

Studienjahresarbeit

**Gelöste Huminstoffe können die Lebensspanne
von *Caenorhabditis elegans* verlängern und
seine Genexpression beeinflussen**

Waltraud Wild
198205
Biologie/Dipl.
Humboldt Universität zu Berlin

Institut für Biologie der Humboldt-Universität zu Berlin
AG Gewässerökologie

Betreuer: Nadine Saul, Kerstin Pietsch, Dr. Ralph Menzel

Prof. Dr. Christian E. W. Steinberg

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

- 1.1. *Caenorhabditis elegans* als Modellorganismus zur Untersuchung von Alterung und Langlebigkeit
- 1.2. Chemische Struktur und ökologische Relevanz von Huminstoffen
- 1.3. Ziel der Studie
 - 1.3.1. Lebensdauererprobung mit *C. elegans* unter Huminstoffeinfluss
 - 1.3.2. Genexpressionsstudie

2. Material und Methoden

- 2.1. Kultivierung von *Escherichia coli*
- 2.2. Kultivierung von *Caenorhabditis elegans*
- 2.3. Charakteristika der Huminstoffe
- 2.4. Lebensdauererprobung
- 2.5. Genexpressionsstudie
 - 2.5.1. Expositionsszenario
 - 2.5.2. Extraktion der Roh-RNA
 - 2.5.3. cDNA Synthese
 - 2.5.4. Quantitative RealTime-PCR
 - 2.5.5. Statistische Auswertung

3. Ergebnisse

- 3.1. Lebensdauererprobung
- 3.2. Genexpressionsstudie
 - 3.2.1. RNA-Gehalt
 - 3.2.2. Normalisierung der cDNA anhand des β -Actingens *act-1*
 - 3.2.3. Expressionsmuster der ausgewählten Gene

4. Diskussion

- 4.1. Lebensdauererprobung
- 4.2. Genexpressionsstudie
- 4.3. Ausblick

5. Zusammenfassung

6. Quellen

7. Anhang

8. Danksagung

9. Erklärung

1. Einleitung

1.1. *Caenorhabditis elegans* als Modellorganismus zur Untersuchung von Alterung und Langlebigkeit

Caenorhabditis elegans ist ein etwa 1 mm langer, terrestrisch lebender Nematode, der eine kosmopolitische Verbreitung aufweist und sich insbesondere von Bakterien ernährt. Der anatomisch einfach strukturierte Körperbau eines Adulten (Abb. 1) umfasst 969 somatische Zellen, deren Anzahl bei jedem Individuum konstant sind. Es existieren zwei Geschlechter: sich selbst-befruchtende Hermaphroditen (XX) und Männchen (X0), die mit einer geringen Wahrscheinlichkeit von 0,1 % auftreten. Ein Hermaphrodit kann innerhalb seiner rund dreiwöchigen Lebensdauer bis zu 300 befruchtete Eier legen, die innerhalb weniger Stunden schlüpfen und sich über 4 Larvalstadien bis zum ausgewachsenen Adulten entwickeln. Unter Optimalbedingungen beginnt die Reproduktion im Alter von 3 Tagen.

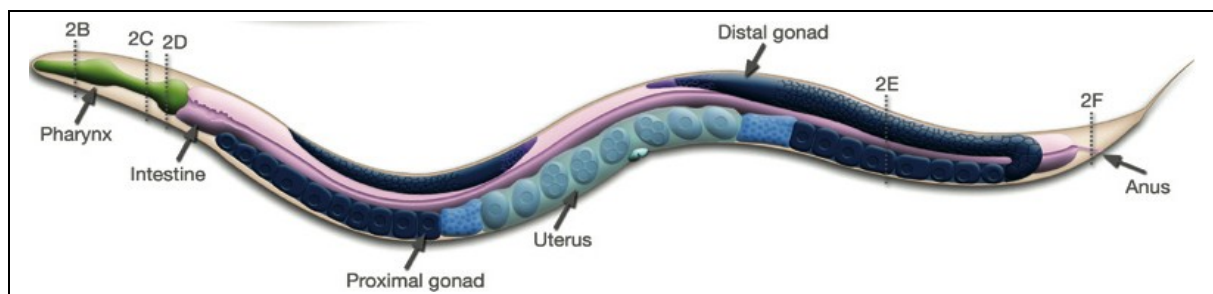


Abb.1: Körperbau eines adulten Hermaphroditen (<http://www.wormatlas.org/handbook/anatomyintro/anatomyintro.htm>)

Sind die Umweltbedingungen suboptimal, wie bei Hungerstress, Hitze oder einer zu hohen Populationsdichte, wird im Laufe des L2 Stadiums ein alternatives Stadium eingelenkt, das Dauerlarvenstadium, in welchem *C. elegans* bis zu 4 Monate verweilen kann. Das Dauerlarvenstadium kennzeichnet eine hohe Stressresistenz. In der biologischen Forschung ist *C. elegans* zu einem bedeutenden Modellorganismus avanciert, besonders in den Teilbereichen wie Genetik, Zellbiologie, Neurowissenschaften und der Altersforschung. Diesen Status haben ihm Eigenschaften eingebracht wie ein kurzer Lebenszyklus, ein kompaktes entschlüsseltes Genom, seine stereotypische Entwicklung, eine einfache Fortpflanzung, vielfältige Techniken zur Veränderung der Genexpression und seine geringe Größe.

Die Erforschung des Altersprozesses wurde in *C. elegans* in den letzten Jahren intensiv betrieben und es liegen mittlerweile vielfältige Kenntnisse über die genetischen Mechanismen des Alterns und der Lebensverlängerung vor. Der Hauptteil der bisher ermittelten Gene, die an der Verlängerung der Lebensspanne maßgeblich beteiligt sind, werden über den Insulin/ IGF-1 Signalweg vermittelt (Braeckman & Vanfleteren, 2006). Dieser reguliert Stressresistenz und Langlebigkeit und das Einlenken ins Dauerlarvenstadium. So können Umwelteinflüsse, wie zum Beispiel das Nahrungsangebot, als Signalwirkung zur Freisetzung von Insulin/ IGF ähnlichen Peptiden führen, die durch Bindung an den Insulin/ IGF ähnlichen Rezeptor DAF-2 eine Signalkaskade auslösen (Kenyon et al., 1993; Kimura et al., 1997). Einen schematischen Überblick bezüglich der am Altersprozess beteiligten Gene und ihren Wechselwirkungen veranschaulicht Abbildung 2.

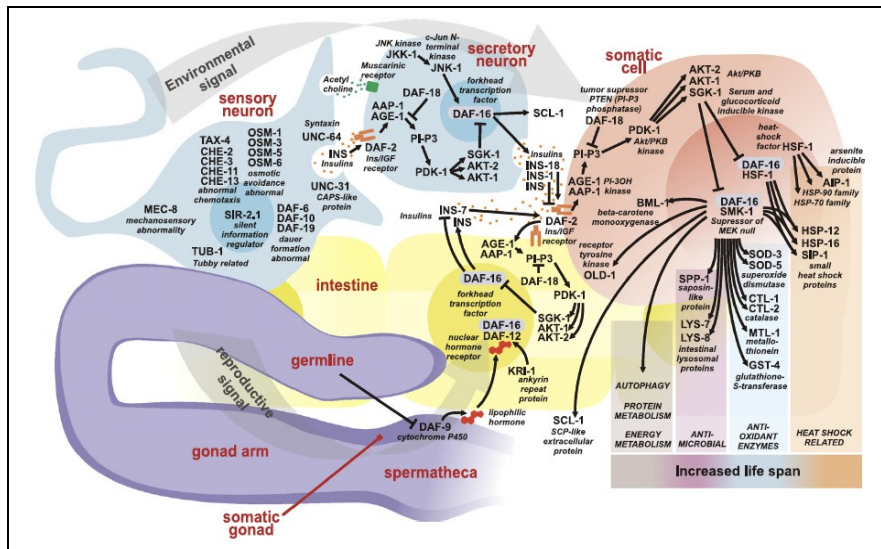


Abb.2: Darstellung der Wechselwirkung zwischen Genen, welche über Inhibition oder Aktivierung von DAF-16 die Lebensspanne von *C. elegans* beeinflussen (Braeckman & Vanfleteren, 2006).

Am Ende der Signalkaskade steht DAF-16, ein Transkriptionsfaktor, der zwischen Cytoplasma und Zellkern agiert. Durch die Signalwirkung über den Insulin/ IGF-1 Signalweg, ausgelöst durch den DAF-2 Rezeptor, wird DAF-16 inhibiert und aus dem Zellkern geschleust. Verschiedenste Umwelteinflüsse oder Mutationen können den Insulin/ IGF-1 Signalweg inhibieren und dazu führen, dass durch Phosphorylierung aktiviertes DAF-16 in den Zellkern gelangt und dort die Genexpression vieler Gene, die für Prozesse wie Stressresistenz, Entwicklung und Metabolismus wichtig sind, reguliert werden. DNA-Microarray Analysen ergaben, dass DAF-16 für die Hochregulation einer Reihe von Genen der zellulären Antwort auf Stress wichtig ist, wie zum Beispiel für die mitochondriale Superoxiddismutase *sod-3* (Honda & Honda, 1999), Metallothionein *mtl-1* (Barysytte et al., 2001), die cytosolische und peroxisomale Katalase *ctl-1*, *ctl-2* (Murphy et al., 2003), die Glutathion-S-Transferase *gst-4* (Murphy et al., 2003) und Hitzeschockproteine wie HSP-16, HSP-70, HSP-90 (McElwee et al., 2003). Schon in der "Freien Radikaltheorie" von Harmann (1956) wurde angenommen, dass Seneszenz an eine unzureichend wirksame antioxidative Schutzantwort gekoppelt ist. Die altersabhängige Akkumulation von Schäden durch Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die unter anderem bei der zellulären Atmung entstehen, sollen wie eine Sanduhr die maximale Lebensdauer bestimmen.

Die „Grüne Theorie“ des Alterns besagt, dass durch das Trainieren des Biotransformationssystems und der antioxidativen Schutzantwort eine Lebensverlängerung bewirkt werden kann (Gems & McElwee, 2005). So kann möglicherweise durch die induzierte Expression von Genen, die eine wichtige Rolle im Detoxifizierungssystem spielen, der Alterungsprozess verlangsamt werden.

So könnte laut Steinberg et al. (2008) milder chemischer Stress dazu führen, dass das chemische Schutzsystem (Biotransformation, Stressproteine, antioxidative Enzyme) trainiert wird und damit eine Lebensverlängerung einhergeht. Ebenfalls könne durch Einführen von mildem chemischen Stress eine multiple Stressresistenz hervorgebracht werden.

Neben diesen Theorien kommt der Reduktion der Kalorienaufnahme, bzw. Caloric Restriction (CR) eine große Bedeutung als lebensverlängernde Maßnahme zu. Lange Zeit wurde angenommen, dass CR zu einer verlangsamten Metabolismusrate, damit zu einer Herabsetzung der ROS Produktion und dies schließlich zu einer ver-

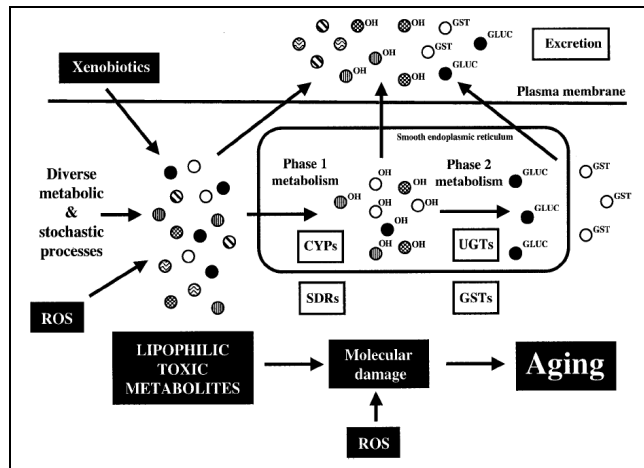


Abb.3: Der "Grünen Theorie" des Alterns zufolge führen Fremdstoffe, ROS und andere metabolische Prozesse zur Anhäufung von toxischen Metaboliten, die durch Enzyme des Biotransformationssystems, zum einen modifiziert und entgiftet werden (CYPs, SDRs) und andererseits über Konjugation zur besseren Ausscheidung wasserlöslich gemacht werden (UGTs, GSTs). Durch Trainieren des Biotransformationssystems kann dem Altersprozess entgegengewirkt werden (Gems & McElwee, 2005).

längerten Lebensspanne in *C. elegans* führe (Labowski & Hekimi, 1998). Diese Annahme wurde durch nachfolgende Studien teilweise widerlegt. Jedoch konnte von Houthoofd et al. (2002, a, b) gezeigt werden, dass CR immerhin zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Hitze und ROS führt, was eine Lebensverlängerung bewirken kann. Den Effekt der Lebensverlängerung über Caloric Restriction können unter anderem Sirtuine vermitteln. Das sind NAD⁺ abhängige Histon Deacetylasen, die das Silencing der Transkription bewirken. Diese Gengruppe kann durch Sirtuin aktivierende Substanzen (STAC's) wie Quercetin induziert werden und damit zu einer Verlängerung der Lebensspanne in *C. elegans* führen (Pietsch et al., 2007).

