

**Induktion von Heatshockprotein 70 in EPC-Zellen (*Epithelioma
Papulosum Cyprini*) als Indikator für Proteotoxizität in der
Biotest-geleiteten Fraktionierung**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie
der Universität Hamburg

aus dem

Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie
-Abteilung Lebensmittelchemie-
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Angelika Kinder

aus Heide

Hamburg 2002

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Oktober 1999 bis September 2002 unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. H. Steinhart am Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie – Abteilung Lebensmittelchemie - an der Universität Hamburg angefertigt.

Die finanzielle Unterstützung der Arbeit erfolgte durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung innerhalb des Verbundvorhabens „ISIS“ (Identifizierung sedimentgebundener Schadstoffe, F0271A-C).

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. H. Steinhart
2. Gutachter: Prof. Dr. B. Bisping

Tag der mündlichen Prüfung: 28.02.2003

Danksagungen

Für die Überlassung des Themas sowie die Betreuung dieser Arbeit möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. H. Steinhart bedanken.

Herrn Prof. Dr. B. Bisping danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Mein besonderer Dank gilt:

Frau Martina Klemm, Frau Denise Pein, Frau Sünje Staack und Frau Regina Hanke für ihren großartigen Einsatz

Herrn Arne Sierts-Herrmann für 3 Jahre sehr gute Zusammenarbeit

Dem Bundesamt für Seeschifffahrt und Hydrographie für die Sedimentprobenahme sowie deren Extraktion und Fraktionierung

Der Bundesforschungsanstalt für Fischerei – Institut für Fischereiökologie - für die Bereitstellung und Kultivierung der Zellen

N. Reineke, N. Heinzl, H. H. Vahl, U. Kammann, D. Danischewski und S. Biselli für die gute Projektarbeit

Herrn Werner Wosniok für die Durchführung der Faktorenanalyse

Frau Kerstin Fleischer und Herrn Arne Sierts-Herrmann für die Durchsicht des Skripts

Dem BMBF für die finanzielle Unterstützung der Arbeit

Inhaltsverzeichnis

<u>1</u>	<u>EINLEITUNG</u>	1
<u>1.1</u>	<u>PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT</u>	1
<u>1.2</u>	<u>BIOTESTGELEITETE FRAKTIONIERUNG</u>	3
<u>1.3</u>	<u>BIOLOGISCHE TESTSYSTEME</u>	4
<u>1.4</u>	<u>HITZESCHOCKPROTEIN70</u>	6
<u>1.4.1</u>	<u>ALLGEMEINES</u>	6
<u>1.4.2</u>	<u>STRUKTUR UND VORKOMMEN</u>	7
<u>1.4.3</u>	<u>FUNKTION</u>	8
<u>1.4.4</u>	<u>GENETISCHE REGULATION DER HITZESCHOCKANTWORT</u>	9
<u>1.4.5</u>	<u>UNTERSUCHUNGEN ZU HSP70 IN DER ÖKOTOXIKOLOGIE</u>	10
<u>2</u>	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	11
<u>2.1</u>	<u>EPC-ZELLEN</u>	11
<u>2.2</u>	<u>SEDIMENTPROBEN</u>	11
<u>2.2.1</u>	<u>PROBENAHMESTATIONEN</u>	11
<u>2.2.2</u>	<u>EXTRAKTION UND FRAKTIONIERUNG</u>	12
<u>2.2.3</u>	<u>HSP70-STANDARD</u>	14
<u>2.2.4</u>	<u>HSP70-ANTIKÖRPER</u>	14
<u>2.3</u>	<u>INKUBATION UND AUFARBEITUNG DER ZELLEN</u>	15
<u>2.4</u>	<u>CYTOTOXIZITÄTSBESTIMMUNG MITTELS LACTATDEHYDROGENASE-ASSAY</u>	16
<u>2.5</u>	<u>QUANTIFIZIERUNG DES PROTEINGEHALTES</u>	17
<u>2.6</u>	<u>QUANTIFIZIERUNG DES HSP70-GEHALTES MITTELS ELEKTROPHORESE</u>	17
<u>2.6.1</u>	<u>NATRIUMDODECYLSULFAT-POLYACRYLAMIDGEL-ELEKTROPHORESE</u>	18
<u>2.6.2</u>	<u>SEMIDRY-BLOTTING</u>	18
<u>2.6.3</u>	<u>BRILLIANT BLACK FÄRBUNG</u>	18
<u>2.6.4</u>	<u>IMMUNFÄRBUNG</u>	19
<u>2.6.5</u>	<u>DENSITOMETRISCHE AUSWERTUNG</u>	19
<u>2.6.6</u>	<u>BERECHNUNG DES HSP70-GEHALTES</u>	20
<u>2.7</u>	<u>STATISTIK</u>	20
<u>3</u>	<u>ARBEITSPLAN</u>	21
<u>3.1</u>	<u>VORGEHEN IM METHODISCHEN TEIL</u>	21
<u>3.2</u>	<u>VORGEHEN IM ANALYTISCHEN TEIL</u>	22

<u>4</u>	<u>METHODISCHER TEIL</u>	23
<u>4.1</u>	<u>VALIDIERUNG DER SDS-PAGE/IB ZUR HSP70-BESTIMMUNG</u>	23
4.1.1	<u>ARBEITSBEREICH UND GRUNDKALIBRIERUNG</u>	24
4.1.2	<u>REPRODUZIERBARKEIT</u>	24
<u>4.2</u>	<u>FESTLEGUNG DER INKUBATIONSBEDINGUNGEN</u>	25
<u>4.3</u>	<u>PROTEOTOXIZITÄT VOM LÖSUNGSVERMITTLER UND LÖSUNGSMITTELN</u>	30
4.3.1	<u>DMSO ALS LÖSUNGSVERMITTLER</u>	30
4.3.2	<u>TOXIZITÄT DER VERWENDETEN LÖSUNGSMITTEL</u>	31
<u>4.4</u>	<u>VERGLEICH VON ABNAHME IM PROTEINGEHALT UND FREISETZUNG VON LDH ALS CYTOTOXIZITÄTSPARAMETER</u>	33
<u>5</u>	<u>ERGEBNISSE</u>	37
<u>5.1</u>	<u>BLINDWERTE</u>	37
<u>5.2</u>	<u>UNTERSUCHUNG VON SEDIMENTROHEXTRAKTEN</u>	37
5.2.1	<u>AUFNAHME VON DOSIS-WIRKUNGSKURVEN</u>	37
<u>5.3</u>	<u>UNTERSUCHUNG VON FRAKTIONEN AUS DER BDF</u>	40
5.3.1	<u>HSP70-INDUKTION DURCH DIE ROHEXTRAKTE (STUFE I)</u>	40
5.3.2	<u>HSP70-INDUKTION DURCH DIE GPC-FRAKTIONEN DER STUFE II</u>	42
5.3.3	<u>HSP70-INDUKTION DURCH DIE HPLC-FRAKTIONEN DER STUFE III</u>	43
5.3.4	<u>HSP70-INDUKTION DURCH DIE HPLC-FEINFRAKTIONEN DER STUFE IV</u>	43
<u>5.4</u>	<u>PROTEOTOXIZITÄT VON AUSGEWÄHLTEN EINZELSUBSTANZEN AUS DEN PROBEN</u>	44
5.4.1	<u>PROTEOTOXIZITÄT VON PAK, HETERO-PAK UND DEREN ABBAUPRODUKTEN</u>	45
5.4.2	<u>PROTEOTOXIZITÄT VON CHLORIERTEN UND BROMIERTEN VERBINDUNGEN</u>	49
5.4.3	<u>PROTEOTOXIZITÄT VON PHOSPHORORGANISCHEN VERBINDUNGEN</u>	50
5.4.4	<u>PROTEOTOXIZITÄT WEITERER SUBSTANZEN</u>	51
<u>5.5</u>	<u>BEITRAG DER ALS PROTEOTOXISCH IDENTIFIZIERTEN SUBSTANZEN ZU DEN EFFEKTEN IN DEN FRAKTIONEN</u>	53
<u>6</u>	<u>DISKUSSION</u>	56
<u>6.1</u>	<u>EIGNUNG DER EPC-ZELLINIE</u>	56
6.1.1	<u>VERGLEICH DER EMPFINDLICHKEIT MIT LITERATURDATEN</u>	56
<u>6.2</u>	<u>VERLAUF DER DOSIS-WIRKUNGSKURVEN</u>	57
<u>6.3</u>	<u>UNTERSUCHUNG DER SEDIMENTROHEXTRAKTE</u>	60
6.3.1	<u>VERGLEICH DES PROTEOTOXISCHEN POTENTIALS DER SEDIMENTROHEXTRAKTE</u>	61
6.3.2	<u>KORRELATION ZWISCHEN PROTEOTOXIZITÄT UND SCHADSTOFFBELASTUNG</u>	62
<u>6.4</u>	<u>UNTERSUCHUNG DER EXTRAKTE UND FRAKTIONEN AUS DER BDF</u>	66
6.4.1	<u>GPC-FRAKTIONEN</u>	67

