2.2. Differential Display Polymerase Chain Reaction (DD-PCR)

Die Methode der DD-PCR wurde entwickelt, um unbekannte Gene aus unterschiedlich differenzierten Zellen, oder gleichen Zellen nach unterschiedlicher Behandlung, zu isolieren und zu identifizieren. Da das Transkriptom (die gesamte mRNA einer Zelle) zu groß ist, um Unterschiede aufzuschlüsseln, wird bei dieser Methode die mRNA in kleinere Subpopulationen aufgespalten. Die RNA aus behandelten und unbehandelten Proben wird isoliert, um Ungleichheiten auf Transkriptionsebene nach der Behandlung nachzuweisen.

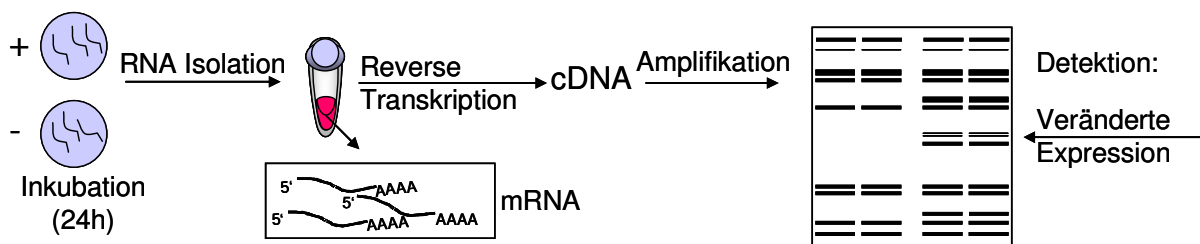


Abbildung I.6. Schematische Darstellung der geplanten Versuche. Nach der Inkubation der Nematoden in unterschiedlichen Medien mit und ohne Cadmium soll die RNA isoliert werden und anschließend die, durch die Cadmium-Behandlung unterschiedlich exprimierte Gene durch Differential Display PCR sichtbar gemacht werden.

Dies geschieht durch die Nutzung dreier unterschiedlicher Anker-Primer bei der reversen Transkription. Die Primer haben jeweils eine andere abschließende Base (A, C oder G) am 3' Ende der Oligo(dT)-Sequenz und binden so während der Reaktion nur an die komplementäre Sequenz der entsprechenden mRNA. Die mRNA wird in drei Subpopulationen einzelsträngige cDNA umgeschrieben. In der darauf folgenden Amplifikation der cDNA werden erneut die Anker-Primer mit zufällig gewählten Primern (Zufallsprimer) kombiniert, und das doppelsträngige PCR-Produkt auf einem Acrylamidgel aufgetrennt. Die Genfragmente werden gefärbt und die Bandenmuster der Fragmente aus unterschiedlichen Proben miteinander verglichen. Nachweislich stärker oder schwächer exprimierte Gene werden aus dem Gel ausgeschnitten und identifiziert. Auf die Identifikation der Genfragmente wurde in dieser Arbeit verzichtet, daher erfolgt hier keine nähere Beschreibung. Abbildung I.6. zeigt schematisch die Vorgehensweise der durchgeführten Schritte der DD-PCR. Vorteile der DD-PCR sind die relativ niedrigen Materialkosten und die Anwendbarkeit

auch für unsequenzierte (Modell) Organismen. Bekannte Nachteile wie geringe Reproduzierbarkeit, häufige Detektion von falsch-positiven und personalintensive Durchführung sollen hier abgewägt werden. Das Ziel war die Erstellung einer Musterbibliothek zur Klassifizierung der Effekte von Schadstoffen anhand der Genexpression von *C. elegans*.

I.5. Erwartung an die Ergebnisse

Mit der Kombination der Methoden zur Erfassung akuter und chronischer Effekte, soll der Zusammenhang zwischen den molekularen Entgiftungssystemen und den Auswirkungen auf die Vitalität des Nematoden *C. elegans* in Abhängigkeit von der Exposition erfasst werden. Es wird erwartet, dass der Aufnahmeweg und die Anreicherung im Körper der Nematoden von großer Bedeutung für den schädlichen Einfluss der Chemikalie sind und dass ein Zusammenhang zwischen der Induktion relevanter Gene und der Auswirkungen auf den gesamten Organismus besteht.

Für die geplanten Untersuchungen mussten vorbereitend geeignete Primer für die Untersuchung der Genexpression von *cyp-35C1*, *pqp-3* und *act-1* ausgewählt und getestet werden. Dann konnte überprüft werden, ob Fluoranthene die Gene dosisabhängig induziert und bei welcher Konzentration ein möglicher Schwellenwert der Induktion liegt, der Hinweise auf eine Überlastung der molekularen Mechanismen geben könnte. Die Überforderung der Detoxifikation auf molekularer Ebene sollte dann anhand eines modifizierten Langzeittests geprüft werden. Des Weiteren sollte der Faktor der Inkubationszeit untersucht werden. Es wurde vermutet, dass sowohl durch steigende Fluoranthene-Konzentration, als auch durch zunehmende Inkubationszeit Schwellenwerte der Genexpression erkannt werden würden, was durch einen gleichzeitigen Einsatz negativer Effekte auf den Organismus belegt würde. In diesem Zusammenhang soll besondere Aufmerksamkeit auf die zellulären Reaktionen (*cyp-35C1* und *pqp-3*) in Abhängigkeit vom Expositionsweg (Medium und Medium mit Futterpartikeln) gelegt werden. Die Lokalisation der Expression der beiden Gene im Darm und zusätzlich im Pharynx (nur *pqp-3*) soll dabei als Grundlage dienen den Zusammenhang der Aufnahme mit der Bioverfügbarkeit der giftigen Substanz und ihrer Effekte zu beleuchten.

Die Etablierung eines Mustererkennungsverfahrens zur ökotoxikologischen Bewertung mit Hilfe der Methode der Differential Display PCR sollte auf ihre Eignung

getestet werden. Dabei wurde erwartet, dass sich die Methode grundsätzlich eignen würde, molekulare Reaktionen auf Schadstoffinkubation nachzuweisen. Fraglich war jedoch, ob Sensitivität und Reproduzierbarkeit genügen würden, um die Fragestellung zu beantworten.

II. MATERIAL und METHODEN

II.1. Chemikalien

Alle erwähnten Chemikalien wurden von Sigma Aldrich Deutschland, Carl Roth Deutschland oder Fisher Scientific bezogen. Enzyme und Reagenzien zur Durchführung der molekularbiologischen Analysen (RNA-Isolierung, reverse Transkription, PCR, Elektrophorese) wurden von Invitrogen, Bio-Rad und Stratagene bezogen. Alle Primer für die reverse Transkription, die real-time PCR und die DD-PCR wurden synthetisiert von der Firma Biomers in Ulm und in einer Konzentration von 10 pmol/ μ l eingesetzt.

II.2. Geräte

- Varian CARY 50 UV/VIS Spectrophotometer
- Ultraschallgerät Bandelin Sonoplus UW 2200
- Power-Pac Basis Power Supply
- Sequi-Gen GT Sequencing cell (Bio-Rad)
- Wide Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad)
- Molecular Imager GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad)
- Biophotometer (Eppendorf)
- Bio Zentrifuge (Eppendorf)
- MyiQ Single-Color real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

II.3. Medien und Reagenzien (alphabetisch geordnet):

Agarosegel, 1%

2 μ g/ml Ethidiumbromid

10ml (10-fach konzentrierten) MOPS Puffer

Auffüllen mit 90 ml DEPC-H₂O

Cadmium Lösung

Für die 5 μ M bzw. 50 μ M Cadmium-Lösungen entsprechende Mengen einer 500 μ M Stammlösung von Cadmiumchlorid (CdCl₂) in M9-Medium in jeweils einem Liter M9-

Medium lösen.

Fluoranthen-Lösungen:

Die unpolare Substanz Fluoranthen wurde als Stammlösung mit einer Konzentration von 50 mg/L und 5 mg/L in DMSO angesetzt. Um sie in wässrigen M9-Medium zu lösen wurden die entsprechenden Mengen der Stammlösung mit dem Lösungsvermittler DMSO bis zu einer Endkonzentration von 0,3 % (v/v) im Medium vermischt und zu jeweils einem Liter M9-Medium gegeben.

LB-Medium (Miller), pH 7,5

Peptone aus Casein: 10,0 g/L

Hefeextrakt: 5,0 g/L

NaCl: 10,0 g/L

Mit H₂O dest. auf 1L auffüllen und in 50 ml Kolben autoklavieren.

M9-Medium (1l)

Na₂HPO₄: 3,16 g in 480 ml

KH₂PO₄: 3 g in 260 ml

NaCl: 5 g in 180 ml

MgSO₄ x 7H₂O: 0,5 g in 80 ml

Lösungen getrennt autoklavieren, nach dem Abkühlen zusammengeben.

10x MOPS-Puffer (1 L)

0, 2 M MOPS (209,27 g/M) 41,85 g/L

0,05 M Natriumacetat (82,04 g/M) 4,10 g/L

0,01 M EDTA (372,24 g/M) 3,72 g/L

pH 7,0, in DEPC-H₂O In dunkler Flasche bei RT aufbewahren!

NGM-Agar

Peptone aus Casein: 2,5 g/L

Agar: 17,0 g/L

NaCl: 3,0 g/L

Pepton, Agar und NaCl in 975 ml deionisiertem Wasser lösen und autoklavieren.

Nach Abkühlung auf ca. 55 °C folgende Lösungen steril dazugeben:

1 ml Cholesterin-Stammlösung (5 g/l)
1 ml CaCl₂-Lösung (1 mol/L)
1 ml MgSO₄-Lösung (1 mol/L)
25 ml KH₂PO₄-puffer, pH 6,0 (1 mol/L)
mit KOH auf pH 6,0 einstellen

Polyacrylamidgel (denaturierendes, 40ml)

4 ml TBE-Puffer (10x)
16,81 g Harnstoff (7 M)
6 ml Acrylamid/ Bisacrylamidlösung (40:1)
13,19 ml H₂O
300 µl 10% (APS) Ammoniumpersulfat-Lösung (Frisch oder -20 °C)
35 µl TEMED (CAS 110-18-9)

RNA-Probenpuffer

20 µl 10x MOPS-Puffer
30 µl Formaldehyd
100 µl Formamid
1 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml)

Saccharose-Lösung (35%)

350 g/L Saccharose
50 mM NaCl
lösen in 1 l H₂O dest.

Silberfärbung

Färbelösung (1 l):	Entwicklerlösung (1 l):
200 ml EtOH	30 g Na ₂ CO ₃
800 ml H ₂ O dest.	969 ml H ₂ O dest.
2 g AgNO ₃	1 ml Formaldehyd (CHO)

10x TBE-Puffer (10-fach konzentriert), pH 8,3, 1 L

55,03 g/L 0,89 M Borsäure (61,83 g/Mol):
44 g/L 0,20 M EDTA-Na₂ (372,24 g/Mol):

107,81 g/L

0,89 M TRIS (121,14 g/Mol):

II.4. Stämme und Kultivierung

II.4.1. *Escherichia coli* (OP₅₀)

- Stammkultur (-20°C): Die Stammkulturen von *E. coli* wurden in einem Volumen von 2 ml (50% Glycerin) bei -20°C gelagert.
- Übernachtskultur (37°C): 50 ml LB-Medium wurden mit 20 µl *E. coli* Stammkultur angeimpft und über Nacht (ü.N.) bei 37°C (14-16 h) schüttelnd inkubiert.

II.4.2. *Caenorhabditis elegans* N2 Bristol

- Dauerplatten: *Caenorhabditis elegans* wurde auf NG-Agar Platten (+Nystatin) bei 20°C kultiviert. 1x pro Woche wurden vier Platten mit 1 ml *E. coli* Übernachtskultur bestrichen und jeweils zwei Stücke von einer Ein-Monat alten Dauerplatte wurden umgekehrt aufgesetzt.
- Testplatten: NG-Agar Platten (-Nystatin) wurden ebenfalls mit 1 ml *E. coli* Übernachtskultur bestrichen und jeweils zwei Stücke Dauerplatte wurden aufgesetzt. Die Platten wurden dann bei 25°C für 96 h inkubiert.

II.5. Schadstoffinkubation

II.5.1. Schadstoffinkubation in Fluoranthen

Die Nematoden wurden mit M9-Medium von den Testplatten gespült und restliche Bakterien durch Waschen mit Saccharose-Lösung entfernt. Die gereinigten Würmer (jeweils von 4 Platten) wurden anschließend in 20 ml der entsprechenden Fluoranthen-Lösungen ohne Schütteln inkubiert. Für die Exposition der Würmer mit Bakterien wurden *E. coli* in M9-Medium zugegeben, so dass eine OD von 0,2 bei 600 nm erreicht wurde. Die entsprach einer Zellzahl von 146 500 000 pro ml. Nach der Eichung erfolgte die Berechnung der Zellzahl/ml anhand der Formel:

$$c(\text{ Zellen/ml}) = \text{OD} - 0,0535 / 1 \times 10^{-9}.$$

Bei der Inkubation in dem organischen Schadstoff wurden lediglich Glasgefäße

verwendet, um eine Adsorption des Stoffes an das Probengefäß zu verhindern. Pro Versuchsansatz und Kontrolle wurden drei Replikate untersucht. Nach der Inkubation und vor weiteren Behandlungen wurden die Nematoden am Binokular betrachtet und festgestellt, dass die gewählten Konditionen keine akuten Effekte auf die Würmer hatten. Die Würmer wirkten vital und beweglich.

II.5.2. Schadstoffinkubation in Cadmium

Die Nematoden wurden mit M9-Medium von den Testplatten gespült und restliche Bakterien durch Waschen mit Saccharose-Lösung entfernt. Die gereinigten Würmer (jeweils von 4 Platten) wurden anschließend in 20 ml der entsprechenden Cadmium-Lösungen inkubiert. Pro Versuchsansatz und Kontrolle wurden drei Replikate verwendet. Die Nematoden wurden vor der RNA-Isolation für 24 Stunden in M9-Medium als Kontrolle oder in M9-Medium mit 5 μM oder 50 μM Cadmium ohne die Zugabe von Bakterien als Nahrung inkubiert. Die unterschiedlichen Cadmium-Konzentrationen wurden ausgewählt, um die Sensitivität der Methode zu überprüfen. Nach der Inkubation wurde der Zustand der Würmer am Binokular überprüft und festgestellt, dass die getesteten Schwermetallkonzentrationen keine akuten Effekte auf die Nematoden hatten.

II.6. Waschen der Nematoden

Die Zentrifuge wurde auf 4 °C vorgekühlt und die gekühlten Medien auf Eis gestellt. Die Würmer wurden mit M9-Medium von der Platte gespült bzw. aus dem Testgefäß entnommen und in ein 50 ml Greinerröhrchen überführt. Anschließend wurden sie bei 4 °C und 3000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 3 ml gekühltem Leitungswasser resuspendiert. Etwa 8 ml 35% Saccharose-Lösung wurden zugegeben, bevor die Würmer erneut bei 4 °C und 3000 rpm 3 min zentrifugiert wurden. Die an der Oberfläche schwimmenden Würmer wurden mit einer Pasteurpipette vorsichtig in ein neues 50 ml-Greiner-röhrchen überführt und ca. 8 ml Leitungswasser zugegeben. Nach einer anschließenden Zentrifugation bei 4 °C, 3000 rpm für 5 Minuten wurde der Überstand abgenommen und das Wurmpellet erneut mit Leitungswasser gewaschen, um die restliche Saccharose zu entfernen. Für die weiteren Analysen wurde das Pellet in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und in der Mikrozentrifuge bei 10000 rpm für etwa

30 Sekunden zentrifugiert, um den verbliebenen Überstand abzunehmen.

II.7. RNA-Isolation mit Trizol

Für die RNA-Isolation wurden jeweils 500 µl Trizol (Invitrogen) zu etwa 100 µl Wurm-Pellet gegeben und die Proben kräftig geschüttelt (Vortex). Die Würmer wurden über Nacht bei -70°C gelagert und anschließend 5 mal in N₂ (flüssig) eingefroren und bei Raumtemperatur wieder aufgetaut, um die Cuticula zu zerstören. Nun wurden 100 µl Chloroform pro 500 µl Trizol zugeben, die Proben wurden gut geschüttelt und 2 Minuten bei RT inkubiert bevor sie 15 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert wurden. Nach dem Zentrifugieren wurden die Proben auf Eis gestellt, die obere, wässrige Phase abgenommen und in ein neues Eppi überführt, welches nicht auf Eis gestellt wurde. Es wurde Isopropanol im Verhältnis 1:1 zu der ursprünglich eingesetzten Menge (500 µl) Trizol zugegeben und die Proben 10 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde erneut 10 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das weißlich scheinende RNA-Pellet wurde mit etwa 500 µl 80% Ethanol (in DEPC-H₂O) gewaschen und 10 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet an der Luft getrocknet. Die so aufgereinigte Gesamt-RNA wurde in DEPC-H₂O aufgenommen und zum Lösen kurz auf 56°C erwärmt.

II.8. DNase I-Behandlung

Um etwaige Kontaminationen genomischer DNA zu entfernen, wurden die RNA Proben mit DNase I Amplification Grade (Invitrogen Cat. No. 18068-015) gemäß dem Protokoll von Invitrogen 15 Minuten bei RT inkubiert. Die DNase wurde anschließend durch Zugabe von EDTA bei 65°C inaktiviert.

II.9. Bestimmung der Konzentration und Reinheit der RNA

Vor und nach dem DNase I-Behandlung wurden die Konzentration und die Reinheit der Gesamt-RNA photometrisch mit einem Eppendorf Biophotometer überprüft. Zur Bestimmung der Reinheit der RNA wurde der Quotient der Absorptionsspektren A_{260}/A_{280} berechnet. Bei einer sauberen RNA-Probe liegt dieser Quotient zwischen

1,7 und 2,1. Die Konzentration wurde automatisch nach folgender Formel berechnet.

$$\text{RNA } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 44,19 \text{ (Farrell, 1993)}$$

A_{260} = Absorption bei 260 nm Wellenlänge in optischer Dichte (OD)

44,19 = Extinktionskoeffizient der RNA

II.10. Polymerase Chain Reaction (PCR)

II.10.1. real-time PCR

II.10.1.1. Primer Auswahl für die real-time PCR

Um verlässliche Ergebnisse zu erhalten ist die Auswahl der Primer für die real-time PCR besonders wichtig. Um ihre Qualität und Funktionalität zu garantieren, wurden sie anhand der bereits gespleissten (d.h. nur die kodierenden Regionen enthaltenden) Originalsequenzen der entsprechenden Gene ausgesucht, welche frei von den folgenden Internet-Seiten bezogen werden können (www.wormbase.org, www.ncbi.nlm.nih.gov). Erstellt wurden die Primer mit Hilfe des Programms Primer 3 (Rozen und Skaletsky, 2000). Es wurden Primer ausgesucht, die möglichst Sequenzen nahe des PolyA-Schwanzes der mRNA amplifizieren. So konnte gewährleistet werden, dass das cDNA-Template aus der reversen Transkription die vollständigen Sequenzen beinhaltet. Es wurde darauf geachtet, dass die Primer etwa 200 Basenpaare (bp) auseinander liegen, um in der real-time PCR die Möglichkeit für Kettenabbrüche und die Bildung von Artefakten zu minimieren. Um die Primer auf etwaige weitere Bindungsstellen im gesamten Genom von *C. elegans* zu überprüfen, wurden die Sequenzen mit der Datenbank NCBI Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) abgeglichen. Es wurden nur solche Primer ausgesucht die keine zusätzlichen Bindungsstellen im Gesamtgenom hatten. Waren die Primer für die etwa 200 bp großen Fragmente spezifisch für das ausgesuchte Gen, wurden sie ohne Modifikationen in Auftrag gegeben. Es wurden Primer für *act-1* (T04C12.6), *cyp-35A1* (C03G6.14), *cyp-35B1* (K07c6.4), *cyp-35C1* (C06B3.3) und *pgp-3* (ZK455.7), *pgp-5* (C05A9.1) und *pgp-14* (F22E10.3) bestellt (In Klammern angegeben sind die Sequenznamen der Gene). Die Auswahl der Gene geschah anhand der Microarray-Daten von Menzel et al. (2005).

II.10.1.2. reverse Transkription

Die reverse Transkription (RT) wurde in 200 µl Reaktionsgefäßen im BIORAD Cyclor durchgeführt. Enzyme und Puffer wurden von Invitrogen bezogen. Der RT-Mix I wurde für 5 min bei 65 °C inkubiert und auf Eis gestellt.

RT-Mix I (12 µl):

2 µl RNA Template (Proben)

1 µl Oligo d(T) Primer

1 µl dNTPs (Carl Roth K044.1)

8 µl H₂O

Nach Zugabe von RT-Mix II und 2-minütiger Inkubation bei 42 °C, wurde jeweils 1 µl der Reversen Transkriptase SuperScriptII (Invitrogen 18064-014) hinzupipettiert und gründlich mit der Probe vermischt.

RT-Mix II (7 µl):

4 µl 5x RT-Puffer

2 µl DTT

1 µl RNase Out (Invitrogen 10777-019)

Die Transkription von RNA in cDNA wurde bei 42 °C für 50 min durchgeführt. Nach anschließender, 15-minütiger Denaturierung des Enzyms bei 72 °C, wurde die Reaktion gestoppt und die Proben bis zu ihrer Verwendung in der PCR bei –20 °C gelagert.

II.10.1.3. real-time PCR

Die ausgewählten Primer wurden in einem PCR-Lauf im Biorad MyIQ single Colour real-time PCR Cyclor unter den folgenden PCR-Konditionen getestet.

PCR-Konditionen

1x 3 min 94 °C

40x 30 sec 94 °C

1 min 55 °C

30 sec 72 °C

1x 5 min 72 °C

∞ 4 °C

real-time PCR Mix (20 µl):

2 µl cDNA

10 µl SybrGreen MasterMix (Bio-Rad 172-5851)

1 µl Primer 1

1 µl Primer 2

6 µl H₂O

Überprüft wurde das Ergebnis auf einem 1%-igen Agarosegel. Stimmt das Molekulargewicht der Banden und zeigten sich keine Kontaminationen genomischer DNA, wurde die Amplifikation der cDNA in der real-time PCR mit den ausgesuchten Primern für *cyp-35C1*, *act-1*, *pgp-14* und *pgp-3* nach dem oben beschriebenen Programm und dem real-time-PCR-Mix durchgeführt. Für jede Probe wurde jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt. Um das Auftreten von falsch-positiven Signalen durch Primer-Dimerisierung auszuschließen, wurde eine Kontrolle ohne cDNA-Template bei jeder Reaktion bestimmt. PCR und real-time PCR wurden in 96-Well Platten durchgeführt. Ausgewertet wurden die Reaktionen nach der $\Delta\Delta CT$ Methode. Bei dieser Methode wird die Cyclenzahl des Housekeeping-Gens (Hk-Gen), bei der das durch SybrGreen ausgelöste Fluoreszenzsignal einen bestimmten Wert (C_T = Cycle Threshold, logarithmischer Anstieg der DNA-Konzentration) überschreitet, von der des Zielgens abgezogen und die normalisierte relative Expression des Zielgens berechnet.

$$\Delta C_T (\text{Probe}) = \text{Zielgen (Probe)} - \text{Hk-Gen (Probe)}$$

$$\Delta C_T (\text{Kalibrator}) = \text{Zielgen (Kontrolle)} - \text{Hk-Gen (Kontrolle)}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{Probe}) - \Delta C_T (\text{Kalibrator})$$

$$\text{Normalisierte relative Expression des Zielgens} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

II.10.2. Differential Display PCR

II.10.2.1. Primer-Auswahl für die DD-PCR

Sequenzen der Anker-Primer:

5`-AAGCTT-T(11)C `3

5`-AAGCTT-T(11)G `3

5`-AAGCTT-T(11)A `3

Sequenzen der Zufalls-Primer:

R1: 5`AAGCTTGATTGCC `3

R2: 5`AAGCTTCGACTGT `3

R3: 5`AAGCTTTGGTCAG `3

R4: 5`AAGCTTCTCAACG `3

R5: 5`AAGCTTAGTAGGC `3

R6: 5`AAGCTTCGACCAT `3

R7: 5`AAGCTTAACGAGG `3

R8: 5`AAGCTTTTACCGC `3

II.10.2.2. reverse Transkription (für Differential Display)

Für die Differential Display Analyse wurden bei der reversen Transkription keine gewöhnlichen Oligo d(T) Primer verwendet, sondern einer von drei verschiedenen Anker-Primern, die sich durch die letzte Base (A, C, G) am 3' Ende unterscheiden. Die reverse Transkription (RT) wurde in 200 µl Reaktionsgefäßen im BIORAD Cycler durchgeführt. Der RT-Mix I wurde für 5 min bei 65°C inkubiert und auf Eis gestellt.

RT-Mix I (12 µl)

2 µl RNA-Template

1 µl Anker-Primer (A, C oder G)

1 µl dNTPs

8 µl H₂O

Nach Zugabe von RT-Mix II und zweiminütiger Inkubation bei 42°C, wurde jeweils 1 µl SuperScriptII hinzupipettiert und gründlich mit der Probe vermischt.

RT-Mix II (7 µl)

4 µl 5x RT-Puffer

2 µl DTT

1 µl RNase Out

Die Transkription von RNA in cDNA wurde bei 42°C und 50 min durchgeführt. Nach anschließender 15-minütiger Denaturierung des Enzyms bei 72°C wurden die Proben bis zu ihrer Verwendung in der PCR bei -20°C gelagert.

II.10.2.3. Differential Display PCR

Die Methode des Differential Display wurde entwickelt, um unbekannte Gene aus unterschiedlich differenzierten Zellen oder gleichen Zellen nach unterschiedlicher Behandlung, zu isolieren und zu identifizieren. Die DD-PCR wurde mit den in der reversen Transkription verwendeten Anker-Primern und einem der Zufalls-Primer (R1-R8) durchgeführt. Die Bedingungen wurden optimiert, um möglichst reine, konzentrierte DNA-Fragmente zu amplifizieren. Dafür wurden die Konzentrationen der dNTPs von 50-200 µM und die des MgCl₂ von 1-4 µM variiert, sowie die Zyklenanzahl und Länge verändert (Tabelle I.2.1). Das beste Ergebnis wurde in einem 20 µl Ansatz DD-PCR-Mix (Mix 6) erzielt. Die Proben wurden im Thermocycler amplifiziert und entweder bei -20°C gelagert oder mit 6 µl Probenpuffer versetzt und auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen.