1.2. Chemische Struktur und ökologische Relevanz von Huminstoffen

Huminstoffe oder auch gelöste organische Materie (DOM = dissolved organic matter) sind natürliche organische Polymere mit komplexer hochmolekular heterogener Struktur, die bei mikrobieller und chemischer Umwandlung von sowohl Pflanzen- als auch Mikroorganismenrückständen entstehen. Sie sind wichtige Zwischenstufen der Mineralisierung organischer Substanz im Boden. In der aquatischen sowie terrestrischen Umwelt stellen sie ein bedeutsames Reservoir für organischen Kohlenstoff dar. So sind Huminstoffe eine reichhaltige Quelle für NOM (Natural organic matter = Organische Substanz). Bis zu 80 % des gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC) kann in Oberflächengewässern Huminstoffen zugerechnet werden. Huminstoffe sind dafür bekannt, dass sie viele funktionelle Gruppen enthalten, wie zum Beispiel aromatische und aliphatische Gruppen, Carboxyl-, Keton- und Phenolgruppen. Aufgrund ihrer hohen spezifischen Oberfläche, ihrer vielfältigen funktionellen Gruppen und in ihrer Eigenschaft als Träger einer großen Anzahl an Donorstellen sind sie in der Lage, mit vielen natürlichen und anthropogenen Chemikalien Verbindungen einzugehen, wie zum Beispiel in Komplexbildungsreaktionen mit Metallionen. Hinsichtlich ihrer Größe gehören Huminstoffe zu den Kolloiden und bewegen sich somit in einer Größendimension zwischen Molekülen und Partikeln. So können sie durchaus von Organismen aufgenommen werden.

Huminstoffen wurden in den letzten Jahren weitreichende Wirkungen auf Organismen nachgewiesen. Effekte auf die Veränderung von *Daphnia magna*, ihrer Reproduktionsleistung und Sterblichkeitsrate wurden von Petersen & Persson (1987) und Meems et al. (2004) nachgewiesen. Des Weiteren konnte eine verbesserte physiologische Konstitution bei dem Schwertfisch *Xiphophorus helleri* (Meinelt et al., 2004) festgestellt werden. Hinsichtlich des Einflusses der Huminstoffe auf die Genexpression wurde eine veränderte Aktivität von Biotransformationsenzymen der Phase II bestätigt. So konnte beispielsweise eine erhöhte Aktivität der Glutathion-S-Transferase in mehreren Süßwasserorganismen bei Einwirkung von Huminstoffen nachgewiesen werden (Pflugmacher et al., 2001). In einer großangelegten DNA-Microarray Analyse konnten Menzel et al. (2005) zeigen, dass eine Vielzahl von Genen in *Caenorhabditis elegans* unter Einwirkung zweier Huminstoffe unterschiedlich reguliert werden. Darunter fielen einige Gene für Chemorezeptoren, Biotransformationsenzyme, Acyl- und Glycosyltransferasen. Huminstoffen sind auch in der Lage, als endokrine Disruptoren eine hormonähnliche Wirkung auf Organismen auszuüben wie zum Beispiel durch einen xenoöstrogen wirkenden Effekt auf Larvalstadien des Krallenfroschs *Xenopus laevis* (Lutz et al., 2005). Hierbei wurden durch Huminstoffe Östrogeneffekte über eine Interaktion mit dem Östrogenrezeptor vorgetäuscht. Des Weiteren konnten Höss et al. (2001) eine dosis-abhängige Verschiebung des Geschlechterverhältnisses bei dem Schwertfisch *Xiphophorus helleri* zugunsten weiblicher Fische unter Einwirkung von einem bestimmten Huminstoff (HS 1500) feststellen.

1.3. Ziel der Studie

1.3.1. Lebensdauertest mit *C. elegans* unter Huminstoffeinfluss

Da *Caenorhabditis elegans* terrestrisch lebt und Huminstoffe einen Großteil der Natürlichen Organischen Substanz (NOM) im Boden umfassen, steht der Fadenwurm nicht nur in seinem natürlichen Umfeld in direktem Kontakt mit diesen, sondern nimmt sie auch angeheftet an der Nahrung auf. Vorhergehende Chemoattraktionstests konnten nachweisen, dass *Caenorhabditis elegans* als bodenbewohnender Organismus ein huminstoffangereichertes Milieu aktiv aufsucht (Menzel et al., 2005). Es liegt also die Vermutung nahe, dass Huminstoffe in *C. elegans* nicht nur negative Effekte nach sich ziehen, wie das Auslösen von Stressreaktionen und deren energetisch kraftaufwendige Bewältigung. Auf der anderen Seite kann das aktive Aufsuchen eines Huminstoffmilieus durch *C. elegans* dafür sprechen, dass positive Effekte die nachteiligen überwiegen. Ziel dieser Studie ist es, die Wirkung vier verschiedener Huminstoffe (künstliche und natürliche) auf die Lebensspanne von *Caenorhabditis elegans* zu untersuchen und zu überprüfen, ob durch den Einfluss der Huminstoffe bei zwei umweltrelevanten Konzentrationen eine signifikante Lebensverlängerung festzustellen ist.

1.3.2. Genexpressionsstudie

Der zweite Teil befasst sich mit einer Studie der Genexpression von 16 ausgewählten Genen mittels RealTime PCR. Die untersuchten Gene gehören verschiedener Klassen an, die zum einen eine Rolle in der chemischen Stressantwort bzw. im Insulin/ IGF-1 Signalweg spielen, oder einen Einfluss auf die Lebensdauer über den Effekt der Caloric Restriction haben. Als letzte Gruppe

werden Gene in ihrer Expression untersucht, die als Indikatoren des hormonellen Zustands gelten. In vier verschiedenen Entwicklungsstadien von *C. elegans* wurde eine vergleichende Genexpressionsstudie durchgeführt, im Larvalstadium 2 und 4, zu Anfang des adulten Stadiums ("Jung Adult") und als ausgewachsener Fadenwurm etwa einen halben Tag später ("Alt Adult"). Zum einen sollen mögliche Unterschiede der Genexpression in den einzelnen Entwicklungsstadien aufgedeckt werden. Andererseits ist im Hinblick auf den ersten Teil der Studie zu überprüfen, ob der Einfluss der getesteten Huminstoffe auf die Lebensspanne ebenfalls auf Transkriptionsniveau nachvollzogen werden kann. Ist es also möglich einen Unterschied hinsichtlich des Wirkens verschiedener Huminstoffe auf die Lebensspanne, auch auf der Ebene der Genexpression zurückzuverfolgen? Welche Gene rücken hinsichtlich der Erhöhung ihrer Expression durch Huminstoffe in den Fokus? Kann man ausgehend von der Kenntnis der Funktionen der Gene, die sich durch Huminstoffeinfluss in ihrer Expression änderten, ableiten, auf welchem Weg sie zu einer Lebensdaueränderung beitragen?

2. Material und Methoden

2.1. Kultivierung von *E. coli*

In dieser Arbeit wurde *Escherichia coli* des Stammes OP 50 als Futterquelle für *C. elegans* eingesetzt. Zur Kultivierung entnahm man einer Stammkultur mittels einer Impföse Bakteriensubstanz und führte damit einen Verdünnungsausstrich auf LB-Platte durch [LB Medium siehe Anhang (1)], die über Nacht bei 37 °C im Brutschrank (INB 500, Memmert) inkubiert wurde. Daraus impfte man 50 ml DYT Medium [s. A. (2)] mit einem Einzelkon an, was der Vorkultur entsprach.

2.2. Kultivierung von *C. elegans*

Die Kultivierung von *C. elegans* Wildtypstamm Bristol N2 erfolgte auf NGM-Agarplatten [Nematode Growth Medium; Brenner, 1974; s. A. (3)] Diese wurden mit einigen Tropfen einer *E. coli* (OP 50) Flüssigkultur angeimpft. Aus einer bei 15 °C gehaltenen „verhungerten“ *C. elegans* Population wurde ein kleiner Agarblock ausgeschnitten, auf eine frische mit *E. coli* versehene NGM-Platte gelegt. Bei 20°C dauert das Erreichen des 4. Larvenstadiums etwa 2 bis 3 Tage. Zur Stammhaltung wurden die Fadenwürmer in einer Einfrierlösung bestehend aus gleichen Anteilen Einfrierpuffer [s. A. (4)] und M9-Puffer [s. A. (5)] bei -80 C eingefroren.

2.3. Charakteristika der Huminstoffe

Es wurden Huminstoffe verschiedener Herkunft und Charakteristika zweier Konzentrationen, 5 bzw. 20 mg/l, verwendet, die mit dem Nematode Growth Medium und der *E. coli* Kultur gemischt wurden.

Der Huminstoff Fuchskuhle (FuKu) ist natürlichen Ursprungs und wurde aus dem See "Fuchskuhle" im nordöstlichen Brandenburg im März 2002 mittels Reverser Osmose (RO) isoliert. Er besteht aus hydrophoben, neutralen und aromatischen Säuren, Kohlenhydrat-, Carboxyl- und Carbonylgruppen.

Schwarzer See (SchwSee) ist ebenfalls ein RO-Isolat, gewonnen aus dem gleichnamigen "Schwarzen See" in Brandenburg, welcher äußerst humin- und torfreich ist.

HS 1500 ist eine synthetische huminstoffähnliche Substanz (Weyl GmbH, Deutschland), die als Produkt aus der Autooxidation von Hydrochinon entsteht und größtenteils aromatische sowie quinoide Strukturen aufweist. Es sind Analogien im Grundaufbau zu Lignin feststellbar.

HS Huminfeed (HF) wurde durch alkalische Extraktion aus hochoxidierten Ligniten isoliert. Diese synthetische huminstoffartige Substanz (Humintech GmbH, Deutschland) verfügt im Vergleich zu den anderen über den höchsten Anteil an LMW (Low molecular weight), also Molekülen kleiner als 1000 Dalton.

Das Brasilianische Sediment wurde 2007 von Christian Steinberg dem brasilianischen Küstenboden entnommen. Der Huminstoffanteil liegt bei 84, 2 %, Polysaccharide sind zu 0,1 % vertreten und organische Substanzen betragen 15,8 %.

2.4. Lebensdauererbst

Für die Lebensdauererbsts wurden etwa 300 bis 400 *C. elegans* N2 Fadenwürmer im Larvalstadium (L4) auf große NGM-Platten über Nacht zur Vereinzellung gesetzt.

Am nächsten Tag erfolgte das Überführen dieser L4 der Generation I auf große Platten, die mit jeweils einem der zu testenden Huminstoffe bzw. Konzentration versetzt waren (Compound-Platten). Ebenfalls wurden NGM-Kontrollplatten ohne Huminstoffe mit N2 bestückt, damit ein Vergleich zwischen der Lebensdauer der Fadenwürmer, die Huminstoffen ausgesetzt wurden mit jener ohne Huminstoffzusatz vollzogen werden konnte.

Nach etwa zwei Tagen hatte der Nachwuchs der Generation I ebenfalls das Larvalstadium 4 erreicht, wovon 10 bis 15 Fadenwürmer der Generation II pro Huminstoff bzw. Kontrolle und Konzentration auf 10 kleine NGM-Platten der gleichen Bedingungen gesetzt wurden.

Aufgrund der hohen Reproduktionsleistung von *C. elegans* war es dringend erforderlich das Umsetzen aller adulten Fadenwürmer etwa für eine Woche beizubehalten, so dass eine Vermischung der nachkommenden Generationen mit den als Testorganismen ausgesuchten Fadenwürmern ausgeschlossen werden konnte.

Überdies erfolgte ein tägliches Auszählen und Protokollieren der lebenden und toten bzw. verschwundenen Fadenwürmer.

2.5. Genexpressionsstudie

2.5.1. Expositionsszenario

Konditionen

Die Genexpression von *C. elegans* wurde unter Einwirkung von jeweils vier verschiedenen Huminstoffen in vier unterschiedlichen Entwicklungsstadien getestet, wobei die Huminstoffe eine Konzentration von 5 mg/ l in den NGM-Platten und im *E. coli* (OP50) Bakterienrasen betrogen. Für die gesamte Genexpressionsstudie wurden *C. elegans* Fadenwürmer des Stammes N2 Bristol Wildtyp verwendet, die bei 20,5°C angezogen wurden.

Kultivierung

Die Fadenwürmer wurden vier Tage auf jeweils drei große NGM-Platten pro Huminstoff/Kontrolle und Entwicklungsstadium angezogen.

Filtern und Abspülen

Dann wurden die Fadenwürmer mit M9-Puffer von den NGM-Platten gespült. Jede Probe (Huminstoff bzw. Kontrolle/ Entwicklungsstadium) wurde durch Membranfilter mit 10 µm großen Poren gefiltert (SM 16510/ 11, Sartorius; Germany). Aufgrund der Porengröße der Membran wurden ausschließlich Fadenwürmer des L1-Stadiums durchgelassen. Alle anderen Stadien verblieben auf dem Filter. Hierdurch erlangte man eine zeitliche Synchronisierung der Entwicklungsstadien, da es möglich war, die L1-Larven von den restlichen Larvenstadien zu isolieren und sie nun synchron heranwachsen zu lassen. Bei Erreichen eines bestimmten Entwicklungsstadiums wurde der Entwicklungsverlauf durch ein zweites Abspülen mit M9-Puffer unterbrochen. Um 4 hinsichtlich des Alters unterschiedliche Fadenwurmkulturen zu erhalten, wurde ab der 1. Filtration nach Verstreichen folgender in der letzten Spalte in Tabelle 1 angegebener Zeiträume abgestoppt.

Tab. 1: Darstellung der Gesamtlebenszeit aller Entwicklungsstadien und der zeitlichen Differenz zwischen den einzelnen Stadien

Probe	Lebenszeit in Stunden (h)	Differenz in h zu L1
L1	24	0
L2	46	22
L4	69	45
Jungadult	89	65
Altadult	116	92

Alle Proben wurden zunächst in Eppendorfgefäße in M9-Puffer gelagert, dann mittels der Tischzentrifuge (1-14 von Sigma) zentrifugiert und nach Entfernen des Überstandes mit 100 µl Lysislösung RL aus dem "innuSpeed Tissue RNA Kit" von Analytik Jena versetzt.