6.4.2 HPLC-FRAKTIONIERUNG	67
6.4.3 HPLC-FEINFRAKTIONIERUNG	70
6.5 PROTEOTOXIZITÄT VON EINZELSUBSTANZEN	71
6.5.1 PAK, HETERO-PAK UND DEREN ABBAUPRODUKTE	71
6.5.2 HALOGENIERTE VERBINDUNGEN	73
6.5.3 PHOSPHORORGANISCHE VERBINDUNGEN	74
6.5.4 WEITERE SUBSTANZEN	75
6.6 HSP70-INDUKTION ALS BESTANDTEIL EINER BIOTESTBATTERIE	76
6.6.1 VERGLEICH DER ERGEBNISSE MIT DEN ERGEBNISSEN ANDERER BIOTESTS	77
6.6.2 STELLUNG DER HSP70-INDUKTION IN DER BIOTESTBATTERIE	80
6.7 HSP70-INDUKTION ALS INDIKATOR EINER PROTEOTOXIZITÄT IN DER BDF	82
7 ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY	84
<hr/>	
7.1 ZUSAMMENFASSUNG	84
7.2 SUMMARY	86
8 ANHANG	88
<hr/>	
8.1 METHODEN	88
8.1.1 AUFARBEITUNG UND INKUBATION DER ZELLEN	88
8.1.2 LACTATDEHYDROGENASE-BESTIMMUNG	89
8.1.3 PROTEINBESTIMMUNG	90
8.1.4 HSP70-BESTIMMUNG MITTELS SDS-PAGE/IB	91
8.2 DATEN ZU DEN SEDIMENTPROBEN	96
8.3 ERGEBNISTABELLEN	97
8.4 CHEMIKALIENLISTE, GERÄTE, VERBRAUCHSMITTEL, ZUBEHÖR	110
8.4.1 CHEMIKALIENLISTE	110
8.4.2 GERÄTE	111
8.4.3 VERBRAUCHSMITTEL UND ZUBEHÖR	111
9 LITERATURVERZEICHNIS	112
<hr/>	

Abkürzungsverzeichnis

A.E.	Flächeneinheiten
AP	Abnahme im Proteingehalt
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BdF	Biotest-geleitete Fraktionierung (Bioassay directed Fractionation)
Bidest.	Bidestilliert
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
CKW	Chlorierte Kohlenwasserstoffe
CV	Verfahrensvariationskoeffizient
DMSO	Dimethylsulfoxid
DONS	Diocetylnatriumsulfosuccinat
EC	Effect concentration
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPA	Environmental Protection Agency
EPC	<i>Epithelioma Papulosum Cyprini</i>
FKS	Fötale Kälberserum
GPC	Gelpermeationschromatographie
HCH	1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan
HF	Hauptfraktion
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (High Performance Liquid Chromatography)
HRP	Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase)
HSE	Hitzeschock-Element
HSF	Hitzeschock-Faktor
Hsp	Hitzeschockprotein
IB	Immunoblot
IgG	Immunoglobulin
ISIS	Identifizierung sedimentgebundener Schadstoffe
KW	Kontrollwert
LC	Tödliche Dosis (lethal concentration)
LDH	Lactatdehydrogenase
MG	Molekulargewicht
NC	Nitrocellulose
NF	Nachfraktion
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAK	Polycyclische Aromatische Kohlenwasserstoffe
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PCB	Polychlorierte Biphenyle
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodiumdodecylsulfate)
SN	Signifikanzniveau
TC	Gesamtkohlenstoff (Total Carbon)
TIE	Toxicity Identification Evaluation
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TOC	Organischer Kohlenstoff (Total Organic Carbon)
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
VF	Vorfraktion
WG	Wassergehalt

1 EINLEITUNG

1.1 PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT

In den letzten Jahrzehnten hat die Menge und Anzahl an Chemikalien, die jährlich hergestellt und in die Umwelt entlassen werden, drastisch zugenommen: Während die weltweite Produktion an organischen Chemikalien sich im Jahr 1930 noch auf ca. 1 Millionen t belief, werden mittlerweile 400 Millionen t jährlich produziert (RÄBIGER, 2002). Im Chemical Abstract Service der American Chemical Society waren Anfang September 2002 mehr als 20 Millionen Chemikalien registriert (CHEMICAL ABSTRACT SERVICE, 2002), von denen schätzungsweise 63 000 im täglichen Gebrauch sind (HENSCHLER, 1989). Die Zunahme an neuen synthetischen Substanzen beläuft sich auf 200 bis 1000 pro Jahr (MORIARTY, 1993).

Ein Großteil anthropogener Substanzen gelangt auf unterschiedlichen Wegen wie z.B. den Eintrag über Flüsse oder die Landwirtschaft in die marine Umwelt und führt zu einer hohen Belastung dort lebender Organismen. Besonders Sedimente spielen aufgrund ihrer Eigenschaft als Schadstoffsene eine große Rolle.

Zur Erfassung der Belastung in marinen Lebensräumen werden eine Reihe von Schadstoffen, die für ihre Toxizität bzw. ihre Persistenz bekannt sind, im Rahmen von nationalen und internationalen Monitoringprogrammen untersucht. Eine vollständige chemische Datenerfassung ist jedoch aufgrund der Vielzahl an Substanzen nicht möglich. Zudem ist die Aussagekraft von chemischen Untersuchungen für die ökotoxikologische Bewertung nicht ausreichend, da bisher weniger als 1 % der produzierten chemischen Stoffe auf ihre Toxizität für aquatische Organismen untersucht sind und die Untersuchungen somit keine Zuordnung der beobachteten biologischen Effekte zu einzelnen Schadstoffen erlauben. Die Verbindung von chemischen Daten und biologischen Untersuchungen wird zudem durch Wechselwirkungen innerhalb eines Schadstoffgemisches in Form von synergistischen und antagonistischen Effekten, sowie die Bildung von Metaboliten, die häufig ein weit höheres toxisches Potential als die Ausgangssubstanz aufweisen, erschwert (MARTELL ET AL., 1988; MCCARTHY UND SHUGART, 1990). Die Kenntnis über die verantwortlichen Substanzen ist jedoch Voraussetzung, um ein sinnvolles und effektives Schadstoffmonitoring betreiben bzw. Maßnahmen zum Abbau der Belastung ergreifen zu können.

Um sich diesem Problem zu nähern, wurde für die Untersuchung von Abwässern vor etwa einem Jahrzehnt von der US Environmental Protection Agency (EPA) das sogenannte „TIE-Konzept“ (Toxicity Identification Evaluation) entwickelt. Das Konzept verknüpft toxikologische Untersuchungen mit chemischer Analytik. Ein wesentlicher Bestandteil ist dabei die Fraktionierung der Proben zur Verringerung ihrer Komplexität.

Angelehnt an das Konzept ist die Vorgehensweise der biotestgeleiteten Fraktionierung (BdF). Dabei wird das Ziel verfolgt, komplexe Matrices durch die biotestgeleitete Fraktionierung in ihrer Komplexität soweit zu verringern, dass durch Kombination von Biotest und chemischer Analytik die Zuordnung von Ursache und Wirkung ermöglicht wird (FERNÁNDEZ ET AL., 1992; BRAUNBECK ET AL., 1997a).

Vor dem Hintergrund, das Konzept der BdF im marinen Bereich anzuwenden, wurde das Projekt „ISIS“ (Identifizierung sediment-gebundener Schadstoffe), in dessen Rahmen diese Arbeit entstanden ist, vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) gefördert. In diesem Projekt sollten gemäß des BdF-Konzeptes analytische Methoden mit toxikologischen Untersuchungen kombiniert werden. Dabei wurden unterschiedliche Biotest für eine Biotestbatterie ausgewählt mit dem Ziel, eine große Bandbreite von toxikologischen Wirkmechanismen wie beispielsweise Mutagenität, Genotoxizität, hormonelle Wirksamkeit, Embryotoxizität, Neurotoxizität oder auch Proteotoxizität zu erfassen.