DD- PCR Programm

1x	3 min 94 °C
40x	30 sec 94 °C
	2 min 40 °C
	30 sec 72 °C
1x	5 min 72 °C
	∞ 4 °C

Tabelle I.2.1. Optimierung der DD-PCR

	Mix3	Mix5	Mix6	Mix7
In µl				
cDNA	2	2	2	2
Puffer (10x)	2	2	2	2
MgCl ₂ (50 mM)	1	1,5	1,5	1
dNTP (10 mM) (Carl Roth K044.1)	0,5	0,5	0,25	0,25
Zufalls-Primer	1	1	1	1
Anker-Primer	1	1	1	1
Taq-Polymerase (Invitrogen 10342-046)	0,2	0,2	0,2	0,2
H ₂ O	12,3	11,8	12,05	12,55
Gesamt (µl)	20	20	20	20

II.10.2.4. Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Glasplatten der Gelapparatur wurden mit Reinigungsmittel gespült und mit Ethanol entfettet. Die Oberfläche der Wärmeplatte wurde dünn mit Silikonlösung eingerieben. Die Ohrenplatte wurde im Bereich des Gels dünn mit Silikon eingerieben. Das Gel hat die Größe 40 x 21 x 0,4 cm. Die Kammbreite beträgt 15 cm mit insgesamt 48 Probestaschen. Für ein denaturierendes (7 M Harnstoff) 6% Polyacrylamidgel wurden 40 ml Acrylamidlösung angesetzt und 10 Minuten mit einer Vakuumpumpe im Exsikkator entgast. Anschließend wurden 300 µl 10% APS-Lösung und 35 µl TEMED zugegeben, die Lösung zwischen die Glasplatten gegossen und der Kamm eingesetzt. APS startet als Radikalgeber die Polymerisation des Gels und TEMED verstärkt die Polymerisation durch eine

Quervernetzung der Acrylamid/ Bisacrylamidbausteine. Das Gel musste 2 h polymerisieren und in 1x TBE Puffer bei 1300 V für 30 min vorlaufen. Dann wurden die Proben aufgetragen und für etwa 3 h bei 1300 V ihrer Größe nach aufgetrennt.

II.10.2.5. Silberfärbung/ Auswertung

Das Gel wurde aus der Apparatur entfernt und in eine Schale überführt, in der es 3-mal mit H₂O gespült wurde. Anschließend wurde das Gel für 45 min mit 1 l 0,2 % AgNO₃ Färbelösung gefärbt. Nach der Färbung wurde das Gel 3-mal mit H₂O gewaschen und anschließend in reduzierender Entwickler-Lösung wenige Minuten entwickelt. Nachdem die Färbung ausreichend entwickelt war, wurden die Gele mit H₂O gewaschen und mittels eines Densitometer 800 (BIORAD) dokumentiert. Ausgewertet wurden die Gele mit Hilfe des Programmes Quantity One (BIORAD) und Unterschiede in der Genexpression mit Hilfe von Statistika 6.0 auf Signifikanz überprüft.

II.11. Life cycle test mit *C. elegans*

Der recovery life cycle test wurde in Anlehnung an den Nematodentest durchgeführt (Traunspurger et al., 1997). *C. elegans* von Testplatten (II.4.2.) wurden nach 72 Stunden mit M9-Medium gewaschen und für 4-24 Stunden in unterschiedlichen Fluoranthen-Lösungen mit oder ohne *E. coli* (0,2 OD bei einer Wellenlänge von 600 nm) inkubiert. Als Kontrolle dienten Würmer, die in M9-Medium mit 0,3 % DMSO inkubiert wurden. Nach der Inkubation wurden die Würmer erneut mit M9-Medium gewaschen und zehn juvenile Würmer (L1) wurden bei einer Bakteriendichte von 0,23 OD in 1 ml M9-Medium für 96 Stunden bei 20 °C gehalten. Die Proben wurden weder während der Inkubation in Fluoranthen noch in der Erholungszeit in M9-Medium geschüttelt. Nach 96 Stunden wurden 0,5 ml Bengalrosa-Lösung zugegeben und die Würmer mit Hitze abgetötet. Der Einfluss der organischen Chemikalie wurde anhand einer Kontrollprobe bestimmt, in die Würmer ohne Fluoranthenbehandlung eingesetzt wurden. Die Parameter zur Bestimmung sind Wachstum, welches anhand einer Größenkontrolle zu Beginn der 96 Stunden errechnet wurde, Reproduktion, wobei die Nachkommenzahl bestimmt wurde und zuletzt die Fertilität. Sie gibt an, ob die Würmer gravid. Die Hemmung wurde jeweils mit den Mittelwerten nach der

folgenden Formel berechnet:

$$\text{Hemmung in \%} = 100 - \frac{\text{Mittelwert (Probe)}}{\text{Mittelwert (Kontrolle)}} * 100$$

Mit diesem Ansatz ist es möglich die Reversibilität der Effekte auf den Organismus zu untersuchen, was zu einer Bewertung des Schadstoffes beiträgt.

II.12. Body Burden Fluoranthen

Um die Bioakkumulation von Fluoranthen in den Nematoden nachzuweisen, wurden die Würmer nach der Behandlung mit Saccharose-Lösung gewaschen. Die Kutikula der Würmer (Trockengewicht ca. 5 mg) wurde auf Eis mit Ultraschall (Bandelin Sonoplus UW 2200; 3 x 5 Sekunden) bei einer Frequenz von 20 kHz weitestgehend zerstört. Der Erfolg der Disruption wurde am Mikroskop überprüft. Die chemische Bestimmung der internen Belastung der Würmer wurde im Zentrallabor der Technischen Universität Hamburg Harburg durchgeführt. Dort wurde das Pellet in Diethylether (250 µl) aufgenommen und die Konzentration der organischen Verbindung im Überstand per Fluoreszenz-HPLC (High Performance Liquid Chromatography) bestimmt. Zuletzt wurden die Proben getrocknet, um die Fluoranthenbelastung anhand des Trockengewichtes und der definierten Menge des Lösungsmittels berechnen zu können. Es wurde ebenfalls versucht mögliche Metabolite per ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) nachzuweisen. Dazu wurde das Fluoranthen aus der Nematoden-Suspension mit Dichlormethan extrahiert (Flüssig-Flüssig Extraktion), die Extrakte eingeeengt und analysiert. (Gaschromatographen HP 5890II mit MSD 5971A). Fluoranthen konnte nachgewiesen werden, jedoch war die Detektion von Metaboliten nicht erfolgreich.

II.13. Statistische Auswertung

Alle Versuchsansätze wurden mit jeweils drei Replikaten (n=3) ausgewertet. Die Grafiken zeigen die Mittelwerte (\pm Standardabweichung). Mittelwerte der Parallelen und die Standardabweichungen wurden berechnet mit Excel. Statistische Analysen auf Signifikanz wurden mit Hilfe des Programms Statistika 6.0 durchgeführt. Dabei wurde der t-Test für die Variablen als unabhängige Stichproben mit einem

Signifikanz-Niveau von 0,05 (p-Wert), sowie Korrelationsanalysen angewendet. Die t-Tests zur Berechnung der Signifikanz der unterschiedlichen Genexpression von *cyp-35C1* und *pgp-3* wurden anhand der Werte der relativen Expression ($\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert oder ΔCt -Wert) durchgeführt. Eine mehrfaktorielle ANOVA wurde benutzt, um Wechselwirkungen der unabhängigen Faktoren Fluoranthren und Futter im Nematodentest zu berechnen. Relevante Ergebnistabellen der statistischen Auswertung sind im Anhang gelistet.

III. ERGEBNISSE

III.1. Biomarker für die Bioverfügbarkeit (Cytochrome P₄₅₀ Monooxygenase)

Cyps sind aufgrund ihres generellen Vorkommens, ihrer niedrigen Substratspezifität und zuletzt wegen ihrer Sensitivität geeignet, Targetreaktionen von PAKs in Organismen nachzuweisen. Mit Hilfe dieser Biomarker sollten die Fragen beantwortet werden, ob ein Einfluss der Expositionsart und Dauer für die Verfügbarkeit des Schadstoffs bereits auf zellulärer Ebene nachzuweisen ist und ob es möglich ist, einen Schwellenwert der Biomarkerinduktion zu bestimmen, der auf irreversible Effekte schließen lässt. Um die Bedeutung membrangebundener, alternativer Exkretionssysteme organischer Substanzen zu untersuchen, wurde die Induktion eines ABC-Transporters (*pgp-3*) untersucht.

Zur Bestimmung der Expression von *C. elegans cyp* und *pgp*-Genen per real-time PCR mussten geeignete Primer gesucht werden. Nach den folgenden Vorarbeiten wurde die Induktion durch verschiedene Bedingungen der Fluoranthen-Exposition getestet.

III.1.1. Auswahl und Eignung der Primer für die real-time PCR

Es wurde die Eignung mehrerer Primer für *cyp-35C1*, *act-1*, *pgp-3* und *pgp-14* in-silico und in-vitro überprüft. Der Schmelzpunkt aller Primer liegt bei 60°C und die amplifizierten Fragmente haben eine Länge zwischen 100 und 250 Basenpaaren. Es wurden folgende Primer-Paare ausgewählt.

cyp-35C1 (C06B3.3)

CYP-35C1L2: AACAATCCCCAAGTCATGGA

CYP-35C1R2: GCACTCAATTGGGAAGCAAT

pgp-3 (ZK455.7)

Pgp3L2: TGTGTTTCGAGATGCCGACT

Pgp3R2: ATCTCCGAGCTGAACCAAGG

act-1 (T04C12.6)

Actin1L: CTAACCGTGAAAAGATGACCCA

Actin1R: AGCGTAGAGGGAGAGGACAGC

pgp-14 (F22E10.3)

Pgp14_L: CGGAGATAAGCTTGGAGTGC

Pgp14_R: AGTCGTTTTCCAGCCTTTGA

Die Eignung wurde anhand einer PCR-Reaktion gemäß der Konditionen für die real-time PCR überprüft. Die amplifizierten Fragmente wurden auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen und ihre Größe und Reinheit anhand eines DNA-Standards bestimmt. Bereits hier konnte eine deutliche Induktion des *cyp-35C1* durch eine achtstündige Behandlung mit Fluoranthen nachgewiesen werden (Abbildung III.1.a). Es wurde ein Fragment der erwarteten Größe amplifiziert und das Agarosegel zeigte ansonsten keine weiteren DNA-Banden. Die benutzten Primer konnten damit für die real-time PCR verwendet werden. *cyp-35A1* und *B1* wurden ebenfalls durch Fluoranthen induziert, jedoch nicht zur Bestimmung der relativen Expression herangezogen.

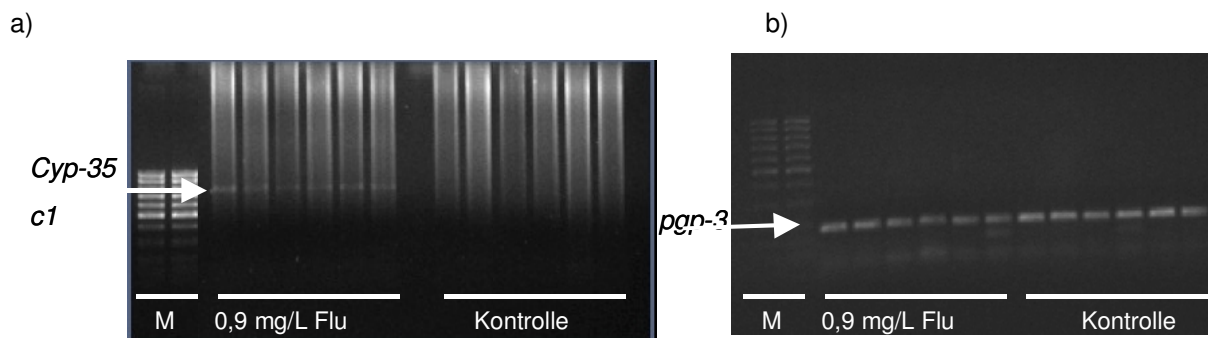


Abbildung III.1.a: 1%-iges Agarosegel mit dem PCR-Produkt von *cyp-35C1*. Induziert durch Inkubation von *C. elegans* in 0,9 mg/L Fluoranthen für 8 Stunden. b: 1%-iges Agarosegel mit *pgp-3*. Schwache bis keine Induktion des konstitutiv exprimierten ABC-Transporters durch Fluoranthen.

Die untersuchten Primer für *pgp-3* und *pgp-14* erwiesen sich ebenfalls als spezifisch, es wurde jeweils ein Fragment der erwarteten Größe auf dem Agarosegel nachgewiesen, welches durch die Fluoranthenbehandlung augenscheinlich nur geringfügig induziert wurde. Abbildung III.1.b zeigt das Produkt für *pgp-3*. Das Produkt von *pgp-14* wird nicht gezeigt. Die Primer konnten nun eingesetzt werden, um die Induktion mit der weitaus sensitiveren Methode der real-time PCR zu überprüfen. Die Primer für *act-1* wurden ebenfalls getestet und es zeigten sich klare Banden auf dem Agarosegel sowohl in der Kontrolle als auch in den behandelten Proben (nicht dargestellt). Es konnte keine Induktion durch die Fluoranthenbehandlung nachgewiesen werden, womit *act-1* sich als Houskeeping-Gen für die real-time PCR eignete. Somit konnten die Effekte von Fluoranthen auf die Induktion der Gene in den folgenden Untersuchungen überprüft werden. Die dosisabhängigen Effekte einer Fluoranthen-Konzentrationsreihe auf die Genexpression wurden nach 6 Stunden gemessen. Um der Genexpression chronische Effekte zuzuordnen, wurde nach der Schadstoffinkubation ein modifizierter Nematodentest durchgeführt und die Auswirkungen auf Reproduktion, Wachstum und Fertilität bestimmt. Es wurde ein dosisabhängiger Anstieg der *cyp-35C1* Expression erwartet, begleitet von einem zunehmenden Einfluss auf die chronischen Beobachtungsgrößen. Vergleichsweise wurde eine schwächere Induktion des *pgp-3* erwartet, da die Vorversuche eine konstitutive Expression des ABC-Transporters zeigten.

III.1.2. Effekte auf die *cyp-35C1*-und *pgp-3*-Expression und chronische Parameter durch Kurzzeitinkubation in Fluoranthen

Durch die Behandlung mit Flu für sechs Stunden konnte eine starke konzentrationsabhängige Induktion des *cyp-35C1*-Gens von 0,01 mg/L bis 10 mg/L nachgewiesen werden. Eine Konzentration von 0,01 mg/L induzierte eine zweifach erhöhte relative Expression des Gens. Bei einer Inkubation in 15 mg/L Flu verminderte sich die relative Expression verglichen mit der Expression nach Inkubation in 10 mg/L. Höhere Flu-Konzentrationen zu testen war aufgrund der geringen Löslichkeit von Flu in Wasser trotz des Lösungsvermittlers DMSO nicht möglich. Abbildung III.2. zeigt die relative Expression von *cyp-35C1* nach sechsständiger Flu-Behandlung.

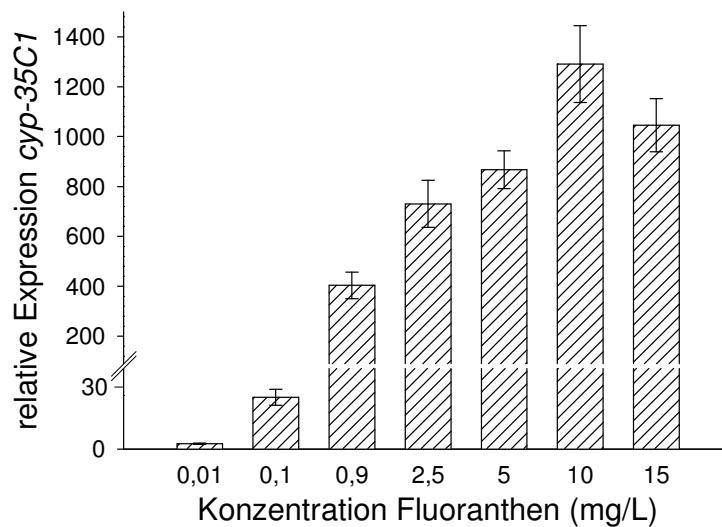


Abbildung III.2. Relative Expression von *C. elegans cyp-35C1* induziert durch Inkubation in Fluoranthen-Lösungen für sechs Stunden ohne *E. coli*. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (n=3). Es besteht eine Korrelation zwischen der Konzentration und der Geninduktion ($r^2=0,83$). Zur besseren Veranschaulichung der relativen Expressionswerte bei 0,01 und 0,1 mg/L wurde eine Unterbrechung in die Y-Achse zwischen 50 und 150 eingefügt.

Um die Bedeutung der intrinsischen Membran-Proteine der Familie der ABC-Transporter zu untersuchen, wurde die Induktion der Genexpression von *p_gp-3* in denselben Proben in denen die relative Expression von *cyp-35C1* bestimmt wurde, gemessen. Die Expression des ABC-Transporter *p_gp-3* wurde durch die Behandlung mit Fluoranthen ebenfalls konzentrationsabhängig induziert, jedoch deutlich geringer als die Cytochrome P₄₅₀ Monooxygenase. Die Induktion des *cyp*-Genes zeigte sich im Vergleich etwa 100-mal stärker. Die Auffälligkeit der ähnlichen Induktionsmuster wurde durch eine konzentrationsabhängige Korrelation bestätigt: r^2 der Induktion der beiden Gene ist 0,98. Abbildung III.3. zeigt die relative Expression von *p_gp-3* nach sechs Stunden Inkubation in der Fluoranthen-Konzentrationsreihe. Es wurde deutlich, dass beide Gene konzentrationsabhängig induziert werden und ferner noch, gleichen Induktionsmustern folgen.

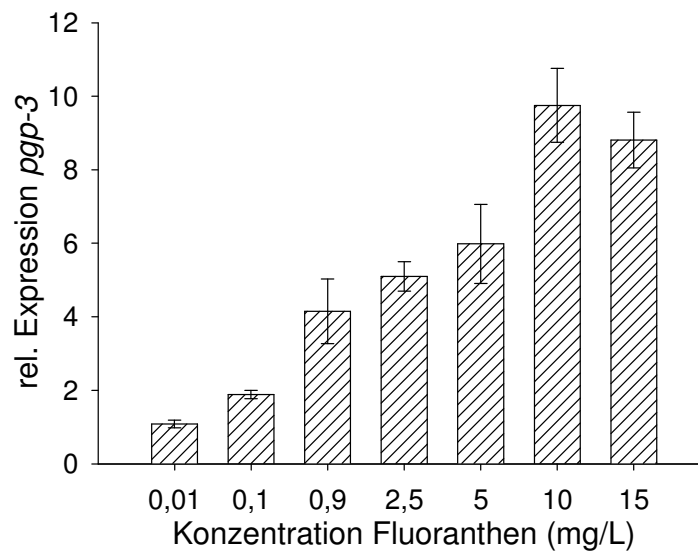


Abbildung III.3. Relative Expression von *C. elegans pgp-3* induziert durch Inkubation in Fluoranthen-Lösungen für sechs Stunden ohne *E. coli*. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (n=3). Es besteht eine Korrelation zwischen Konzentration und Induktion ($r^2=0,90$).

Um nun zu untersuchen, ob die veränderte Geninduktion in Zusammenhang mit etwaigen chronischen Schäden gebracht werden kann, wurde ein modifizierter Nematodentest durchgeführt. Zehn juvenile Würmer (L1) wurden nach der Behandlung in Fluoranthen-Medium (Behandlung) und in reinem Medium (Kontrolle) für 96 Stunden in reinem Medium mit Nahrungspartikeln inkubiert. Nach dieser Erholungszeit wurden die Auswirkungen der vorherigen Schadstoffbehandlung bestimmt. So sollte festgestellt werden, ob die bis dahin akkumulierte Substanz dem Organismus irreversible Schäden in Form von verminderter Reproduktionsleistung, Längenwachstum oder Fruchtbarkeit zugefügt hatte. Es wurde vermutet, dass chronische Schäden erst durch eine Fluoranthenkonzentration von 15 mg/L verursacht würden, da hier die Induktionskapazität des *cyp*-Genes erreicht wurde. Die Induktion von *cyp-35C1* zeigte sich zwischen 10 und 15 mg/L signifikant vermindert (t-Test $p=0,004659$).

Die Auswertung des Nematodentest ergab interessanterweise durch die Vorbehandlung mit Fluoranthen (0,01 bis 15 mg/L) keine messbaren Effekte auf die Parameter Fertilität und Wachstum. Abbildung III.4. zeigt Ergebnisse der adulten Würmer für Wachstum als Größe in μM und die Fertilität in % in Kontrolle (schwarze

Balken) und Fluoranthen-Vorbehandlung (weiße Balken). Anders als für das Wachstum und die Fertilität wurde die Reproduktionsleistung durch die 6-stündige Vorinkubation in Fluoranthen vermindert.

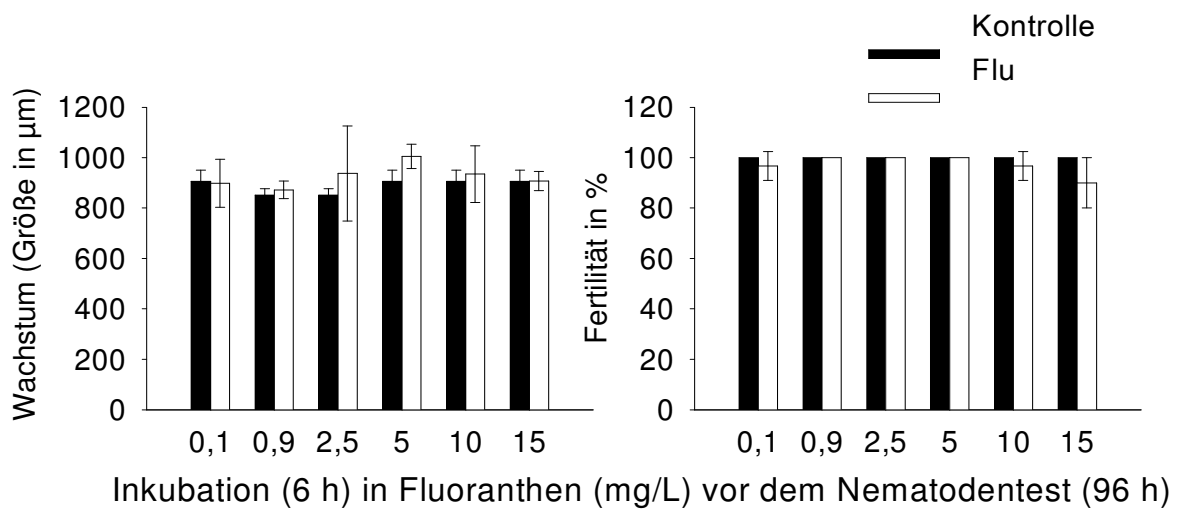


Abbildung III.4. Ergebnis der Parameter Wachstum und Fertilität von *C. elegans* nach 96h in M9-Medium und nach vorheriger Inkubation in Kontrollmedium (M9) und in unterschiedlichen Fluoranthen-Konzentrationen für sechs Stunden. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (n=3).

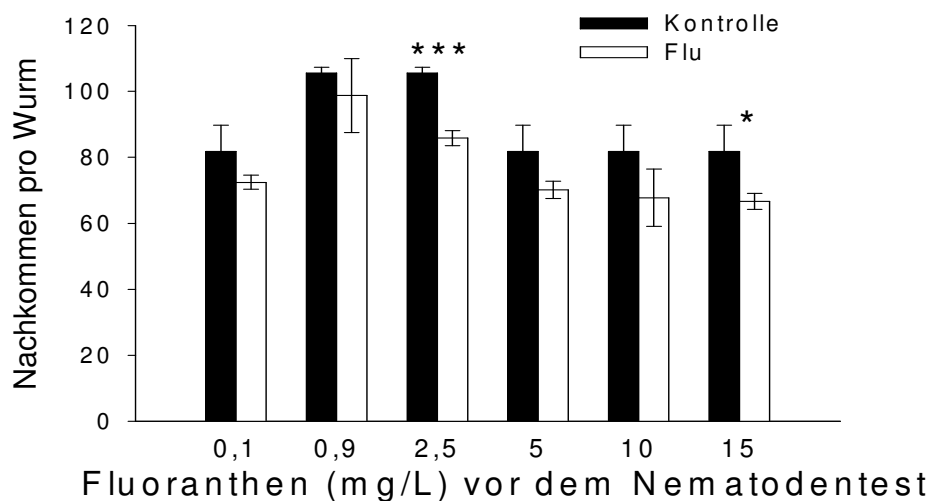


Abbildung III.5. Reproduktionsleistung als Nachkommen pro Wurm (*C. elegans*) nach 96h in M9-Medium und vorheriger Inkubation in Kontrollmedium (M9) und in unterschiedlichen Fluoranthen-Konzentrationen für sechs Stunden. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (n=3). (t-Test * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$)

Abbildung III.5. zeigt die Nachkommenzahl pro Wurm der Kontrolle (schwarze Balken) und der Fluoranthen behandelten Würmer (weiße Balken). Eine Hemmung war durch Inkubation der Würmer in 2,5 mg/L Fluoranthen ($p = 0,000269$) und 15 mg/L ($p = 0,034026$) signifikant. Es wird deutlich, dass die chronischen Parameter, wenn dargestellt als Hemmung in %, nicht konzentrationsabhängig von der Vorinkubation in Fluoranthen beeinflusst wurden, obwohl die kurzzeitige Inkubation in Fluoranthen irreversible Schäden der Reproduktionsleistung zur Folge hatte (Abbildung III.6.).

Entgegen den Erwartungen ließen sich aus dem Vergleich der beiden Versuchsansätze keine direkten Abhängigkeiten der Induktionskapazität der Biomarker *cyp-35C1* oder *pqp-3* und der Effekte auf die chronischen Parameter ableiten. Des Weiteren zeigten sich die Auswirkungen der sechsständigen Fluoranthen-Behandlung auf chronische Beobachtungsgrößen konzentrationsunabhängig. Daher wurden im Folgenden Effekte untersucht, die in Abhängigkeit von der Expositionsdauer und bei einer konstanten Konzentration (0,9 mg/L Fluoranthen) auftraten. So konnte überprüft werden, ob ein zeitlicher Schwellenwert existiert, der Geninduktion und chronische Effekte miteinander verbindet.