2.5.2. Extraktion der Roh-RNA

Zellaufschluss

Der Aufschluss der Zellen wurde mithilfe des Aufschlussgerätes "SpeedMill" (Analytik Jena) vollzogen. Dabei wurden die Proben in Lysis Tube C (innuSpeed Tissue RNA Kit) überführt und 2 x 1 min homogenisiert.

Extraktion der RNA

Die Extraktion erfolgte mithilfe des Kits von Analytik Jena "innuSpeed Tissue RNA Kit", wobei die einzelnen Schritte in der Anleitung zum Kit aufgeführt sind.

OD-Messung

Zur Ermittlung des RNA-Gehalts bzw. der Quantität der Proben wurde die Extinktion der Roh-RNA über Absorptionsspektroskopie einer 1:50 bzw. 1:100 Verdünnung am Photometer (Specgene von TECHNE) bestimmt. Die Quantität der RNA-Proben wurde mittels nachstehender Formel ermittelt:

$$C_{\text{RNA}} (\mu\text{g}/\text{ml}) = (\text{OD}_{260\text{nm}} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor})$$

2.5.3. cDNA Synthese

Die RNA-Proben wurden daraufhin in cDNA umgeschrieben. Zuerst wurde ein Mastermix aus folgenden Substanzen von Promega hergestellt:

- 30 µl RT-Puffer
- 8 µl dNTPs (10mM)
- 4 µl M-MLV-Revertase

Dann wurde 10 µl eines individuellen Mischungsverhältnisses zwischen RNA und Wasservolumen eingesetzt, so dass pro Probe 6 µg RNA für die cDNA Synthese bereitgestellt wurden.

Nach Zugabe von 0,8 µl Oligonukleotide pro Probe, wurden sie für 5 min bei 70°C inkubiert und anschließend auf Eis gestellt.

Dann addierte man zu jeder Probe 4,2 µl des Mastermixes und inkubierte 1 h bei 42°C. Die Reaktion wurde gestoppt, indem man die Proben 4 min 94 °C aussetzte und dann auf Eis stellte.

2.5.4. Quantitative RealTime-PCR

Die RealTime quantitative PCR wird zur Amplifikation von Nukleinsäuren verwendet und beruht auf dem herkömmlichen Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Als Neuerung ist hierbei parallel zum Amplifikationsprozess eine Quantifizierung der gewonnenen DNA möglich. Die Messung des Nukleinsäuregehalts wird mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen durchgeführt, die sich aus der Interkalierung eines Fluoreszenzfarbstoffs (SYBR Green I) ergeben. Die Einlagerung des Fluoreszenzfarbstoffs in die DNA ist mit einer Zunahme der Fluoreszenz korreliert, und das Fluoreszenzsignal steigt parallel zur Zunahme der Ziel-DNA von Zyklus zu Zyklus an. Hier wurde mit dem RealTime PCR-Cycler des Typs MyiQ von BIO-RAD gearbeitet.

Normalisierung des RealTime-PCR Geräts mittels des Referenzgens Actin

Um die Proben zu normalisieren, wurde eine interne Kontrolle benötigt. Durch vorhergehende Versuche wurde β -Actin als Referenzgen ausgewählt, da es durch seine Eigenschaft als House-Keeping Gen kaum Expressionsveränderungen während des Zellzyklus oder als Antwort auf die experimentelle Behandlung aufweist. Dessen Fluoreszenzsignal diente nun dazu, Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten cDNA auszugleichen.

Genspezifische PCR - Gene, Primersequenzen, PCR Szenario, Set 1-3

Für die Genexpressionsstudie wurden 16 verschiedene Gene ausgewählt, deren Expression in Abhängigkeit von jeweils unterschiedlichen Huminstoffen in vier verschiedener Entwicklungsphasen getestet wurde. In Tabelle 2 befinden sich nähere Informationen zu den untersuchten Genen.

Tab. 2: Auflistung der für die RealTime PCR eingesetzten Gene mit deren Proteinentsprechungen, biologischen, metabolischen bzw. molekularbiologischen Funktionen und verwendeten Primersequenzen

Genname	Funktion	Primernamen	Sequenz (5' - 3')
abu-11	Transmembran Protein mit Glutamin/ Asparagin-reicher Domäne und Cystein-reichen Repeats; Expression induziert durch fehlendes Signal von ungefalteten Proteinen aus dem ER; schützt Organismus eventuell vor mißgefalteten naszenten Proteinen; Funktion in der Speicherung von Nährstoffen	ABU-11-1	GGTGGCTGCTGAGGAGAATG
		ABU-11-4	ACTGGGCGATTGGCTGTTGC
act-1	Aktin; Organisierung und Biogenese des Aktin Cytoskeletts; Muskelentwicklung; Reproduktion; Embryonale Entwicklung	ACT-1-1	ACGAGGCCCAATCCAAGAGA
		ACT-1-3	TCCAAGAGAGGTATCCTTAC
akt-2	Homolog der Serine/ Threonin Kinase Akt/ PKB; erforderlich für die Dauerlarvenentwicklung; negative Regulation der adulten Lebensspanne durch die Inhibition von DAF-16 im Insulin-Rezeptor-Signalweg in Zellen; Protein Serin/ Threonin (Tyrosine) Kinase Akt.	AKT-2-1	GTGAACATGGACGCAACAAG
		AKT-2-4	GCCACCTCAGAACGATCAAC
cpr-2	Kodiert Protein mit großer Ähnlichkeit zu Cystein Protease; zur Papain Familie gehörend; Cathepsin L; Proteolyse; Cysteintypische Endopeptidase Aktivität; Cysteintypische Peptidase Akt.; Membranprotein	CPR-2-2	GTTGACAGCGAGCCAATATG
		CPR-2-3	CCTACACCAACGACAAGAAC
cpy-35b1	Cytochrom P450-abhängige Monooxygenase/ Oxidoreduktase, Phase I Enzym des Biotransformationssystem, Spaltung von molekularen Sauerstoff, Übertragung eines Sauerstoffatoms auf Fremdstoffe und Reduktion des anderen zu Wasser, Umbau und Entgiftung von Fremdstoffen; Regulation der Lebensspanne; Elektronencarrier; Hämbindung; Bindung von Eisenionen	CYP-35B1-2	AGCGTGGCGTTGGATTTCCG
		CYP-35B1-3	CGACTTTGGTCGCAGGATTC
dhs-23	Mitochondriale Short-chain Dehydrogenase; 2,3-Dihydro-2,3-Dihydroxybenzoat-Dehydrogenase; Oxidoreduktase Aktivität; Katalytische Aktivität; NAD(P)-bindend; Enterobactin Biosynthese Pathway; besitzt Homologie zu 17- β - Estradiol - dehydrogenase; beeinflusst möglicherweise die Größe der Nachkommenschaft bei <i>C. elegans</i> .	DHS-23-2	AAGAGTCGATCCTCCATCAG
		DHS-23-3	GTGCGCGTAAACTCGGTTAG
gst-1	Gluthation S-Transferase, Phase II Enzym der Biotransformation, führt Konjugationsreaktionen mit Fremdstoffen zur Steigerung der Wasserlöslichkeit durch zur zusätzlichen Entgiftung durch; Schutzantwort; Metabolische Prozesse; wichtig für Spermienwanderung	GST-1-1	CCCTCAAGCTCACGTACTTC
		GST-1-4	AGCGAGATGACGGATGATAG
gst-10	Gluthation S-Transferase; Phase II Enzym der Biotransformation	GST-10-1	TGGCCGTGCCACAACCTTAC
		GST-10-4	GCTCCAGTCTGCACAATCTC
gst-4	kodiert eine Gluthation-abhängige Prostaglandin D Synthase; Gluthation S-Transferase;	GST-4-1	TTTGATGCTCGTGCTCTTGC

	Phase II Enzym der Biotransformation; Schutzantwort	GST-4-4	TCAGCGTAAGCTTCTTCTC
<i>hsp-70</i>	Hitzeschock Protein; Mitglied der HSP 70 Familie der Chaperone; moduliert Lebensspanne; ER Antwort für ungefaltete Proteine; Faltung und Stabilisierung von ungefalteten oder mißgefalteten Proteinen.	HSP-70-1	ACGGGATGCTGTCATTAATG
		HSP-70-4	ATGTACCTCCTCCCAAATCG
<i>sir-2.1</i>	NAD ⁺ -abhängige Histon Deacetylase, katalysiert die Deacetylierung von Lysin am N-terminalen Ende des Histons, ermöglicht bessere Affinität von Lysin zum Phosphatrückgrat der DNA, die für Transkriptionsfaktoren blockiert wird, Herunterregulation der Transkription (Silencing); reguliert Lebensspanne; Deacetylierung von Proteinen/ AS; DNA abhängige Regulation der Transkription; reguliert Expressionslevel von <i>abu-11</i> ; spielt entscheidende Rolle beim Effekt der Caloric Restriction; Induktion durch STAC's	SIR-2.1-2	AATGTGGGAGGGATTCTCTG
		SIR-2.1-3	CTATGCGTGTTGCCATTGC
<i>sir-2.3</i>	NAD ⁺ -abhängige Histon Deacetylase, katalysiert Chromatin Silencing; Deacetylierung von Proteinen/ AS; DNA abhängige Regulation der Transkription; Verwandt mit Sirtuine der Klasse II (SIR 2 Familie)	SIR-2.3-2	CAGCTCTAGTAGGTCCAATG
		SIR-2.3-3	GTAGCGAACAAGGGTTCAAG
<i>sod-3</i>	Eisen-, Manganabhängige Superoxid Dismutase, Umwandlung des Superoxidradikals in das weniger reaktive Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂); eventuell mitochondrial; Schutz gegen oxidativen Stress; moduliert Lebensspanne; mRNA- Level geht bei Mutation von <i>daf-16</i> zurück	SOD-3-2	GTCGAGCATTGGCAAATCTC
		SOD-3-3	TATTGCGGTTCAAGGCTCTG
<i>tkr-1</i>	Homolog zum Tachykinin ähnlichen Neuropeptid Rezeptor; Membranständig; Modulation der excitatorischen Neurotransmission; spielt eventuell eine Rolle in der Regulation des Fettstoffwechsels; Rhodopsin ähnliche Rezeptor Aktivität	TKR-1-1	TGTCCTTCTGATGGCAACTG
		TKR-1-4	TGAGCACACGGATACGGTAG
<i>vit-6</i>	Kodiert Vitellogenin Vorläufer Protein, welches in zwei kleinere Yolk Proteine gespalten wird; Eidotter Vorläufer Protein; Vitellogenin Strukturgen; Transport von Lipiden	VIT-6-1	GTTCTTCATAGCGCTTGCTC
		VIT-6-4	ATGCGGACGGTGTTTCCATC
<i>y57g11c.4</i> 7	Pyrazinamidase/ Nicotinamidase; Metabolische Aktivität; Katalytische Aktivität; reguliert den zellulären Gehalt an NAD und hat damit indirekt einen Einfluss auf die Aktivität von NAD-abhängigen Sirtuinen	Y57G11.C47-1	TTCCCGAGTTGGATCGGTTG
		Y57G11.C47-4	TCTTGCTCCGCGTCTCCTTC
<i>zk384.3</i>	Aspartyl Protease; Aminoacyl-tRNA Synthetase; Proteolyse; tRNA Aminoacylierung bei Proteintranslation; Aminoacyl-tRNA Ligase Aktivität; Pepsin A Aktivität; Homologie zu <i>pnc1</i> aus <i>S.cerevisiae</i> : Nicotinamidase, die Nicotinamid in Nicotinsäure umwandelt als Teil des NAD ⁺ "Salvage" Pathways	ZK3284.3-1	CAGCCAACCTTGTTGGGTGATG
		ZK3284.3-4	CAGTCCTCCAATCTCAACAG

PCR Szenario

Nach der Normalisierung des PCR Geräts mittels des Referenzgens Actin wurden drei 96-Well Platten mit allen Genen bestückt. In Tabellen 3, 4, 5 ist die Belegung der Platten mit den zu amplifizierenden Genen aufgeführt, sowie der PCR Lauf mit den eingestellten Bereich des Temperaturgradienten für jede Platte.