Als Parameter zur Bestimmung von proteotoxischen Wirkungen wird häufig die Induktion von Hitzeschockprotein70 (Hsp70) herangezogen. Eine verstärkte Hsp70-Synthese wurde bereits in zahlreichen Studien und unterschiedlichsten Organismen für eine Vielzahl an chemischen Substanzen nachgewiesen (SALMINEN ET AL., 1996; BIERKENS ET AL., 1998; SCHRÖDER ET AL., 1999; KILEMADE UND MOTHERSILL, 2001). Zudem ist der Einsatz von Hsp70 als Biomarker im biologischen Effektmonitoring in der Literatur oft erwähnt (WILLIAMS ET AL., 1996; WERNER ET AL., 1998). In der BdF dagegen wurde er bisher nicht beschrieben.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, zu überprüfen, ob sich die Hsp70-Induktion zur Detektion von proteotoxischen Effekten in der BdF eignet. Als Organismus für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurde die permanente Zelllinie *Epithelioma Papulosum Cyprini* (EPC) aus einem Hauttumor vom Karpfen (*Cyprinus Carpio* L.) gewählt.

Die Schwerpunkte der Arbeit lagen zum einen darin, den Test an die gewählte Zelllinie und den Anforderungen der BdF anzupassen. Dazu gehört in erster Linie die Festlegung der optimalen Testbedingungen, um bei guter Durchführbarkeit und einfacher Handhabbarkeit eine möglichst große Empfindlichkeit zu gewähren, sowie zu testen, welchen Einfluss Lösungsmittel und Lösungsvermittler aus der Probenaufarbeitung auf den Test haben.

Zum anderen sollte der Test an einigen Sedimentproben aus Nord- und Ostsee in der BdF eingesetzt werden, um anschließend eine Aussage über die Anwendbarkeit und die Eignung des Tests treffen zu können. Anhand einer statistischen Zusammenführung der Daten aller im Projekt durchgeführten Biotests sollte zudem die Stellung des durchgeführten Testsystems in der Biotestbatterie beurteilt werden.

1.2 BIOTESTGELEITETE FRAKTIONIERUNG

Um Maßnahmen in Form von Anwendungsbeschränkungen oder einem gezielten Monitoring ergreifen zu können, ist es wichtig, die toxisch relevanten Substanzen zu kennen. Die wirksamste Methode, diese Substanzen zu identifizieren, ist die Kombination aus biologischen Testsystemen und chemischer Analytik in einer BdF (SAMOILOFF ET AL., 1983; GRIFOLL ET AL., 1990; HO UND QUINN, 1993; BRACK ET AL., 1999). Die BdF ist angelehnt an das von der EPA entwickelte TIE-Konzept zur Untersuchung von Abwasserproben.

Das Prinzip dieses Konzeptes beruht dabei auf der Verringerung der Komplexität von Umweltproben durch wiederholte Fraktionierung, der Detektion von toxischen Fraktionen mittels biologischer Testsysteme und der Identifizierung von Substanzen durch chemische Analytik (ANKLEY ET AL., 1992). Durch diese Vorgehensweise können die problematischen Substanzklassen oder sogar die Substanzen selbst identifiziert werden, die für die biologische Wirksamkeit der Probe verantwortlich sind. Abb. 1 stellt das Prinzip schematisch dar.

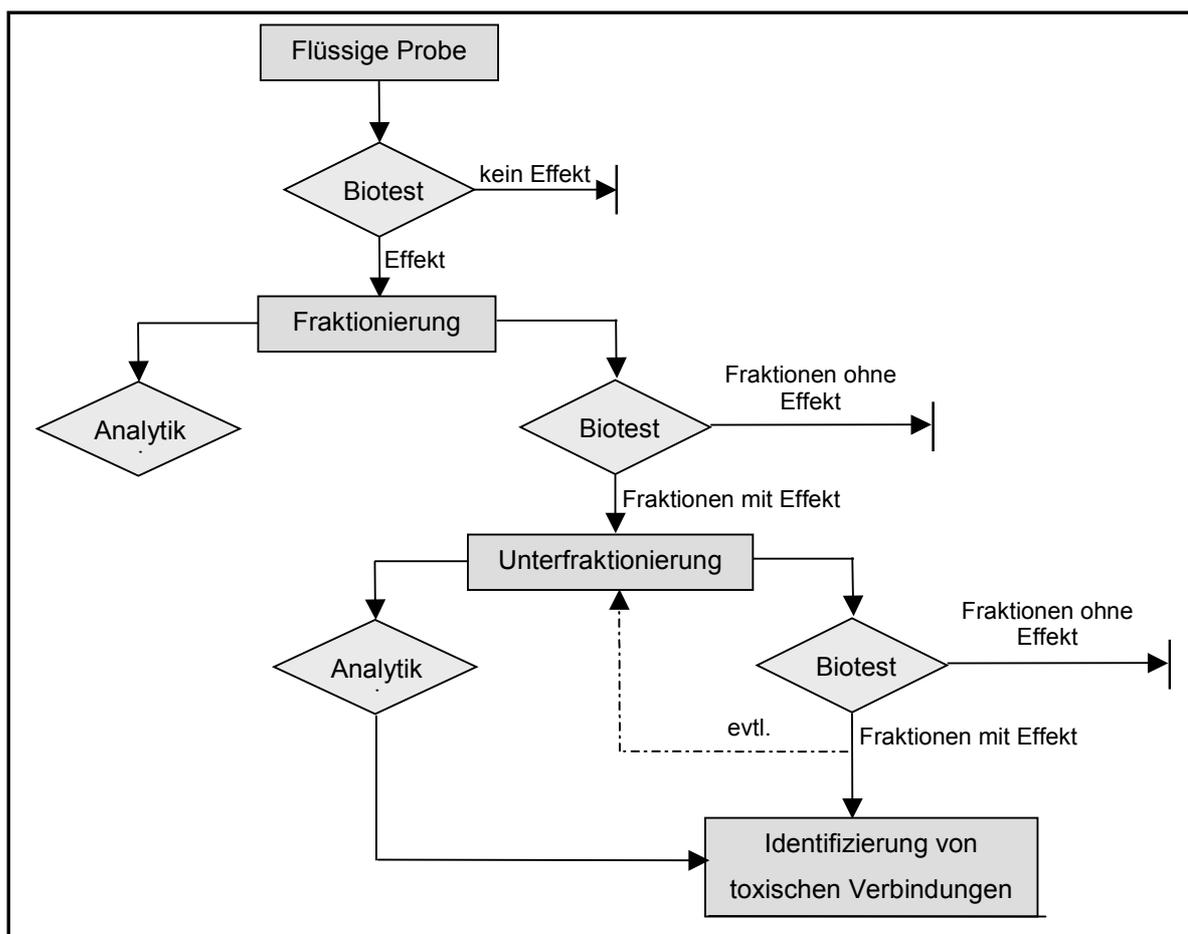


Abb. 1 – Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Identifizierung toxischer Verbindungen anhand der BdF und chemischer Analytik

Während wässrige Proben direkt zur Fraktionierung eingesetzt werden können, müssen die Schadstoffe aus festen Proben wie Sedimenten in Lösung gebracht werden. Möglich ist dies durch Abtrennung und Testen von Porenwasser, durch das Herstellen wässriger Eluate oder durch Extraktion mit organischen Lösungsmitteln. Porenwasser und wässrige Eluate haben den Nachteil, dass nur die darin enthaltenen Schadstoffe meist hydrophilen Charakters Berücksichtigung finden, während bei Organismen, die an Sedimente exponiert werden, auch eine Aufnahme über den Kontakt mit dem Sediment und eine direkte Aufnahme erfolgt (HARKEY ET AL., 1994). Die Extraktion der Sedimente mit organischen Lösungsmitteln dagegen führt zu einer nahezu vollständigen Erfassung der organischen Substanzen, lässt jedoch die Bioverfügbarkeit der extrahierten Substanzen außer acht. Aus diesem Grund eignet sich dieser Ansatz für die Identifizierung möglicher Schadstoffe, lässt jedoch keine Aussage über die Toxizität des Sediments zu. Für die Abschätzung der ökotoxikologischen Relevanz müssten Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit durchgeführt werden.

Für die anschließende Fraktionierung werden häufig säulenchromatographische Methoden wie die Gelpermeationschromatographie (GPC) oder die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) an Normal- oder Umkehrphasen durchgeführt. Die Identifizierung der Substanzen erfolgt meistens mit massenspektrometrischen Methoden.