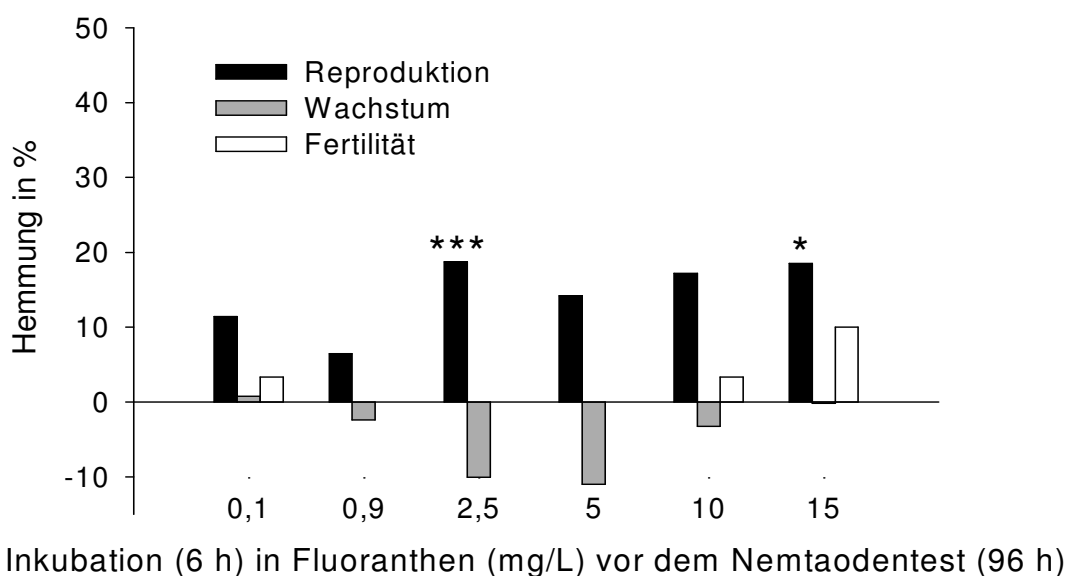


Abbildung III.6. Ergebnis des Nematodentests nach vorheriger Inkubation von *C. elegans* in unterschiedlichen Fluoranthen-Konzentrationen für 6 Stunden. Gezeigt ist die Hemmung in % nach 96 Stunden für Reproduktion, Wachstum und Fertilität. * Hemmungen signifikant unterschiedlich zur Kontrolle (t-Test * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

III.1.3. Effekte von Langzeitexposition und Expositionsart auf die Genexpression von *cyp-35C1* und *pgp-3*, Reproduktion und Bioakkumulation

Die Experimente mit variierender Inkubationszeit wurden bei einer Konzentration von 0,9 mg/L Fluoranthen durchgeführt. Die ausgesuchte Konzentration entspricht dem EC₅₀-Wert für Reproduktion im klassischen Nematodentest (Menzel und Reichert, 2005). Dabei werden die Würmer während der gesamten Versuchszeit dem Schadstoff ausgesetzt. Daher war in den hier durchgeführten Tests davon auszugehen, dass bei zunehmender Expositionsdauer chronische Effekte auftreten und die Genexpression induziert werden würde. Abbildung III.7. zeigt die Expression von *cyp-35C1* nach Exposition in Fluoranthen-Medium. Nach sechsständiger Exposition war ein Maximum der Expression zu beobachten, wobei der steile Anstieg der Induktion zwischen vier und sechs Stunden besonders auffiel. Nach acht Stunden war die Expression bereits um etwa die Hälfte verringert und nach 24-stündiger Inkubation war lediglich noch eine 2-fach erhöhte Expression des Genes detektierbar.

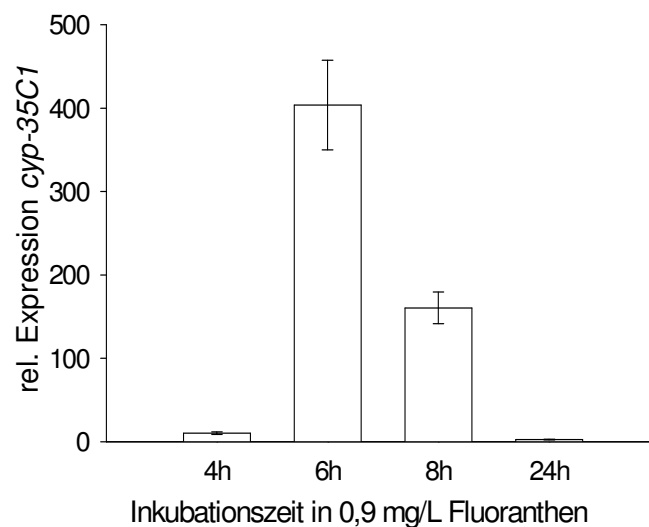


Abbildung III.7. Relative Expression von *C. elegans cyp-35C1* induziert durch Inkubation in 0,9 mg/L Fluoranthen für 4-24 Stunden ohne *E. coli*. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (n=3).

Um die Bedeutung des zeitabhängigen Induktionsmusters näher zu beleuchten wurden die Experimente unter veränderten Expositionsbedingungen wiederholt. Durch Zugabe von *E. coli* zu den Versuchsansätzen konnte der Einfluss der

Nahrungspartikel auf die Bioverfügbarkeit bestimmt werden.

Abbildung III.8. zeigt die Ergebnisse der Untersuchungen mit Nahrungspartikeln (gestreifte Säulen) im Vergleich zu den Resultaten der Experimente ohne *E. coli* als Nahrungsquelle (weiße Säulen) während der Schadstoff-Inkubation. Die Induktionsmuster der beiden Ansätze ähneln sich generell, jedoch ist der Anstieg der Expression von *cyp-35C1* zwischen sechs und acht Stunden bei einer Exposition über Nahrung vergleichsweise mäßig. Interessanterweise hatte die veränderte Exposition einen signifikanten Einfluss auf die Expression der Monooxygenase.

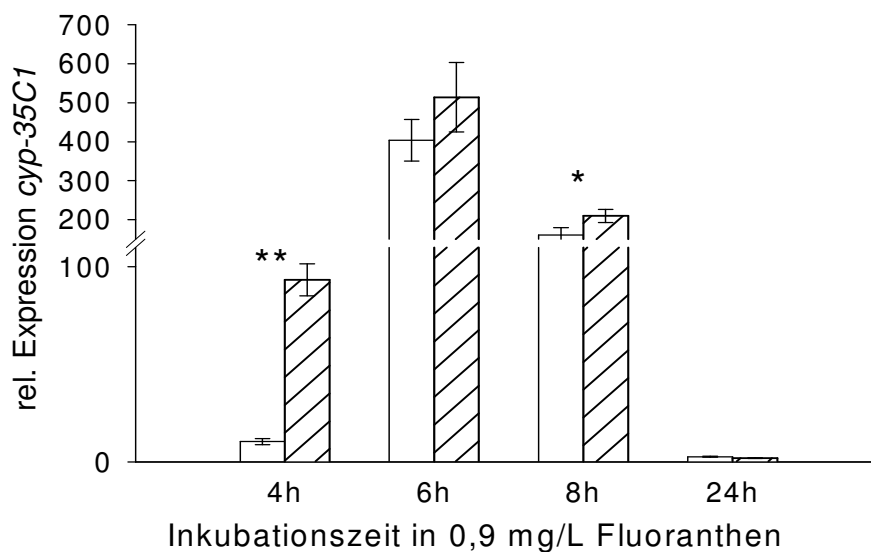


Abbildung III.8. Relative Expression von *C. elegans cyp-35C1* induziert durch Inkubation in 0,9 mg/L Fluoranthen für 4-24 Stunden mit (gestreifte Säulen) und ohne (weiße Säulen) *E. coli*. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (n=3). Signifikante Unterschiede in der Genexpression durch Exposition mit und ohne Bakterien wurden markiert durch *. (t-Test * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) Zur besseren Veranschaulichung wurde zwischen 110 und 150 eine Unterbrechung in die Y-Achse eingefügt.

Abgesehen von dem Endpunkt nach 24h wurde eine stärkere Induktion des Genes nachgewiesen, wenn die Exposition über die Nahrung in Form von Bakterien erfolgte. Für vier und acht Stunden Inkubation waren die Unterschiede der Genexpression signifikant.

Die Induktion der Expression der Cytochrom Monooxygenase wurde nun verglichen mit der des ABC-Transporters *pgp-3* (Abbildung III.9.). Es wurde erwartet, dass die Induktion von *pgp-3* durch die Exposition über Medium mit Flu und ohne Bakterien

verstärkt werden würde. Das Gen wird im Darm, aber auch in den pharyngealen Zellen exprimiert, durch die ein direkter Efflux der nicht an Bakterien gebundenen Substanz vermutet wurde. Mögliche Effekte in Abhängigkeit von dem Aufnahmeweg auf die Reihenfolge der Induktion der beiden Gene sollten so die unterschiedlichen Schutzmechanismen beleuchten. Die Inkubation in 0,9 mg/L Fluoranthren induzierte zu allen getesteten Zeitpunkten die Expression von *pgp-3*. Die Induktion war generell weitaus schwächer als die des *cyp*-Genes und es konnte eine Korrelation des Induktionsmusters der Gene *cyp-35C1* und *pgp-3* nachgewiesen werden. Dabei war r^2 ohne *E. coli* = 0,87, r^2 mit *E. coli* = 0,79. Wider Erwarten konnte kein signifikanter Unterschied der Induktion, der durch die Exposition über Medium oder Medium mit Bakterien verursacht wurde, festgestellt werden.

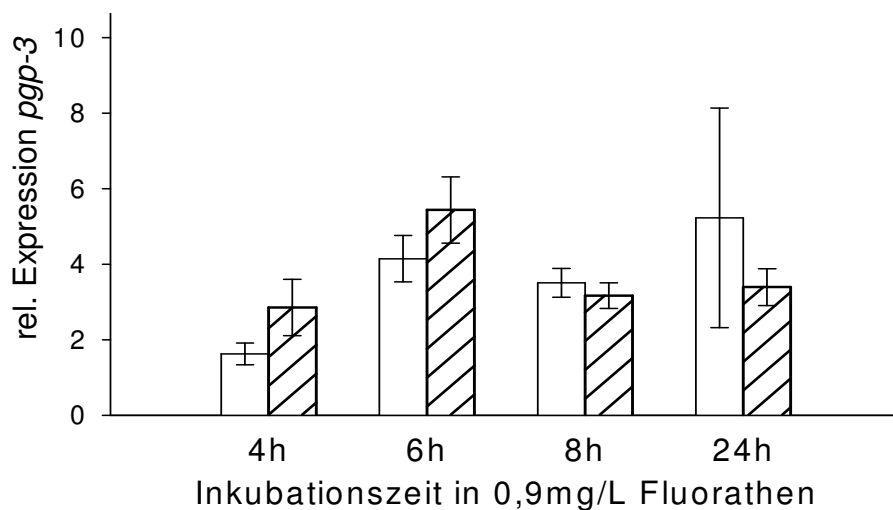


Abbildung III.9. Relative Expression von *C. elegans pgp-3* induziert durch Inkubation in 0,9 mg/L Fluoranthren für 4-24 Stunden mit (gestreifte Säulen) und ohne (weiße Säulen) *E. coli*. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (n=3).

Wie schon für die Fluoranthren-Konzentrationsreihe beschrieben, wurde mit den Nematoden nach der Inkubation in dem schadstoffbelasteten Medium ein Langzeittest für 96 Stunden durchgeführt. Der schädliche Einfluss der Chemikalie, bzw., die Möglichkeit des Nematoden sich von dem chemischen Stress zu erholen, sollte so bestimmt werden. Die Versuche wurden unter der Annahme durchgeführt, dass die negativen Effekte auf den Organismus mit zunehmender Vorinkubationszeit verstärkt werden. Hier war besonders von Interesse, ob die Unterschiede in der Expression von *cyp-35C1* durch die Exposition über Futter, sich auch als chronische

Schäden bemerkbar machen würden. Die Parameter Wachstum und Fertilität wurden durch die Vorbehandlung mit Fluoranthen nur geringfügig beeinträchtigt (Abbildung III.10.). Lediglich nach 24 Stunden zeigt sich eine leicht verminderte Fertilität der Nematoden in dem Versuchsansatz mit Fluoranthen und ohne *E. coli*. Offensichtlich hat die Verlängerung der Vorinkubation in M9-Medium keinen Einfluss auf die beiden Vitalitätsparameter. Auch ein Futtermangel der Vorinkubation ohne *E. coli* macht sich hier im direkten Vergleich nicht bemerkbar.

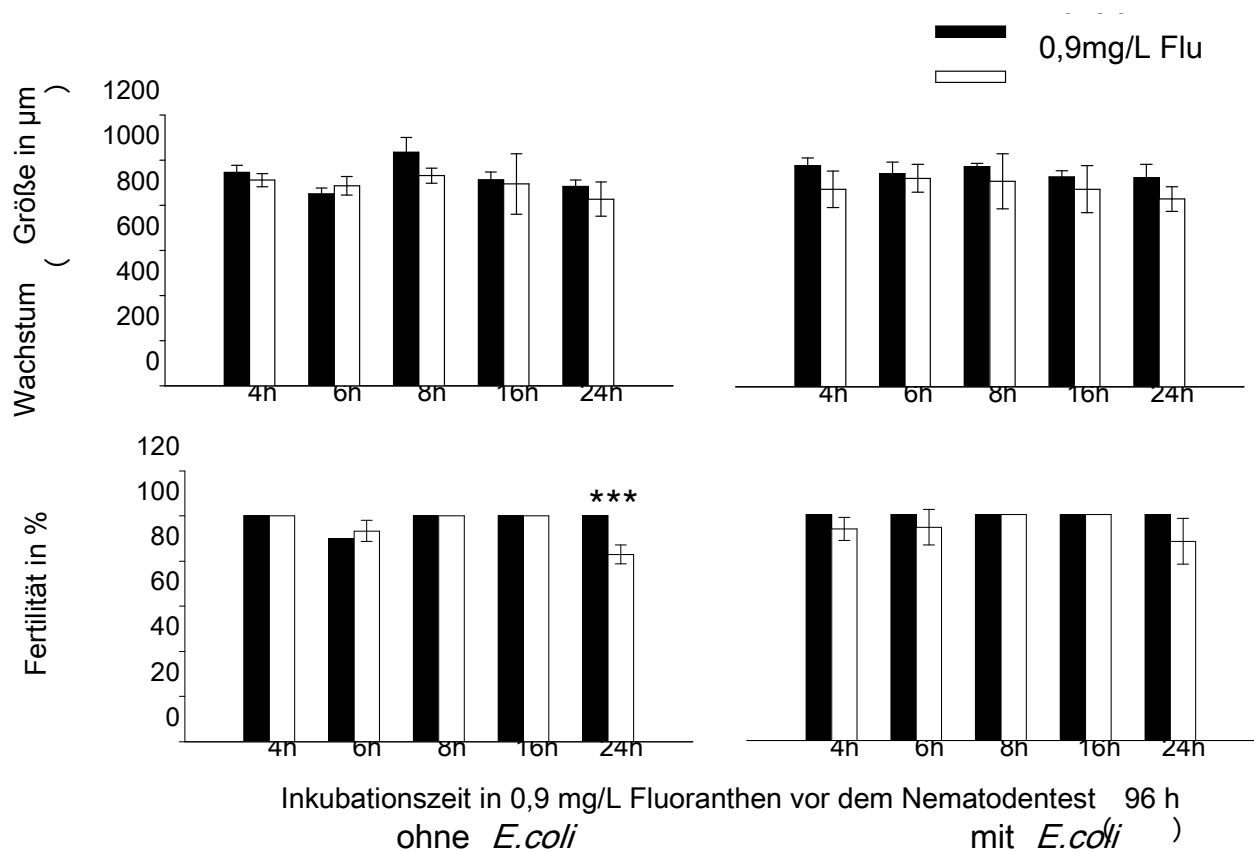


Abbildung III.10. Ergebnis der Parameter Wachstum und Fertilität von *C. elegans* nach 96h in M9-Medium und nach vorheriger Inkubation in M9-Medium (schwarze Säulen) und in 0,9 mg/L Fluoranthen (weiße Säulen) für 4-24 Stunden mit und ohne *E. coli*. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (n=3). * Fertilität signifikant unterschiedlich zur Kontrolle (t-Test *** p< 0,005).

Die Reproduktionsleistung der Nematoden wurde nicht nur durch die Behandlung mit Flu stark beeinträchtigt, auch die Dauer der Vorinkubation und die Exposition über Bakterien spielten für die Anzahl der Nachkommen eine entscheidende Rolle. Abbildung III.11. zeigt die Anzahl der Nachkommen pro Wurm für die Kontrollen und

die behandelten Würmer mit und ohne Bakterien. Den offensichtlichsten Effekt hatte, unabhängig von der Zugabe von Futter und/oder Fluoranthren die Dauer der Vorinkubation. Eine deutliche Verminderung der Nachkommenzahl war mit zunehmender Vorinkubationszeit sowohl bei den Kontrollen als auch bei den Fluoranthren-Ansätzen zu beobachten. Dieser Effekt trat besonders deutlich bei den unbehandelten Würmern, die ohne *E. coli* inkubiert wurden, hervor. Signifikant wurde die Nachkommenzahl durch 0,9 mg/L Fluoranthren ab einer Inkubationszeit von sechs Stunden mit Bakterien und acht Stunden ohne Bakterien vermindert.

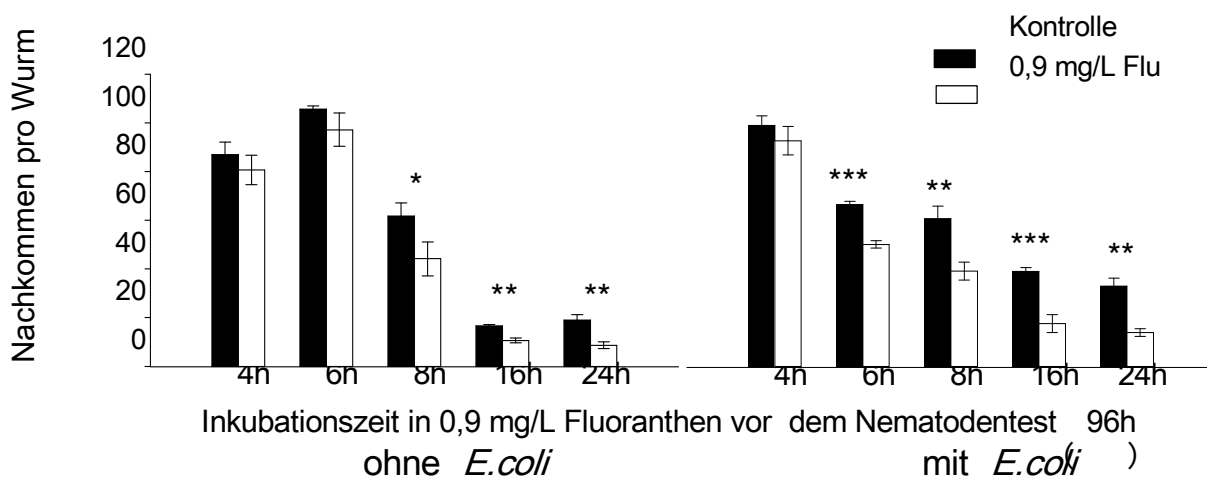


Abbildung III.11. Ergebnis der Reproduktion von *C. elegans* nach 96h in M9-Medium und nach vorheriger Inkubation in Kontrollmedium (M9) und in 0,9 mg/L Fluoranthren für 4-24 Stunden mit und ohne *E. coli*. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (n=3). * Fertilität signifikant unterschiedlich zur Kontrolle (t-Test* < 0,05; ** < 0,01; *** p < 0,005).

Die Ergebnisse demonstrieren, dass die Nematoden nicht in der Lage sind, sich von einer mehr als sechsständigen Inkubation vollkommen zu erholen. Um den Einfluss der Inkubationszeit in Anwesenheit der organischen Chemikalie zu verdeutlichen, wurde die Hemmung der Reproduktion in % berechnet. Die Reproduktionsleistung nahm mit zunehmender Inkubationszeit ab (Abbildung III.12.). Nach 24 Stunden Vorinkubation zeigte sich eine um nahezu 50% verringerte Reproduktionsleistung. Auch hier schien die Exposition von Bedeutung - die Hemmung war höher bei einer Exposition über Bakterien. Eine zweifaktorielle ANOVA zeigte, dass die Reproduktion stärker gehemmt wurde, wenn die Würmer dem Schadstoff in Kombination mit Bakterien ausgesetzt wurden. Dieser Effekt trat signifikant nach einer Vorinkubation länger als acht Stunden auf.

Als letzter Parameter wurde die interne Belastung der Nematoden bestimmt, um auch hier zu überprüfen, ob der Aufnahmeweg Bedeutung für die Bioakkumulation von Fluoranthen hat. Es wurde vermutet, dass mehr Fluoranthen aufgenommen wird, wenn die Exposition über die Nahrung stattfindet, womit sich auch die erhöhte Hemmung der Reproduktion einfach erklären ließe. Interessanterweise wurde jedoch eine höhere Belastung der Nematoden nach Inkubation ohne Bakterien festgestellt, die nach einer Inkubation länger als acht Stunden signifikant wurde. Unabhängig vom Expositionsweg wurde der Großteil der organischen Substanz während der ersten 8 Stunden aufgenommen, danach folgte mengenmäßig nur noch eine geringe Steigerung. Abbildung III.12. zeigt also den Zusammenhang zwischen der internen Belastung von Fluoranthen der Nematoden (Scatter-Plot) und den Effekten auf die Reproduktion (Säulendiagramm). In schwarz sind die Ergebnisse der Versuche ohne, in weiß die Ergebnisse mit Bakterien dargestellt.

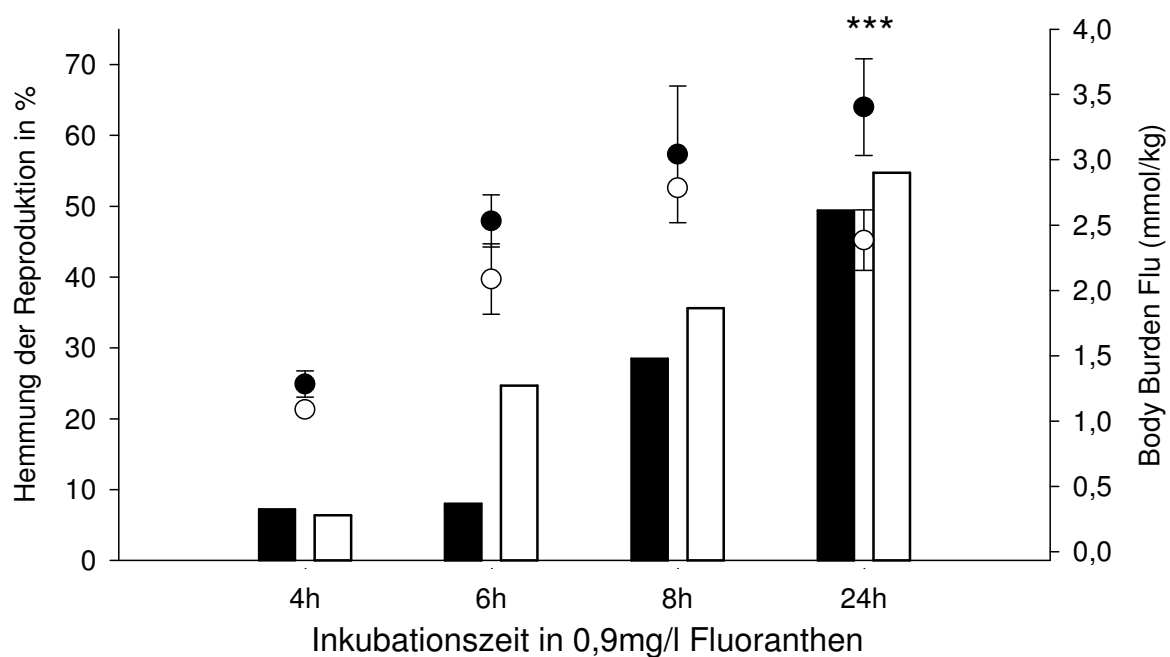


Abbildung III.12. Ergebnis des modifizierten Nematodentests (Säulendiagramm n=3) und der internen Belastung (Body Burden als Scatter-Plot n=3) von *C. elegans* nach vorheriger Inkubation in 0,9 mg/L Fluoranthen für 4-24 Stunden. Säulen geben die Hemmung der Reproduktion in % nach 96 Stunden für die vorherige Inkubation ohne *E. coli* (schwarze Säulen) und mit *E. coli* (weiße Säulen) wieder. Der Body Burden ist angegeben in mmol/kg (Trockengewicht) \pm Standardabweichung nach Aufnahme von Flu über Medium ohne (schwarze Punkte) und mit (weiße Punkte) *E. coli*. *** Signifikante Unterschiede der Belastung durch Inkubation mit und ohne Bakterien (t-Test *** p = 0,004823).

Die Belastung mit Flu nach der Inkubation wurde sowohl für die Nematoden, als auch nur für die Bakterien bestimmt, um zu untersuchen, ob die Bakterien als Träger der Substanz auf den Weg in den Körper dienen. Der BB für *E. coli* alleine zeigte eine starke Zunahme der Belastung erst nach 8 Stunden. Nach 8 Stunden betrug der BB (*E. coli*) $1,4 \pm 0,03$ mmol/kg (Trockengewicht), nach 24 Stunden war die Menge mit $4,9 \pm 0,03$ mmol/kg (Trockengewicht) mehr als verdreifacht. Es konnte keine Korrelation der Belastung der Bakterien und der Belastung der Nematoden festgestellt werden, somit war die Aufnahme des Schadstoffes nicht direkt auf die Belastung der Nahrung zurückzuführen.

II.1.4. Bedeutung der ABC-Transporter für die Entgiftung: *pgp-3* als Membranbarriere der Zelle?

Die enzymatische Aktivität der ABC-Transporter könnte möglicherweise eine Erklärung für die gegensätzlichen Ergebnisse der Belastung des Nematoden und der chronischen Effekte liefern. Um daher das bisher unklare Verhältnis der beiden Genfamilien (*cyps* und *pgps*) für die Detoxifikation zu bestimmen, wurde die Enzymaktivität der ABC-Transporter *pgp* durch Verapamil (25 μ M) gehemmt und die Induktion von *cyp35C1* und *pgp-3* detektiert. Zusätzlich zu den beiden Genen wurde die Induktion eines weiteren Mitglieds der *pgps* ansatzweise untersucht. Durch *pgp-14*, welches ausschließlich in den pharyngealen Zellen exprimiert wird, sollte die Bedeutung dieses Organs für die Entgiftung belegt werden. Die Würmer wurden für sechs Stunden in 0,9 mg/L Fluoranthenlösung und 25 μ M Verapamil ohne Zugabe von *E. coli* inkubiert. Als Kontrolle wurden Würmer in 25 μ M Verapamil ohne Fluoranthen inkubiert. Nach der Hemmung der *pgps* wurde sowohl der BB als auch die Geninduktion von *cyp-35C1*, *pgp-3* und *pgp-14* bestimmt, um die Auswirkungen auf die Detoxifikation bewerten zu können. Die interne Belastung des Wurmes nach sechsständiger Inkubation in 0,9 mg/L Flu war höher wenn die Transporter mit 25 μ M Verapamil gehemmt wurden. Unerwartet wurde zudem die Induktion von *cyp-35C1* durch die Blockierung der *pgps* verstärkt (Abbildung III.13.b). Die Induktion von *pgp-3* selbst wurde durch die Hemmung des enzymatischen Produktes nicht verändert, wohl aber wurde eine erhöhte Expression des *pgp-14* nachgewiesen (Abbildung III.13.a). Es wurde kontrolliert, dass Verapamil nur in Kombination mit Fluoranthen Einfluss auf die Expression der Gene hatte.