Pro Probe bzw. pro Well wurden 10 µl Fluorophor und ein pro Probe individuelles Mischungsverhältnis aus 9,8 µl cDNA und H₂O pipettiert (Tabelle 9). Hinzu kommen jeweils 0,1 µl von Primer 1 (Forward-Primer), 0,1 µl von Primer 2 (Backward Primer) des zu amplifizierenden Gens und 10 µl iQTM SYBR^R Green Supermix, der die iTaqTM DNA Polymerase enthält, sowie Puffer und dNTPs. Das Mischungsverhältnis zwischen Probe und Wasser stammt aus dem Normalisierungsvorgang mit β-Actin. Die jeweilige Aufteilung der Gene auf die drei Platten wurde so gewählt, dass der Temperaturgradient möglichst optimal zu den Annealingtemperaturen der jeweils spezifischen Primerpaaren passte. Die Amplifizierung der Gene erfolgte nach folgendem Protokoll:

Zyklus 1: (1X)

Schritt 1: 95,0 °C für 03:00 min

Zyklus 2: (50X)

Schritt 1: 95,0 °C für 00:10 min

Schritt 2: SET 1 56,7 °C - 60,2 °C

SET 2 56,6 °C - 61,0 °C

SET 3 56,5 °C - 58,5 °C

Set 1

Tab. 3: Die in Set 1 amplifizierten Gene mit zugehöriger jeweiliger Annealingtemperatur; K - Kontrolle; Fuku - Fuchskuhle; HF - HS Huminfeed; SchwSee - Schwarzer See; NTC - None template control; Zahl 3 entspricht dem jung adulten, Zahl 4 dem alt adulten Entwicklungsstadium

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Temperatur (C°)/ Bedingung	K3	Fuku 3	HF 3	HS 1500 3	Schw See 3	K 4	Fuku 4	HF 4	HS 1500 4	Schw See 4		NTC
A	60,2	Y57G 11.C47	Y57G 11.C47	Y57G 11.C47	Y57G 11.C47	Y57G 11.C47	Y57G 11.C47	Y57G 11.C47	Y57G 11.C47	Y57 11.C47	Y57 11.C47		Y57G 11.C47
B	60	DHS- 23	DHS- 23	DHS- 23	DHS- 23	DHS- 23	DHS- 23	DHS-23	DHS- 23	DHS- 23	DHS- 23		DHS- 23
C	59,6	GST- 10	GST- 10	GST- 10	GST- 10	GST- 10	GST- 10	GST-10	GST- 10	GST-10	GST- 10		GST- 10
D	59	AKT-2	AKT-2	AKT-2	AKT-2	AKT-2	AKT-2	AKT-2	AKT-2	AKT-2	AKT-2		AKT-2
E	58,1	SIR- 2.3	SIR- 2.3	SIR- 2.3	SIR- 2.3	SIR- 2.3	SIR- 2.3	SIR-2.3	SIR- 2.3	SIR-2.3	SIR- 2.3		SIR-2.3
F	57,5	GST- 10	GST- 10	GST- 10	GST- 10	GST- 10	GST- 10	GST-10	GST- 10	GST-10	GST- 10		GST- 10
G	57	ACT-1	ACT-1	ACT-1	ACT-1	ACT-1	ACT-1	ACT-1	ACT-1	ACT-1	ACT-1		ACT-1
H	56,7	SIR- 2.1	SIR- 2.1	SIR- 2.1	SIR- 2.1	SIR- 2.1	SIR- 2.1	SIR-2.1	SIR- 2.1	SIR-2.1	SIR- 2.1		SIR-2.1

Set 2

Tab. 4: Die in Set 2 amplifizierten Gene mit jeweiliger Annealingtemperatur; K - Kontrolle; Fuku - Fuchskuhle; HF - HS Huminfeed; SchwSee - Schwarzer See; NTC - None template control

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Temperatur (C°)/ Bedingung	K3	Fuku 3	HF 3	HS 1500 3	Schw See 3	K4	Fuku 4	HF 4	HS 1500 4	Schw See 4		NTC
A	61	ABU-11	ABU-11	ABU-11	ABU-11	ABU-11	ABU-11	ABU-11	ABU-11	ABU-11	ABU-11		ABU-11
B	60,8												
C	60,3	CYP-35B1	CYP-35B1	CYP-35B1	CYP-35B1	CYP-35B1	CYP-35B1	CYP-35B1	CYP-35B1	CYP-35B1	CYP-35B1		CYP-35B1
D	59,5												
E	58,4	HSP-70	HSP-70	HSP-70	HSP-70	HSP-70	HSP-70	HSP-70	HSP-70	HSP-70	HSP-70		HSP-70
F	57,6	TKR-1	TKR-1	TKR-1	TKR-1	TKR-1	TKR-1	TKR-1	TKR-1	TKR-1	TKR-1		TKR-1
G	57	ACT-1	ACT-1	ACT-1	ACT-1	ACT-1	ACT-1	ACT-1	ACT-1	ACT-1	ACT-1		ACT-1
H	56,6	VIT-6	VIT-6	VIT-6	VIT-6	VIT-6	VIT-6	VIT-6	VIT-6	VIT-6	VIT-6		VIT-6

Set 3

Tab. 5: Die in Set 3 amplifizierten Gene mit jeweiliger Annealingtemperatur; K - Kontrolle; Fuku - Fuchskuhle; HF - HS Huminfeed; SchwSee - Schwarzer See; NTC - None template control

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Temperatur (C°)/ Bedingung	K 3	Fuku 3	HF 3	HS 1500 3	Schw See 3	K 4	Fuku 4	HF 4	HS 1500 4	Schw See 4		NTC
A	58,5												
B	58,4	SOD-3	SOD-3	SOD-3	SOD-3	SOD-3	SOD-3	SOD-3	SOD-3	SOD-3	SOD-3		SOD-3
C	58,2												
D	57,9												
E	57,5	GST-1	GST-1	GST-1	GST-1	GST-1	GST-1	GST-1	GST-1	GST-1	GST-1		GST-1
F	57,2	ZK384.3	ZK384.3	ZK384.3	ZK384.3	ZK384.3	ZK384.3	ZK384.3	ZK384.3	ZK384.3	ZK384.3		ZK384.3
G	57	ACT-1	ACT-1	ACT-1	ACT-1	ACT-1	ACT-1	ACT-1	ACT-1	ACT-1	ACT-1		ACT-1
H	56,5	CPR-2	CPR-2	CPR-2	CPR-2	CPR-2	CPR-2	CPR-2	CPR-2	CPR-2	CPR-2		CPR-2

2.5.5. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse des Lebensdauertests für die durchschnittliche Lebensspanne (mean lifespan) erfolgte über den Log-Rank Test (<http://bioinf.wehi.edu.au/software/russell/logrank/>). Für die Ergebnisse der Genexpression der alt adulten Fadenwürmer wurden unter Einbeziehung früherer Daten von Heike Staudacher (Expression Alt Adult (2) in Tab. 10) und Lisa Fischmeier (Expression Alt Adult (3) in Tab. 10) die Standardabweichung (n = 3) berechnet.

3. Ergebnisse

3.1. Lebensdauererbst

Der Lebensdauererbst für die Huminstoffe Schwarzer See und HS Huminfeed ergab folgendes in Abbildung 4 dargestelltes Ergebnis. Dabei wurde der prozentuale Anteil der Lebenden an der Gesamtpopulationsgröße in Tagen angegeben, wobei die 50 % Marke den Wert für die mediane Lebensspanne darstellt, die direkt aus der Grafik entnommen werden kann. Aus dem Diagramm ist abzulesen, dass der Lebensdauererbst einzig für HS Huminfeed bei einer Konzentration von 5 mg/ l im Vergleich zur Kontrolle eine Verlängerung der durchschnittlichen Lebensdauer bei $n = 86$ getesteten Individuen ergab. Dabei wurde die durchschnittliche Lebensdauer von mindestens 86 und maximal 109 Fadenwürmer bei Einwirkung von HS Huminfeed oder Schwarzer See der Konzentrationen von 5 bzw. 20 mg/ l ermittelt. In Tabelle 6 befinden sich alle errechneten Werte für die beiden Huminstoffe HS Huminfeed und Schwarzer See.

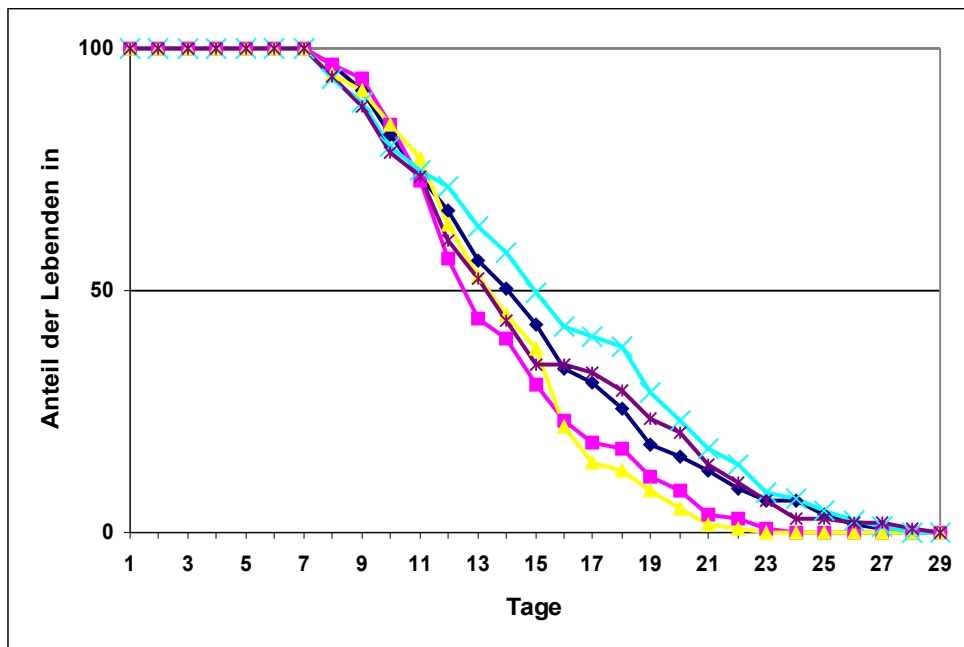


Abb. 4.: Darstellung der Lebensdauerkurven, die sich aus der durchschnittlichen Lebensspanne von $n = 86 - 118$ Fadenwürmer ergeben, welche einer Exposition der Huminstoffe Schwarzer See (5, 20 mg/ l) oder HS Huminfeed (5, 20 mg/ l) unterlagen. Die Kontrolle ist dunkelblau dargestellt, Schwarzer See bei 5 mg/l pink, Schwarzer See bei 20 mg/l gelb, Huminfeed HS bei 5 mg/l türkis und Huminfeed bei 20 mg/l bordeaux.

Es wurden drei verschiedene Parameter gemessen: die maximale Lebensspanne, die durchschnittliche Lebensspanne (mean lifespan) und die mediane Lebensspanne. Die maximale Lebensspanne bezeichnet die längste Lebensdauer eines Individuums, welches eines "natürlichen" Todes, also aufgrund des Alterns, starb. Bei einer Konzentration von 20 mg/ l des Huminstoffs HS Huminfeed ist bei einer Gesamtzahl n von 106 Individuen die längste Lebensdauer von 29 Tagen erreicht worden. Die mediane Lebensspanne bezeichnet die Lebensdauer in Tagen, bei der noch 50 % der Fadenwurmpopulation am Leben waren. Hier zeigt sich, dass HS Huminfeed bei 5 mg/ l die längste Lebensdauer im Vergleich zur Kontrolle ergab. Letztlich hat man den Gesamtdurchschnitt der Lebensdauer aller bei einer

bestimmten Konzentration eines jeweiligen Huminstoffs ausgesetzten Testorganismen berechnet. Eine statistische Auswertung wurde hier mittels des Log-Rank Tests durchgeführt. Es ergab sich eine signifikante Erhöhung mit $p < 0,05$.

Tab. 6: Maximale, mediane und durchschnittliche Lebensspanne der Proben, die mit Huminfeed HS oder Schwarzer See bei den angegebenen Konzentrationen behandelt wurden im Vergleich zur Kontrolle;* $p < 0.01$ nach Log-Rank Test.

Huminstoff	Konzentration [μM]	Gene-ration	Max.Lebens-spanne [d]	%	Mediane Lebens-spanne [d]	%	Durchschnittl. Lebens-spanne [d]	%	n	p^a
Kontrolle	0	II	28	100	14,06	100	15,42	100	109	
Huminfeed	5	II	28	100	14,93	106,2	15,94	104,62	86	0,28
	20	II	29	103,57	13,28	94,42	15,03	98,62	106	0,97
Schwarzer See	5	II	24	85,71	12,54	89,16	13,98	91,74	103	0,02
	20	II	23	82,14	13,37	95,05	14,04	92,15	118	0,00857*

Der zweite Lebensdauer test wurde für die Huminstoffe Brasilianisches Sediment und Fuchskuhle durchgeführt. Die Abbildung 5 zeigt das grafische Ergebnis. Bei keinem dieser getesteten Huminstoffe und Konzentrationen konnte eine Verlängerung der Lebensdauer im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden (Tab. 7). Obwohl die Lebensdauerkurve für das Brasilianische Sediment bei einer Konzentration von 5 mg/l im ersten Drittel der Lebenskurve viel höher als die Kontrollkurve verlief, konnte im weiteren Verlauf dieser Vorsprung nicht gehalten werden, da offensichtlich eine Kontamination der Fitness der Testorganismen schadete. Der Test für das Brasilianische Sediment bei einer Konzentration von 20 mg/l wurde zu Anfang des Versuchs abgebrochen, da vermutlich durch den eingesetzten Huminstoff zuviel Kontaminationen auf die Testorganismen übertragen wurden (kein Ergebnis).

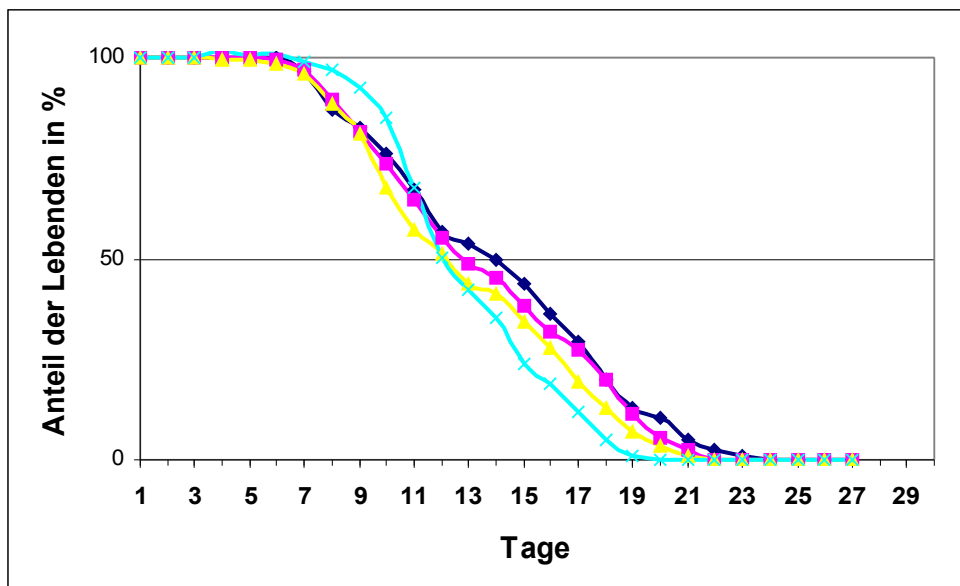


Abb. 5.: Lebensdauerkurven, die sich aus der durchschnittlichen Lebensspanne von $n = 113$ - 125 Fadenwürmer ergeben, welche zeitlebens mit den Huminstoffen Fuchskuhle (5, 20 mg/l) oder Brasilianischem Sediment (5 mg/l) in Berührung standen. Die Kontrolle ist dunkelblau dargestellt, Fuchskuhle bei 5 mg/l pink, Fuchskuhle bei 20 mg/l gelb und Brasilianisches Sediment bei 5 mg/l türkis.