Das Konzept der BdF findet in der Ökotoxikologie bereits vielfach Anwendung. NISHIOKA ET AL. nutzten es schon 1988, um in Luftpartikeln hydroxylierte Nitroaromaten und hydroxylierte Nitro-PAK (Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe) als mutagen wirksam zu charakterisieren. AMATO ET AL. (1992) identifizierten mit Hilfe des TIE-Konzeptes Diazinon als Schadstoff in Abwasserproben. KOSIAN ET AL. (1998) wendeten die BdF auf Porenwasser von Sedimenten an und konnten darin neun PAK, die nach Bestrahlung mit UV-Licht toxisch wirkten, identifizieren.

1.3 BIOLOGISCHE TESTSYSTEME

Zur Herabsetzung des Gefährdungspotentials für Mensch und Umwelt wurden auf nationaler und internationaler Ebene Gesetze und Richtlinien erlassen, die Untersuchungen zur Toxizität von neu entwickelten Substanzen sowie von Abwässern vorschreiben. In der Bundesrepublik Deutschland sind derartige Bestimmungen für den aquatischen Bereich im Rahmen des Wasserhaushalts-, Chemikalien- und Abwasserabgabengesetzes sowie zugehörigen DIN-Normen und übergeordneten Richtlinien der Europäischen Gemeinschaft geregelt (BRAUNBECK ET AL., 1997b). Doch auch in anderen Bereichen der Ökotoxikologie finden toxikologische Untersuchungen immer häufiger Anwendung, da erkannt wurde, dass rein chemische Untersuchungen nicht ausreichend sind.

Gemäß der Rahmen-Abwasser-Verwaltungsvorschrift (1996) findet hauptsächlich der akute Fischtest Anwendung, aber auch Tests mit Wasserflöhen (Daphnien), Leuchtbakterien und Algen werden durchgeführt (SCHULZ ET AL., 1995). Für den akuten Fischtest werden nach Angaben des Bundesministeriums für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft jährlich etwa 200.000 Fische eingesetzt. Ermittelt werden sogenannte LC₅₀-Werte (lethal concentration), die nach 96 Stunden Expositionszeit für 50 % der Population letal sind. Die alleinige Erfassung von letalen Dosen macht den akuten Fischtest relativ unempfindlich, da bei der Gewässerbelastung und Schadstoffeinträgen in das Ökosystem vor allem subletale und chronische Effekte eine Rolle spielen. Zudem treten häufig Probleme in der Standardisierbarkeit und im Zusammenhang damit in der Reproduzierbarkeit der Untersuchungen auf. Neben ethischen und tierschutzrechtlichen Aspekten sind dies Gründe dafür, dass ständig nach Alternativen geforscht wird (SEGNER UND LENZ, 1993; BRAUNBECK ET AL., 1997b).

Für die Untersuchung von Sedimenten wurden in den letzten Jahren eine Reihe von Testsystemen entwickelt. Man unterscheidet dabei zwischen *in vivo*- und *in vitro*-Testsystemen. Bei den *in vivo*-Testsystemen handelt es sich in der Regel um Kontakttests, bei denen niedere Lebewesen wie Schnecken, Muscheln oder Amphipoden dem Sediment direkt ausgesetzt werden (DJOMO ET AL., 1996; WERNER ET AL., 1998; HOPKINS ET AL., 2000). Bei *in vitro*-Testsystemen werden meistens Bakterien oder Zellkulturen verwendet und diese mit Sedimentextrakten exponiert (SALIZZATO ET AL., 1997; JOHNSON UND LONG, 1998). Für die Untersuchung von Extrakten und Fraktionen aus der BdF kommen dabei fast ausschließlich nur *in vitro*-Testsysteme in Frage.

Tab. 1 – Überblick über Messparameter zur Detektion von subletalen Effekten

Messparameter	Angezeigte Wirkung	Quellen
Induktion von Proteinreparaturmechanismen	Proteotoxizität	BIERKENS ET AL. (1998)
DNA-Schäden	Genotoxizität	GAGNE UND BLAISE (1995)
Änderungen im zellulären Redox-System	Oxidativer Stress	DESCAMPIAUX ET AL. (1999)
Veränderung des Erbmateri-als	Mutagenität	VAHL ET AL. (1997)
Missbildungen bei Embryonen	Embryotoxizität	LANGE ET AL. (1995)
Wirkungen auf Rezeptoren	Hormonelle Wirkungen	PONS ET AL. (1990)
Einfluss auf Neurotransmitter	Neurotoxizität	PAYNE ET AL. (1996)
Änderungen im Energiestatus	Störung des Energiehaushaltes	SALIZZATO ET AL. (1997)

Neben letalen Effekten werden anhand von biologischen Testsystemen auch subletale Effekte erfasst, indem nach Beendigung der Exposition unterschiedlichste Parameter auf zellulärer oder biochemischer Ebene als Indiz für eine schädigende Wirkung untersucht werden. Tab. 1 fasst einige dieser möglichen Parameter sowie damit angezeigte Wirkungen zusammen und gibt zugleich einen Überblick über die im „ISIS“-Projekt untersuchten toxikologischen Wirkmechanismen.

Die Verwendung von kultivierten Fischzellen gewinnt für die Untersuchung von marinen und limnischen Proben immer mehr an Bedeutung (DESCAMPIAUX ET AL., 1999). Dabei muss man zwischen primären und permanenten Zelllinien unterscheiden: Primäre Zellkulturen werden aus frisch isolierten Zellen, wie z.B. Hepatozyten kultiviert und sind einige Tage lebensfähig (GAGNÉ UND BLAISE, 2000). Der Verbrauch an Versuchstieren wird im Vergleich zum akuten Fischtest um 90 % reduziert (BRAUNBECK ET AL., 1997a). Der Vorteil von primären Zellkulturen liegt in ihrer zumeist noch vollständig vorhandenen metabolischen Aktivität, z.B. in Form von Phase I-Enzymen, die eine wichtige Rolle im Fremdstoffmetabolismus spielen. Substanzen wie Benz[a]pyren entfalten erst nach Metabolisierung ihr toxisches Potential, so dass für die Untersuchung solcher Substanzen die Verwendung metabolisch aktiver Testorganismen zwingend erforderlich ist (HIGHTOWER UND RENFRO, 1988; BAKSI UND FRAZIER, 1990).

Im Vergleich zu den primären Zelllinien kann bei Verwendung von permanenten Zellkulturen nahezu vollständig auf Versuchstiere verzichtet werden. Permanente Zelllinien werden aus unterschiedlichen Organen oder Tumoren an- und über viele Generationen weitergezüchtet. Eine nur noch gering vorhandene metabolische Aktivität führt dazu, dass sie in ihren Eigenschaften sehr stabil sind. Die Untersuchung von Schadstoffen, die erst nach Metabolisierung aktiv sind, ist jedoch aus diesem Grund nicht ohne weiteres möglich, sondern erfordert einen exogenen Zusatz von Enzymen (BAKSI UND FRAZIER, 1990; FERNÁNDEZ ET AL., 1992).

1.4 HITZESCHOCKPROTEIN70

1.4.1 ALLGEMEINES

Die Hitzeschockantwort wurde erstmals 1962 von RITOSSA publiziert. Er entdeckte nach Temperaturerhöhung an den Riesenchromosomen in den Speicheldrüsen von Drosophila-Larven Aufblähungen, sogenannte „Puffs“. Diese Aufblähungen waren das erste Beispiel für eine Genexpression als Antwort auf Stressoren (RYAN, 1997).

TISSIÈRE ET AL. zeigten 1974, dass die hitzeinduzierte Puff-Bildung mit einer steigenden mRNA-Synthese und der Synthese einer Gruppe von Proteinen korrelierte, die sie aufgrund ihres auslösenden Faktors als Hitzeschockproteine bezeichneten. Gegen Ende der 70er Jahre waren Hsp bei vielen verschiedenen Organismen (Archae- und Eubakterien, niedere Pilze, Pflanzen, Menschen und Tiere) nachgewiesen worden und man geht davon aus, dass sie ubiquitär vorkommen (HIGHTOWER, 1993).

Mittlerweile sind neben Hitze eine Reihe weiterer Stressoren (UV-Licht, Schwermetalle, Alkohole, Xenobiotika), die zur Hsp-Expression führen, bekannt, so dass die gewählte Bezeichnung heute irreführend ist. Man zählt sie zur Gruppe der Stressproteine bzw., da sie auch im ungestressten Zustand in der Zelle essentielle Funktionen besitzen, zur Gruppe der Chaperone (Begleitproteine) (HIGHTOWER UND WHITE, 1981; SANDERS, 1993).