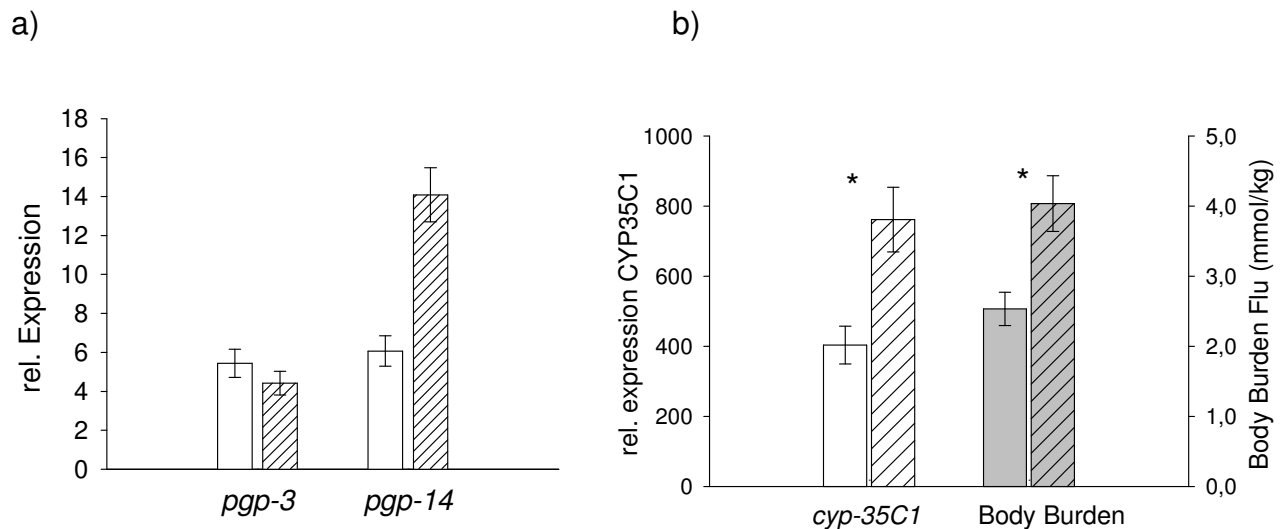


Abbildung III.13 a. und b. a) Relative Expression von *C. elegans pgp-3* und *pgp-14* nach Inkubation in 0,9 mg/L Fluoranthen Lösung für 6 Stunden ohne den *pgp*-Inhibitor Verapamil (Säulen ohne Streifen) und mit Verapamil (gestreifte Säulen). b) Relative Expression von *cyp-35C1* (weiße Säulen) und Body Burden (graue Säulen) von *C. elegans* nach Inkubation in 0,9 mg/L Fluoranthen Lösung für 6 Stunden ohne den PGP-Inhibitor Verapamil (Säulen ohne Streifen) und mit Verapamil (gestreifte Säulen). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (n = 3). *=p < 0,05.

III.2. Genexpressionsanalyse durch Differential Display PCR

Die Methode der Differential Display-PCR wurde etabliert, um die Eignung für die Erstellung eines Bewertungsverfahrens der Wirkung von Chemikalien auf zellulärer Ebene zu testen. Als kostengünstige Alternative zu Microarrays sollten hier Chemikalien, die gleiche Genexpressionsmuster hervorrufen gleiche zelluläre Angriffstellen und somit auch gleiche MoAs zugeordnet werden. Exemplarisch wurde die Methode anhand der Modellsubstanz Cadmium getestet, da bereits Daten über cadmiuminduzierte Genexpression in der Arbeitsgruppe vorlagen, die die Interpretation der Ergebnisse vereinfachen sollten (Neddermann und Ahlf, 2005). Anschließend sollte die Methode dann ebenfalls für die Analyse der molekularen Wirkung von Fluoranthen genutzt werden.

III.2.1. RNA-Isolation und reverse Transkription

Die Würmer wurden mit Saccharose-Lösung gewaschen und die Gesamt-RNA mit Trizol isoliert. Um DNA-Kontaminationen zu entfernen, wurde die RNA mit DNase I behandelt und die Integrität und Reinheit vor und nach der Behandlung anhand eines Agarosegels überprüft. Abbildung III.14. zeigt die 18S- und 28S-Untereinheiten der ribosomalen RNA.

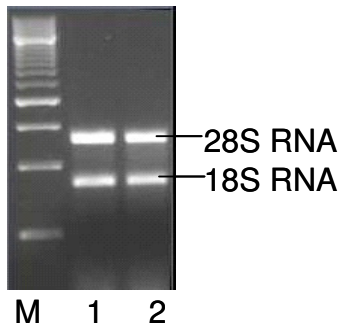


Abbildung III.14. Gesamt RNA von *C.elegans*. Links aufgetragen der RNA-Größen-Standard. Mittig die RNA vor und rechts nach dem Verdau mit DNase I. Die Integrität und Konzentration ist auch nach der Behandlung gut.

Die klaren Banden vor (1) und nach (2) der DNase I Behandlung weisen darauf hin, dass die RNA nicht degradiert wurde und in guter Qualität und hoher Konzentration vorhanden war. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt und lag durchschnittlich bei etwa 1 µg/µl. Waren Qualität und Konzentration der RNA in Ordnung, wurde die reverse Transkription wie unter II.10.1.2. beschrieben durchgeführt.

III.2.2. Optimierung der PCR und Silberfärbung

Um die PCR-Bedingungen nach Ausbeute und Reinheit der amplifizierten Gen-Fragmente zu optimieren, wurden die Konzentrationen von MgCl₂, dNTPs und Primer Konzentrationen variiert. Je 1,5 µl der PCR-Produkte wurde gemischt mit 1,5 µl Probenpuffer auf ein 6% Polyacrylamidgel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und mit Silbernitrat gefärbt. Nach einer Vorauswahl wurde aus den folgenden Mischungen Mix 6 für die geplanten Versuche ausgewählt, da unter diesen Bedingungen während der PCR-Reaktion das beste Ergebnis bezüglich Ausbeute

und Reinheit erzielt wurde. Es wurden ebenfalls mehrere Methoden der Silberfärbung getestet, unter anderem auch gebrauchsfertige Färbelösungen der Firma BIORAD. Das Preis-Leistungs-Verhältnis in Betracht ziehend, wurde das beste Ergebnis mit der unter II.10.2.5. beschriebenen Methode erzielt. Die gefärbten Gele wurden mit einem Densitometer 800 (BIORAD) eingescannt und die Bilder am Computer ausgewertet (Abbildung III.15.).

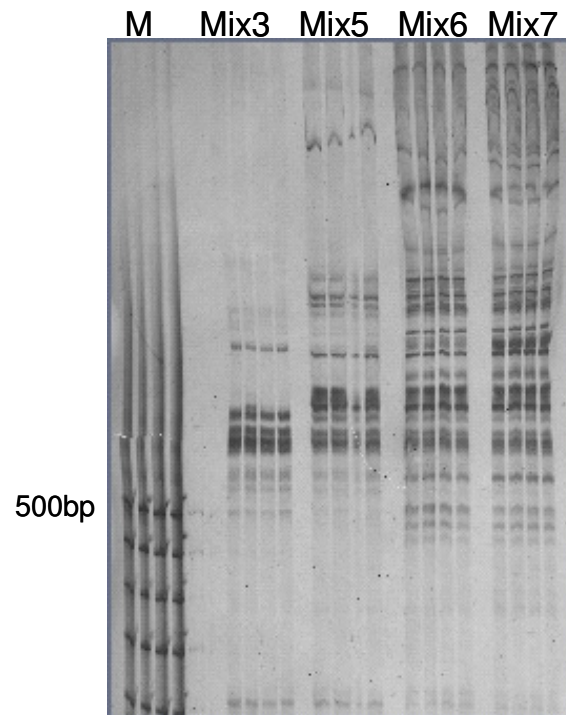


Abbildung III.15. Ergebnis der Optimierung der DD-PCR: Zusammensetzung und Ergebnisse der entsprechenden PCR-Variationen auf einem 6% Polyacrylamidgel mit DNA-Fragmenten (Primer AnkerA/RAP1) angefärbt durch reduziertes Silbernitrat (M: DNA-Größen-Standard).

III.2.3. Differential Display zur Identifikation cadmiuminduzierter Gene

Um möglichst alle Gene, die durch die Cadmium-Behandlung induziert wurden nachzuweisen, wurden systematisch die Anker-Primer A, C und G mit jeweils einem der 8 Zufallsprimer kombiniert und cDNA-Proben von Nematoden, die in M9-Medium, 5 μ M und 50 μ M Cadmium inkubiert wurden, in der PCR amplifiziert. Die PCR Produkte wurden anschließend auf Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und mit Silber angefärbt, um Unterschiede in der Genexpression nachzuweisen. Abbildung III.16.a zeigt, dass die Reproduzierbarkeit der Banden abhängig von den

benutzten Primern war. Daher wurden nur Banden die in allen Replikaten vorhanden waren bzw. fehlten als veränderte Genexpression gewertet. Abbildung III.16.b zeigt ein ausgewertetes Gel auf dem die Genfragmente durch die Cadmium-Behandlung nicht verändert wurden.

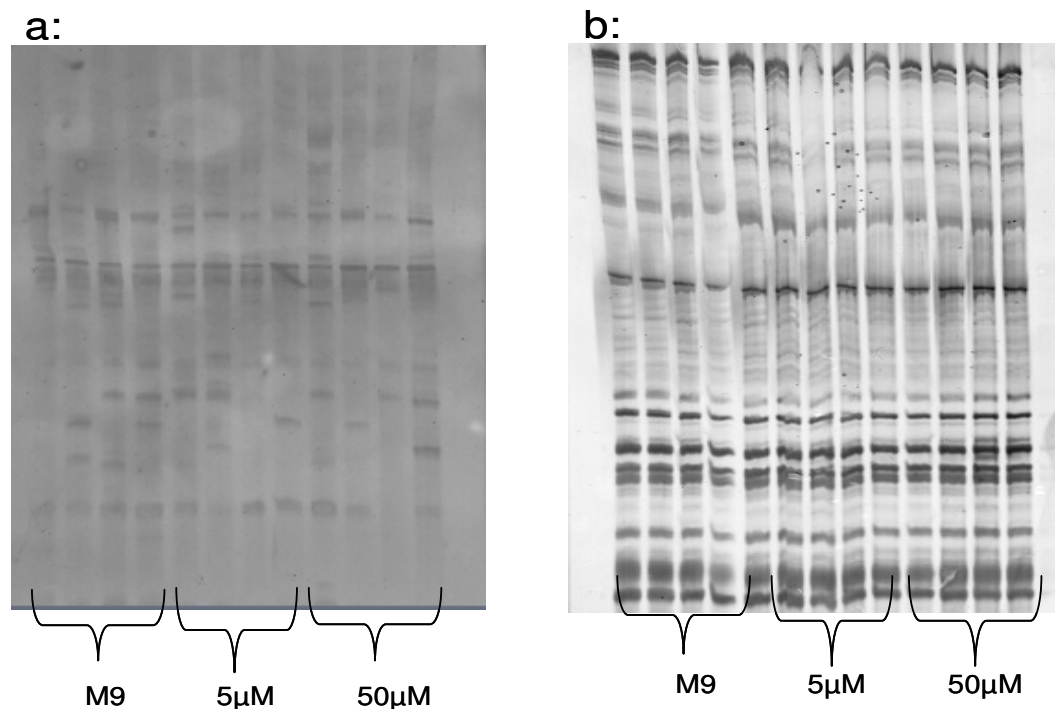


Abbildung III.16.a. Ausschnitt aus Polyacrylamidgelen mit PCR-Produkten des Primerpaares a: C/R5 und b: C/R6 aus Proben von *C.elegans* behandelt mit M9-Medium, 5 und 50 µM Cadmium. Zu sehen ist die schlechte Reproduzierbarkeit der Banden in den Parallelen auf Gel a und die deutlich bessere Reproduzierbarkeit auf Gel b. Es handelt sich um dieselben Proben, lediglich die Primer wurden variiert.

Unterschiede in der Genexpression durch die Behandlung mit Cadmium konnte bei den DNA-Fragmenten der Primer C/R7 erstmalig nachgewiesen werden. Das entsprechende Gen(Fragment) mit einer Größe von etwa 500 bp wurde durch die Behandlung mit Cadmium augenscheinlich verstärkt exprimiert. Der DNA-Standard mit Größenmarkern zwischen 100 und 1000 bp wurde stets auf beiden Seiten des Geles aufgetragen, um die spätere Auswertung der Geninduktion durch das Programm Quantity One (BIORAD) zu präzisieren. Nach der Dokumentation der Gele wurden die entsprechenden Banden mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und bei -80 °C gelagert, um das Fragment gegebenenfalls zu vervollständigen und zu identifizieren. Abbildung III.17. zeigt das Acrylamidgel mit den PCR-Produkten des Primerpaares C/R7.

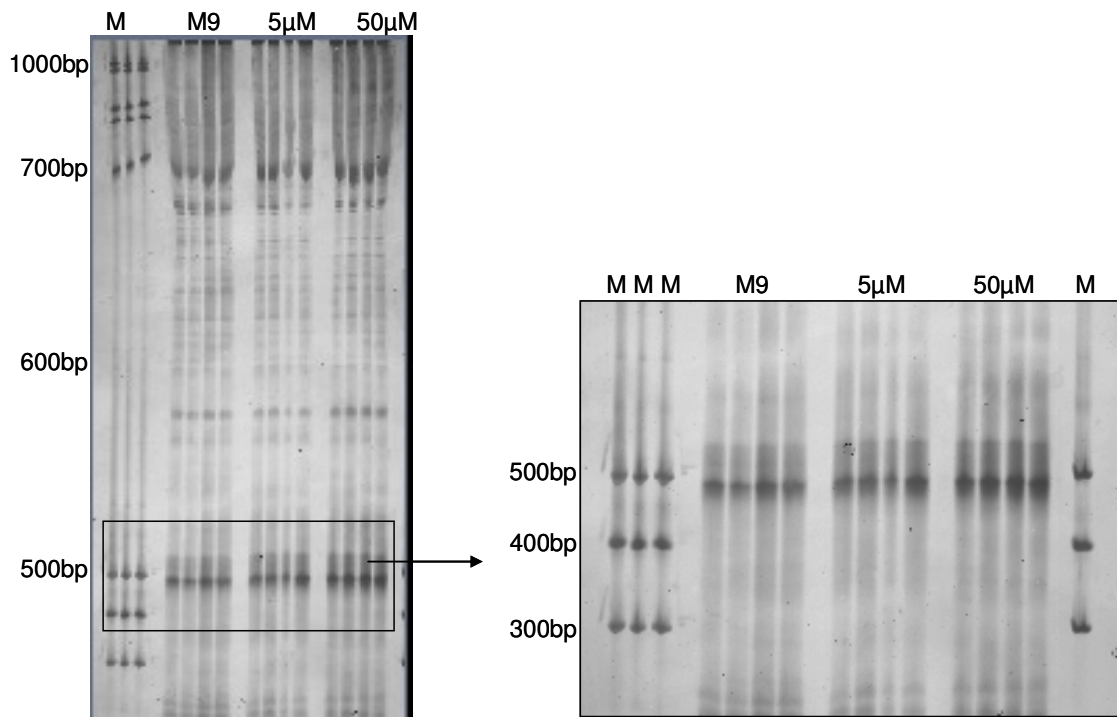


Abbildung III.17. Acylamidgel mit PCR Produkten des Primerpaares C/R7 aus Proben von *C.elegans* behandelt mit M9 Medium, 5 und 50 μM Cadmium. Der vergrößerte Ausschnitt zeigt deutlich die unterschiedlich starken Banden bei etwa 486 bp, induziert durch die Cadmium-Behandlung.

III.2.4. Auswertung der differentiellen Genexpression nach Cadmium-Behandlung

Mit der bereits erwähnten Software Quantity One wurden die Gele ausgewertet. Dabei wurden neben dem Molekulargewicht der Banden ebenfalls die Intensität (relative Menge) und die optische Dichte bestimmt und miteinander verglichen. Anhand des aufgetragenen Standards wurde die Größe des durch Cadmium induzierten Fragments auf 486 bp berechnet. Relative Menge und optische Dichte wurden ebenfalls berechnet und auf signifikante Unterschiede überprüft. Es stellte sich heraus, dass beide Größen signifikante Unterschiede zwischen den Proben M9-Medium und 50 μM Cadmium und 5 μM und 50 μM Cadmium-Behandlung zeigten. Jedoch konnte anhand der Genexpressionsmuster nicht zwischen der Behandlung mit unkontaminiertem Medium und gering konzentrierter Cadmium-Lösung (5 μM) unterschieden werden. Laut der Genexpression hatte die 24-stündige Behandlung mit gering konzentriertem Cadmium keine Auswirkung auf den Nematoden, wie die

Signifikanzanalysen in Tabelle III.1. zeigen.

Tabelle III.1. p-Werte für die optische Dichte der DNA (links) und relative Menge (rechts) der durch Cadmium induzierten Genfragmente. Signifikante Unterschiede sind angegeben als $p < 0,05$.

Behandlung	p (optische Dichte)	p (relative Menge)
M9-Medium gegen 5 μM	0,477192	0,720368
M9-Medium gegen 50 μM	0,002452	0,043137
5 μM gegen 50 μM	0,036147	0,030218

Hier konnte gezeigt werden, dass die Sensitivität der DD-PCR in Kombination mit der Silberfärbung zum Nachweis der differentiell exprimierten Gene nicht ausreicht, um Schadstoffeffekte (hier Cadmium) auf die Genexpression bewerten zu können. Geplante Untersuchungen zur Klassifizierung von Wirkungsmechanismen weiterer Substanzen (wie Fluoranthren) auf der Grundlage von Genexpressions-mustervergleichen durch DD-PCR wurden daher nicht durchgeführt.

IV. DISKUSSION

IV.1. Exposition und Bioverfügbarkeit von Fluoranthen

IV.1.1. Genexpression und chronische Toxizität durch Kurzzeitinkubation in Fluoranthen

Zelluläre Reaktionen auf die Behandlung mit Fluoranthen wurden anhand der Induktion molekularer Biomarker (*cyp-35C1* und *pgp-3*) an dem Nematoden *C. elegans* untersucht. Durch kurzzeitige Inkubation (6 Stunden) in dem Schadstoff konnte eine konzentrationsabhängige Induktion der beiden Gene nachgewiesen werden. Die Expression von *cyp-35C1* und *pgp-3* durch Fluoranthen-Induktion war stark korreliert ($r^2 = 0,98$). Jedoch zeigte sich die relative Expression des ersteren 100mal stärker als die des ABC-Transporters. In humanen Intestinalzellen konnte ähnliches nach Behandlung mit dem PAK Benz(a)pyren beobachtet werden, was die Relevanz der erzielten Ergebnisse bei *C. elegans* für die humane Risikobewertung bestärkt (Lampen, 2004). *Cyp* und *pgp* werden durch dieselben Liganden induziert und ihre Transkription scheint koreguliert zu sein - gleiches gilt für humane Isoformen der Enzyme (Aninat et al., 2005).

Es ist unwahrscheinlich, einen direkten Zusammenhang zwischen der Expression einzelner Gene und chronischer Effekte zu finden, jedoch könnte der Wert der höchsten Induktion (hier 10 mg/L Fluoranthen) als Schwellenwert betrachtet werden, der als Indikator die Auslastung bzw. Überlastung des gesamten zellulären Systems beschreibt. Die Verminderung der Expression von *cyp-35C1* und auch *pgp-3* nach Inkubation in 15 mg/L Fluoranthen deutet auf einen solchen Wendepunkt hin. Der anschließend an die sechsstündige Inkubation durchgeführte, modifizierte Nematodentest sollte durch auftretende irreversible Schäden die Existenz eines Schwellenwerts zwischen 10 und 15 mg/L Fluoranthen belegen. Die Parameter Wachstum und Fertilität wurden durch die Schadstoffinkubation jedoch nicht beeinträchtigt. Zwar hatte Fluoranthen in Konzentrationen zwischen 2,5 und 5 mg/L einen leicht stimulierenden Effekt auf das Wachstum der Würmer, allerdings nicht signifikant. Die Reproduktion jedoch wurde durch die Inkubation in 15 mg/L Fluoranthen (Hemmung 18,5%) signifikant gehemmt, ebenso in 2,5 mg/L (Hemmung 18,7%). Daher wurde vermutet, dass hier nicht die Konzentration, sondern die Inkubationszeit von sechs Stunden ausschlaggebend für die irreversible Schädigung

ist. Ein Schwellenwert der Geninduktion, der auf chronische Toxizität schließen lässt, konnte konzentrationsabhängig nicht bestimmt werden, daher wurden weitere Versuche mit veränderter Expositionszeit unternommen.

IV.1.2. Einfluss der Nahrung auf Bioverfügbarkeit, Reproduktion und Bioakkumulation

Die Abhängigkeit der Effekte von der Inkubationszeit wurde genauer untersucht. Mit der Kombination aus Reproduktionstest, Bestimmung der Genexpression und der internen Belastung des Organismus, konnte gezeigt werden, dass der Expositionsweg und die Inkubationszeit eine entscheidende Rolle spielen. Beim Vergleich des Expressionsmusters von *cyp-35C1*, der Hemmung der Reproduktion und der Bioakkumulation konnte zwischen sechs und acht Stunden Inkubation ein Wendepunkt ausgemacht werden.

IV.1.2.1. Reaktionen am Zielort: Expression von *cyp-35C1* und *pqp-3*

Die Induktion des *cyp-35C1* hatte ein Maximum zwischen vier und acht Stunden Inkubation in 0,9 mg/L Fluoranthen-Lösung, danach fiel die Induktion stark ab und nach 24 Stunden konnte nur noch eine leicht erhöhte Transkription des Gens nachgewiesen werden. Die enzymatische Aktivität des Translationprodukts war wahrscheinlich noch hoch zu dieser Zeit. Es zeigte sich generell eine höhere Induktion des Gens, wenn Fluoranthen zusammen mit den Nahrungspartikeln aufgenommen wurde. Der Unterschied wurde besonders deutlich an dem ersten Messpunkt (vier Stunden Inkubation, Abbildung III.7.). Es wäre denkbar, dass die narkotisch wirkende Substanz, an die Bakterien gebunden, direkt in den Darm transportiert wird, wo die untersuchten Gene hauptsächlich lokalisiert sind. Im Gegensatz dazu würde Fluoranthen, aufgenommen über die Wasserphase, verlangsamt in den Körper und somit an den Wirkungsort gelangen, was eine verzögerte Induktion der Targetreaktion erklären würde. Um den Zusammenhang des Aufnahmewegs mit der zellulären Reaktion genauer zu verstehen, muss das Fressverhalten des Nematoden kurz erklärt werden. *C. elegans* ist ein Filtrierer, der die Nahrungssuspension durch peristaltisches Pumpen aufnimmt. Das Medium wird wieder ausgespuckt und die verbleibenden Nahrungspartikel werden am terminalen Ende (Bulbus) des Pharynx konzentriert, zermahlen und in den Darm gepresst. Der

Darm ist ein Schlauch aus einer einzellstarken Epithelschicht, durch die Nährstoffe endozytiert werden (Avery und Thomas, 1997).

An *E. coli* gebundenes Fluoranthren kann nicht nur, wie bereits vermutet mit der Bakteriensuspension direkt über den Pharynx in den Darm transportiert werden; dort angelangt kann die Substanz durch weitere Faktoren beschleunigt an ihren Wirkungsort gelangen. Sowohl bei dem Übergang/ Austausch hydrophober Moleküle zwischen unterschiedlichen Kompartimenten in der Umwelt, als auch bei der Aufnahme in Organismen wirkt die Diffusion durch wässriges Medium oftmals als limitierender Faktor (Mayer et al., 2005). Diese Barriere kann gegebenenfalls durch den direkten Kontakt der kontaminierten Bakterien mit dem Darmepithelgewebe umgangen werden. Ohne eine Flüssigkeitsschicht zwischen den Fluoranthren-Molekülen und dem Epithel kann der diffuse Stofftransfer des hydrophoben Fluoranthrens beschleunigt werden und die Substanz leichter (als in Wasser gelöst) in die Darmzellen aufgenommen werden. Weiterhin zeigen Mayer et al. (2007), dass auch die Darmflüssigkeit von benthisch lebenden Würmern (*Nereis virens*) den diffusen Massentransfer von hydrophoben Substanzen gegenüber Wasser beschleunigt.

So wird die Geninduktion in den Intestinalzellen durch Fluoranthren nach kurzer Zeit initiiert. Die vergleichsweise starke Induktion des *cyp-35C1* nach Exposition über die Nahrung zu Anfang der Inkubationszeit, nach vier Stunden, wird so plausibel erklärt. Nur ein kleiner Teil des aufgenommenen Fluoranthrens (die toxikologisch aktive Substanz) löst die Reaktion am Wirkungsort aus. Durch die Aufnahme über die Nahrung gelangt Fluoranthren schneller an den Wirkungsort. Im Gegensatz dazu erreicht Fluoranthren, exponiert über das Medium (ohne Futter), verzögert den Darm und somit den Zielort, da ein Großteil der Flüssigkeit wieder ausgespuckt wird.

Die Bedeutung der Bioverfügbarkeit für die Verteilung in dem Organismus konnten anhand der Genexpression von *cyp-35C1* deutlich gemacht werden. Dieser wichtige Punkt wird später noch einmal aufgegriffen und anhand der weiteren Beobachtungsgrößen Reproduktion und interne Belastung diskutiert. *Pgp-3* wurde weniger stark induziert als *cyp-35C1*. Die Induktion wurde durch die Exposition des Schadstoffes über die Nahrung nicht signifikant beeinflusst. Jedoch waren auch in den zeitabhängigen Versuchen die Expressionsmuster der beiden Gene miteinander korreliert. Die Vermutung, dass der im Darm und im Pharynx lokalisierte ABC-Transporter *pgp-3* stärker induziert wird durch Exposition über das Medium,

bestätigte sich nicht. Durch die Korrelation mit dem ausschließlich im Darm lokalisierten *cyp-35C1* ist die Expression von *pgp-3* im Pharynx wohl von untergeordneter Bedeutung. Ein Screening der Induktion weiterer Mitglieder der ABC-Transporter-Superfamilie, z.B. den *pgps 1-14*, sowie *mrps* wäre sinnvoll, um die Bedeutung der Lokalisation der Gene für die Entgiftung zu überprüfen. Die Bedeutung dieser Gene bei der Entgiftung von Fluoranthen wird später noch einmal anhand der Versuche zur Hemmung der *pgps* mit Verapamil diskutiert.