Die Ergebnisse des Lebensdauertests für die Fuchskuhle zeigen einen negativen Einfluss auf die Lebensdauer von *C. elegans*, dabei zeigte die Exposition der Fuchskuhle bei 20 mg/ l eine hohe Signifikanz mit $p < 0.001$.

Tab. 7: Maximale, mediane und durchschnittliche Lebensspanne der Proben, die mit Brasilianischem Sediment oder Fuchskuhle bei den angegebenen Konzentrationen behandelt wurden im Vergleich zur Kontrolle; ** $p < 0.001$ nach Log-Rank Test

Huminstoff	Konzentration [µM]	Generation	Max.Lebensspanne [d]	%	Mediane Lebensspanne [d]	%	Durchschnittl. Lebensspanne [d]	%	n	p ^a
Kontrolle	0	II	24	100	14,00	100	14,21	100	115	
Brasil. Sediment	5	II	20	83,33	12,05	86,08	13,22	93,03	119	0,31
Fuchskuhle	5	II	22	91,67	12,81	91,52	13,82	97,28	124	0,025
	20	II	22	91,67	12,17	86,91	13,15	92,56	113	0,000959**

3.2. Genexpressionsstudie

3.2.1. RNA-Gehalt

Aus den OD₂₆₀-Werten wurde die Konzentration der RNA in µg/ ml ermittelt (Tab. 8). Die Proben für die Entwicklungsstadien L2 und L4 sind zur Vollständigkeit mit angeführt, allerdings ist hier die RNA Konzentration aufgrund eines Fehlers beim Extraktionsprozess so gering, dass man sie im weiteren Verlauf ausschloss. Ausgeschlossen wurden auch die Proben, welche mit dem Huminstoff Brasilianisches Sediment behandelt wurden, da er in allen Wurmkulturen zu Kontaminationen führte.

Tab. 8: Gehalt der Roh-RNA nach der Extraktion, ermittelt über den OD-Wert bei 260 nm und einer 50-fachen Verdünnung; Zahl 1/ 2 stehen für Larvalstadium L2/ L4, Zahl 3 für Jung Adult, Zahl 4 für Alt Adult.

	OD ₂₆₀	Ratio [260/280 nm]	RNA [µg/ml]
	Kontrolle 1	0,095	1,03
Fuchskuhle 1	0,199	1,97	398
HS Huminfeed 1	0,301	1,99	602
HS 1500 1	0,261	1,85	522
Schwarzer See 1	0,106	1,92	212
Kontrolle 2	0,029	2,06	58
Fuchskuhle 2	0,373	1,87	746
HS Huminfeed 2	0,228	1,92	456
HS 1500 2	0,04	1,23	80
Schwarzer See 2	0,021	1,26	42
Kontrolle 3	0,823	1,92	1646
Fuchskuhle 3	0,888	1,9	1776
HS Huminfeed 3	1,165	1,88	2330
HS 1500 3	0,942	1,87	1884
Schwarzer See 3	0,826	1,85	1652
Kontrolle 4	0,749	1,9	1498
Fuchskuhle 4	0,307	2,05	614
HS Huminfeed 4	0,623	1,97	1246
HS 1500 4	1,147/1,060	1,88	2294
Schwarzer See 4	1,326/1,249	1,89	2652

3.2.2. Normalisierung der cDNA Proben anhand des β -Actingens *act-1*

Die Normalisierung erfolgte mittels der Genexpression des House-Keeping Gens *act-1* (β -Actin). Der Threshold Cycle Wert (CT) markiert den Beginn der exponentiellen, quantifizierbaren Phase und es besteht eine lineare umgekehrte proportionale Beziehung zwischen dem Logarithmus der eingesetzten Menge an cDNA und dem CT-Wert. Je höher also der CT-Wert ist, desto kleiner ist die Probenkonzentration. In einem PCR Lauf wurde die Expression von *act-1* in den Proben gemessen. Die roten CT-Werte markieren die kleinsten Werte pro Gruppe der Entwicklungsstadien. Hier ist der Beginn der exponentiellen Phase am frühesten erreicht, die Ausgangsmenge an cDNA ist am größten und somit die Expression von Actin. Alle anderen Werte orientieren sich daran und das Mischungsverhältnis für die folgenden Genexpressionstests zwischen einzusetzender Menge an cDNA und Wasser wird über den Faktor, der sich aus dem CT-Wert jeder einzelnen Probe und des ihr zugeordneten CT-Referenzwerts ergibt, ermittelt. So konnten die Variationen in der Ausgangsmenge einzusetzender cDNA ausgeglichen werden.

Tab. 9: Normalisierungstabelle der Proben mittels Actin

	CT	Differenz	Faktor	cDNA [μ l]	H ₂ O [μ l]
Kontrolle 3	14,06	0	1	9,8	0
Fuchskuhle 3	14,57	0,51	1,4	6,8	3
HS Huminfeed 3	14,56	0,5	1,4	5,4	4,4
HS 1500 3	15,52	1,46	2,8	9,8	0
Schwarzer See 3	14,37	0,31	1,2	4,7	5,1
Kontrolle 4	16,65	0,09	1,1	2,6	7,2
Fuchskuhle 4	16,62	0,06	1	9,8	0
HS Huminfeed 4	16,56	0	1	3,3	6,5
HS 1500 4	16,75	0,19	1,1	3	6,8
Schwarzer See 4	16,76	0,2	1,1	1,4	8,4

3.2.3. Expressionsmuster der ausgewählten Gene

Nach dem Amplifizieren der 16 unterschiedlichen Gene mittels RealTime PCR wurde über den Vergleich des CT Werts jeder Probe mit ihrer entsprechenden Kontrolle die Expression des jeweiligen Gens ermittelt. In Tabelle 10 ist das Ergebnis aufgeführt, wobei in Spalte "Expression Alt Adult 1" die Ergebnisse des Versuches mit den Fadenwürmer, die 116 Stunden alt waren, zu finden sind. "Expression Alt Adult (2)" und "Expression Alt Adult (3)" sind Ergebnisse früherer Studien von Heike Staudacher und Lisa Fischmeier, die hier aus statistischen Gründen mit angeführt wurden. Aus den drei verschiedenen Expressionswerten pro Probe wurde ein Mittelwert für die Alt Adulten errechnet. Außerdem befindet sich hier das Expressionsergebnis für das Entwicklungsstadium der jung adulten N2. Damit ist der Zeitpunkt kurz nach dem Übergang des letzten Larvalstadiums in die adulte Entwicklungsphase angegeben. Somit sind die hier in ihrer Genexpression untersuchten Würmer um etwa 27 Stunden jünger als die Alt Adulten (Lebenszeit: 89 Stunden). Die Werte für die Expression der Gene der Jung Adulten liegen hierbei nur einfach vor und wurden bisher nicht durch weitere Wiederholungen bestätigt.

Dabei hält man es für eine signifikante Änderung der Genexpression, wenn die Expression entweder $\leq 0,5$ oder $\geq 2,0$ beträgt. Dies entspricht einer Herunterregulierung der Expression um mindestens die Hälfte bzw. einer Erhöhung der Genexpression um mindestens das Zweifache.

Zu überprüfen ist überdies, ob in den unterschiedlichen Entwicklungsstadien ein anderes Expressionsmuster vorliegt. Zum Beispiel könnte eine Verschiebung des Schwerpunkts in der Aktivität einzelner Gengruppen stattgefunden haben. Dies veranschaulicht der Vergleich der Expressionsergebnisse für Jung Adult und Alt Adult in der letzten Spalte der Tabelle 10.

Tab. 10: Differentielle Genexpression ausgewählter Gene. Die Werte für die durchschnittliche Expression (\emptyset Expression Alt Adult) der Alt Adulten ergeben sich aus drei voneinander unabhängigen Genexpressionsstudien. Rot steht für Gene, deren Expression um den Faktor 2 oder mehr hochreguliert wurde. Grün markierte Gene sind um mindestens die Hälfte in ihrer Expression gesunken, das heißt $\leq 0,5$. Die letzten Spalte stellt einen Genexpressionsvergleich zwischen jung adulten und alt adulten N2 dar. Orange zeigt an, dass die Expression bei Alt Adulten höher ist, hellblau die bei Jung Adulten.

Bedingung	Gene	Expression Jung Adult	Expression Alt Adult (1)	Expression Alt Adult (2)	Expression Alt Adult (3)	\emptyset Expression Alt Adult	Differenz zwischen Jung Adult und Adult
Fuku	ABU-11	0,6	0,9	1,1	4,0	1,8	1,2
Fuku	ACT-1						
Fuku	AKT-2	1,5	27,5	2,5	0,7	9,9	8,4
Fuku	CPR-2	16,1	7,5	2,7	3,8	9,1	7,0
Fuku	CYP-35B1	6,4	18,0	0,5	0,9	8,4	2,0
Fuku	DHS-23	11,4	43,9	1,3	6,7	20,6	9,3
Fuku	GST-1	0,5	2,0	0,7	0,9	1,1	0,7
Fuku	GST-10	9,6	4,8	1,3	2,0	5,5	4,1
Fuku	GST-4	0,5	25,3	0,3	0,3	8,7	8,2
Fuku	HSP-70	15,2	24,3	3,5	2,1	13,9	1,4
Fuku	SIR-2.1	2,7	8,3		0,8	3,9	1,2
Fuku	SIR-2.3	1,3	0,2	0,7	2,7	1,4	0,1
Fuku	SOD-3	2,0	10,2	0,4	0,4	4,2	2,2
Fuku	TKR-1	18,8	21,4	0,9	1,4	13,9	4,9
Fuku	VIT-6	0,7	14,2	2,4	6,2	7,1	6,3
Fuku	Y57G11.C47	1,1	0,5	0,4	0,3	0,6	0,5
Fuku	ZK3284.3	20,5	8,6	0,9	3,1	10,7	9,8
HF	ABU-11	1,4	1,3	1,2	3,6	2,1	0,7
HF	ACT-1						
HF	AKT-2	0,6	2,2	2,3	1,0	1,3	0,6
HF	CPR-2		9,9	0,2	3,0	6,4	
HF	CYP-35B1	0,4	0,4	0,5	0,8	0,5	0,1
HF	DHS-23	0,7	2,6	1,6	5,5	2,9	2,3
HF	GST-1	0,3	0,7	0,6	0,6	0,6	0,2
HF	GST-10	1,4	0,3	1,1	1,1	0,9	0,5
HF	GST-4	0,3	0,4	0,2	0,4	0,4	0,1
HF	HSP-70	0,6	1,1	3,8	1,7	1,1	0,5
HF	SIR-2.1	2,0	0,9		0,6	1,2	0,8
HF	SIR-2.3	2,5	0,2	1,7	3,6	2,1	0,4
HF	SOD-3	0,5	0,9	0,4	0,3	0,6	0,1
HF	TKR-1	1,1	0,9	1,3	2,4	1,4	0,4
HF	VIT-6	3,0	3,0	1,8	4,2	3,4	0,4
HF	Y57G11.C47	1,0	0,8	0,5	0,0	0,6	0,4
HF	ZK3284.3	0,3	1,0	2,1	5,6	2,3	2,0

HS 1500	ABU-11	0,7	0,7	0,6	3,2	1,5	0,8
HS 1500	ACT-1						
HS 1500	AKT-2	0,5	0,8	1,7	0,6	0,6	0,2
HS 1500	CPR-2		0,3	0,3	3,5	1,9	
HS 1500	CYP-35B1	0,1	0,2	0,7	1,0	0,4	0,3
HS 1500	DHS-23	2,1	0,3	0,7	3,1	1,9	0,3
HS 1500	GST-1	1,5	0,4	0,9	0,9	0,9	0,5
HS 1500	GST-10	3,2	0,2	1,1	1,4	1,6	1,6
HS 1500	GST-4	0,7	0,3	0,4	0,7	0,6	0,2
HS 1500	HSP-70	0,7	0,1	2,4	1,2	0,7	0,1
HS 1500	SIR-2.1	2,4	0,2		0,8	1,1	1,2
HS 1500	SIR-2.3	3,5	0,2	0,9	2,3	2,0	1,5
HS 1500	SOD-3	0,4	0,4	0,8	0,6	0,5	0,1
HS 1500	TKR-1	1,0	0,2	1,2	1,7	1,0	0,0
HS 1500	VIT-6	2,0	0,0	1,1	16,6	6,2	4,2
HS 1500	Y57G11.C47	0,8	1,0	0,4	0,6	0,8	0,0
HS 1500	ZK3284.3	0,5	0,1	0,5	1,1	0,6	0,1
SchwSee	ABU-11	1,1	3,7	0,9	4,4	3,0	2,0
SchwSee	ACT-1						
SchwSee	AKT-2	0,1	1,2	4,2	0,7	0,7	0,5
SchwSee	CPR-2		0,0	1,3	3,3	1,7	
SchwSee	CYP-35B1	0,2	0,2	4,3	1,9	0,7	0,6
SchwSee	DHS-23	2,6	0,7	6,9	7,3	3,6	0,9
SchwSee	GST-1	1,1	0,1	0,5	0,5	0,6	0,5
SchwSee	GST-10	2,1	0,3	2,3	3,1	1,8	0,3
SchwSee	GST-4	4,5	0,1	0,8	1,2	1,9	2,5
SchwSee	HSP-70	0,5	0,1	7,6	0,3	0,3	0,2
SchwSee	SIR-2.1	2,4	0,3		0,8	1,2	1,2
SchwSee	SIR-2.3	2,7	0,1	0,5	2,4	1,7	0,9
SchwSee	SOD-3	0,0	0,6	0,8	0,4	0,3	
SchwSee	TKR-1	0,7	0,2	7,1	2,4	1,1	0,4
SchwSee	VIT-6	4,4	2,2	3,1	14,6	7,0	2,7
SchwSee	Y57G11.C47	1,1	0,5	0,6	0,9	0,8	0,3
SchwSee	ZK3284.3	1,0	0,1	10,9	2,1	1,0	0,0