Hsp werden nach ihrem Molekulargewicht (MG) in kDa in vier Klassen eingeteilt (Hsp60, Hsp70, Hsp90 und „kleine“ Hsp mit einer molaren Masse zwischen 15 und 30 kDa). Jede Klasse besteht wiederum aus mehreren Isoformen. Hsp weisen mit 60-78 % übereinstimmenden Aminosäuren innerhalb einer Klasse und mit 40 % zwischen den Klassen eine hohe Homologie auf (LINDQUIST UND CRAIG, 1988; EDWARDS ET AL., 1990). Die einzelnen Isoformen unterscheiden sich in ihrer Substratspezifität und ihrer Funktion. Zudem unterscheidet man zwischen konstitutiv gebildeten Isoformen, die auch im ungestressten Zustand eine Funktion besitzen und daher permanent vorhanden sind, und stressinduzierbaren Formen (BIERKENS ET AL., 1998).

Im Folgenden soll nur näher auf die Hsp70-Familie eingegangen werden, da diese Gegenstand der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen waren.

1.4.2 STRUKTUR UND VORKOMMEN

Die Hsp70-Familie ist die größte und am besten untersuchte aller Stressproteinfamilien mit der am höchsten konservierten Struktur. Es wurden in den unterschiedlichsten Organismen 21 Proteine, die zu dieser Familie gehören, charakterisiert.

Hsp70 kommen in zahlreichen Zellkompartimenten, wie Mitochondrien, Cytosol und dem Endoplasmatischen Retikulum vor (NOVER, 1991).

Bei Hsp70 handelt es sich um Adenosintriphosphatasen, die aus einer hochkonservierten nucleotidbindenden aminoterminalen Domäne mit hoher Affinität zu Adenosin-5'-triphosphat (ATP) und einer carboxyterminalen Domäne, die zu Interaktionen mit verschiedenen Proteinstrukturen befähigt ist, bestehen. Die aminoterminal Domäne besteht aus 385 und die carboxyterminale Domäne aus 145 Aminosäuren (FLAHERTY ET AL., 1990; ZUH ET AL., 1996; MUN ET AL., 2000).

1.4.3 FUNKTION

Funktion im ungestressten Zustand

In zahlreichen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Hsp an der korrekten Faltung und Stabilisierung naszierender und partiell denaturierter Proteine, am Transport von Proteinen durch Membranen und am Zusammenbau oligomerer Proteinstrukturen beteiligt sind. Aus diesem Grund werden Hsp zur Gruppe der molekularen Chaperone gezählt. Chaperone verhindern Interaktionen zwischen partiell denaturierten Proteinen und hier vermutlich zwischen exponierten hydrophoben Bereichen, die dann zu irreversiblen Inaktivierungen durch Aggregatbildung führen. Diese Aufgaben werden in Zusammenarbeit mit weiteren Chaperonen und Enzymen durchgeführt (RUTHERFORD UND ZUKER, 1994; HARTL, 1996).

Gemäß den heutigen Vorstellungen bindet Hsp70 mit der carboxyterminalen Domäne Proteinsubstrate und ändert oder bewahrt durch diese Bindung deren Konformation oder erlaubt Interaktionen mit anderen Proteinen. Voraussetzung für die Freisetzung der gebundenen Proteinsubstrate ist die Hydrolyse von ATP (LANGER UND NEUPERT, 1991; HARTL ET AL., 1992).

Funktion im gestressten Zustand

Ein primärer Toxizitätsmechanismus, verursacht durch nachteilige physikalische oder chemische Konditionen, ist die Denaturierung von Proteinen aufgrund der Schwächung von polaren Bindungen und die daraus resultierende Exposition von hydrophoben Gruppen. Dieser Mechanismus führt zu missgefalteten und aggregierten Proteinen. HIGHTOWER führte 1991 analog zur Genotoxizität den Begriff „Proteotoxizität“ ein.

Die Funktion von Hsp70 im gestressten Zellzustand hat zum Ziel, die Zelle vor proteotoxischen Schäden zu schützen. Dazu findet eine verstärkte Biosynthese dieser Proteine statt.

Cytoplasmisches Hsp70 wandert zum Zellkern und bindet an Pre-Ribosomen und andere Proteinkomplexe, um sie vor Denaturierung zu schützen (GETHING UND SAMBROOK, 1992). Zudem verhindern sie die Bildung von unlöslichen Proteinaggregaten bzw. brechen schon vorhandene Proteinaggregate auf und ermöglichen geschädigten Proteinen eine korrekte Faltung und somit die Erhaltung ihrer biologischen Aktivität (ELLIS, 1990). Irreversibel geschädigte Proteine werden letztendlich zum Abbau zu den Lysosomen transportiert (CHIANG ET AL., 1989).

Eine verstärkte Hsp70-Induktion schützt die Zelle dabei nicht nur zum Zeitpunkt der Expression vor Schäden, sondern sie tolerieren auch innerhalb eines bestimmten Zeitraumes nach der Expression erhöhten Stress, der ohne vorherige Hsp70-Induktion möglicherweise letale Folgen gehabt hätte. Führt diese, durch subletale Temperaturen erlangte Toleranz dazu, dass normalerweise letale

Temperaturen überlebt werden können, spricht man von einer sogenannten „Thermotoleranz“. Als „erlangte Toleranz“ bezeichnet man eine erhöhte Toleranz gegenüber anderen stressauslösenden Faktoren. Den Begriff „Crosstoleranz“ verwendet man, sofern eine erhöhte Toleranz nicht nur gegenüber dem auslösenden Faktor vorhanden ist (LINDQUIST UND CRAIG, 1988; SANDERS, 1993).

1.4.4 GENETISCHE REGULATION DER HITZESCHOCKANTWORT

Die Regulation der Hitzeschockantwort erfolgt bei allen Organismen durch einen Aktivator der Transkription. Prokaryontische und eukaryontische Zellen besitzen unterschiedliche Aktivatoren, wobei an dieser Stelle nur auf die eukaryontischen Zellen eingegangen werden soll.

Die Aktivierung der Hitzeschock-Gene erfolgt durch den sogenannten Hitzeschock-Faktor (HSF), der an einem Abschnitt der DNA stromaufwärts vom Promotor des Hitzeschock-Gens bindet. Diese Bindungsstelle wird als Hitzeschock-Element (HSE) bezeichnet. In ungestressten Zellen liegt der HSF sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern in einer monomeren Form, die nicht an DNA binden kann, vor. Als Antwort auf Stress bildet der HSF aktive Trimere, die im Zellkern akkumulieren, bindet an das HSE und aktiviert somit die Transkription der Hitzeschock-Gene. Beendet wird die Hitzeschock-Antwort durch die Konversion der trimeren in die monomere Form des HSF (MORIMOTO ET AL., 1992).

Die Regulierung der Aktivität des HSF erfolgt über Hsp, die in Abwesenheit von Stress bevorzugt mit HSF-Monomeren interagieren und somit die Trimerbildung unterbinden. Nach Einwirkung von Stress wird in den Zellen die Konzentration an missgefalteten und aggregierten Proteinen, die mit dem HSF um die Hsp konkurrieren, erhöht. Die Menge an freiem Aktivator steigt; es kommt zur Trimerbildung und somit zur Transkription der Hitzeschock-Gene. Nach der „Reparatur“ der missgefalteten und aggregierten Proteine können die Hsp wieder mit dem HSF interagieren und die Hitzeschockantwort wird abgeschaltet (CRAIG UND GROSS, 1991; MORIMOTO ET AL., 1992).

Von großer Bedeutung für die Hsp70-Bestimmung zur Detektion von proteotoxischen Effekten ist die Abhängigkeit der Hsp70-Expression vom Ausmaß der Schädigung. In der Regel besteht eine Korrelation zwischen Hsp70-Gehalt und Stressorkonzentration.

1.4.5 UNTERSUCHUNGEN ZU HSP70 IN DER ÖKOTOXIKOLOGIE

Neben Untersuchungen zu Hsp70 im medizinischen und pharmazeutischen Bereich wie beispielsweise Untersuchungen zur Toxizität von Ochratoxin A (BARIŠIĆ ET AL., 2002), zur Neurotoxizität (RAJDEV UND SHARP, 2000) oder zur Induktion von Hsp70 während einer Mittelohrentzündung (EGUSA ET AL., 1995) gibt es zahlreiche Studien im ökotoxikologischen Bereich.