IV.1.2.2. Nematodentest und chronische Schäden

Die Vermutung, dass chronische Effekte nach längerer Inkubationszeit (und verminderter Geninduktion) auftreten, bestätigte sich. Der Einfluss der Vorinkubation auf die Reproduktion wurde mit zunehmender Zeit stärker. Das Wachstum wurde weder von der Dauer der Vorinkubation, noch von den kombinierten Faktoren Futter oder Fluoranthen beeinflusst. Gleiches gilt auch für die Fertilität, die nur marginal nach 24-stündiger Inkubation gehemmt wurde. Kontrollwürmer und vorbehandelte Würmer erreichten beide nach dem Nematodentest eine Größe von etwa 1000 μM , was der Durchschnittsgröße für adulte *C. elegans* entspricht (Brenner, 1974).

Deutlich empfindlicher präsentierten sich die Auswirkungen der Vorinkubation auf die Zahl der Nachkommen. Die Reduktion der Nachkommenzahl mit steigender Inkubationszeit in Kontrollmedium und Fluoranthen-Medium ist der offensichtlichste Effekt. *C. elegans* erbringt in Flüssigkultur eine verminderte Reproduktionsleistung. Besonders durch Schwenken der Kulturgefäße (was hier nicht getan wurde) wird die Nachkommenschaft weiter dezimiert. Es wurden, unabhängig von der Dauer der Vorinkubation, immer L1-Würmer für den Nematodentest verwendet. Daher waren Nematoden nach einer 24-stündigen Vorinkubation nicht nur länger dem Schadstoff ausgesetzt, sondern auch ausgehend von einem früheren Entwicklungsstand. Da von der Eiablage bis zum Schlüpfen der L1-Würmer lediglich neun Stunden vergehen, waren die Würmer während ihrer gesamten Embryonalentwicklung (*in utero*) bis zum Schlüpfen und der folgenden Juvenilentwicklung dem Schadstoff ausgesetzt. Aber nicht nur Fluoranthen hatte einen Effekt auf die Reproduktion der Würmer. Nach einer Vorinkubation von 24 Stunden wurde zudem eine Reaktion auf die Futterverfügbarkeit bzw. deren Abwesenheit bemerkbar. Kontrollwürmer, die mit *E. coli* inkubiert wurden, pflanzten sich deutlich zahlreicher fort als solche ohne *E.*

coli, da sie keinem Nährstoffmangel ausgesetzt wurden. Fluoranthen hatte zusätzlich einen signifikant negativen Einfluss auf die Reproduktion bereits nach sechs (mit Futter) und achtstündiger (ohne Futter) Vorinkubation. Nach 24 Stunden Vorinkubation in 0,9 mg/L Fluoranthen und *E. coli* wurde die Reproduktionsleistung um nahezu die Hälfte verringert. Nach diesen Ergebnissen wurde nicht erwartet, dass eine längere Inkubation zu bedeutend höherer Hemmung führen würde, da die gewählte Fluoranthen-Konzentration dem EC₅₀ Wert für Reproduktion im Nematodentest entspricht.

Die Kombination von Futter und Fluoranthen hatte eine verstärkte Hemmung der Reproduktion von *C. elegans* zur Folge. Die Hypothese, dass die Aufnahme der Verbindung über Nahrungspartikel die Konzentration am Wirkungsort beschleunigt und/ oder erhöht und so die schädlichen Effekte auf den Organismus verstärkt werden (Escher und Hermens 2004), konnte durch die gezeigten Ergebnisse bestätigt werden. Die Induktion von CYP-Enzymen durch organische Substanzen und deren Beteiligung an der Aktivierung des Fettstoffwechsels von *C. elegans* scheint hierbei von großer Bedeutung. Die folgende Erhöhung des Körperfettanteils kann als Speicherstelle für die unpolaren Verbindungen dienen, um so deren toxische Wirkung am Zielort zu minimieren, wenn nicht zu verhindern (Menzel et al., 2007). Da negative Effekte öfter in den Membranen, als in den Speicherlipiden geschehen, wäre es zukünftig gerade für Langzeituntersuchungen wichtig, den Lipidgehalt von *C. elegans* zu bestimmen und den Body Burden so zu normalisieren. Die Lipidbestimmung kann sowohl durch Anfärben und mikroskopische Auswertung, aber auch chemisch, durch Gaschromatographie erfolgen (Ashrafi et al., 2003). Eine erhöhte interne Belastung hat nicht zwangsläufig stärkere Effekte zur Folge, wenn gleichzeitig auch der Körperfettanteil erhöht wäre (Escher und Hermens, 2004).

Eine verstärkte Toxizität von Fluoranthen kann auch durch die Biometabolisation durch Cytochrome P₄₅₀ Enzyme ausgelöst werden (Bioaktivierung). Versuche mit Mückenlarven (*Chironomus tentans*) führten zu der Annahme, dass bei dem Umsatz von Fluoranthen Metabolite gebildet wurden, die eine erhöhte toxische Wirkung auf die Organismen hatten (Schuler et al., 2004). Menzel et al. (2005) konnten für *C. elegans* zeigen, dass CYP35A und C Knock-out Mutanten weniger empfindlich auf die Behandlung mit Fluoranthen oder PCB52 reagierten als der Wildtyp. Das gleiche Phänomen trat bei Nematoden auf, deren *cyp*-Gene durch RNAi gehemmt wurden. In beiden Fällen (K.O. und RNAi) war die Hemmung der Reproduktion geringer als

die der Kontrollwürmer, was zu der Vermutung eines bioaktivierenden Effektes durch die Metabolisierung führte. Dies erscheint jedoch aufgrund der bekannten geringen Biometabolisierungsaktivität von Invertebraten unwahrscheinlich (Fent, 2007). Bei der massenspektrometrischen Bestimmung (ICP-MS) der Konzentration von Fluoranthenen in Medium und in *C. elegans* nach der Inkubation konnten keine Metabolite nachgewiesen werden, möglicherweise aufgrund der zu geringen metabolischen Aktivität und einer daraus folgernden zu geringen Konzentration der Verbindungen. In jedem Fall verbraucht der Organismus für die gesteigerte Genexpression und die Metabolisierung/ Detoxifikation des Schadstoffes viel Energie. Lipidsynthese und auch die Synthese von endogenen, hydrophilen Makromolekülen (z.B. Kohlenhydraten), die in Phase-II-Reaktionen an lipophile Substanzen gebunden werden, um die Exkretion zu ermöglichen, sind energetisch ungünstige Prozesse. Um diesen „Luxus“ zu ermöglichen, muss der betroffene Organismus die verbrauchte Energie an anderer Stelle sparen, was eine Verminderung der Reproduktionsleistung zur Folge hat (Gems und McElwee, 2005). Ob nun die direkte Biometabolisierung der Fremdstoffe oder auch die Biosynthese von Lipiden; die Funktion der CYP- und PGP-Enzyme bleibt zu klären. Eine generelle Beteiligung an der Schadstoffwirkung ist sicher.

IV.1.2.3. Interne Belastung und das Critical Body Burden (CBB) Konzept

Die interne Fluoranthenen-Konzentration wurde bestimmt, um einen Einfluss der Nahrung auf die Bioakkumulation nachzuweisen. Es ist anzunehmen, dass das nachgewiesene Fluoranthenen nicht aus dem Darm stammt, sondern in Membranen und Lipidtröpfchen eingelagert wurde. Die Defäkationszeit von *C. elegans* beträgt etwa 45 Sekunden und die Reinigung der Nematoden vor der Bestimmung der Belastung nahm etwa 60 Minuten in Anspruch (Avery und Thomas, 1997).

Unabhängig von der Expositionsart und Dauer lag der Body Burden zwischen 1 und 3,5 mmol/kg (Trockengewicht). Der stärkste Anstieg der Schadstofflast war in den ersten acht Stunden zu vermerken. Folgt man der Daumenregel für unpolare Narkotika für den akut letalen kritischen Body Burden, liegt dieser zwischen 2 und 8 mmol/kg. Für chronische Effekte jedoch wird er um den Faktor zehn verringert und liegt somit zwischen 0,2 und 0,8 mmol/kg (Thompson und Stewart 2003). Obwohl den hier durchgeführten Experimenten nicht das Schema klassischer CBB-

Experimente zugrunde liegt, liegen die ermittelten Werte in dem Bereich für akut letale CBB, dennoch waren nur chronische Effekte zu beobachten. So wird der CBB-Ansatz durch diese Experimente nicht gestützt und auch unterschiedliche Werte der Belastung, hervorgerufen durch die Exposition über Nahrungspartikel sind nur teilweise erklärbar.

Im Folgenden soll daher die Bedeutung der verantwortlichen Prozesse abgewogen werden. Dazu gehören neben Biotransformation und Elimination auch die Bioverfügbarkeit und die interne Verteilung der Substanz. Des Weiteren spielen noch Verhaltensweisen der Testorganismen, wie Nahrungsverweigerung oder verstärkte Exkretion eine entscheidende Rolle, um die Unterschiede der internen Belastung zu erklären.

Geht man von einer Erhöhung des Lipidstoffwechsels durch enzymatische Aktivität bestimmter CYPs und damit vermehrt gebildeten Speicherlipiden aus, so würde ebenfalls eine erhöhte Belastung der Nematoden in Anwesenheit von Futter erwartet werden. Jedoch zeigte sich, dass im Gegensatz zur *cyp*-Induktion und Hemmung der Reproduktion die Belastung der Nematoden mit Fluoranthen höher war, wenn diese ohne *E. coli* inkubiert wurden. Gleiche Resultate konnten bei Regenwürmern (*Lumbricus rubellus*) beobachtet werden (Ma et al., 1994). Regenwürmer, die für einige Wochen in mit Fluoranthen versetzter Erde ohne Futter inkubiert wurden, akkumulierten mehr von der Substanz als Würmer, die mit Futter gehalten wurden. Der Lipidgehalt der Würmer hatte keinen Einfluss auf den Effekt. Als Ursache wurde eine verstärkte Aufnahme von Bodenpartikeln (und damit Fluoranthen) in Folge des Nahrungsmangels vermutet. Auch bei *C. elegans* wird durch die Abwesenheit von Nahrung das pharyngeale Pumpen verstärkt (Avery und Horwitz, 1990). Dadurch würde die Aufnahme von Fluoranthen in den Körper gesteigert werden.

Eine weitere Erklärung für die geringere Belastung der Nematoden (mit Futter) ist die verstärkte Elimination der Substanz durch Exkretion eines großen Teils des Fluoranthens, welches mit der verdauten Nahrung ausgeschieden wird. Würmer, die kein Futter zu sich nehmen, scheiden zwangsläufig weniger aus (Liu und Thomas, 1994). Neben der verstärkten Exkretion ist der Nematode in der Lage, aktiv die Aufnahme von für ihn toxischen Substanzen zu verringern, indem er die Aktivität des pharyngealen Pumpens, durch das die Nahrung in den Darm gebracht wird, vermindert (Jones und Candido, 1999). Die Bestimmung der Belastung der Bakterien alleine inkubiert mit Fluoranthen (ohne Nematoden) bekräftigt diese Hypothese: Die

Belastung von *E. coli* bleibt zwischen vier und acht Stunden konstant und steigt nach 24 Stunden stark an. Die starke Belastung der Nahrung nach 24-stündiger Inkubation könnte die Würmer von der Aufnahme der Bakterien abhalten. Abschließend zeigt sich die interne Belastung in diesen Versuchen nicht als entscheidender Parameter für die giftige Wirkung von Fluoranthren, da abnehmend mit der Menge der akkumulierten Substanz (nach 24h Stunden) die Effekte auf den Organismus verstärkt werden. Um die tatsächliche Bedeutung der ingestierten, mit Fluoranthren beladenen Nahrungspartikel abzusichern, muss die Aufnahme der Substanz über die Körperoberfläche bestimmt werden. Ein Verschluss der Mundöffnung wie bei Vijfer et al. (2003) beschrieben, ist aufgrund der geringen Größe des Nematoden nicht möglich. Die Gabe von Nahrungspartikeln, welche größer als die Mundöffnung von *C. elegans* sind, würde eine sinnvolle Alternative bieten.

Die Ergebnisse im Ganzen lassen darauf schließen, dass der Nematode durch eine Folge von aktiven Verhaltensänderungen und molekularen Mechanismen in der Lage ist, den toxischen Einfluss von Chemikalien zu minimieren bzw. hinaus zu zögern. Jedoch gibt es einen zeitlichen Wendepunkt (bei etwa sechs Stunden), ab dem chronische Effekte nicht mehr zu verhindern sind. Bei einem kleinen Organismus wie *C. elegans* ist es unmöglich, die Menge der toxikologisch aktiven Substanz am Zielort zu bestimmen, da man anders als bei Fischen, Organe nicht einzeln auf ihre Belastung untersuchen kann. Daher ist die hier eingesetzte Kombination der Analyse der Expression unterschiedlich lokalisierter Gene und chronischer Effekte sehr gut geeignet, um Aufnahme, Verteilung und resultierende Effekte zu beschreiben. Zusätzlich könnte eine Fraktionierung zellulärer Bestandteile durch differentielle Zentrifugation und die anschließende Untersuchung der Belastung der einzelnen Fraktionen, wie bei Selck und Forbes (2004) beschrieben, möglicherweise Aufschluss über die Verteilung der Schadstoffe in den Zellen selbst geben.

IV.1.3. Bedeutung der ABC-Transporter für die Wirkung von Fluoranthren

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass *pgp-3* konzentrationsabhängig durch Fluoranthren induziert wird und das Expressionsmuster korreliert ist mit dem von *cyp-35C1*. Bisher konnte für das Gen eine Induktion durch natürliche pflanzliche und bakterielle Giftstoffe nachgewiesen werden, nicht aber durch anthropogen erzeugte Substanzen (Broeks et al., 1995).

Ohne eine Untersuchung der Genexpression konnten Aufnahme-Versuche mit der giftigen, organischen Verbindung Rhodamin eine Beteiligung der ABC-Transporter im Pharynx für den Schadstoffefflux nachweisen (Meyer, 2000). Eine Konzentration des fluoreszierenden Farbstoffs nach Hemmung der ABC-Transporter wurde mikroskopisch im Pharynx des Nematoden *C. elegans* nachgewiesen, wo *pgp-3* unter anderem und *pgp-14* ausschließlich lokalisiert sind. Vergleichsweise wenig der organischen Verbindung wurde im Darm lokalisiert.

In dieser Arbeit konnten nun weitere Aspekte der Bedeutung der ABC-Transporter für die Detoxifikation (von Fluoranthen), durch die spezifische Hemmung der enzymatischen Aktivität der Transporter durch Verapamil beleuchtet werden. Dabei wurde überprüft, dass Verapamil selbst (ohne Fluoranthen) keinen Einfluss hatte. Durch die Hemmung der Efflux-Proteine wurde die Verbindung stärker in den Nematoden akkumuliert und die Induktion von *cyp-35C1* wurde erhöht. Somit hatte die Inhibition der *pgps* die gleiche Wirkung auf das Zielgen wie die Gabe von Fluoranthen über Nahrungspartikel. Es wäre möglich, dass die giftige Substanz durch die Bindung an die Nahrungspartikel an den Effluxmechanismen im Pharynx vorbei geschleust wird und so in den Darm gelangt.

Die Induktion von *pgp-3* wurde durch die Hemmung nicht erhöht. Um herauszufinden, ob *pgp-3* tatsächlich am Efflux von Fluoranthen beteiligt ist, müssten Experimente mit K.O.-Mutanten des Genes [*pgp-3 (pk-18)*] durchgeführt werden und die Induktion der anderen *pgps* bestimmt werden. Es scheint wahrscheinlich, dass andere *pgps* (*pgp-1* bis *14*) am Transport der Substanz beteiligt sind. Die Erhöhung der Expression durch die Behandlung mit Fluoranthen und Verapamil von *pgp-14*, welches ausschließlich im Pharynx lokalisiert wurde, bestätigt diese Vermutung, sollte aber in zukünftigen Arbeiten verifiziert werden.

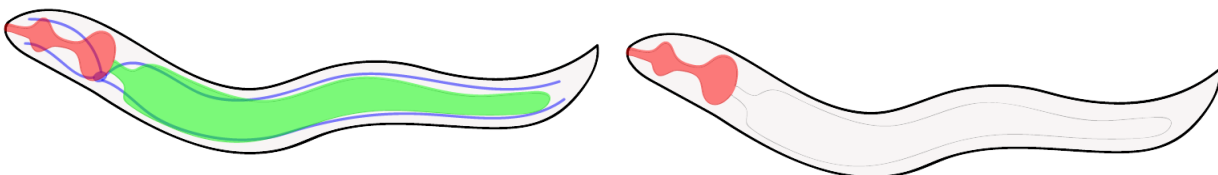


Abbildung IV.1. Bedeutung für die Schadstoffaufnahme und Elimination? Die Lokalisation der Effluxprotein-codierenden Gene *pgp-3* (links) in Darmzellen und Pharynx und *pgp-14* (rechts) nur im Pharynx von *C. elegans* (Abbildung www.wormbase.org).

Zudem könnten Untersuchungen der Expressionsprodukte (zum Beispiel Inhibition

der Aktivität) Aufschluss über die Funktion geben (Stevenson et al., 2006). Neben zellulären Prozessen in den intestinalen Zellen scheinen besonders solche in pharyngealen Zellen für die Aufnahme und Entgiftung von großer Bedeutung zu sein. Efflux-Proteine im Pharynx würden somit als erste Barriere gegen die Schadstoffaufnahme in die Zellen arbeiten.

Es scheint möglich, dass nach Ausschaltung der Barriere in den Membranen (durch Verapamil) die toxische Substanz nicht mehr ausgeschieden, sondern vermehrt akkumuliert wird und alle folgenden Prozesse und Konsequenzen für den Organismus gestartet werden. Die Ergebnisse zeigen die Komplexität der Mechanismen der Entgiftung organischer Substanzen und einen engen Zusammenhang der Induktion der beiden unterschiedlichen, streng konservierten Genfamilien CYP und ABC-Transporter. Die Untersuchung der hier aufgestellten Hypothesen kann Einblicke in die grundlegenden molekularen und physiologischen Mechanismen der Entgiftung geben.

IV.1.4. Bedeutung molekularer Prozesse für die zukünftige Chemikalienbewertung

Es konnte gezeigt werden, dass ein Zusammenhang besteht zwischen Schwellenwerten der Geninduktion und toxischen Effekten auf chronischer Ebene. Dies wurde besonders durch den Vergleich der Reproduktionsleistung der Würmer und der *cyp-35C1*-Induktion nach 6 bis 8 Stunden Inkubation in Fluoranthen deutlich. Der zusätzliche variable Faktor Nahrung (*E. coli*) bestärkte die Hypothese.

Die Prozesse, die zur Entgiftung und Erholung auf der einen Seite und zu irreversiblen Schäden auf der anderen Seite führen, können jedoch nicht direkt und konzentrationsabhängig durch einzelne Biomarker wie mutmaßliche Phase-I- und II-Enzyme bestimmt werden. Die Induktion ausgesuchter Gene ist wohl ein sensitiver, kurzzeitiger Indikator für Exposition, nicht aber zur Vorhersage von chronischen Effekten geeignet. Daher ist es weder möglich relevante Effekte auf ganze Ökosysteme vorauszusagen (Forbes et al., 2006), noch, wie hier gezeigt werden konnte, auf der Ebene von einzelnen Organismen. Es ist jedoch aufschlussreich, verschiedene molekulare Mechanismen und ihr Zusammenspiel unter unterschiedlichen Expositionsbedingungen zu untersuchen, um auch speziesübergreifend, der Giftwirkung zugrunde liegende Mechanismen zu entschlüsseln.

Für Fluoranthen wurde, trotz der Klassifizierung als MoA1-Substanz, eine gen-

toxische Wirkung nachgewiesen, wodurch DNA-Reparatur-Mechanismen induziert werden. (Palmquist et al., 2003). Auch die Überexpression von C-type-Lektinen, die wahrscheinlich an immunologischen Prozessen beteiligt sind, sowie Collagenen, die unter anderem zu einer Verstärkung der Kutikula beitragen, gehören zu dem komplexen Zusammenspiel der Abwehr der Effekte von organischen Substanzen (wie Fluoranthen) auf den gesamten Organismus (Reichert und Menzel, 2005). Andere Mechanismen, wie die Errichtung molekularer Membranbarrieren tragen einen Teil zur Detoxifikation bei, wie es für die Unterfamilie der ABC-Transporter hier gezeigt werden konnte. Die Rolle der ABC-Transporter bei der Detoxifikation von Narkotika ist weitestgehend unbekannt. Durch diese Arbeit konnte gezeigt werden, dass *Caenorhabditis elegans* alle erforderlichen molekularbiologischen und ökotoxikologischen Voraussetzungen stellt, um die zellulären Ursachen einer toxischen Wirkung zu untersuchen. Es reicht nicht aus, die internen Konzentrationen der Schadstoffe in den Organismen zu bestimmen, um Rückschlüsse auf die Effekte zu ziehen, da die Ausprägung der Effekte von unterschiedlichen Faktoren wie z. B. dem Aufnahmeweg abhängt. Zukünftige Arbeiten in diesem Bereich sollten genannte molekulare Schlüsselfunktionen der Entgiftung untersuchen, um die Auslöser toxischer Effekte identifizieren und bewerten zu können. Die Untersuchung ausgewählter Gene durch die real-time PCR hat sich hier als viel versprechend erwiesen, dennoch wäre eine Untersuchung ganzer Genfamilien von großer Bedeutung. Im Folgenden wird diskutiert, ob die Methode des DD-PCR geeignet für solche groß angelegten Untersuchungen ist. Entsprechende molekularbiologische Versuchsansätze sollten eine Verbindung zur Untersuchung chronischer Toxizität stets beinhalten, wobei die Bestimmung der Reproduktion von *C. elegans* sich als sensitivster Parameter zeigte.

IV.2. Genexpressionsanalyse durch Differential Display PCR

Die Methode der DD-PCR konnte relativ zügig etabliert werden. Kultivierung und Inkubation der Nematoden, sowie RNA-Isolation, reverse Transkription, PCR und die Auftrennung der PCR-Produkte auf einen Polyacrylamidgel konnten durchgeführt werden. Der aufwendigste Teil hierbei war die Abstimmung der PCR-Reaktion mit der Gelelektrophorese und der anschließenden Silberfärbung der Gen-Fragmente, um möglichst viele Gen-Fragmente klar und kontrastreich voneinander zu

unterscheiden. Auch war es möglich die cadmiuminduzierte Genexpression mittels DD-PCR nachzuweisen. Warum die Methode dennoch als nicht geeignet bewertet wurde, um anhand der Genexpressionsmuster auf toxisitätsverursachende Mechanismen zu schließen, wird im Folgenden diskutiert.

Vorteile der DD-PCR sind zum einen die geringen Kosten für die Anwendung der Methode und zum anderen beschränkt sich die DD-PCR nicht auf Modellorganismen, deren Genom bereits sequenziert wurde. Unterschiede in der Genexpression lassen sich somit bei jedem Organismus nachweisen, sind jedoch keinem Expressionsprodukt direkt zuzuordnen. Die Identifikation der unterschiedlich exprimierten Gene erweist sich als langwierig. Weitere Nachteile der DD-PCR sind die geringe Reproduzierbarkeit und speziell hier der hohe Arbeitsaufwand und die ungenügende Sensitivität der Silberfärbung, um feine Unterschiede nachzuweisen (Sturtevant, 2000). Der Arbeitsaufwand könnte durch die Nutzung moderner Sequenziergeräte (Kapillarelektrophorese), in denen 96 PCR-Proben mit internen Größenstandards gleichzeitig aufgetrennt werden, verringert werden. Bei der hier verwendeten Gelelektrophorese konnten gleichzeitig lediglich 16 Proben analysiert werden, wodurch sich die Methode in der Anwendung als viel zu personalintensiv herausstellte. Die Nutzung kapillarelektrophoretischer Systeme würde die Sensitivität und Reproduzierbarkeit erhöhen, da statt manueller Silberfärbung die Genfragmente in der PCR-Reaktion bereits mit fluoreszierenden Primern gebildet werden und so per Laser während der Elektrophorese detektiert werden können. Entsprechende Geräte werden vertrieben durch www.appliedbiosystems.com (ABIPrism) und sind derzeit erhältlich ab etwa 300.000€.

Auch wenn die genannten Verbesserungsvorschläge sinnvoll scheinen, rät die Autorin von der Durchführung klar ab. Die Methode der DD-PCR war in den 90er-Jahren bestimmt wert im Science-Magazin veröffentlicht zu werden und wird auch heute noch erfolgreich in der Ökotoxikologie angewendet (Meyer et al., 2005). Um nahezu alle Veränderungen einer Behandlung nachzuweisen, ist es ratsam, aufgrund der hohen Probenzahl, jeweils nur zwei, höchstens drei unterschiedliche Versuchsansätze miteinander zu vergleichen. Unter optimaler Primerwahl sollen etwa 50-100 Gene pro Primerpaar amplifiziert werden (Liang und Pardee, 1992). Das Genom von *C.elegans* besteht aus etwa 20 000 Genen, was den Umfang der Erstellung einer Musterbibliothek erahnen lässt. Unter den gegebenen

Voraussetzungen würde die Erstellung einer Musterbibliothek der Veränderung der Genexpression durch Chemikalien und Chemikaliengemische zu umfassend und damit auch zu unübersichtlich werden. Zudem wäre es nötig, unterschiedlich stark exprimierte Genfragmente nachträglich zu identifizieren. Ohne eine Identifikation wäre nicht sichergestellt, dass Fragmente identischer Größe, die durch gleiche Primerpaare aber nach unterschiedlicher Behandlung der Würmer gebildet wurden, auch gleichen Genen entsprechen.