Expression Jung Adult:

Es zeigte sich, dass annähernd eine gleiche Anzahl an Genen bei den jung adulten wie alt adulten N2 überexprimiert wurden, jedoch dreimal soviel Gene einem Expressionsrückgang unterlagen. *vit-6* und *dhs-23* folgen tendenziell dem Ergebnis der Genexpression für die Alt Adulten und liegen überexprimiert vor, allerdings zu einem geringeren Faktor. *sir-2.1* ist in allen Fällen und *sir-2.3* zu 75% in den Proben signifikant hochreguliert. Ansonsten lässt sich im Gegensatz zu den Alt Adulten für die mit dem Effekt der Caloric Restriction gekoppelten Gene kein eindeutiges Expressionsmuster erkennen.

Genexpression Alt Adult und Vergleich der Genexpression in den zwei Entwicklungsstadien:

Im Allgemeinen fällt auf, dass eher eine Hochregulation der Gene bei den Alt Adulten als eine Hemmung der Genexpression stattgefunden hat. Ein huminstoffspezifischer Vergleich lässt erkennen, dass 75 % der untersuchten Gene unter Einfluss von

Fuchskuhle hochreguliert wurden. Außerdem ist hier der Faktor, um den eine Hochregulation stattfand, auch im Vergleich zu den anderen Huminstoffen, am Größten. HS Huminfeed hat bei etwas weniger als einem Drittel der Gene zu erhöhter Expression geführt. Für HS 1500 und Schwarzer See betrifft dies nur knapp 20 % der Gene. Hinsichtlich der Gene wurde *vit-6* unter Einfluss aller Huminstoffe signifikant hochreguliert. *dhs-23* wurde dreimal und *abu-11* zweimal signifikant überexprimiert. Unter der Exposition zweier Huminstoffe fand eine signifikante Herunterregulation von *sod-3* und *cyp-35B1* statt.

In den Abbildungen 6 a - p stellen Säulendiagramme die unterschiedliche Expression einzelner Gene unter dem Einfluss der Huminstoffe dar. So ist es mittels dieser Darstellung möglich, das unterschiedliche Einwirken der Huminstoffe auf die Expression eines Gens miteinander zu vergleichen. Die Abbildungen 6 a, c, i, k, m und p umfassen Gene für die Stressantwort, wobei unter dieser Kategorie Gene des Biotransformationssystems fallen, antioxidativ wirksame Gene sowie Hitzeschockproteine. Als nächstes folgen Gene, die vermutlich in Beziehung zu dem lebensverlängernden Effekt der Caloric Restriction stehen (Abbildung 6 b, d, e, f, g, j und o). Abbildung 6 l zeigt das Ergebnis für *akt-2*, dessen Genprodukt eine Rolle im Ins/IGF-1 Signalweg spielt. Als Letztes sind in Abbildung 6 h und n die Expression zweier Gene abgebildet, die auf östrogen wirksame Substanzen reagieren. Die Skala ist auf der y-Achse so zu lesen, dass die positiven Zahlen den Faktor darstellen, um den eine Erhöhung der Genexpression vorliegt und die negativen Werte sind als Faktor für die Herunterregulation der Expression zu verstehen. Auf den Bereich von -2 bis 2 wurde eine Maske gelegt, da diese Expressionswerte keinen signifikanten Unterschied zu dem Kontrollwert darstellen. Die Expression der Kontrolle wurde auf Null gesetzt. Die Angaben verstehen sich immer als relative Werte in Bezug zur Expression der Kontrolle. Außerdem wurde jeder Säule, deren Höhe den gemittelten Expressionswert angibt, eine Standardabweichung (n = 3) hinzugefügt.

Von den sechs betrachteten Gene für die Stressantwort fand bei *hsp-70*, *cyp-35B1* und *gst-1* eine, wenn auch in den meisten Fällen nicht signifikante Herunterregulation der Expression statt. Die Ausnahme hierbei bildet die Genexpression bei der Behandlung mit Fuchskuhle, die eine sehr hohe positive Regulation zeigt. Das Expressionsmuster für *gst-4* und *gst-10* und *sod-3* zeichnet ein gemischtes Bild. Bis auf das Expressionsergebnis für *gst-4* unter Einfluss von Fuchskuhle sind die Werte entweder positiv oder negativ reguliert, allerdings ohne Signifikanz.

Die eventuell an der Caloric Restriction beteiligten Gene zeigen einen klaren Trend in Richtung Expressionssteigerung auf. Wenn die Überexpression dieser Gene auch mehrheitlich nicht in den Signifikanzbereich fällt, ist es dennoch bemerkenswert, dass bei allen huminstoffgetesteten Proben dieser Gruppe kein Gen herunterreguliert wurde. Im Gegenteil findet man bei *abu-11*, *sir-2.1*, *sir-2.3*, *cpr-2* und *zk384.3* sogar in der Hälfte der Fälle eine signifikante Erhöhung ihrer Expression.

Das Ergebnis von *akt-2* als einziges Gen des Ins/IGF-1 Signalwegs ist relativ unbestimmt. Zwei der Huminstoffe lassen eine Überexpression erkennen und bei den anderen Huminstoffen findet eine Senkung der Genexpression statt.

Zum Schluß kann für die Gene *vit-6* und *dhs-23*, die mit dem hormonellen Zustand verbunden sind, ein eindeutiges Ergebnis notiert werden. *vit-6* wird von allen Huminstoffen im Durchschnitt um das nahezu sechsfache in seiner Genexpression verstärkt. *dhs-23* wurde sogar um mehr als das siebenfache in seiner Aktivität gesteigert. Da bei *vit-6* die Werte für alle vier Huminstoffe in den Signifikanzbereich fallen, ist es das statistisch am Besten abgesicherte Ergebnis dieses Versuchs.

Im direkten Vergleich der Expressiondaten unter den alt adulten und jung adulten N2 sind mehr als die Hälfte der Genexpressionswerte in den alt adulten N2 höher.

Interessant ist die Feststellung, dass *gst-10* und *hsp-70* in drei oder mehr Fällen in den Jung Adulten höher reguliert sind als in den Alt Adulten. Besonders bei den Huminstoffen HS 1500 und Schwarzer See ist ein ganzer Block an Glutathion-S-Transferasen und HSP-70 in den jung adulten N2 aktiver als in den Alt Adulten.

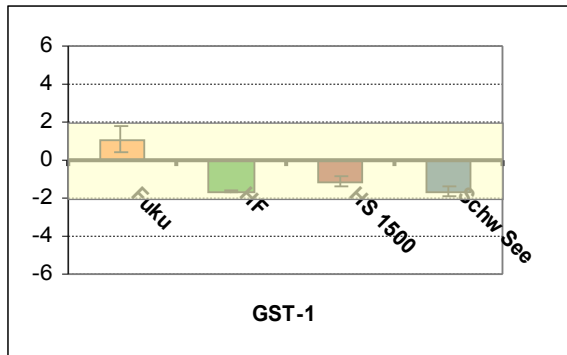


Abb. 6 a.

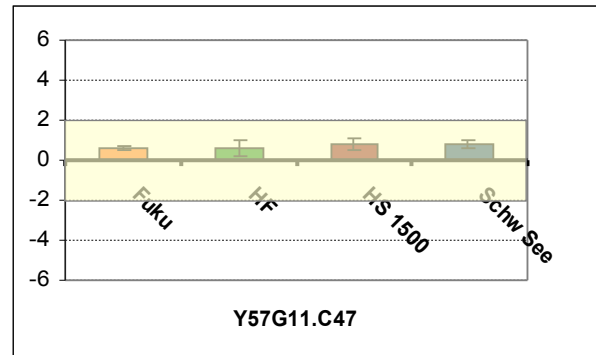


Abb. 6b.

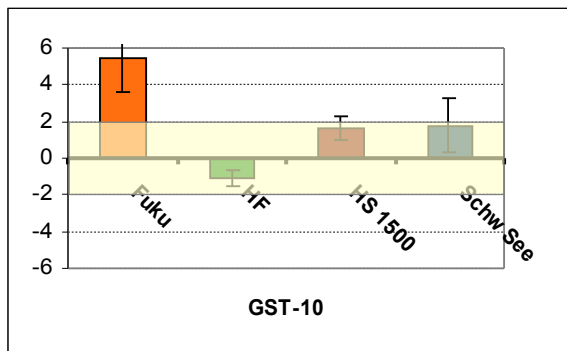


Abb. 6 c.

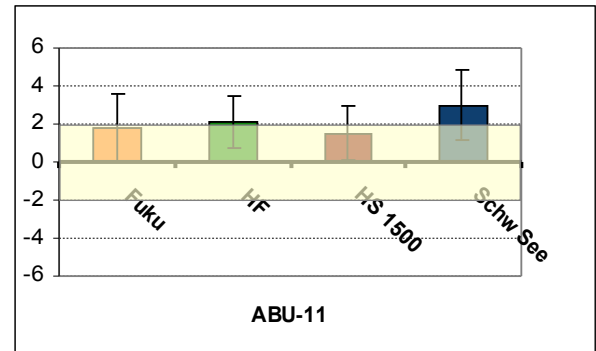


Abb. 6 d.

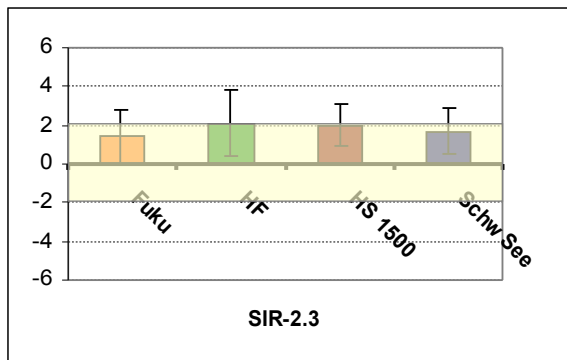


Abb. 6 e.

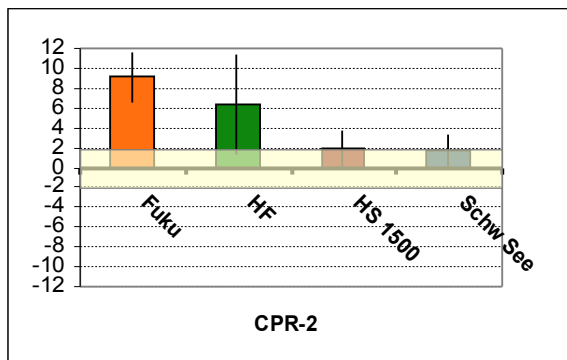


Abb. 6 f.

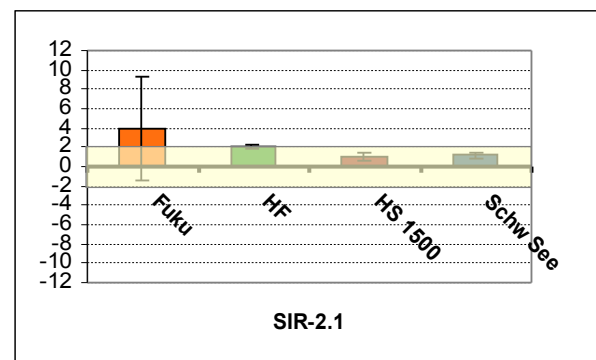


Abb. 6 g.

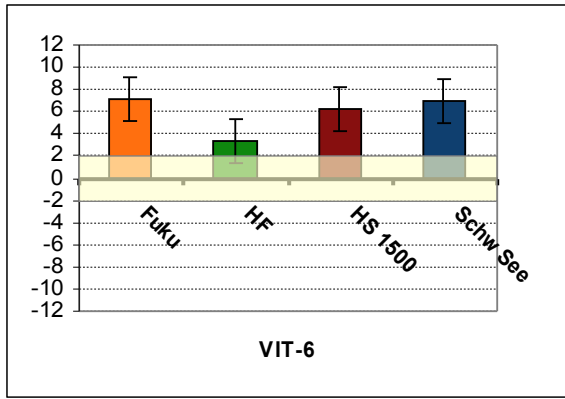


Abb. 6 h.