Gegenstand der Untersuchungen sind oft einzelne Xenobiotika, die wirtschaftliche Bedeutung besitzen und daher in der Ökotoxikologie eine Rolle spielen. Bei den untersuchten Substanzen handelt es sich dabei meistens um Stoffe aus der Klasse der PAK, der Pestizide und der Schwermetalle. Beispielhaft seien an dieser Stelle einige Studien aufgeführt:

BIERKENS ET AL. (1998) führten an der Grünalge *Raphidocelis subcapitata* Untersuchungen zur Proteotoxizität der Schwermetalle Zink und Selen und der Pestizide Lindan, Pentachlorphenol und Carbaryl durch. Für alle Substanzen, ausgenommen Pentachlorphenol, wurde eine Hsp70-Induktion nachgewiesen. DYER ET AL. (1993) haben in der Fischart Dickkopfelnitz (*Pimephales promelas*) eine Hsp70-Induktion, ausgelöst durch Arsenit, Chromat, Lindan und Diazinon in umweltrelevanten Konzentrationen, gemessen. In der Roten Abalone (*Haliotis rufescens*) führte die Exposition mit Phenobarbital, Heptachlor und Pentachlorphenol zu einer Hsp70-Induktion (SNYDER ET AL., 2001). WERNER UND NAGEL (1997) exponierten drei Amphipodenarten mit Fluoranthen, Dieldrin und Diazinon und bestimmten in allen drei Arten unterschiedliche Stressantworten.

Sehr häufig sind Untersuchungen mit Cadmium als Stressor beschrieben. So führten beispielsweise NOVER (1991), OVELGÖNNE ET AL. (1995) und WERNER UND NAGEL (1997) Studien mit Cadmium in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen und an unterschiedlichen Organismen durch.

An Zellkulturen wurden ebenfalls schon Experimente bezüglich der Hsp70-Expression, induziert durch Schadstoffe, durchgeführt. KILEMADE UND MOTHERSILL (2001) inkubierten primäre Epidermiszellen der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) mit 2,4-Dichloranilin und RYAN (1997) inkubierte RTG-2- und CHSE-214-Zellen z.B. mit unterschiedlichen Schwermetallen, Tributylzinn und Arsenit.

Untersuchungen zu komplexeren Proben sind in der Literatur seltener beschrieben. VIJAYAN ET AL. (1998) exponierten Regenbogenforellen Abwässern von Papierbleichwerken und stellten in der Leber erhöhte Hsp70-Gehalte fest. MARIÑO ET AL. (1999) setzten Regenwürmer (*Lumbricus rubellus*) aus einem nicht kontaminierten Boden mehreren stark mit Schwermetallen belasteten Böden aus und stellten ebenfalls eine Hsp70-Induktion fest. WERNER ET AL. (1998) führten ein ähnliches Experiment mit Amphipoden an Sedimenten durch und haben Hsp70-Gehalte bestimmt, die teilweise mit der Schadstoffbelastung korrelierten.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 EPC-ZELLEN

Die Gewinnung der in dieser Arbeit verwendeten EPC-Zellen erfolgt aus einer durch Herpesviren induzierten hyperplastischen Läsion (Warze) auf der Haut des Karpfens (*Caprinus Carpio* L.). Es handelt sich bei den Zellen um eine permanente Zelllinie. EPC-Zellen sind über einen sehr weiten Temperaturbereich von 15 bis 33 °C wachstumsfähig. Bei geringeren Temperaturen (7-10 °C) können sie ohne Einschränkungen mehrere Monate überleben; Temperaturen oberhalb von 37 °C führen zum Absterben der Zellen (FIJAN ET AL., 1983). Die Zellen wachsen als adhärente Kulturen und bilden in dem Kulturgefäß einen Monolayer aus; d.h., nachdem der Boden des Kulturgefäßes in einer einfachen Lage bewachsen ist, stellen sie ihre Zellteilung ein. Der Vorteil der Zellen liegt neben ihrem weiten Wachstumsbereich in der hohen Teilungsrate von 1:10 (FIJAN ET AL., 1983) und der Unempfindlichkeit gegenüber geringen osmotischen Veränderungen (HASHIMOTO ET AL., 1999).

Die Kultivierung der Zellen wurde im Institut für Fischereiökologie der Bundesforschungsanstalt für Fischerei durchgeführt. Sie erfolgte in 25 cm²-Zellkulturflaschen in Eagle's Minimal Essential Medium mit einem Zusatz von 10 % fötalem Kälberserum (FKS), nicht-essentiellen Aminosäuren, Natriumpyruvat, Penicillin und Streptomycin bei einer Temperatur von 25 °C in einer 5 %igen CO₂-Atmosphäre. Nach Ausbildung des Monolayers wurden die Zellen zur Weiterkultivierung 1:10 in frisches Nährmedium umgesetzt. Ein vollständig ausgebildeter Monolayer bestand aus ca. 3 x 10⁶ Zellen und wurde je nach Vitalität der Zellen in ca. 4-14 Tagen erreicht (BJÖRKLUND ET AL., 1997; KAMMANN ET AL., 2000).

2.2 SEDIMENTPROBEN

2.2.1 PROBENAHMESTATIONEN

Die Sedimentproben wurden auf Ausfahrten des Forschungsschiffes „Gauss“ in den Jahren 2000 und 2001 an sieben Stationen von Nord- und Ostsee gezogen. Die Probenahme erfolgte gemäß der Verfahrensanweisung des Bundesamtes für Seeschifffahrt und Hydrographie (MURDOCK, 1991) mit einem Kastengreifer bzw. für die Stationen 5 und 7 mit einem zweikernigem Gemini-Corer. Die Stationen sind in Abb. 2 dargestellt. Die genauen Koordinaten sowie Angaben zum Kohlenstoff (TC)-, Stickstoff- und Wassergehalt (WG) und zum Gehalt an organischem Kohlenstoff (TOC) sind Tab. A5 Anhang 8.2 zu entnehmen.

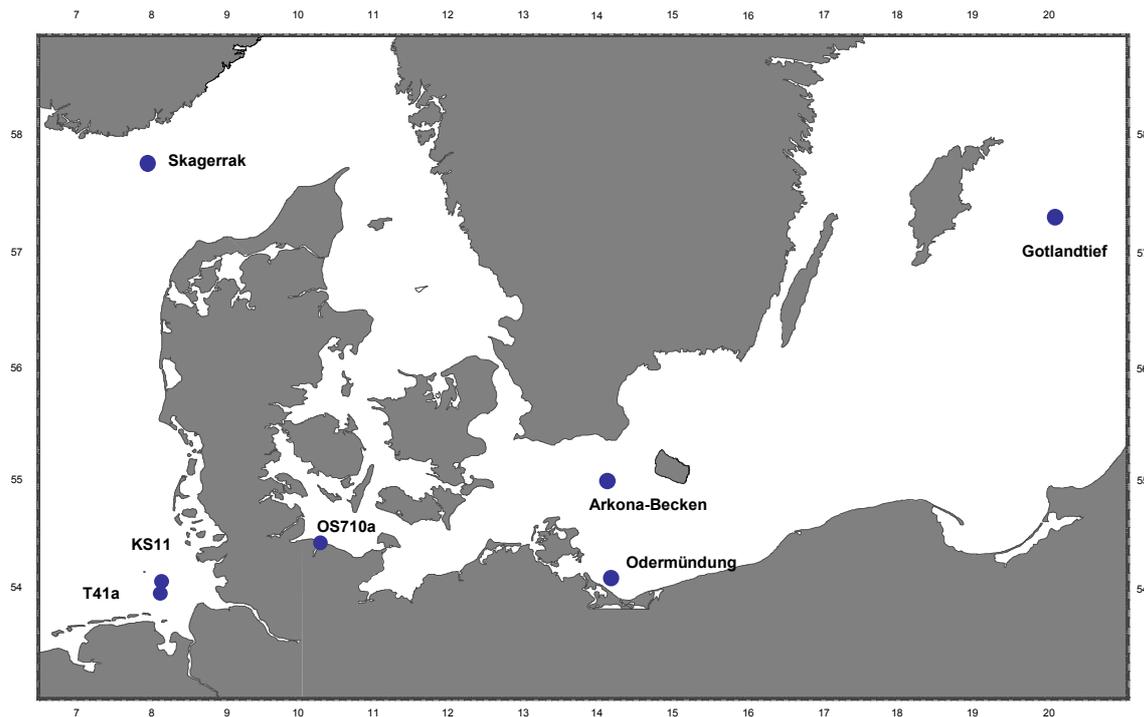


Abb. 2 – Stationskarte

2.2.2 EXTRAKTION UND FRAKTIONIERUNG

Extraktion und Fraktionierung der Proben wurden im Rahmen des ISIS-Projektes vom Teilprojekt P (Bundesamt für Seeschifffahrt und Hydrographie) und C3 (Universität Hamburg, Institut für Organische Chemie) durchgeführt.