Die Nutzung von Microarrays zur Erfassung des Gefährdungspotentials von Chemikalien scheint in diesem Falle aussichtsreicher. Gesamtgenomische Microarrays sind inzwischen für Organismen unterschiedlicher Phyla kommerziell erhältlich (www.affymetrix.com). Da es sich für viele universitäre Einrichtungen nicht lohnen würde, alle notwendigen Geräte und Analyseprogramme anzuschaffen, bietet es sich an, die volle Probenprozessierung von einem Auftragslabor durchführen zu lassen. cDNA-Synthese und -Reinigung, Markierung, cDNA-Fragmentierung, Hybridisierung, Scan und Primäranalyse der Genexpression können dort durchgeführt werden. Die Kosten für eine gesamtgenomische Untersuchung schadstoffinduzierbarer Gene von *C. elegans*, wie im experimentellen Teil beschrieben (Kontrolle und zwei Behandlungen hier: 5 und 50 μ M Cadmium), lägen für drei Replikate derzeit bei knapp 6.000 €. (Integrierte funktionelle Genomik (IFG) Münster, <http://ifg-izkf.uni-muenster.de>).

Standardisierte Bedingungen von Anfang an sind nötig, betrachtet man die (noch) hohen Kosten der Arraytechnologie. Definierte und an natürliche Bedingungen angepasste Expositionsbedingungen sind hier, wie auch bei klassischen ökotoxikologischen Tests wichtig. Parameter wie der Aufnahmeweg und die Expositionszeit sind von großer Bedeutung für die Anreicherung und Verteilung des Schadstoffes im Organismus und die toxische Wirkung (Neddermann und Ahlf, 2005). Zudem gestalten sich die Interpretation und somit auch die Bewertung dieser eindeutigen Effekte auf ausgesuchte Gene des Organismus als schwieriger als der Nachweis. Um eine Beeinträchtigung des Organismus aufgrund molekularer Reaktionen vorherzusagen, müssen in zukünftigen Untersuchungen klassische ökotoxikologische Verfahren und molekularbiologischer Methoden miteinander kombiniert werden.

V. SCHLUSSFOLGERUNG und AUSBLICK

Analysen veränderter Genexpression oder Proteinbiosynthese durch die Einwirkungen von Chemikalien haben sich in den letzten Jahren als bedeutsame Methoden erwiesen, um Schadstoffeffekte auf zellulärer Ebene nachzuweisen. Der Nachweis ist hochsensitiv und Effekte sind meist schon nach kurzer Zeit detektierbar. Zudem eignen sich die zellulären Reaktionen, um die Schadstoffwirkung am Zielort nachzuweisen. Auf diese Weise kann die biologische Verfügbarkeit der Substanzen unter unterschiedlichen Expositionsbedingungen bestimmen werden.

Untersuchungen der cadmiuminduzierten Genexpression konnten einen Einfluss von Partikeln und mit unterschiedlichen Substituenten wie Carboxyl- oder Aminogruppen auf die Bioverfügbarkeit und Bioakkumulation der Substanz nachweisen (Offermann et al, 2008). Auch in klassischen ökotoxikologischen Tests wird der Expositionsart zunehmend größere Bedeutung zugemessen (Feiler et al., 2005). Die Verfügbarkeit der Schadstoffe über Partikel (Sediment oder Boden) unterscheidet sich maßgeblich von der Verfügbarkeit über die Wasserphase und führt somit auch zu Unterschieden in der Giftigkeit. Die Kombination molekularbiologischer Untersuchungen und klassischer Biotests eignet sich sehr, um die der Schadstoffaufnahme und Wirkung zugrunde liegenden zellulären Mechanismen abhängig von den Expositionsbedingungen zu untersuchen.

Die Bedeutung der Fluoranthen-Exposition über Nahrungspartikel konnte hier sowohl für die Geninduktion, als auch für chronische Beobachtungsgrößen gezeigt werden. Durch die Aufnahme über die Nahrung gelangte Fluoranthen schneller an den Wirkungsort, was die Effekte auf den Organismus verstärkte. Dabei waren sowohl physiologische Eigenschaften des Testorganismus (Futteraufnahme und Defäkation), aktive Verhaltensänderungen (pharyngeales Pumpen), als auch die chemische Eigenschaften der Substanz von Bedeutung. Gerade der Zusammenhang der biologischen Verfügbarkeit mit den zellulären Zielstrukturen der Schadstoffe ist von großer Bedeutung und weitere grundlegende Fragen können mit Hilfe von Untersuchungen auf molekularbiologischer/ biochemischer Ebene beantwortet werden. Hier sind sowohl Analysen einzelner relevanter Gene, aber auch gesamtgenomischer Microarrays geeignet, um die Mechanismen der Schadstoffwirkung aufzuklären.

Die hohe Zahl der Veröffentlichungen in den letzten Jahren, die Microarrays zur Beantwortung ökotoxikologischer Fragestellungen verwendeten, bekräftigt die zeitgeistliche Bedeutung der Anwendung. Die Kosten die entstehen würden, um die

Wirkungen von einzelnen Chemikalien, Chemikaliengemischen oder auch Umweltproben auf die Genexpression zu untersuchen, sind für eine standardisierte Anwendung noch nicht tragbar. Es bietet sich daher an, gesamtgenomische Microarrays lediglich einzeln (ohne Replikate) einzusetzen, um Kandidatengene zu identifizieren und diese gezielt auf eine Schadstoffinduktion zu untersuchen (Muncke et al., 2007; Reichert et al., 2005). Beachtung finden sollten hier auch Mechanismen der Genregulation. Wenn auch gezeigt werden konnte, dass die Induktion der *C.elegans cyps* nicht mit der, der Vertebraten über AH-Rezeptoren verglichen werden kann (Menzel et al., 2005), scheint eine Koregulation mit Vertretern der Familie der ABC-Transporter zu bestehen. Das Zusammenspiel bekannter Entgiftungsprozesse (Biometabolisierung) und weiterer Mechanismen, wie aktive Efflux-Systeme, sowie Lipidstoffwechsel, oder Immunsystem regulierende Prozesse sollten hier eingehend untersucht werden. Eine systematische Untersuchung der zugrunde liegenden Regulationsmechanismen und deren Zusammenspiel anhand relevanter Gene und Genfamilien kann Aufschluss über die tatsächliche Bedeutung der Induktion für die Schadstoffwirkung und Detoxifikation geben. Zudem sollte auch die Inkubationszeit Beachtung finden. Konzentrations- und zeitabhängige Höchstwerte bzw. Schwellenwerte der Geninduktion scheinen generell auf Toxizität hinzuweisen, können das Ausmaß der Folgen jedoch nicht voraussagen. Es ist sinnvoll die Induktion relevanter Gene für zwei oder mehr aufeinander folgende Zeitpunkte zu testen, um die Abfolge unterschiedlicher Schutzmechanismen zu erfassen. Bestenfalls würde parallel eine Analyse auf Translationsebene (Enzyme, Proteine) stattfinden, um das zelluläre Bild zu vervollständigen.

Grundlegende Untersuchungen der Genexpression sollten mit Ergebnissen öko-toxikologischer Testsysteme verglichen werden, da sonst die Relevanz der beobachteten Geninduktion nicht bewertet werden kann. Das hier untersuchte *cyp-35C1* wurde bereits durch eine geringe Fluoranthenkonzentration (0,01 mg/L nach sechs Stunden) induziert, bei der chronische Effekte noch nicht nachzuweisen waren. Chronische Toxizität wurde nur durch hohe, nicht umweltrelevante Konzentrationen ausgelöst. Um *C. elegans* zur Untersuchung relevanter Gengruppen und molekularer Schutzmechanismen zu nutzen, müssten geplante Experimente im hohen Konzentrationsbereich stattfinden. Alternativ bieten sich andere sequenzierte Modellorganismen mit höheren Sensitivitäten für chronische Effekte an. Beim Vergleich toxischer Endpunkte (EC_{50} / LC_{50}) von *C. elegans* und *Daphnia magna* für

Fluoranthen reagierte die Crustaceen-Art deutlich sensitiver. Der EC_{50} (Reproduktion) für Fluoranthen bei *C. elegans* liegt bei 0,9 mg/L wobei der LC_{50} bei *D. magna* schon durch eine Konzentration von 0,117 mg/L erreicht wird (Menzel et al., 2005).

Die Tests mit *D. magna* sind für akute (Immobilisation nach 24 Stunden) und auch chronische (Reproduktion nach 14 Tagen) Effekte standardisiert. Daphnien sind als verbreitete Vertreter des pelagischen Zooplanktons beliebte Testorganismen und die Kultivierungsbedingungen sind einfach. Im Zuge des neuen europäischen Chemikaliengesetzes REACH (Registration, Evaluation, Authorisation of Chemicals) werden mit Daphnien akute und chronische Tests durchgeführt (www.reach-info.de). Jedoch ist die Testdurchführung begrenzt auf aquatisches Milieu und für chronische Effekte sehr langwierig. Kurze Expositionszeiten (48 Stunden) und variable Expositionsbedingungen in Flüssigphase oder Partikeln bietet neben *C. elegans* noch der Fischeitest mit *Danio rerio* (Hollert et al., 2003). Abhängig von der Fragestellung eignen sich *Daphnia magna* oder auch *Danio rerio* ebenfalls, um molekulare Mechanismen als Auslöser von Langzeiteffekten zu untersuchen. Untersuchungen an *Danio rerio* wären humantoxikologisch besonders interessant, da hier sowohl der adulte Organismus als Vertreter der Vertebraten, als auch die Embryonen zur Verfügung stehen. Individuen in beiden Lebenszyklen eignen sich sowohl zur Untersuchung chronischer Effekte als auch zur Analyse molekularbiologischer Mechanismen (Fenske et al., 2005, Muncke et al., 2006).

Die besten ökotoxikologischen Voraussetzungen bietet aus Sicht der Autorin der Nematode, da neben den molekularbiologischen Vorteilen, auch chronische Tests, sogar über mehrere Generationen in vergleichsweise kurzer Zeit durchführbar sind. Reichhaltige Datenbanken und Literaturquellen konnten genutzt werden, die anspruchslose Kultivierung der Nematoden vereinfachte die praktischen Untersuchungen und induzierte Gene durch geringe Konzentrationen waren leicht nachzuweisen. Zudem können die Expositionsbedingungen beliebig variiert werden, da der Nematode sowohl für Flüssig-, als auch für Festphasentests geeignet ist. Somit lassen sich auch die Aufnahmewege genau definieren. Methoden wie real-time PCR für ausgesuchte Gene, und auch Microarrays für gesamtgenomische Untersuchungen haben für die ökotoxikologische Bewertung, basierend auf den toxizitätsvermittelnden Mechanismen großes Potential, solange sie mit ökologisch relevanten Beobachtungsgrößen verglichen werden.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

In der Umwelt gelangen Schadstoffe auf unterschiedlichste Weise zu Organismen. Der benthisch lebende Nematode *Caenorhabditis elegans* kann Schadstoffe sowohl durch die freie Wasserphase, das Porenwasser, aber auch durch die Ingestion kontaminierter Partikel oder Nahrung aufnehmen. Die Exposition über kontaminierte Partikel wirkt sich maßgeblich auf die Bioverfügbarkeit der Substanzen und damit auch auf die toxische Wirkung aus.

Die Ursache der durch die Expositionsbedingungen veränderten Bioverfügbarkeit für die resultierenden negativen Effekte wurde bisher wenig untersucht und soll Kernpunkt der Arbeit sein. So wurde die Bestimmung der fluorantheninduzierbaren Genexpression einer Cytochrom P₄₅₀-abhängigen Monooxygenase (*cyp-35C1*) und eines ABC-Transporters (*pgp-3*) per real-time PCR genutzt, um den biologisch verfügbaren Anteil des eindringenden Fremdstoffs (Flu) nachzuweisen. Beide Gene gehören streng konservierten, bei Vertebraten am Fremdstoff-Metabolismus beteiligten Genfamilien an. Mit Hilfe dieser Biomarker sollte untersucht werden, ob es möglich ist, (A) einen konzentrations-abhängigen Schwellenwert der Geninduktion zu bestimmen, welcher auf chronische Toxizität schließen lässt und (B) ob der Einfluss von Expositionsart (mit und ohne Nahrungspartikel) und Expositionsdauer (4-24 Stunden) auf die Verfügbarkeit von Flu auch auf zellulärer Ebene nachzuweisen ist. Zusätzlich wurde die Methode der Differential Display-PCR etabliert, um generelle Muster der Schadstoffwirkung auf die Genexpression aufzuzeigen. Zur Verknüpfung der Ergebnisse der Genexpression mit der chronischen Wirkung wurde ein modifizierter Nematodentest durchgeführt. Schließlich wurde die Belastung der Nematoden bestimmt, um die Bedeutung von Aufnahme und Bioverfügbarkeit für die irreversiblen Effekte bewerten zu können.

(A) Obwohl *cyp-35C1* und *pgp-3* konzentrationsabhängig durch Flu induziert wurden, konnte durch den Vergleich mit den Langzeiteffekten kein konzentrationsabhängiger Schwellenwert nachgewiesen werden. Die verminderte Reproduktionsleistung des Nematoden deutete auf eine generelle Überlastung des zellulären Systems nach etwa 6 Stunden Inkubation hin. Dies wurde durch eine zeitabhängige Versuchsreihe bestätigt. (B) Die Exposition über Bakterien erhöhte die *cyp-35C1*-Expression so wie die negativen Effekte auf die Reproduktionsleistung. Im Gegensatz dazu wurde die Flu-Belastung verringert. Der bioverfügbare Anteil ist somit wichtiger für die negativen Effekte als die Gesamtbelastung. In allen Versuchen war die Expression von *cyp-35C1* und *pgp-3* korreliert. Die Bedeutung der ABC-Transporter wurde durch die Hemmung der enzymatischen Aktivität der PGP's mit Verapamil untersucht. Durch die Inhibition dieser ersten Barriere der Schadstoffabwehr wurde die Bioverfügbarkeit von Flu erhöht.

Die Ergebnisse wurden so interpretiert, dass aktive Verhaltensänderungen und molekulare Schutzmechanismen der Nematoden zur Minimierung bzw. Verzögerung toxischer Effekte beitragen. Jedoch existiert ein zeitlicher Wendepunkt, ab dem Effekte nicht mehr reversibel sind und es zu chronischen Schäden kommt. Die Bestimmung der Expression einzelner relevanter Gene, sowie ganzer Genfamilien eignet sich gut zur Identifikation zellulärer Wirkungsmechanismen als Auslöser toxischer Effekte unter unterschiedlichen Expositionsbedingungen. Um die Aussagekraft der molekularen Reaktionen bewerten zu können, ist eine Kombination mit klassischen öko-toxikologischen Verfahren von entscheidender Bedeutung.

VI. SUMMARY

Effects of fluoranthene-exposure on gene expression and reproduction of *Caenorhabditis elegans*

Contaminants can be taken up from the environment by organisms through different exposure routes. The nematode *Caenorhabditis elegans* may take up contaminants directly via the water phase, the pore water as well as bound to particles and food by ingestion. The exposition to contaminated particles has a strong influence on the bioavailability of the substances and hence their toxic impact.

In this study the cause for the altered bioavailability and the resulting effects will be investigated. Expression of a Cytochrome P₄₅₀ Monooxygenase (*cyp-35C1*) and an ABC-Transporter (*pgp-3*) were determined by real-time PCR to measure the biological available fraction of the entering substance fluoranthene. Both genes belong to large, conserved gene families which are involved in metabolism processes of hydrophobic substances and are fluoranthene inducible. The aim of the study was to test (A) whether gene induction shows a concentration-dependent threshold, which is conclusive on chronic parameters (reproduction, fertility, growth); (B) changes in bioavailability on cellular level due to exposition (media-only vs. dietary particles) and incubation-time (4-24 h). Additionally, the differential display-PCR was established to detect an overview of chemical-induced gene-expression-patterns. To connect gene-expression results to long-term-effects a modified nematode life-cycle test was performed. At least the body burden was determined to assess the relevance of uptake and bioavailability on the irreversible effects.

(A) Induction of *cyp-35C1* and *pgp-3* by fluoranthene are concentration-dependent. A threshold of the gene-induction followed by irreversible effects could not be detected. A general capacity overload of the cellular system was indicated by a decreased number of offspring after 6 h of fluoranthene-incubation. This hypothesis was confirmed in a time-dependent test series.

(B) Both, *cyp-35C1*-expression and inhibition of reproduction were increased by an exposition via dietary particles (*E. coli*). In contrast, the body burden of the nematodes decreased. Hence the total load is of minor importance, meaning that the bioavailable fraction triggers the adverse effects on the organism. All tests showed a correlation of the expression of *cyp-35C1* and *pgp-3*. The relevance of the ABC-transporters was determined by inhibition of the enzymatic activity of the PGPs with Verapamil. The bioavailability of fluoranthene was increased by deactivating this first cellular barrier.

In conclusion, active behavioural changes as well as molecular defence-mechanisms of the nematode *C. elegans* contribute to a minimisation respectively delay of the toxic effects. There definitely is a time-dependent turning point where effects are no longer reversible and permanent damage occurs. Determination of gene expression of single relevant genes as well as whole gene families is suitable to unravel cellular mechanisms of action which elicit toxic effects. The influence of different exposition conditions can be identified easily. To assess the significance of the molecular reactions it is of vital importance to connect them to classical ecotoxicological assays.

VII. REFERENZEN

- Ahlf W, Dahm M, Förstner U, Wild-Metzko M (1991) Biologisches Bewertungskonzept für Sedimente. *Vom Wasser* 76:215–223.
- Ahlf W, Braunbeck T, Heise S, Hollert H (2002) Sediment and soil quality criteria. In: Burden FR, McKelvie I, Förstner U, Günther H (eds), *Environmental Monitoring Handbook*. McGraw-Hill, New York 17.1.-17.18.
- Aninat C, Andre F, Delaforge M (2005) Oxidative metabolism by P₄₅₀ and function coupling to efflux systems: modulation of mycotoxin toxicity. *Food Additives and Contaminants* 22(4):361-8.
- Ashrafi K, Chang FY, Watts JL, Fraser AG, Kamath RS, Ahringer J, Ruvkun G (2003) Genome-wide RNAi analysis of *Caenorhabditis elegans* fat regulatory genes. *Nature* 121:268-272.
- Avery L, Horvitz HR (1990) Effects of starvation and neuroactive drugs on feeding in *Caenorhabditis elegans*. *Journal for Experimental Zoology* 253(3):263-70.
- Avery L, Thomas JH (1997) "Feeding and Defecation", in *The Nematode C elegans II*, D Riddle (ed), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. 679-716.
- Broeks A, Janssen HWRM, Calafat J, Plasterk RHA (1995) A P-glycoprotein protects *Caenorhabditis elegans* against natural toxins. *EMBO Journal* 14:1858-1866.
- Broeks A, Gerrard B, Allikmets R, Dean M, Plasterk RHA (1996) Homologues of the human multidrug resistance genes MRP and MDR contribute to heavy metal resistance in the soil nematode *Caenorhabditis elegans*. *EMBO Journal* 15:6132-6143.
- Brenner S (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77:71–94.
- Bustin SA (2002) Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology* 29:23-39.
- Chang G (2003) Multidrug resistance ABC transporters. *FEBS Letters*. 555(1):102-5.
- Cheung VG, Morley M, Aguilar F, Massimi A, Kucherlapati R, Childs G (1999) Making and reading microarrays. *Nature Genetics* 21:15-19.
- Custodia N, Won SJ, Novillo A, Wieland M, Li C, Callard IP (2001) *Caenorhabditis elegans* as an environmental monitor using DNA microarray analysis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 948:32–42.
- Crommentuijn T, Doornekamp A, Van Gestel CAM (1997) Bioavailability and ecological effects of cadmium on *Folsomia candida* in an artificial soil substrate as influenced by pH and organic matter. *Applied Soil Ecology* 5:261–271.

- David HE, Dawe AS, de Pomerai DI, Jones D, Candido EPM, Daniells C (2003) Construction and evaluation of a transgenic hsp16-GFP-lacZ *Caenorhabditis elegans* strain for environmental monitoring. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22:111–118.
- Donkin SG, Dusenbery DB (1993) A soil toxicity test using the nematode *Caenorhabditis elegans* and an effective method of recovery. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 25:145-151.
- Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM (1999) Expression profiling using cDNA microarrays. *Nature Genetics Supplement* 21:10-14.
- EG Wasserrahmenrichtlinie Nr. 2000/60/EG Artikel Richtlinie 2000/60/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 23. Oktober 2000.
- Escher BI, Hermens JLM (2002) Modes of action in ecotoxicology: their role in body burdens, species sensitivity, QSARs, and mixture effects. *Environmental Science and Technology* 36:4201-4217.
- Escher BI, Hermens JLM (2004) Internal Exposure: Linking Bioavailability to Effects. *Environmental Science and Technology* 38:455A-462A.
- Escher BI, Bramaz N, Eggen RI, Richter M (2005) In vitro assessment of modes of toxic action of pharmaceuticals in aquatic life. *Environmental Science and Technology* 39:3090-3100.
- Farrell RE Jr (1993) RNA isolation strategies. In: Farrell RE Jr (ed) *RNA methodologies*. Academic Press, San Diego New York: 47–92.
- Feiler U, Ahlf W, Hoess S, Hollert H, Neumann-Hensel H, Meller M, Weber J, Heininger P (2005) The SeKT joint research project: definition of reference conditions, control sediments and toxicity thresholds for limnic sediment contact tests. *Environmental Science and Pollution Research* 12(5):257-258.
- Fenske M, Maack G, Schäfers C, Segner H (2005) An environmentally relevant concentration of estrogen induces arrest of male gonad development in zebrafish, *Danio rerio*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24(5):1088-98.
- Fent K (2007) *Ökotoxikologie* 3. Auflage. Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland
- Flöter C (2007) Entwicklung von ökotoxikologischen Instrumenten und ihre rechtliche Implementierung zur marinen ökologischen Risikobewertung von Chemikalien, Pestiziden und Baggergut. Dissertation an der Technischen Universität Hamburg Harburg, Shaker Verlag, Aachen
- Forbes VE, Palmquist A, Bach L (2006) The Use and Misuse of Biomarkers in

Ecotoxicology. Environmental Toxicology and Chemistry 25 (1):272-280

- Gems D, McElwee JJ. (2005) Broad spectrum detoxification: the major longevity assurance process regulated by insulin/IGF-1 signaling? *Mechanisms of Ageing and Development* 126:381–387.
- Gibson GG, Skett P (2001) Introduction to drug metabolism. Cheltenham, UK: Nelson Thornes. viii. 256.
- Gotoh O (1998) Divergent structures of *Caenorhabditis elegans* cytochrome P₄₅₀ genes suggest the frequent loss and gain of introns during the evolution of nematodes. *Molecular Biology and Evolution*. 15(11):1447-59.
- Hollert H, Keiter S, König N, Rudolf M, Ulrich M, Braunbeck T (2003) A New Sediment Contact Assay to Assess Particle-bound Pollutants Using Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos. *Journal of Soils and Sediments* 3:197-207.
- Huang X, Powell-Coffman, JA Jin, Y (2004) The AHR-1 aryl hydrocarbon receptor and its co-factor the AHA-1 aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator specify GABAergic neuron cell fate in *C. elegans*. *Development* 131:819-828.
- ISO/CD 10872 (www.iso.org) Water quality -- Determination of the toxic effect of sediment and soil samples on growth, fertility and reproduction of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda) (under development).
- Jones D and Candido PM (1999) Feeding is inhibited by sublethal concentrations of toxicants and by heat stress in the nematode *Caenorhabditis elegans*: Relationship to the cellular stress response. *Journal of Experimental Zoology* 284:147-157.
- Lampen A, Ebert B, Stumkat L, Jacob J, Seidel A (2004) Induction of gene expression of xenobiotic metabolism enzymes and ABC-transport proteins by PAH and a reconstituted PAH mixture in human CAco2-cells. *Biochemica and Biophysica Acta* 1681:38-46.
- Liang P, Pardee AB (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257(5072):967-971.
- Liao VH, Dong J, Freedman JH (2002) Molecular characterization of a novel, cadmium-inducible gene from the nematode *Caenorhabditis elegans*. A new gene that contributes to the resistance to cadmium toxicity. *The Journal of Biological Chemistry* 277(44):42049-59.
- Liao VH, Freedman JH (1998) Cadmium-regulated genes from the nematode *Caenorhabditis elegans*. Identification and cloning of new cadmium-responsive genes by differential display. *The Journal of Biological Chemistry* 273(48):31962-70.

- Lindblom TH, Dodd AK (2006) Xenobiotic detoxification in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Experimental Zoology* 305A:720–730.
- Liu DW, Thomas JH. (1994) Regulation of a periodic motor program in *C. elegans*. *Journal of Neuroscience* 14(4):1953-62.
- Ma Wei-chun, Immerzeel J, Bodt J (1995) Earthworms and food interactions on bioaccumulation and disappearance in soil of polycyclic aromatic hydrocarbons: Studies on Phenanthrene and Fluoranthene. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 32:226-232.
- Mayer P, Karlson U, Christensen PS, Johnsen AR, Trapp S (2005) Quantifying the effect of medium composition on the diffusive mass transfer of hydrophobic organic chemicals through unstirred boundary layers. *Environmental Science and Technology* 39(16):6123-9.
- Mayer P, Fernqvist MM, Christensen PS, Karlson U, Trapp S (2007) Enhanced diffusion of polycyclic aromatic hydrocarbons in artificial and natural aqueous solutions. *Environmental Science and Technology* 41(17):6148-55.
- McCarty LS, Mackay D, Smith AD, Ozburn AD, Dixon DG (1993) Residue-based interpretation of toxicity and bioconcentration QSARs from aquatic bioassays: polar narcotic organics. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 25:253-270.
- Menzel R, Bogaert T, Achazi R (2001) A systematic gene expression screen of *Caenorhabditis elegans* cytochrome P₄₅₀ genes reveals CYP35 as strongly xenobiotic inducible. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 395(2):158-68.
- Menzel R, Rodel M, Kulas J, Steinberg CE (2005) CYP35: Xenobiotically induced gene expression in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 438(1):93-102.
- Menzel R, Reichert K (2005) Entwicklung und Validierung eines *Caenorhabditis elegans* Biomonitor-Tests auf DNA-Ebene (Transkriptionsebene) zur Prüfung von Arzneimitteln, Bioziden und anderen Umweltchemikalien UBA-FB 000671/1 27/2005.
- Menzel R, Yeo HL, Rienau S, Li S, Steinberg CE, Stürzenbaum SR (2007) Cytochrome P₄₅₀s and short-chain dehydrogenases mediate the toxicogenomic response of PCB52 in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Molecular Biology* 370(1):1-13.
- Meyer U (2000) Zur Xenobiotika Resistenz ausgewählter freilebender Nematoden und ihrer Eignung als Biotestorganismus. Diplomarbeit, Zoologisches Institut und zoologisches Museum der Universität Hamburg.