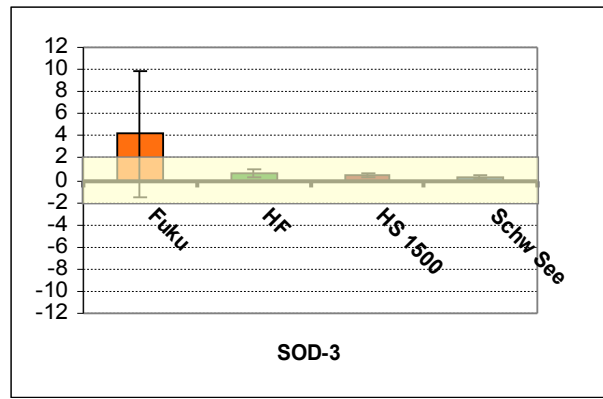


Abb. 6 i.

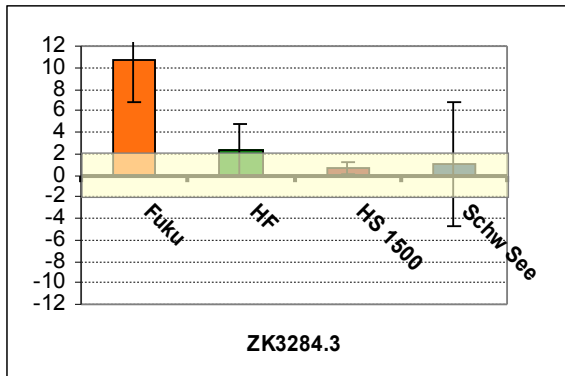


Abb. 6 j.

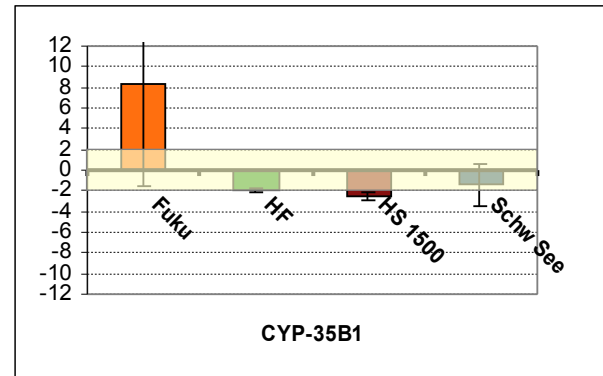


Abb. 6 k.

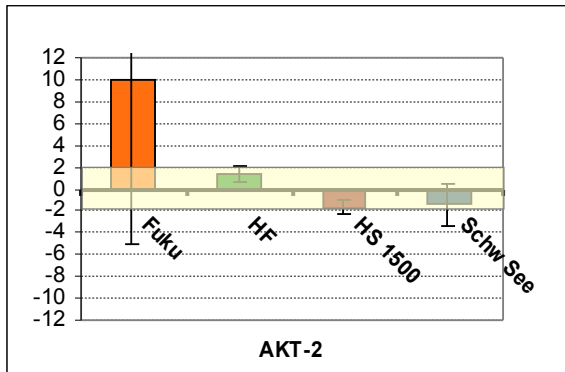


Abb. 6 l.

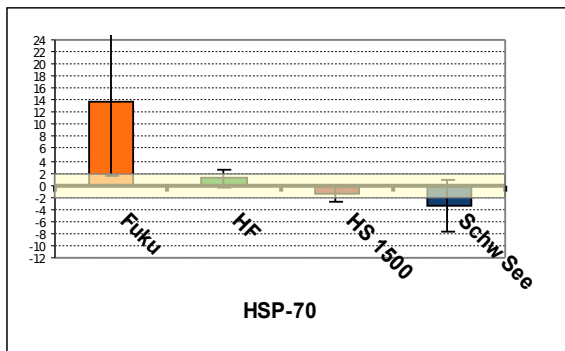


Abb. 6 m.

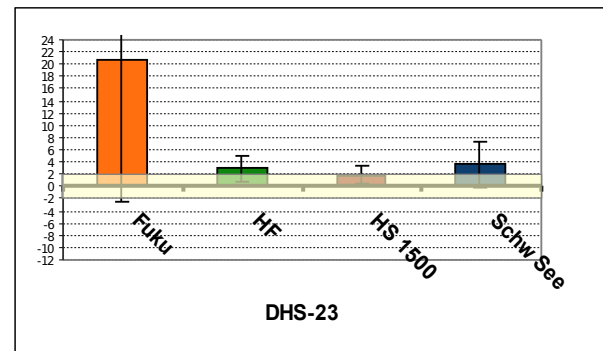


Abb. 6 n.

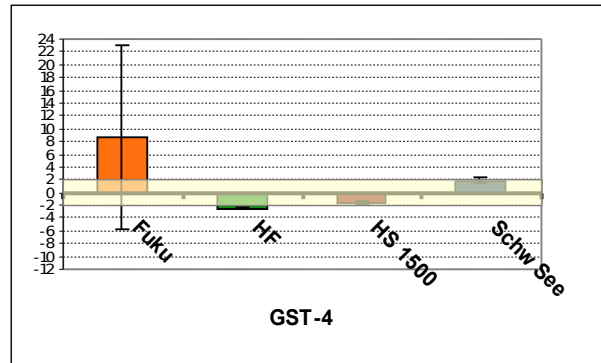
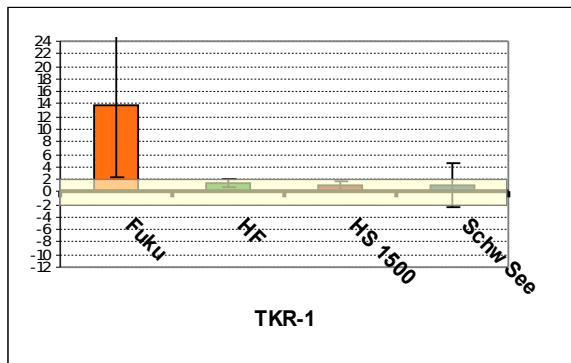


Abb. 6 o.

Abb. 6 p.

Abb. 6 a-p: Darstellung der Genexpression der 16 betrachteten Gene unter dem Einfluss von Fuchskuhle (Fuku), HS Huminfeed (HF), HS 1500 und Scharzer See (SchwSee)

4. Diskussion

4.1. Lebensdauererbst

Bei den Lebensdauererbsts mit *C. elegans* in Einwirkung der Huminstoffe Schwarzer See, Fuchskuhle und Brasilianischem Sediment konnte keine signifikante Lebensverlängerung in den getesteten Konzentrationen von 5 und 20 mg/ l festgestellt werden. Eine Ausnahme hierbei bildet der Test mit HS Huminfeed bei einer Konzentration von 5 mg/ l, welcher eine Lebensverlängerung gegenüber der Kontrolle von beinahe 5 % ergab ($p < 0.05$). Damit bestätigte sich die Aussage von Steinberg et al. (2007), die bereits vergleichbare Ergebnisse für lebensverlängernde Wirkung von Huminfeed auf *C. elegans* nachweisen konnten. HS Huminfeed besitzt laut einer Studie von Meinelt et al. (2007), die mehrere Huminstoffe hinsichtlich ihrer Fraktionen und funktionellen Gruppen miteinander vergleicht, das größte Potential, eine Hemmung des vegetativen Wachstums des fischpathogenen Wasserpilzes *Saprolegnia parasitica* zu bewirken. Außerdem fehlt HS Huminfeed die HMW Fraktion (high molecular weight substance), welche hauptsächlich Polysaccharide stellt und sein Absorptionsspektrum ähnelt dem von organischen Radikalen in Humin- und Fulvinsäuren. Aufgrund dieser fungiziden bzw. wachstumshemmenden Wirkung könnte man annehmen, dass HS Huminfeed auf *C. elegans* ebenfalls eine positive Wirkung ausübt. Des Weiteren besteht HS Huminfeed aus einem hohen Gehalt an LMW (Low-molecular weight), also Molekülen kleiner als 1000 Dalton, was eine Aufnahme durch den Organismus begünstigt.

An dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, dass die Lebensdauererbsts lediglich einmal durchgeführt wurden und sich das Ergebnis somit auf einen einzigen Wert stützt. Zur statistischen Absicherung sollten mindestens zwei weitere Durchgänge durchlaufen werden. Zudem muss man anführen, dass es während der Versuche vorrangig mit dem Huminstoff Brasilianisches Sediment zu Kontaminationen kam.

4.2. Genexpressionsstudie

Ein Expressionsvergleich zwischen den beiden untersuchten Entwicklungsstadien von *Caenorhabditis elegans* zeigt, dass die Gene in den jung adulten Fadenwürmern, welche für die Stressantwort stehen, stärker exprimiert wurden als in

den alt adulten N2. Dies trifft vor allem für *gst-10* und *hps-70* zu. So kann man die Vermutung aufstellen, dass die Antwort auf Stressoren im jüngeren Entwicklungsstadium noch aktiver ist als in den Alt Adulten. Dies hängt eventuell mit einem über die Expositionsphase hinweg einsetzenden Prozess der physiologischen Tolerierung von Huminstoffe zusammen.

Vergleicht man das Genexpressionsergebnis der alt adulten Fadenwürmer in den einzelnen Huminstoffgruppen mit dem Lebensdauerterestergebnis, so lässt sich kaum ein logischer Bezug knüpfen. Obwohl HS Huminfeed in den Lebensdauerterest bei 5 mg/ l eine Lebensdauererlängerung ergab, hebt sich das Expressionsmuster der Proben, die HS Huminfeed ausgesetzt waren, nicht von den Genexpressionsergebnissen der anderen Huminstoffe ab.

Der Genexpressionstest der alt adulten Fadenwürmer wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt und soll im Folgenden eingängiger diskutiert werden.

Die hinsichtlich der Stressantwort wichtigen Gene zeigen in den Expresssionstests für die alt adulten huminstoffbehandelten Fadenwürmer keine nennenswerten Unterschiede zur Expression der Kontrolle. Lediglich durch den Huminstoff Fuchskuhle konnte in den meisten Fällen eine signifikante Überexpression festgestellt werden. Somit kann man daraus schlussfolgern, dass die hier getesteten Huminstoffe mit Ausnahme von Fuchskuhle in *C. elegans* zu keiner Induktion der Stressantwort führten. Möglicherweise zeigt *C. elegans* eine intrinsische Toleranz gegenüber den geringen Konzentrationen der hier getesteten Huminstoffe.

Auf der anderen Seite haben sich einige signifikante Expressionsunterschiede für Gene ergeben, die mit dem Effekt der Caloric Restriction in Beziehung stehen. Zum Beispiel wurden die Histon Deacetylasen SIR-2.1 und SIR-2.3 durch alle Huminstoffe in ihrer Expression gesteigert und in der Hälfte der Fälle liegt sogar eine signifikante Erhöhung vor. In *S. cerevisiae* wurde eine Lebensverlängerung durch die NAD⁺-abhängige Deacetylase SIR-2 gefunden (Horst et al., 2007), welche durch Nicotinamid inhibiert werden kann. Außerdem konnte in der vorliegenden Studie eine durchweg erhöhte Expression der Nicotinamidase /Pyrazinamidase Y57G11.C47 unter Huminstoffeinfluss festgestellt werden, wenn auch keine signifikante. Das Gen für die Nicotinamidase *pnc1* in *S. cerevisiae* wurde von Balan et al. (2008) als Vermittler der Caloric Restriction und durch Stress induzierten Lebensverlängerung beschrieben, da es den zellulären Gehalt an Nicotinamid und NAD⁺ reguliert und damit zu einer Erhöhung der Aktivität der SIR-2 Familie der Klasse III Histon Deacetylasen führt. Die erhöhte Expression von SIR-2 führt wiederum dazu, dass durch Deacetylierung von Histonen ein Silencing der Genexpression bestimmter Gene vonstatten geht.

Ein ähnliches Expressionsmuster ergibt sich auch für die Cysteinprotease CPR-2 und die Aspartylprotease ZK3284.3. Beide Gene wurden von allen Huminstoffe in ihrer Expression hochreguliert und in der Hälfte der Fälle sogar signifikant. Aspartylproteasen sind hydrolytische Enzyme, die intra- und extrazelluläre Degradation von Proteinen bewirken. In Studien mit *C. elegans* wurde festgestellt, dass die Reduktion der Aktivität von Aspartylproteasen durch spezifische Mutationen oder Hungern eine Verringerung der Nekrose von Motorneuronen bewirkte. Des weiteren stellen Cysteinproteasen beim nicht apoptotischen Zelltod eine Brücke dar zwischen deregulierter Calcium-Homöostase, die zelluläre Nekrose signalisiert, und einer weiter downstream wirkenden Degradationsmaschinerie, zu der auch Aspartylproteasen gehören können (Samara & Tavernarakis, 2003). Die hier gefundenen Ergebnisse könnte man so interpretieren, dass die Induktion der

Cysteinprotease und Aspartylprotease eine Erhöhung denaturierter Proteine signalisiert, die abgebaut werden müssen, um das zelluläre Gleichgewicht zu wahren. Da hier allerdings eine Überexpression dieser proteinabbauenden Enzyme vorliegt, könnte man zelluläre nekrotische Prozesse vermuten. In *C. elegans* wurde bestätigt, dass die Aktivierung von proteolytisch wirksamen Enzymen zum Einleiten des neurodegenerativen Zelltods beiträgt (Syntichaki et al., 2002).