Abb. 3 zeigt schematisch das Vorgehen zur Extraktion und Fraktionierung der Sedimentproben. Das Verfahren begann mit einer sequentiellen Extraktion mit Aceton und *n*-Hexan des Feuchtsedimentes nach Abtrennung von Porenwasser. Die verwendeten Extraktionsmittel deckten dabei einen weiten Polaritätsbereich ab, um möglichst viele Schadstoffe zu extrahieren. Anschließend wurden die Lösungsmittel vereint und die wässrige Phase ausgefroren. Dadurch wurden stark polare Substanzen bzw. Schwermetalle zum Teil schon entfernt. Für die zweite Stufe erfolgte eine Trennung mittels GPC, um makromolekulare Bestandteile biogenen Ursprungs und Huminstoffe in der Vorfraktion (VF) sowie elementaren Schwefel in der Nachfraktion (NF) abzutrennen.

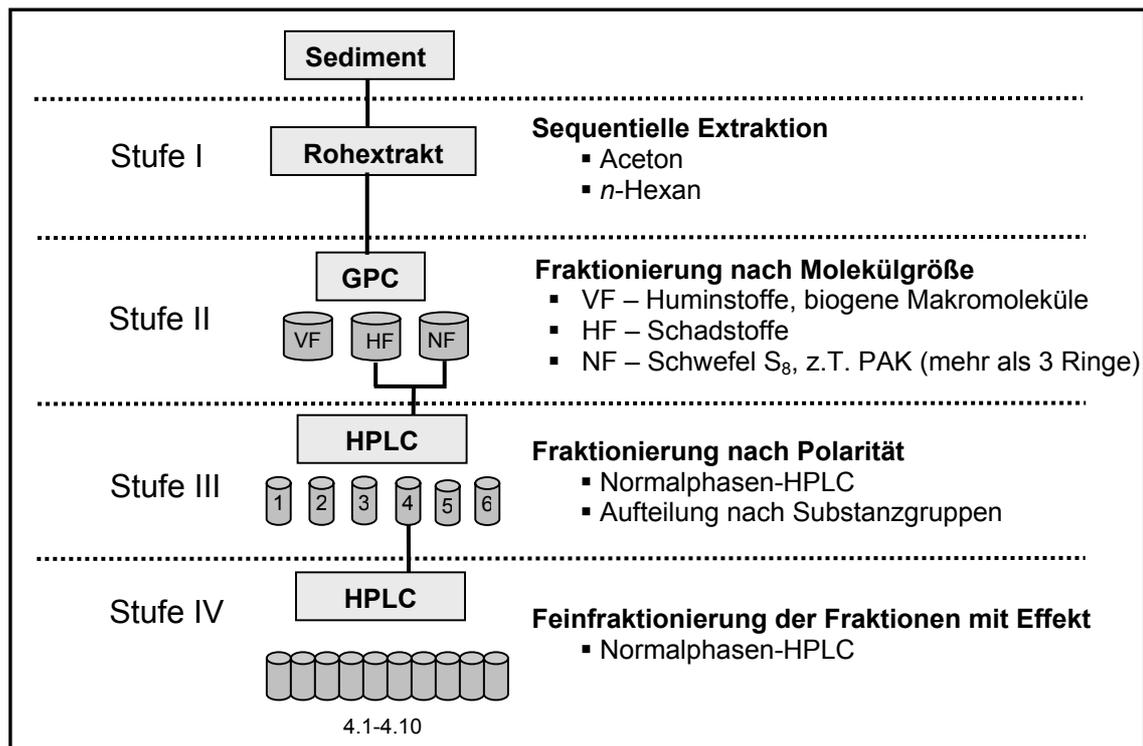


Abb. 3 – Vorgehensweise zur Extraktion und Fraktionierung der Sedimentproben

In der Hauptfraktion (HF) befand sich der Großteil an anthropogenen Schadstoffen. Die GPC erfolgte an Biobead SX3 mit Ethylacetat/*cyclo*-Hexan im Verhältnis 1:1 (v:v) als Laufmittel. Die dritte und vierte Stufe wurden jeweils mittels HPLC an einer modifizierten Kieselgelsäule (Cyanopropyl-Phase) mit *n*-Hexan, Dichlormethan und Methanol als Elutionsmittel durchgeführt. Die Trennung erfolgte nach Polarität der Schadstoffe in unterschiedliche Substanzklassen. Die Feinfraktionierung (Stufe IV) wurde von den Fraktionen der Stufe III, die einen positiven Response im Biotest ergaben, durchgeführt und folgte damit der BdF. Im Vergleich zur dritten Stufe wurden hier lediglich die Schnittzeiten im entsprechenden Bereich verkürzt. In Abb. 3 ist exemplarisch nur die Feinfraktionierung der Fraktion 4 dargestellt.

Für die Durchführung der Biotests fand eine Aufkonzentrierung und ein Lösungsmittelwechsel zu Dimethylsulfoxid (DMSO; s. 4.3.1) von Aliquoten der einzelnen Extrakte und Fraktionen statt.

Die Einwaagen für Stufe I richteten sich nach dem TOC-Gehalt der Proben, da dieser mit der organischen Matrix im Sediment korreliert. In Tab. A6 in Anhang 8.2 sind die Gehalte an Trockenmasse und TOC in den für die Biotests hergestellten Lösungen aufgeführt.

Um sicherzustellen, dass ein toxischer Effekt nicht durch das verwendete Material oder die Lösungsmittel hervorgerufen wurde, wurden zu jedem Extraktions- und Fraktionierungsschritt begleitend Blindwerte mitgeführt.

Die begleitenden chemisch-analytischen Untersuchungen der einzelnen Extrakte und Fraktionen wurden von Frau Reineke (ISIS Teilprojekt C3, Universität Hamburg, Institut für Organische Chemie), Herrn N. Heinzel (ISIS Teilprojekt C2, Universität Hamburg, Institut für Organische Chemie) und Frau S. Biselli (ISIS Teilprojekt P, Bundesamt für Seeschifffahrt und Hydrographie) durchgeführt.

2.2.3 HSP70-STANDARD

Da Hsp70 aus EPC-Zellen als Standard nicht zur Verfügung stand, wurde als Referenzsubstanz zur Entwicklung der Methoden und als externer Standard ein kommerziell erhältlicher Hsp70-Standard aus Rinderhirn der Firma Sigma (Deisenhofen) eingesetzt. Die Verwendung dieses Standards ist aufgrund der hohen Homologie zwischen Hsp70 unterschiedlicher Spezies möglich, erlaubt jedoch nur die Bestimmung relativer Hsp70-Gehalte.

2.2.4 HSP70-ANTIKÖRPER

Für die spezifische Detektion von Hsp70 stand ein Antikörper der Firma Sigma, Deisenhofen zur Verfügung. Dabei handelte es sich um einen monoklonalen Antikörper (Klon BRM-22). Für die Produktion des Antikörpers in der Maus wurde aus Rinderhirn isoliertes und gereinigtes Hsp70 als Immunogen eingesetzt. Laut Hersteller detektiert der Antikörper sowohl die induzierbare als auch die konstitutive Form von Hsp70 in Rind, Mensch, Ratte, Kaninchen, Hamster, Huhn, Meerschweinchen und in Drosophila-Zellen. Für diesen Antikörper wurde bereits die Kreuzreaktivität zu Hsp70 aus Karpfen *Cyprinus carpio* (DE WACHTER ET AL., 1998) und weiteren Fisch- und Muschelarten (SANDERS ET AL., 1994) nachgewiesen. Der Antikörper liegt in Lösung mit einer Konzentration von 2,2 mg Immunoglobulin G (IgG)/mL vor. Vom Hersteller wird eine 1:5.000-Verdünnung für Immunfärbungen vorgeschlagen.