- Meyer JN, Volz DC, Freedman JH, Di Giulio RT (2005) Differential display of hepatic mRNA from killifish (*Fundulus heteroclitus*) inhabiting a Superfund estuary. *Aquatic Toxicology* 73:327-341.
- Muncke J, Eggen RI (2006) Vitellogenin 1 mRNA as an early molecular biomarker for endocrine disruption in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 25(10):2734-41.
- Muncke J, Junghans M, Eggen RI (2007) Testing estrogenicity of known and novel (xeno-)estrogens in the MolDarT using developing zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology* 22(2):185-193.
- Nebert DW, Dalton TP, Okey AB, Gonzalez FJ (2004) Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1-enzymes in environmental toxicity and cancer. *Journal of Biological Chemistry* 279:23847–23850.
- Neddermann K, Ahlf W (2005) What are the important vectors for the transfer of cadmium to the nematode *Caenorhabditis elegans*? SETAC Europe Annual Meeting, Lille, France 23-27 May 2005.
- Offermann K, Matthäi A, Ahlf W (2008) Assessing the relative importance of particle-bound and waterborne cadmium on bioavailability and bioaccumulation to the nematode *Caenorhabditis elegans*. Eingereicht bei *Environmental Chemistry and Toxicology*
- Palmquist A, Selck H, Rasmussen LJ, Forbes VE (2003) Biotransformation and genotoxicity of Fluoranthene in the deposit-feeding Polychaete *Capitella SP I*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22 (12):2977-2985.
- Pascoe D, Edwards RW (1989) Single species toxicity tests. In Boudou A, Ribeyre F (eds) *Aquatic Ecotoxicology: Fundamental Concepts and Methodologies*, CRC Florida 11:93–126.
- Pedersen MB, Van Gestel CAM, Elmegaard N (2000) Effects of Copper on Reproduction of two Collembolan Species exposed through soil, food, and water. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19(10):2579–2588.
- Pfaffl, MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29(9):e45.
- Powell-Coffman J, Bradfield CA, Wood WB (1998) *Caenorhabditis elegans* orthologs of the aryl hydrocarbon receptor and its heterodimerization partner the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95: 2844-2849.

- Poynton HC, Varshavsky JR, Chang B, Cavigliolo G, Chan S, Holman PS, Loguinov AV, Bauer DJ, Komachi K, Theil EC, Perkins EJ, Hughes O, Vulpe CD (2007) *Daphnia magna* ecotoxicogenomics provides mechanistic insights into metal toxicity. *Environmental Science and Technology* 41(3):1044-50.
- Rand GM, Wells PG; McCarthy LS. (1995). *Fundamentals of aquatic toxicology II. Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment* Rand G M (ed), Taylor and Francis: Washington DC 3-67.
- Reichert K, Menzel R (2005) Expression profiling of five different xenobiotics using a *Caenorhabditis elegans* whole genome microarray. *Chemosphere* 61(2):229-37.
- Roh JY, Lee J, Choi J (2006) Assessment of stress-related gene expression in the heavy metal-exposed nematode *Caenorhabditis elegans*: a potential biomarker for metal-induced toxicity monitoring and environmental risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25(11):2946-56.
- Rozen S, Skaletsky HJ (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ 365-386.
- Selck H, Palmqvist A, Forbes VE (2003) Uptake, depuration, and toxicity of dissolved and sediment-bound fluoranthene in the polychaete, *Capitella* sp. I. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22(10):2354-63.
- Selck H, Forbes VE (2004) The relative importance of water and diet for uptake and subcellular distribution of cadmium in the deposit-feeding polychaete, *Capitella* sp. I. *Marine Environmental Research* 57(4):261-79.
- Sheps JA, Ralph S, Zhao Z, Baillie DL, Ling V (2004) The ABC transporter gene family of *Caenorhabditis elegans* has implications for the evolutionary dynamics of multidrug resistance in eukaryotes. *Genome Biology* 5:(3).
- Schierenberg E, Cassada R (1986) Der Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Biologie in unserer Zeit* 16:1-7.
- Schuler LJ, Landrum PF, Lydy MJ (2004) Time-dependent toxicity of fluoranthene to freshwater invertebrates and the role of biotransformation on lethal body residues. *Environmental Science and Technology* 38(23):6247-55.
- Selck H, Palmqvist A, Forbes VE (2003) Uptake, depuration, and toxicity of dissolved and sediment-bound fluoranthene in the polychaete, *Capitella* sp. I. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22(10):2354-63.
- Staudinger JL, Madan A, Carol KM, Parkinson A (2003) Regulation of drug

transporter gene expression by nuclear receptors. *Drug metabolism and disposition* 31:523–527.

- Stevenson CN, MacManus-Spencer LA, Luckenbach T, Luthy RG, Epel D (2006) New perspectives on perfluorochemical ecotoxicology: inhibition and induction of an efflux transporter in the marine mussel, *Mytilus californianus*. *Environmental Science and Technology* 40(17):5580-5.
- Sturtevant J (2000) Application of Differential-Display Reverse Transcription-PCR to Molecular Pathogenesis and Medical Mycology. *Clinical Microbiology Reviews* 13(3):408-427.
- Sulston JE, Hodgkin J (1988) The nematode *Caenorhabditis elegans*. Wood.W.B. (ed) Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Tawe WN, Eschbach ML, Walter RD, Henkle-Duhrsen K (1998) Identification of stress-responsive genes in *Caenorhabditis elegans* using RT-PCR differential display. *Nucleic Acids Research* 26(7):1621-7.
- The Chipping Forecast (1999) *Nature Genetics*. 21(1).
- The *C. elegans* Sequencing Consortium (1998) Genome sequence of the nematode *Caenorhabditis elegans*. A platform for investigating biology. *Science* 282:2012–2018.
- Thompson R, Stewart KM (2003) Critical Body Burden: A review of the literature and identification of experimental data requirements. CEFIC LRI. BL 7549/ B. 39 pp.
- Teodori E, Dei S, Martelli C, Scapecchi S, Gualtieri F (2006) The functions and structure of ABC transporters: implications for the design of new inhibitors of Pgp and MRP1 to control multidrug resistance (MDR). *Current Drug Targets* 7(7):893-909.
- Traunspurger W, Steinberg C, Bongers T (1995) Nematoden in der ökologischen Forschung. *UWSF-Zeitschrift für Umweltchemie und Ökotoxikologie* 7(29):74-83.
- Traunspurger W, Haitzer M, Höss S, Beier S, Ahlf W, Steinberg C (1997) Ecotoxicological assessment of aquatic sediments with *Caenorhabditis elegans* (Nematoda) - a method for testing liquid medium and whole-sediment samples. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16(2):245-250.
- Vache C, Camares O, De Graeve F, Dastugue B, Meiniel A, Vaury C, Pellier S, Leoz-Garziandia E, Bamdad M (2006) *Drosophila melanogaster* p-glycoprotein: a membrane detoxification system toward polycyclic aromatic hydrocarbon pollutants. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25(2):572-80.
- Van der Ven K, De Wit M, Keil D, Moens L, Van Leemput K, Naudts B, De Coen W (2005) Development and application of a brain-specific cDNA microarray for effect

evaluation of neuro-active pharmaceuticals in zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology* 141(4):408-17

- Van Kessel WHM, Brocades Zaalberg RW, Seinen W (1989) Testing environmental pollutants on soil organisms: a simple assay to investigate the toxicity of environmental pollutants on soil organisms, using CdCl₂ and nematodes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 18:181-190.
- Van Wezel AP, Opperhuizen A (1995) Narcosis due to environmental pollutants in aquatic organisms: residue-based toxicity, mechanisms, and membrane burdens. *Critical Reviews in Toxicology* 25(3):255-279.
- Verhaar HJM, van Leeuwen CJ, Hermens JLM (1992) Classifying environmental pollutants. *Chemosphere* 25(4):471-491.
- Vijver MG, Vink, JM Miermans CJH, Van Gestel CAM (2003) Oral sealing using glue: a new method to distinguish between intestinal and dermal uptake of metals in earthworms. *Soil Biology and Biochemistry* 35:125–132.
- Walker G, Houthoofd K, Vanfleteren JR, Gems D (2005) Dietary restriction in *C. elegans*: From rate-of-living effects to nutrient sensing pathways. *Mechanisms of Ageing and Development* 126:929–937.
- Watanabe H, Takahashi E, Nakamura Y, Oda S, Tatarazako N, Iguchi T (2007) Development of a *Daphnia magna* DNA microarray for evaluating the toxicity of environmental chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26(4):669-76.
- Xu Z, Kawai M, Bandiera SM, Chang TK (2001) Influence of dietary zinc deficiency during development on hepatic CYP2C11, CYP2C12, CYP3A2, CYP3A9, and CYP3A18 expression in postpubertal male rats. *Biochemical Pharmacology* 62(9):1283-91.

VII. ANHANG

VII.1. Gensequenzen auf deren Basis die Primer für die real-time PCR ausgewählt wurden

C. elegans actin 1

T04C12.6.1 (spliced coding region)

ATGTGTGACGACGAGGTTGCCGCTCTTGTGTAGACAATGGATCCGGAATGTGCAAGGCCGGATTCCGCCG
AGACGACGCTCCACGCGCCGTGTTCCCATCCATTGTCGGAAGACCACGTCATCAAGGAGTCATGGTCCGTA
TGGGACAGAAGGACTCGTACGTCGGAGACGAGGCCAATCCAAGAGAGGTATCCTTACCCTCAAGTACCCA
ATTGAGCAGGATATCGTCACCAACTGGGATGATATGGAGAAGATCTGGCATCACACCTTCTACAATGAGCTT
CGTGTTGCCCCAGAAGAGCACCCAGTCCCTCCTCACTGAAGCCCCACTCAATCCAAGGCTAACCGTGAAAA
GATGACCCAAATCATGTTTCGAGACCTTCAACACCCAGCCATGTATGTCGCCATCCAAGCTGTCCTCTCCCT
CTACGCTTCCGGACGTACCACCGGAGTCGTCCTCGACTCTGGAGATGGTGTACCCACACCGTCCCAATCT
ACGAAGGATATGCCCTCCACACGCCATCCTCCGTCTTGACTTGGCTGGACGTGATCTTACTGATTACCTCA
TGAAGATCCTTACCGAGCGTGTTACTCTTTACCACACCCGCTGAGCGTGAAATCGTCCGTGACATCAAGG
AGAAGCTCTGCTACGTCGCCCTCGACTTCGAGCAAGAAATGGCCACCGCCGCTTCTTCTCTTCCCTCGAGA
AGTCTACGAACTTCTGACGGACAAGTATCACCGTCGGAACGAACGTTCCGTTGCCAGAGGCTATGT
TCCAGCCATCCTTCTTGGGTATGGAGTCCGCCGGAATCCACGAGACTTCTTACAACCTCCATCATGAAGTGCG
ACATTGATATCCGTAAGGACTTGTACGCCAACACTGTTCTTTCCGGAGGAACCACCATGTACCCAGGAATTG
CTGATCGTATGCAGAAGGAAATCACCGCTCTTGCCCCATCAACCATGAAGATCAAGATCATGCCCCACCG
AGCGCAAGTACTCCGTCTGGATCGGAGGATCTATCTCGCTTCCCTCTCCACCTTCCAACAGATGTGGATCT
CCAAGCAAGAATACGACGAGTCCGCCCATCCATCGTTCACCGCAAGTGCTTCTAA

C. elegans cyp-35C1

C06B3.3 (spliced coding region)

TATTGCAAAACAATGTTTTCTATTCTACTATTTGTTCCATAATTCGTTCCCTGACTGCCCGTCAATTTCTGAAG
GCAAAAAGACTTCCACCTGGACCTTTTTCGCTCCCATTAATTGAAATGCTCATCAAGTTGGTTATCAATTGTG
GAGAACTGGAGGAGTTACAAATATGCTTAATCATTTAGAAAAGAAATGGAGACATTTTACATTGTGGTTGG
GACCAATTCCTCATGTAAATATTACAAACTAGAGCTCTCGCATGAAGTTTTGTGAAAAATTCCACAAAATATG
CCGTAAGCATGTTTCCCGATGATTGACTATGTTAGAAAAGGAAATGGAGTGTTCTTCTCGAATGGCGACAAA
TGGCAGGAATTGAGAAGATTCTCCATGTTAACGATGAGAAATATGGGAATGGGAAGAGATTTGATGGAGGAG
AAGATTCTAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAG
AGTGAAGAATTCTTTGATTAACTGTTGAAAGTATCATTAAACAATATGCTCTTAGGATTTGATTTGATGAAAG
AACAAAATCCCGATTTCTCACAAATGAAACACATGTTTGTGAAGGAATGGATAAGATGACACACTATTTTTAC
TCTTCCAGTTTGGGCTCTTCAAAGTTTCTCGCTAAAGATTTTAAATCCATTATAAAAGATCAGTTTGAATAAT
TGATTATGTGTCAGTGGATGCTATAAAAGATCAAGAGATTTTATGAATGGTACTATGAAATGATCCAAATAAC
GTTGAGGATATCGTTGATGCCTTTTTATGAAAGATGAAACAAAATCCGAAAAGTATGTTTATGATGAGAACA
TTTGAATGTTGATACTGATCTATGGATAACCGGCCAGAAAACAACGACAACAACCTCTGGTGTCTGCATTCA
TCCAATTTTGAACAATCCCAAGTATGGATACAGTTTCAAAAAGAGCTCATCAAAGTACTAACGGAGGATC
TCGCCAATTCTTTGAGAGACAAAACCTGAAACTCTTAAATGCAACAATTCGGAATTCGGAAGTACAACGACAT
GCATCCATCCTCAATATCAATTTTTGGCGGATCAATAAGAGCCAACATAATTGGAGGACATCCTGTGACTCA
GGATGTTTGAATGCTTCCCAATTGAGTGCTCTTACATAAAATGAGAAAATCTTTGAAAATCCTGAGAAATCAA
TCCAGAACGATTTATACGAAACGAAAATCTTATGCAACAACCATCCCGTTTGAATTGGAAAAGGTCTTGT
CTGGGAGAATCTTAGCAAGAGCCGAGCTGATTTAATCATTGGAACCTACTACTCCGCTATAATTTTGAAT
CTTCTGGGAAAATGCCATCCACTCGAGAAAACCGTTCCGTTTGGCTTTGCCAAGAGATGCCAAGCCTTCGACA
TGAAAGTCACTAAAATTTAA

C. elegans pgp-3

ZK455.7 (spliced coding region)

ATGAAAAAACGAAGGTAACCCAGAAGACGATATAACACTTGGCAAATTCCTCCAAAACCAAGTCTCAAG
ATTCTTATCAGGGAAACTTTTTGATGTGTTTCGAGATGCCGACTACAAAGATTACATATTATTAGTGGTGG
TTAATTTGAGTGCAGTTAATGGAGCATTGGTGCCATTCAACAGTTTAAATTTTGAAGGAATTGCGAATGCTCT
TATGGAAGGAGAATCACAGTATCAAAATGGAACAATCAACATGCCTTGGTTTCAGCTCGGAGATCAAAATGTT
TGTCTTCGATATTTTACCTTGGAGTCGCACTATTCCTTTGTTCTTATTTTGAATTTCTGTTTGTATACGTTA
TGCGAACGACGACTACATTGCATTGCAAAAGAAATATCTGAAATCTGTGCTTCGTCAAGATGCAAAATGGTTCCG
ACGAGACCACAATTGGGGGCTTGACGCAAAAATGAGCAGTGGAAATCGAAAAGATCAAAGATGGAATCGGA
GACAAAGTTGGAGTTTGGTTCGGTGGAGTTGCTACATTTATCAGTGGAGTTTCAATTGGTTTCTACATGTGTT
GGCAGTTAATTTAGTTATGATGATCACAGTGCCATTGCAACTTGGTTCGATGTATCTATCAGCGAAGCATCT

GAATCGTGCTACCAAAAATGAAATGTCCGCTTATTCAAATGCCGGTGAATGGCAAATGAAGTAATTGCTGG
 GATTAGGACTGTTATGGCATTAAATGCGCAACCGTTTTGAAATCAATAGATATGCACATCAATTAACGAGGCT
 AGAAGAATGGGTATTCGTAAGGCTATTATTCCTGCTATTTGCCACTGCTTTCCATTGATGCTCATGTTACAGTA
 TAGGCAGTTGCTATTTGGTATGGAGCCAGTTAGCCGCTGCGGGTGCAGTTTCTCGGAGCCGTTTTTCGC
 TTTTTCTGGGCTGTTTTATTGGAAGTACAGCTCTCGGAGAAGCTGCTCCACATCTCGGAGCAATTACCG
 TGCCCGTCTTGAATTCATGATATTTCAAGTTCATCGATCACGAGCCGAAATCAAATGTACATCTAGCGAA
 GGAAAGATACCCGAGAAAATCAAGGAAAGCTGACGTTTATGGCATCGAGTTCACCTATCCAACCTCGCCCA
 GAGCTGAAAATCTGAAAGGAGTCTCGTTGAAAGTAAATCCAGGTGAAACTGTTGCGCTTGTGGGCATTCT
 GGATGTGAAAATCTACAAGCATTGGACTTTTATGATGAGATTTTATAATCAGTGTGCTGGAATGATCAAACCTG
 ACGGAATCCCGATTCAAGAATAAATATTCGTTGGCTTCGTAGCACAAATGGAATTGTGCAACAAGAACCAGT
 TATTTTGTAGCGACAGTTCGCTGAAAACATCCGAATGGAGATGTTTTAATCACGGATCAAGACATCGAGAA
 GCATGTAATAATGGCAAATGCTCACGAGTTTCAATTTGCAAGCTCAGTGATAGATATGACACTGTGAATTGGTGCAG
 GTGCTGTACAATCTGAGGAGCCAGAAAACAGCGTGTAGCTATTGCCAGAGCAATTGTCAGAAAACACAAA
 TTCTACTTCTTATGATGAAGCAACTAGTGTCTGGATACTGAAAGTGAAGCGTATGGTACAGACTGCATTGGATAA
 AGCTTCAGAAGGAAGAACTACTTTGTGCATTGCTCATCGATTAAGCACAAATAAGAAATGCCAGTAAAATCTT
 GTATTCCAGCAAGGACTTATTGCGGAAAGAGGTACCCATGATGAACTAATTTCCAAGGATGATGGAATCTAC
 GCCAGTATGGTGAAGCTCAAGAAATCGAACGAGCAAAGGAAGACACTACATTAGATGATGAGGAAGACGA
 GAAAACCTACCGATCTTCCATCGAGATTCAGTGACATCCGATGAGGAGCGCGAATTGCAACAGAGTCTGGC
 AAGACTCGACTCGTCTTCTGTCAGAGTATGATCAGTACAACAACAAAGTTCTGAAATGGGAAATGAAAAT
 GCTCGTGAAGAAATGATTGAGGAAGGAGCTATGGAAGCATCGCTATTTGATATTTCAAATATGCATCTCCGG
 AGATGAGAAAACATCATAATATCTTGTGTTTACACTTATTCGTGGGTTACATGGCCAGCATTCTCAATTGTT
 TATGGTCAACTTTTTCAAATCCTTTCCGCTGGTGGTATGACGTTTCAATTAAGCACTTTTGAATTCGCTTTG
 GTTCATTTTGTAGCTTTACCCGAGGAATCAGTACCCTGATTTCTGGAAGTCTTCTTGGAAAAGCTGGTGAA
 ACAATGTCTGGTCCGCTTCGGATGGATGTTTTCAGAAACATAATGCAACAAGATGCCAGCTATTTTGACGATT
 CTAGACATAATGTGGAAGCTTGCATCTCGACTACTGATGCTCCAAACGTACAGGCTGCAATTGACC
 AACGCTTGTCTGAAGTTCTTACTGGAATAGTGTGCTGCTATTTTGTGGAGTGGGAGTTGCTTTTTACTATGGATG
 GAACATGGCACCCATCGGACTTGTACTGCGCTGCTTCTTGTGTTGTACAGAGTTCAGTTGCTCAATACCTG
 AAGTTCAGAGGACAAAGAGATATGGATTCCGCAATTGAGGCAAGTAGACTTGTCACTGAATCAATCTCAAAC
 GGAAGACTGTGCAAGCTTTACAAAACAAGAATATATGTACGATGCTTTTACTGCTGCATCAAATCACCACA
 CAGAAGAGCAATTGTCCGTGGTCTTTGGCAATCTTTATCATTCCGATTGGCCGGGAAGTTTTGTTATGTGGAAT
 TTTGCAATTGCTTATATGTTTGGTCTTTGGCTAATTTCAAACAATTTGGAGTACTCCATATACCGTGTTCAGTT
 ATCGAAGCGTGAACATGGCATCAATGAGTGTATGTTAAGTGCATCATAATTTCCCTGAATACGTTAGAGCAA
 GAATCTCTGAGCAATAAATGTTCAAAATGTTCAAACTGTGATTGATAACCGAATTGATGAGGAGA
 TACTCCAACAATCAAAGGAAACATCAACATGCGTGGAGTTTACTTTGCGTATCCCAACCGTCTGCTCAACTT
 GTGTTGGATGGATTCAACATGTCTGCTAACTTTGGTCAAACGGTTGCACCTGTTGGACCATCTGGCTGTGGAA
 AGAGTACAATCAATTAATTGAGCGGTACTACGATGCATTTGTGGTCTGTCAAAATGATGATAGTGAT
 ATTCGTGATCTTTCTGTAACAAATTTGCGTGATAACATTGCTCTTGTCCGGCAAGAACCCTCTTTTCAATTT
 AACTATAAGAGAGAATATCACATATGGATTGGAAAACATAACACAGGATCAGGTTGAAAAGCTGCGACACTT
 GCAAACATTCACACATTTGTGATGGGACTTCTGACGGTTACGATACGCTGTAGGAGCATCCGGTGGTCTG
 CTGCTGTGGTGGACAGAAACGTTGTTGCTATTGCTAGAGCGATTGTCAGAGACCCAAAGATCTTACTTCTC
 GATGAAGCCAGCTCAGCTCTTGACACAGAAAAGTGAAAAATTTGTGCAAGAAGCTCTGGATAAAGCGAGACTT
 GGAAGAATTGTGTAGTTATTGCCATCGTCTTTGACAATAACAAACGCCGACAAGATTATTGTTGTAGAA
 ACGGAAAAGCCATTGAAGAAGGAACCCATCAAACGCTACTTGTGACGGGGCTGTACTATAGATTAGTGG
 AAAACAATCATCTTAA

***C. elegans* pgp-14**

F22E10.3 (spliced coding region)

AATTTGATGTACGAATAATTAACATGGCCCTAAAGACGACCCCGATAATCGAGTTTTGACGATCAGCGT
 CGACCCACAGAGGAGTACGGTGTAGCGATACCAGCACTGGCTGTAACGACCCAAAGTCTGATCCAAA
 AATTGCGAGCGACCTACCCGCAAATTACGTAGACGATGATGATGACGCCCAAGATGTATACCCCTCGCT
 TTTGAAAAAATATTGAATACGCGTTGTGTAGAGGTGATTGCTAATCAACAACCTGAAGCTCAACCAGTGT
 TATTCCTGGATTGTTCCGATATGGAAGAAGTTTATTACCTACTCCTGTTTATTGGAACCATTTGTGCAATTAT
 CTCCGGAGTTTCCAACCTATATTGGCTCTTGTGAGTGGTTCGCGTCACTAATGCCCTTCTTGTCTATCCACAAC
 AAGTAAACAATTCGGAAACAAAGCTAACGAAAACGCTCATCTTCTTGGAAATGGTATTTTATCTCGATCAC
 TAACCTCATTAGTACATGTGCTTCCAACATTTGTCACAAGAGTGTGCTCAGATGAGACATCGATTTGTG
 TACTCTGACTTAGACAAAATGCAGATGGTTTATAAGAACCATTCTGGAACAATCACGACCAAATTGAACGA
 CAGTATGGAAAGAAATTCGTGAAGGTATCGGAGATAAGCTTGGAGTGTCTCTCAGAGGATTTGCTATGCTTAT
 CGCTGCCATCGTCTGTTTACATCTACGAGTGGAGACTCGCTTCAATGATGCTTGGAGTTGCTCCAACCTG
 TTGATTTGATGTCACCTTCTTCCGACAAATGACTTCAACTACAATCAAAGAAGTATTGGAGTTGAAAAAGC
 TGGTTCTATCGCTGAAGAGTCTCTGATGGGAGTAAAGACGGTGAAGCTTTCAACGGACAAGAGGAAATGGT
 TGGAGATCAAGAGTGAACCTGAGAAAGGAAGAAAATTCGCGGTGGAAGGGATCTGGAGTGGATCTTT
 GGAGGGCTCTTCTTCTGGCTCTTCTCCTTCTGGTGTGGTATGCTTTACGAGCTTACCTTCTCAAAGT
 CGGAATCATCCAACCTGGAGATGATTATTGATGATGCTATGCTTCTCGGTGCATATTTCTTCTGGTCT
 TCATCTCTCCACATATGATGGTGTCTTAAACCGAGTGTCTGCAGCTTCTATCTATCAAACATGATCGTGTTC
 CAAAGATTGATCCACTCAAAGGCTGGAAAACGACTTCAAACGTTGGTGAAGTGAATTCGAAAATGTTCACT
 TCCGTTACCAAGTCCGAAAGACGCAAGATTCTTAATGGCCTCAATTTAGTTGTTGAACCAGGAACGCTGTT
 GCTTTGGTGCACCTCCGGATGTGGTAAATCTACATCCGTTGGCCTTCTCACTCGTCTCTAGAGCCGAAGCTG