Als Letztes wurde in dieser Gruppe eine Überexpression von *abu-11* festgestellt. ABU-11 ist ein Transmembranprotein, dessen eine Domäne Sequenzähnlichkeit mit dem Oberflächen "Scavenger" Rezeptor in Endothelzellen von Säugern hat, welcher chemisch modifizierte extrazelluläre Protein bindet und ihrer lysosomalen Degradation zuführt (Urano et al., 2002). In *C. elegans* induziert Resveratrol, ein Sirtuin aktivierendes Polyphenol, *abu-11* und andere Komponenten der ER Stressantwort (Viswanathan et al., 2003). Des Weiteren wurde festgestellt, dass SIR-2.1 das Expressionslevel von *abu-11* mitbestimmt. Da *sir-2.1* überexprimiert wurde, liegt die Annahme nahe, dass dadurch *abu-11* in seiner Expression gesteigert wurde. Zusätzlich signalisiert die Überexpression der Aspartyl- sowie der Cysteinprotease ein erhöhtes Vorhandensein von denaturierten Proteinen, die vermutlich von ABU-11 gebunden und ihrer Degradation zugeführt werden.

Insbesondere hat die Genklasse eindeutige Ergebnisse zutage befördert, die einen Hinweis auf das xenoöstrogene Potential der Huminstoffe Aufschluss geben könnte. Das Gen des Yolk Proteins *vit-6* ergab eine bei allen Huminstoffen drei- bis siebenfache Steigerung der Expression im Vergleich zur Kontrolle. Auch die Expression einer Short-Chain Dehydrogenase *dhs-23* wurde in 3 von 4 Fällen signifikant gesteigert. Dies ist bemerkenswert, da man in der Vergangenheit in vielerlei Hinsicht Huminstoffen einen östrogenen Effekt nachwies. Zum Beispiel konnten Menzel et al. (2005) zeigen, dass der zelluläre Hormonrezeptor *sdc-1* in Einwirkung von Huminstoffen auf *C. elegans* signifikant überexprimiert wurde. Zudem wurde bei dem Krallenfrosch *Xenopus laevis* unter Huminstoffeinfluss von HS1500 während seiner Larvalentwicklung eine Steigerung des Östrogenen Rezeptors auf Transkriptionsebene gefunden (Lutz et al. 2005). So lassen sich die hier gefundenen hohen Expressionswerte für *vit-6* und *dhs-23* als ein ausgesprochen östrogen wirkendes Potential der Huminstoffe bewerten.

Man kann also bei der Betrachtung des Expressionsmusters für die huminstoffexponierten alt adulten Fadenwürmer schließen, dass vor allem Gene, die mit dem Effekt der Caloric Restriction in Verbindung stehen, durch die Huminstoffe in ihrer Expression anstiegen. Möglicherweise wird im Falle einer Verlängerung der Lebensspanne, ausgelöst durch die Einwirkung von Huminstoffen, über den Pathway der Caloric Restriction vermittelt. Außerdem lösen die hier getesteten Huminstoffe einen xenoöstrogenen Effekt in *C. elegans* aus.

4.3. Ausblick

Die Lebensdauer tests mit den Huminstoffen sollten zum Erreichen einer statistischen Relevanz noch mindestens zweimal durchgeführt werden. Dies betrifft auch die Genexpressionstests für das Entwicklungsstadium der jung adulten Fadenwürmer. Des Weiteren wäre es interessant, weitere Entwicklungsstadien von *Caenorhabditis elegans* in die Genexpressionsstudie aufzunehmen. Außerdem könnten Mutantentests mehr Aufschluss darüber geben, welche Gene einen wichtigen Beitrag zur Lebensverlängerung leisten. Schließlich könnte man den lebensverlängernden

Effekt der Caloric Restriction mit Starvation Tests, also unter kontrolliertem Nährstoffentzug, näher überprüfen.

5. Zusammenfassung

Die in dieser Studie durchgeführten Lebensdauertests mit dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* in Einwirkung von vier verschiedenen Huminstoffen (Schwarzer See, Fuchskuhle, Brasilianisches Sediment und HS Huminfeed) bei umweltrelevanten Konzentrationen von 5 und 20 mg/ l ergab lediglich bei letzterem eine Lebensdauererweiterung gegenüber der nicht huminstoffbehandelten Kontrolle von 5 % (Konzentration von 5 mg/ l, $p < 0,05$). In einer anschließenden Genexpressionsstudie wurde mittels RealTime PCR die Expression 16 ausgewählter Gene in zwei verschiedenen Entwicklungsstadien von *Caenorhabditis elegans* unter Einfluss vier verschiedener Huminstoffe untersucht. Dabei gehörten die zu untersuchenden Gene verschiedener Gengruppen an, die einerseits zur Stressantwort zählen, den lebensdauererweiternden Effekt der Caloric Restriction vermitteln, eine Rolle in der Signalkaskade des Ins/IGF-1 Signalwegs spielen oder auf ein (xeno)östrogenes Potential reagieren. Hierbei ergab die Untersuchung, dass vor allem die Gene *vit-6* und *dhs-23* in dem Entwicklungsstadium der alt adulten Fadenwürmer überexprimiert wurden, was das xenoöstrogene Potential der Huminstoffe unterstreicht. Erstaunlicherweise wurden die Gene für die Stressantwort nur marginal in ihrem Expressionsmuster im Vergleich zur Kontrolle verändert. Jedoch konnte eine bemerkenswerte Hochregulation der Expression von Genen, die vermutlich über den Effekt der Caloric Restriction agieren, gefunden werden, was zur Annahme führt, dass die durch Huminstoffe ausgelöste Lebensverlängerung über diesen Pathway vermittelt werden könnte.

6. Quellen

- Balan, V., Miller, G., S., Kaplun, L., Balan, K., Chong, Z.Z., Li, F., Kaplun, A., VanBerkum, M., Arking, R., Freeman, D., C., Maiese, K., Tzivion, G., 2008. Life span extension and neuronal protection by *Drosophila* Nicotinamidase. *J. Biol.Chem.* 283, 27810-27819.
- Barsyte, D., Lovejoy, D.A., Lithgow, G.J., 2001. Longevity and heavy metal resistance in *daf-2* and *age-1* long-lived mutants of *Caenorhabditis elegans*. *FASEB J.* 15, 627-634.
- Braeckman, B.P., Vanfleteren, J.R., 2006. Genetic control of longevity in *C.elegans*. *Experimental Gerontology*, 90-98.
- Gems, D., McElwee, J.J., 2005. Broad spectrum detoxification: the major longevity assurance process regulated by insulin/ IGF-1 signaling? *Mech. Ageing Dev.* 126, 381-387.
- Harman, D., 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11, 298-300.
- Honda, Y., Honda, S., 1999. The *daf-2* gene network for longevity regulates oxidative stress resistance and Mn-superoxide dismutase gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *FASEB J.* 13, 1385-1393.

- Houthoofd et al., 2002 (a). No reduction of metabolic rate in food restricted *Caenorhabditis elegans*. *Exp. Gerontol.* 37, 1359-1369.
- Houthoofd et al., 2002 (b). Axenic growth up-regulates mass-specific metabolic rate, stress resistance, and extends life span *Caenorhabditis elegans*. *Exp. Gerontol.* 37, 1371-1378.
- Höss, S., Bergtold, M., Haitzer, M., Traunspurger, W., Steinberg, C.E.W., 2001. Refractory dissolved organic matter can influence the reproduction of *Caenorhabditis elegans*. *Freshwater Biology* 46, 1-10.
- Kenyon, C., Chang, J., Gensch, E., Rudner, A., Tabtiang, R., 1993. A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* 366, 461-464.
- Kimura, K.D., Tissenbaum, H.A., Liu, Y., Ruvkun, G., 1997. *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 277, 942-746.
- Lakowski, B., Hekimi, S., 1998. The genetics of caloric restriction in *Caenorhabditis elegans* by four clock genes. *Science* 280: 1010-1013.
- Lutz, I., Zhang, J., Opitz, R., Kloas, W., Xu, Y., Menzel, R., Steinberg, C.E.W., 2005. Synthetic humic substances act as weak xenoestrogens and affect the thyroid system of *Xenopus laevis*. *Chemosphere*; <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.02.073> .
- McElwee, J., Bubb, K., Thomas, J.H., 2003. Transcriptional outputs of the *Caenorhabditis elegans* forkhead protein DAF-16. *Aging Cell* 2, 111-121.
- Meens, N., Steinberg, C.E.W., Wiegand, C., 2004. Direct and interacting toxicological effects on the waterflea (*Daphnia magna*) by natural organic matter, synthetic humic substances and cypermethrin. *Sci. Total Environ.* 319, 123-136.
- Meinelt, T., Schreckenbach, K., Knopf, K., Wienke, A., Stüber, A., Steinberg, C.E.W., 2004. Humic substances increase the constitution of swordtail (*Xiphophorus helleri*). *Aquat. Sci.* 66, 239-245.
- Meinelt, T., Paul, A., Phan, T.M., Zwirnmann, E., Krüger, A., Wienke, A., Steinberg, C., E., W., 2007. Reduction in vegetative growth of the water mold *Saprolegnia parasitica* (Coker) by humic substance of different qualities. *Aquatic Toxicology* 83, 93-103.
- Menzel, R., Stürzenbaum, S., Bärenwaldt, A., Kulas, J., Steinberg, C.E.W., 2005. Humic material induces behavioral and global transcriptional responses in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environ. Sci. Technol.* 39, 8324-8332.
- Murphy, C.T., McCarroll, S.A., Bargmann, C.I., Fraser, A., Kamath, R.S., Ahringer, J., Li, H., Kenyon, C., 2003. Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 424, 277-284.
- Petersen, R.C., Jr., Persson, U, 1987. Comparison of the biological effects of humic materials under acidified conditions. *Sci. Total Environ.* 62, 387-398.
- Pflugmacher, S., Tidwell, L.F., Steinberg, C.E.W, 2001. Dissolved humic substances directly affect freshwater organisms. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 29, 34-40.
- Pietsch, K., Saul, N., Menzel, R., Steinberg, C.E.W., 2007. Verlängerung der Lebensdauer durch das Polyphenol Quercetin im Nematoden *Caenorhabditis elegans*. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.* 59, 189.
- Samara, C., Tavernarakis, N., 2003. Calcium-dependent and aspartyl proteases in neurodegeneration and ageing in *C.elegans*. *Ageing research reviews* 2, Elsevier, 451-471.
- Steinberg, C.E.W., Meinelt, C., Timofeyev, M.A., Bittner, M., Menzel, R., 2008. Humic Substances, Part 2: Interactions with organisms. *Env. Sci. Pollut. Res.* 15, (2).

- Steinberg, C.E.W., Saul, N., Pietsch, K., Meinelt, T., Rienau, S., Menzel, R., 2007. Dissolved humic substances facilitate fish life in extreme aquatic environments and have the potential to extend lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Annals of Environmental Science* 1, 81-90.
- Syntichaki, P., Xu, K., Driscoll, M., Tavernarakis, N., 2002. Specific aspartyl and calpain proteases are required for neurodegeneration in *C.elegans*. *Nature* 419, 939-944.
- Urano, F., Calfon, M., Yoneda, T., Yun, C., Kiraly, M., Clark, S., Ron, D., 2002. A survival pathway for *Caenorhabditis elegans* with a blocked unfolded protein response. *J Cell Biol* 158, 639-646.
- Van der Horst, A., Schavemaker, J.M, Pellis von Berkel, W., Burgering, B.M., 2007. The *Caenorhabditis elegans* nicotinamidase PNC-1 enhances survival. *Mech. Ageing Dev.* 128, 346-349.
- Viswanathan, M., Kim, S. K., Berdichevsky, A., Guarente, L., 2003: A role for SIR-2.1 regulation of ER stress response genes in determining *C. elegans* life span. *Dev Cell* 9, 605-615.

7. Anhang

Zusammensetzung der angewendeten Substanzen:

(1) LB-Medium: 10 g Bactotrypton; 5 g Bacto Yeast Extract; 15 g NaCl; 20 g Agar auf 1 l mit Aqua dest. aufgefüllt; pH 7,5

(2) DYT Medium: 16 g Bactotrypton; 10 g Bacto Yeast Extract; 5 g NaCl; auf 1 l mit Aqua dest. aufgefüllt

(3) NGM-Medium: 1,5 g NaCl; 8,5 g Agar; 1,25 g Bactopepton; 0,5 ml Cholesterollösung; 12,5 ml Kaliumphosphat-Puffer (1M, pH 6,0); 0,5 ml CaCl₂; 0,5 ml MgSO₄

(4) Einfrierpuffer: NaCl; KH₂PO₄; Glycerin; NaOH

(5) M9-Puffer: KH₂PO₄; Na₂HPO₄; NaCl; MgSO₄

8. Danksagung

Diese Studienjahresarbeit entstand am Institut für Gewässerökologie an der Humboldt-Universität zu Berlin unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. C. E. W. Steinberg.

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. C. E. W. Steinberg für die Möglichkeit bedanken, in seiner Arbeitsgruppe diese Studienjahresarbeit anfertigen zu können.

Dann möchte ich mich ausdrücklich bei Herrn Dr. R. Menzel bedanken, der mich bei der Durchführung der RT-PCR Studie, der Auswertung und schriftlichen Abfassung dieser Arbeit unterstützte.

Als nächstes gilt mein herzlicher Dank Kerstin Pietsch und Nadine Saul, die mir bei der Durchführung und der statistischen Auswertung der Lebensdauertests mit Rat und Tat zur Seite standen.

Heike Staudacher möchte ich recht herzlich für die kooperative Zusammenarbeit danken, für die Normierung des RT-PCR Geräts und die gemeinschaftliche

Durchführung des Filterns und Spülens der Wurmulturen, der RNA-Extraktion und der RT-PCR Durchgänge.

Als Letztes möchte ich Lisa Fischmeier danken für das zur Verfügung stellen ihrer Genexpressionsdaten und der Einarbeitung des RT-PCR Geräts, sowie des Designens von Primern für die zu untersuchenden Gene.

9. Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich diese Studienjahresarbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Diese Arbeit hat in dieser oder ähnlicher Form noch nicht im Rahmen einer anderen Prüfung vorgelegen.