GAAATGTGACATTGATGGAAGCTGATGTCCGAGAGCTGAATATTGAGTGGCTCAGAAATACAGTGAATAGTTCA
 ACAAGAGCCAATTCTTTTCAACGACACTATCCAAACAATTTGTTGATTGGAAACCCCTGGATCTACTCGTAAAA
 CTATGATTGAAGTGTGCAGATGGCTAATGCTCATGATTTTCATTGAGAAAAATGCCAAAGGGATACGACACCTTA
 ATTGGGACGGTGGTGTCAACTATCAGGAGGACAAAAGCAACGTTGTTGCTATTGCTGAACCTTTATTCGTGAT
 CCAAAGGCTTACTTCTCGATGAAGCCACATCTGCTCTCGATGCTCGAGTGAAAGTATTGTACAATCAGCTTT
 GAATAACGCATCGAAAGGTAGAACAACCATCAGATTGCTCACAGACTACAACAATTCGTGAAGCTGATAAGAT
 TGTCTTCTCGAAAAAGGTGTTATTGTTGAAGCTGGAAATCAGAAGAAGTTGTGCGCCTCGGAGGAAGATACT
 TTGATTTAGTGAAGGCCCAACAACAAGGCTGATCCAGAAGCTACTGAAGAGTTTGAAGAGGAAGAAATTTGAT
 TTAGATGACACTTAGGAGTTCACGCCGTTCTTCGATGACAAGTGCACGATCTGGCTCAGAAGCATTGAGAAG
 AGGAAACTCTCTCAATGACTCTTCTCGGGATCAAAAAGATCTGCCAAGCGATGCTGAAAAATAGCGCGTTT
 GCCGTAACGAAGCTGCTATCATGGCTGAAGATGGACAGATCACAGCCGGATATCTGGACATTTTCAAGAAC
 GCAAAAGGAAACTATTTATCATGTTCCCTTGGAACTGTTTTGCTCTAATCAGAGGCTTTGAATTCCTGCTTTA
 GCACTGATTTTTCGGATGGGTTTTCGAAGGTTTACATTTGTACCTTATGGAGGAAGAATGATGCACAGAATGG
 CTATGGCTGTTATTGCATTTGCTTCCGTCGGTGTGCGAGTTTGGTTTTCTCAACTTGCTAGTTTCACTTTGTTT
 GCTGTTGTTTTCGAAAACTTATCAATGAGATTCCGCGTCCAATCATTCCGAAATCTTCTCTACCAAGATGCTTC
 AACTTCGATAATCCAGCTCATGCCCCAGGAAAGCTGATCACTCGGCTTGATCTGACGCACCAAATATCAAAA
 GCTGTGCTGGATGCTCGTATGCTTCAAGTCAATTTATGCATTTGCTGCTATTATTGCAAACATTGCGATTGCGT
 TTATCTACTGCTGGCAAATAGGAATATCGGAACATCTCTCATCTCTCTTCTTGCCTTTGTCATGATCGGGCTT
 GCTTACAAGATTTCTCTCAGAACGTCGAACAAAATCCAAAATGATGATGCAGGAAGAATTGCGATTGAAATCAT
 TGAAAATGTGAAAATATTCAACTGCTCACAAGGTGTGAGCTTTTTCTTTGATCACTACCAAACATCATCCAAGC
 AACAAAAGAGATCTGAACTGAAGAAGGGAATGATTGAAGCCATCAATTACAGTCTAACTCAATCTTTTCATGTA
 CTTTCATGATGTGTTTTACATATGCTGTTGGTATCAGAATTATTTATCAAGGAGACAAATCTTCCGATGACACTT
 TCAAGGGAATCATTGCAATGATGTTGGGTGCCGTTGCAGTCATGAATTCGGCACAATACTTCCCAGAATTTTA
 AAGGCTAAAATGCAGCTGGAATGTTGTTCAACATATCTACAGAAAACCTGAACAGGAGACTTAATGGAAGG
 AGATCGCCCTGAAATTAGAGAAACATTCTCTTTGAAAATGTCAAATCTCGTATCCACAACGACCATTGCAAC
 CAATTATGAAAGGACTTCAATGGACACACTTCGCGGACAAACTGTTGCTCTTGTGCGGCCATCCGGATCCGG
 TAAAAGTACGAACATTGGTATGCTCGAACGATTTACGATGTTACTGGCGGAGCACTTTCGAATTGATGGACAA
 GACATTCGAAAATTGCTACTGTTCCATCTCAGAACACAAATGGCGCTGGTCCGGCCAGAGCCTCGTCTTTTCG
 CAGGAACCATCCGCGAGAACGTGTGCCTTGGGTTGAAGGATGTGCCACTTGAAAAGATCAATCAAGCCTTAG
 AACTTGCCAATGCTAACAGATTCCTTGCCAACCTGCCAGCCGGAATTGACACAGATGTAGAGAAAAAGGAGG
 ACAATTGTCGGGAGGTGAGAAACAGAGAATTGCAATTGCCAGAGCTTTGGTCCGAGACCCCCAAAATTTCTGCT
 TCTGGAGAAGCCACGTCAGCTTTGGATTCCGAAATCCGAAAGGGCTGTACAAGAGGCATTAGATCGTGCCCG
 AGAAGGTCGATCGTATCACAATTGCCATCGTTTGTGCTCCATTGAGAACTCTGACCTTATTGTGTACATC
 GATAAGGGCAAGGTGAGGAAGCTGGCAACCACAGCAGTTGATGCATCAAAAAGGGCAGATACTACAAGCT
 CATCAAGAAACAAGATCTTGTGTTAACTCTGCAATTGCCTTTCAATTCCGAATTATCTGTAAATTTTGATC
 ACTTCCACACTCTTACAGTAATTACTTGTCCCTTTGAACTGTTTTTATTGTGACTTTTCATTGCTTTGTTTTT
 CATTCTCAAAAAATTTTTCCGTCATTTGAAAATGTTCCACGTTGTTTTGAAGCAGTTTTTCTATTAACCGGG
 TCTGTTACATTGCTACTTTTATTTTCAGTAGGTACTCATTAGCTAGTCGCTTTTTTCAATTTTGAATAAAAAAA
 TGAAGAATT

VII.2. Statistische Auswertung

Mehrfaktorielle Anova für die Reproduktion von *C. elegans* unter dem Einfluss der Faktoren Futter (*E.coli*) und Fluoranthen bei einer Inkubation für 4, 6, 8, 16 und 24 Stunden.

4 Stunden Inkubation

Effekt	Univariate Signifikanztests für 4h (24hAnovaReproduktion.sta) Sigmabeschränkte Parametrisierung Typ VI Dekomposition (Effektive Hypothese)				
	SQ	Freih.-grad	MQ	F	p
Konstante	103941,5	1	103941,5	2348,054	0,000000
flu	2,4	1	2,4	0,054	0,821274
<i>E.coli</i>	1037,2	1	1037,2	23,431	0,001287
flu* <i>E.coli</i>	154,1	1	154,1	3,482	0,099007
Fehler	354,1	8	44,3		

6 Stunden Inkubation

Univariate Signifikanztests für 6h (24hAnovaReproduktion.sta) Sigmabeschränkte Parametrisierung Typ VI Dekomposition (Effektive Hypothese)					
Effekt	SQ	Freih.- grad	MQ	F	p
Konstante	76410,27	1	76410,27	3884,018	0,000000
flu	462,55	1	462,55	23,512	0,001274
<i>E.coli</i>	5579,30	1	5579,30	283,602	0,000000
flu* <i>E.coli</i>	46,82	1	46,82	2,380	0,161494
Fehler	157,38	8	19,67		

8 Stunden Inkubation

Univariate Signifikanztests für 8h (24hAnovaReproduktion.sta) Sigmabeschränkte Parametrisierung Typ VI Dekomposition (Effektive Hypothese)					
Effekt	SQ	Freih.- grad	MQ	F	p
Konstante	31652,71	1	31652,71	717,7194	0,000000
flu	1150,85	1	1150,85	26,0953	0,000920
<i>E.coli</i>	28,88	1	28,88	0,6549	0,441772
flu* <i>E.coli</i>	12,08	1	12,08	0,2739	0,614932
Fehler	352,81	8	44,10		

16 Stunden Inkubation

Univariate Signifikanztests für 16h (24hAnovaReproduktion.sta) Sigmabeschränkte Parametrisierung Typ VI Dekomposition (Effektive Hypothese)					
Effekt	SQ	Freih.- grad	MQ	F	p
Konstante	5569,760	1	5569,760	934,1262	0,000000
flu	466,721	1	466,721	78,2756	0,000021
<i>E.coli</i>	751,923	1	751,923	126,1080	0,000004
flu* <i>E.coli</i>	126,164	1	126,164	21,1594	0,001756
Fehler	47,700	8	5,963		

24 Stunden Inkubation

Univariate Signifikanztests für 24h (24hAnovaReproduktion.sta) Sigmabeschränkte Parametrisierung Typ VI Dekomposition (Effektive Hypothese)					
Effekt	SQ	Freih.- grad	MQ	F	p
Konstante	3953,666	1	3953,666	708,1491	0,000000
flu	568,483	1	568,483	101,8222	0,000008
<i>E.coli</i>	326,450	1	326,450	58,4711	0,000060
flu* <i>E.coli</i>	83,156	1	83,156	14,8943	0,004814
Fehler	44,665	8	5,583		

ANHANG

t-Test Nematodentest nach 4-24h Stunden Vorinkubation in Fluoranthen mit und ohne *E. coli*

Effekt auf die Reproduktion

		t-Test für unabh. Stichproben (Reproduktion TTest 3 Replikate)										
		Hinweis: Variablen sind unabhängige Stichproben										
Gruppe1 - Gruppe2		Mittelw. Gruppe1	Mittelw. Gruppe2	t-Wert	FG	p	Gült. N Gruppe1	Gült. N Gruppe2	Stdabw. Gruppe1	Stdabw. Gruppe2	F-Quot. Varianzen	p Varianzen
4h Kontrolle ohne vs. 4h Flu ohne E.coli		98,33333	106,3981	-1,53566	4	0,199422	3	3	5,654552	7,125113	1,587768	0,772867
		t-Test für unabh. Stichproben (Reproduktion TTest 3 Replikate)										
		Hinweis: Variablen sind unabhängige Stichproben										
Gruppe1 - Gruppe2		Mittelw. Gruppe1	Mittelw. Gruppe2	t-Wert	FG	p	Gült. N Gruppe1	Gült. N Gruppe2	Stdabw. Gruppe1	Stdabw. Gruppe2	F-Quot. Varianzen	p Varianzen
4h Kontrolle mit vs. 4h Flu mit		86,90741	80,63611	1,118406	4	0,326023	3	3	6,352878	7,346297	1,337199	0,855725
		t-Test für unabh. Stichproben (Reproduktion TTest 3 Replikate)										
		Hinweis: Variablen sind unabhängige Stichproben										
Gruppe1 - Gruppe2		Mittelw. Gruppe1	Mittelw. Gruppe2	t-Wert	FG	p	Gült. N Gruppe1	Gült. N Gruppe2	Stdabw. Gruppe1	Stdabw. Gruppe2	F-Quot. Varianzen	p Varianzen
6h Kontrolle ohne vs. 6h Flu ohne		105,5926	97,12593	1,721331	4	0,160300	3	3	1,619074	8,364131	26,68754	0,072235
		t-Test für unabh. Stichproben (Reproduktion TTest 3 Replikate)										
		Hinweis: Variablen sind unabhängige Stichproben										
Gruppe1 - Gruppe2		Mittelw. Gruppe1	Mittelw. Gruppe2	t-Wert	FG	p	Gült. N Gruppe1	Gült. N Gruppe2	Stdabw. Gruppe1	Stdabw. Gruppe2	F-Quot. Varianzen	p Varianzen
6h Kontrolle mit vs. 6h Flu mit		66,41795	50,05057	11,46703	4	0,000330	3	3	1,569237	1,910343	1,481991	0,805805
		t-Test für unabh. Stichproben (Reproduktion TTest 3 Replikate)										
		Hinweis: Variablen sind unabhängige Stichproben										
Gruppe1 - Gruppe2		Mittelw. Gruppe1	Mittelw. Gruppe2	t-Wert	FG	p	Gült. N Gruppe1	Gült. N Gruppe2	Stdabw. Gruppe1	Stdabw. Gruppe2	F-Quot. Varianzen	p Varianzen
8h Kontrolle mit vs. 8h Flu mit		60,60370	39,01110	4,812188	4	0,008572	3	3	6,350915	4,479638	2,009956	0,664461
		t-Test für unabh. Stichproben (Reproduktion TTest 3 Replikate)										
		Hinweis: Variablen sind unabhängige Stichproben										
Gruppe1 - Gruppe2		Mittelw. Gruppe1	Mittelw. Gruppe2	t-Wert	FG	p	Gült. N Gruppe1	Gült. N Gruppe2	Stdabw. Gruppe1	Stdabw. Gruppe2	F-Quot. Varianzen	p Varianzen
8h Kontrolle ohne vs. 8h Flu ohne		61,70000	44,12037	2,827030	4	0,047488	3	3	6,609085	8,504462	1,655812	0,753065

ANHANG

		t-Test für unabh. Stichproben (Reproduktion TTest 3 Replikate) Hinweis: Variablen sind unabhängige Stichproben									
Gruppe1 - Gruppe2	Mittelw. Gruppe1	Mittelw. Gruppe2	t-Wert	FG	p	Gült. N Gruppe1	Gült. N Gruppe2	Stdabw. Gruppe1	Stdabw. Gruppe2	F-Quot. Varianzen	p Varianzen
16h Kontrolle ohne vs. 16h flu ohne	16,62222	10,63426	7,453503	4	0,001731	3	3	0,712152	1,195440	2,817800	0,523862
		t-Test für unabh. Stichproben (Reproduktion TTest 3 Replikate) Hinweis: Variablen sind unabhängige Stichproben									
Gruppe1 - Gruppe2	Mittelw. Gruppe1	Mittelw. Gruppe2	t-Wert	FG	p	Gült. N Gruppe1	Gült. N Gruppe2	Stdabw. Gruppe1	Stdabw. Gruppe2	F-Quot. Varianzen	p Varianzen
16h Kontrolle mit vs. 16h Flu mit	38,93882	19,98095	7,014396	4	0,002175	3	3	2,042048	4,212356	4,255186	0,380576
		t-Test für unabh. Stichproben (Reproduktion TTest 3 Replikate) Hinweis: Variablen sind unabhängige Stichproben									
Gruppe1 - Gruppe2	Mittelw. Gruppe1	Mittelw. Gruppe2	t-Wert	FG	p	Gült. N Gruppe1	Gült. N Gruppe2	Stdabw. Gruppe1	Stdabw. Gruppe2	F-Quot. Varianzen	p Varianzen
24h Kontrolle ohne vs. 24h Flu ohne	17,18603	8,685185	8,342608	4	0,001128	3	3	0,379766	1,723560	20,59780	0,092602
		t-Test für unabh. Stichproben (Reproduktion TTest 3 Replikate) Hinweis: Variablen sind unabhängige Stichproben									
Gruppe1 - Gruppe2	Mittelw. Gruppe1	Mittelw. Gruppe2	t-Wert	FG	p	Gült. N Gruppe1	Gült. N Gruppe2	Stdabw. Gruppe1	Stdabw. Gruppe2	F-Quot. Varianzen	p Varianzen
24h Kontrolle mit vs. 24h Flu mit	32,88241	13,85185	7,519059	4	0,001675	3	3	4,078376	1,607595	6,436076	0,268959

t-Test Nematodentest nach 6 Stunden Vorbehandlung in Fluoranthen-Konzentrationsreihe

Effekte auf die Reproduktion

		t-Test für unabh. Stichproben (Tabelle1) Hinweis: Variablen sind unabhängige Stichproben									
Gruppe1 - Gruppe2	Mittelw. Gruppe1	Mittelw. Gruppe2	t-Wert	FG	p	Gült. N Gruppe1	Gült. N Gruppe2	Stdabw. Gruppe1	Stdabw. Gruppe2	F-Quot. Varianzen	p Varianzen
Kontrolle1 vs. 0,1	81,78148	72,43636	1,975462	4	0,119420	3	3	7,909366	2,139533	13,66612	0,136369
Kontrolle1 vs. 5mg	81,78148	70,16667	2,415539	4	0,073115	3	3	7,909366	2,608320	9,19521	0,196171
Kontrolle1 vs. 10mg	81,78148	67,73704	2,066776	4	0,107623	3	3	7,909366	8,716186	1,21442	0,903170
Kontrolle1 vs. 15mg	81,78148	66,65648	3,164830	4	0,034026	3	3	7,909366	2,441508	10,49463	0,173994

ANHANG

		t-Test für unabh. Stichproben (Tabelle1)									
		Hinweis: Variablen sind unabhängige Stichproben									
Gruppe1 - Gruppe2	Mittelw. Gruppe1	Mittelw. Gruppe2	t-Wert	FG	p	Gült. N Gruppe1	Gült. N Gruppe2	Stdabw. Gruppe1	Stdabw. Gruppe2	F-Quot. Varianzen	p Varianzen
kontr2 vs. 0,9	105,5926	98,76667	1,04433	4	0,355288	3	3	1,619074	11,20461	47,89173	0,040907
kontr2 vs. 2,5	105,5926	85,81481	12,08884	4	0,000269	3	3	1,619074	2,32560	2,06319	0,652915

t-Test für die rel. Genexpression (*cyp-35C1*) für die Konzentrationsreihe nach 6h Fluoranthen

		t-Test für unabh. Stichproben (CYPKonzentrationsreihe)									
		Hinweis: Variablen sind unabhängige Stichproben									
Gruppe1 - Gruppe2	Mittelw. Gruppe1	Mittelw. Gruppe2	t-Wert	FG	p	Gült. N Gruppe1	Gült. N Gruppe2	Stdabw. Gruppe1	Stdabw. Gruppe2	F-Quot. Varianzen	p Varianzen
0,01mg/L vs. 0,1mg/L	2,029895	19,22645	-17,4996	4	0,000063	3	3	0,592448	1,595622	7,253687	0,242316
Gruppe1 - Gruppe2	Mittelw. Gruppe1	Mittelw. Gruppe2	t-Wert	FG	p	Gült. N Gruppe1	Gült. N Gruppe2	Stdabw. Gruppe1	Stdabw. Gruppe2	F-Quot. Varianzen	p Varianzen
0,1mg/L vs. 0,9mg/L	19,22645	236,0713	-20,0853	4	0,000036	3	3	1,595622	18,63137	136,3421	0,014562
Gruppe1 - Gruppe2	Mittelw. Gruppe1	Mittelw. Gruppe2	t-Wert	FG	p	Gült. N Gruppe1	Gült. N Gruppe2	Stdabw. Gruppe1	Stdabw. Gruppe2	F-Quot. Varianzen	p Varianzen
0,9mg/L vs. 2,5mg/L	236,0713	730,6540	-6,55269	4	0,002805	3	3	18,63137	129,3970	48,23463	0,040622
Gruppe1 - Gruppe2	Mittelw. Gruppe1	Mittelw. Gruppe2	t-Wert	FG	p	Gült. N Gruppe1	Gült. N Gruppe2	Stdabw. Gruppe1	Stdabw. Gruppe2	F-Quot. Varianzen	p Varianzen
2,5mg/L vs. 5mg/L	730,6540	866,5570	-1,21608	4	0,290809	3	3	129,3970	143,9580	1,237721	0,893766

ANHANG

		t-Test für unabh. Stichproben (CYPKonzentrationsreihe) Hinweis: Variablen sind unabhängige Stichproben									
Gruppe1 - Gruppe2	Mittelw. Gruppe1	Mittelw. Gruppe2	t-Wert	FG	p	Gült. N Gruppe1	Gült. N Gruppe2	Stdabw. Gruppe1	Stdabw. Gruppe2	F-Quot. Varianzen	p Varianzen
5mg/L vs. 10mg/L	866,5570	1290,461	-4,96141	4	0,007698	3	3	143,9580	34,29611	17,61901	0,107417
		t-Test für unabh. Stichproben (CYPKonzentrationsreihe.sta) Hinweis: Variablen sind unabhängige Stichproben									
Gruppe1 - Gruppe2	Mittelw. Gruppe1	Mittelw. Gruppe2	t-Wert	FG	p	Gült. N Gruppe1	Gült. N Gruppe2	Stdabw. Gruppe1	Stdabw. Gruppe2	F-Quot. Varianzen	p Varianzen
10mg/L vs. 15mg/L	1290,461	895,0299	7,638517	3	0,004659	3	2	34,29611	85,41264	6,202325	0,260843

t-Test für die rel. Genexpression für die Fluorantheninkubation zwischen 4 und 24 h mit und ohne *E. coli* (t-Test)

		t-Test für unabh. Stichproben (CYPTTest4-24h.sta) Hinweis: Variablen sind unabhängige Stichproben									
Gruppe1 - Gruppe2	Mittelw. Gruppe1	Mittelw. Gruppe2	t-Wert	FG	p	Gült. N Gruppe1	Gült. N Gruppe2	Stdabw. Gruppe1	Stdabw. Gruppe2	F-Quot. Varianzen	p Varianzen
CYP 4h ohne E.coli vs. CYP4h mit E.coli	10,3570	93,3304	-5,1885	4	0,006568	3	3	2,76729	27,55985	99,2	
CYP 4h ohne E.coli vs. Cyp 6h mit E.coli	10,3570	513,9676	-24,7175	4	0,000016	3	3	2,76729	35,18129	161,6	
CYP 4h ohne E.coli vs. Cyp8h mit E.coli	10,3570	209,7681	-20,5723	3	0,000251	3	2	2,76729	17,97033	42,2	
CYP 4h ohne E.coli vs. Cyp24h mit E.coli	10,3570	1,8832	5,2999	4	0,006088	3	3	2,76729	0,10576	684,7	
cyp6h ohne E.coli vs. CYP4h mit E.coli	403,5819	93,3304	5,6803	4	0,004741	3	3	90,49941	27,55985	10,8	
cyp6h ohne E.coli vs. Cyp 6h mit E.coli	403,5819	513,9676	-1,9691	4	0,120294	3	3	90,49941	35,18129	6,6	
cyp6h ohne E.coli vs. Cyp8h mit E.coli	403,5819	209,7681	2,8453	3	0,065358	3	2	90,49941	17,97033	25,4	
cyp6h ohne E.coli vs. Cyp24h mit E.coli	403,5819	1,8832	7,6880	4	0,001540	3	3	90,49941	0,10576	732288,5	
Cyp8h ohne E.coli vs. CYP4h mit E.coli	142,3065	93,3304	2,4820	4	0,068067	3	3	20,21381	27,55985	1,9	
Cyp8h ohne E.coli vs. Cyp 6h mit E.coli	142,3065	513,9676	-15,8654	4	0,000092	3	3	20,21381	35,18129	3,0	
Cyp8h ohne E.coli vs. Cyp8h mit E.coli	142,3065	209,7681	-3,7908	3	0,032205	3	2	20,21381	17,97033	1,3	
Cyp8h ohne E.coli vs. Cyp24h mit E.coli	142,3065	1,8832	12,0322	4	0,000274	3	3	20,21381	0,10576	36533,2	
Cyp24h ohne E.coli vs. CYP4h mit E.coli	2,6304	93,3304	-5,6989	4	0,004685	3	3	0,58947	27,55985	2185,9	

ANHANG

t-Test für unabh. Stichproben (pgp3TTest4-24h.sta) Hinweis: Variablen sind unabhängige Stichproben											
Gruppe1 - Gruppe2	Mittelw. Gruppe1	Mittelw. Gruppe2	t-Wert	FG	p	Gült. N Gruppe1	Gült. N Gruppe2	Stdabw. Gruppe1	Stdabw. Gruppe2	F-Quot. Varianzen	p Varianzen
pgp3 4h ohne E.coli vs. pgp34h mit E.coli	1,628641	2,854501	-2,65531	4	0,056667	3	3	0,290888	0,744838	6,55651	0,264672
pgp3 4h ohne E.coli vs. pgp36h mit E.coli	1,628641	5,439914	-7,13331	4	0,002042	3	3	0,290888	0,878515	9,12110	0,197607
pgp3 4h ohne E.coli vs. pgp38h mit E.coli	1,628641	3,172553	-5,97743	4	0,003937	3	3	0,290888	0,339891	1,36530	0,845560
pgp3 4h ohne E.coli vs. pgp324h mit E.coli	1,628641	3,393970	-5,36767	4	0,005816	3	3	0,290888	0,489770	2,83487	0,521530
pgp36h ohne E.coli vs. pgp34h mit E.coli	4,147692	2,854501	2,32188	4	0,080969	3	3	0,613045	0,744838	1,47618	0,807696
pgp36h ohne E.coli vs. pgp36h mit E.coli	4,147692	5,439914	-2,08930	4	0,104914	3	3	0,613045	0,878515	2,05359	0,654967
pgp36h ohne E.coli vs. pgp38h mit E.coli	4,147692	3,172553	2,40953	4	0,073592	3	3	0,613045	0,339891	3,25317	0,470238
pgp36h ohne E.coli vs. pgp324h mit E.coli	4,147692	3,393970	1,66375	4	0,171495	3	3	0,613045	0,489770	1,56675	0,779195
pgp38h ohne E.coli vs. pgp34h mit E.coli	3,507811	2,854501	1,35104	4	0,248045	3	3	0,383025	0,744838	3,78154	0,418275
pgp38h ohne E.coli vs. pgp36h mit E.coli	3,507811	5,439914	-3,49182	4	0,025081	3	3	0,383025	0,878515	5,26070	0,319453
pgp38h ohne E.coli vs. pgp38h mit E.coli	3,507811	3,172553	1,13395	4	0,320165	3	3	0,383025	0,339891	1,26992	0,881088
pgp38h ohne E.coli vs. pgp324h mit E.coli	3,507811	3,393970	0,31713	4	0,767008	3	3	0,383025	0,489770	1,63504	0,759001
pgp324h ohne E.coli vs. pgp34h mit E.coli	5,227454	2,854501	1,36868	4	0,242928	3	3	2,909098	0,744838	15,25434	0,123044
pgp324h ohne E.coli vs. pgp36h mit E.coli	5,227454	5,439914	-0,12110	4	0,909455	3	3	2,909098	0,878515	10,96525	0,167151
pgp324h ohne E.coli vs. pgp38h mit E.coli	5,227454	3,172553	1,21520	4	0,291109	3	3	2,909098	0,339891	73,25524	0,026934
pgp324h ohne E.coli vs. pgp324h mit E.coli	5,227454	3,393970	1,07649	4	0,342304	3	3	2,909098	0,489770	35,28034	0,055126

ANETT MATTHÄI

-LEBENS LAUF-

GEBOREN am 07.10.1977 in KÖLN

SCHULAU SBILDUNG

1984-88 städt.-kath. Grundschule Köln Dellbrück
1988-97 Hölderlin Gymnasium, Köln (Abiturnote 2,3)

STUDIUM/ PROMOTION

10/1997-03/2004 Diplom-Biologie an Universität zu Köln (Diplomnote: Sehr gut)
07/2003-03/04 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung
(Thema: Posttranslational modification of regulatory proteins by
the peptides Ubiquitin and SUMO)
seit 12/2004 Promotion an der Technischen Universität Hamburg Harburg
(TUHH) (Thema: Zur Bedeutung der Schadstoffexposition auf die
Genexpression und Reproduktion von *Caenorhabditis elegans*)
20.02.2009 Tag der mündlichen Prüfung

BERUFLICHER WERDEGANG

08/2004-07/2006 wissenschaftliche Mitarbeiterin in dem BMBF Verbundprojekt
SEDYMO (Sediment Dynamics and Mobility) an der TUHH in der
Abteilung Umwelttechnik und Energiewirtschaft
08/2006-01/2007 Mitarbeiterin im Beratungszentrum für integriertes Sediment-
management (BIS) der TUHH
06/2008-heute Angestellte in der Textilabteilung des Institut für Marktökologie
(IMO)