2.3 INKUBATION UND AUFARBEITUNG DER ZELLEN

Die Inkubation der Zellen mit den Schadstofflösungen bzw. den Proben erfolgte als Doppelbestimmung. Untersuchungen von KAMMANN ET AL. (2000) zur Genotoxizität zeigten, dass die EPC-Zellen einen 1 Vol.-%igen DMSO-Zusatz gut tolerieren. Die Untersuchung der Eignung von DMSO für die Messung einer Hsp70-Induktion stand noch aus. Bei allen Untersuchungen wurden Kontrollwerte (KW) mitgeführt, die ohne Inkubation parallel aufgearbeitet wurden, um den Grundgehalt an Hsp70 zu bestimmen.

Zur Ermittlung der optimalen Inkubationsbedingungen wurde die Inkubationszeit variiert (2, 4 und 24 h) und die Inkubation sowohl in den Kulturgefäßen als auch in Reaktionsgefäßen in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) durchgeführt.

Die Aufarbeitung der Zellen bestand im wesentlichen aus dem Ablösen der Zellen, mehreren Wasch- und Zentrifugationsschritten und einer Homogenisierung mittels Ultraschall. Je nachdem, ob die Inkubation in Kultur- oder in Reaktionsgefäßen erfolgte, variierte die Reihenfolge der einzelnen Schritte. In Abb. 4 ist die Aufarbeitung für beide Inkubationsarten schematisch dargestellt.

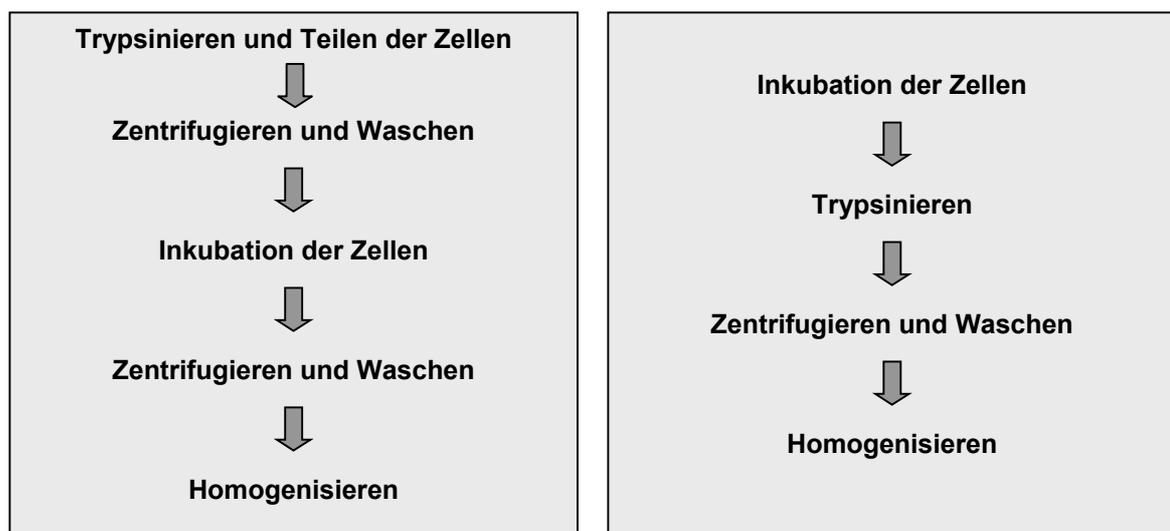


Abb. 4 – Inkubation und Aufarbeitung der Zellen. Links: Inkubation in Reaktionsgefäßen – Rechts: Inkubation in Kulturgefäßen

Für die Inkubation in den Reaktionsgefäßen mussten die Zellen zunächst vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst und auf die Reaktionsgefäße verteilt werden. Das Ablösen der Zellen vom Boden des Kulturgefäßes bezeichnet man als Trypsinieren. Dazu wurden die Zellen nach Abdekantieren des Nährmediums mit einer Trypsin-Ethylendiamintetraacetat(EDTA)-Lösung behandelt.

Das Trypsin bewirkte die Spaltung der Adhäsionsproteine, während EDTA die Calcium- und Magnesiumionen, die die Adhäsionsproteine stabilisieren, komplexierte und den Ablösevorgang somit beschleunigte. Durch leichtes Schwenken des Gefäßes wurden die Zellen dabei vereinzelt. EDTA wirkt in höheren Konzentrationen cytotoxisch und Trypsin führt nach längerer Einwirkzeit zur Lysis der Zellmembran. Aus diesem Grund wurde zu den abgelösten Zellen sofort FKS zugegeben. FKS enthält trypsininhibierende Serumproteine sowie Calcium- und Magnesiumionen, so dass die Trypsinaktivität gestoppt und ein Überschuss an zweiwertigen Ionen erzeugt wurde.

Die Trypsin-EDTA-Lösung wurde durch Zentrifugieren bei 300 x g und einmaligem Waschen mit PBS entfernt und das resultierende Zellpellet in PBS aufgenommen. Nach der Inkubation wurde die Schadstofflösung in gleicher Weise entfernt und das Zellpellet in PBS mit einem Zusatz von Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) als Proteasehemmer mittels Ultraschall homogenisiert. Durch die Homogenisation wurden die Zellmembranen zerstört und die Zellinhaltsstoffe freigesetzt.

Bei der zweiten Variante wurden die Zellen direkt in den Zellkulturflaschen im Nährmedium mit den Schadstofflösungen inkubiert und anschließend trypsiniert. Das Entfernen der Schadstofflösung sowie die weitere Aufarbeitung erfolgte wie bei der ersten Variante beschrieben.

Die genaue Durchführung der Inkubation und Aufarbeitung der Zellen ist in Anhang 8.1.1 beschrieben.

2.4 CYTOTOXIZITÄTSBESTIMMUNG MITTELS LACTATDEHYDROGENASE-ASSAY

Cytotoxische Effekte bewirken in eukaryontischen Zellen die Abnahme der Membran-Integrität und damit verbunden das Ausschleusen von Zellinhaltsstoffen. LEGRAND ET AL. (1992) zeigten, dass sich die Lactatdehydrogenase (LDH)-Aktivität im Medium proportional zur Anzahl an toten Zellen verhält und somit als Marker für cytotoxische Effekte geeignet ist.

In dieser Arbeit wurde die LDH-Aktivitäts-Bestimmung durchgeführt, um eine evtl. Überlagerung von proteotoxischen und cytotoxischen Effekten zu erkennen.

Die Bestimmung erfolgte mittels Testkit der Fa. Sigma. Die Bestimmung beruht auf der Oxidation von Lactat durch NAD^+ in Gegenwart von LDH zu Pyruvat. Dabei gebildetes NADH^+ reduziert an Diaphorase gekoppeltes FAD zu FADH_2 , wobei Elektronen auf *p*-Iodonitrotetrazolium-Violett übertragen werden. Dies führt zur Bildung eines violett gefärbten Formazans, das bei 490 nm spektrophotometrisch vermessen wird. Die Bildung des Formazans ist proportional zur LDH-Aktivität (DECKER UND LOHMANN-MATTHES, 1988).

Die ermittelte LDH-Aktivität wurde auf die maximale LDH-Aktivität, die durch vollständige Lysis eines Zellpellets bestimmt wurde, bezogen und relativ in Prozent angegeben.

Die Durchführung der LDH-Aktivitäts-Bestimmung ist unter Anhang 8.1.2 beschrieben; die Kalibrierfunktion ist in Abb. A1 dargestellt.

2.5 QUANTIFIZIERUNG DES PROTEINGEHALTES

Der Proteingehalt diente zum einen als Bezugsgröße für den Hsp70- und den LDH-Gehalt, da der Proteingehalt direkt mit der Zellzahl korreliert und somit Schwankungen aufgrund unterschiedlicher Zellzahlen ausgeglichen werden können. Zum anderen wurde gezeigt (s. 4.4), dass eine Abnahme des Proteingehaltes im Zellpellet mit einer steigenden LDH-Aktivität in der Inkubationslösung einhergeht und somit als Parameter für einen cytotoxischen Effekt herangezogen werden kann.

Die Quantifizierung des Proteingehaltes aus den Zellhomogenaten erfolgte als Doppelbestimmung photometrisch nach der Methode von BRADFORD (1976). Die Methode beruht auf der Anlagerung negativ geladener Farbstoffmoleküle (Coomassie Brilliant Blue) an die Aminogruppen der Proteine. Die Entstehung der Protein-Farbstoff-Komplexe führt zu einem Farbumschlag von rot nach blau, der photometrisch bei 590 nm vermessen wird. Die Kalibrierung wurde mit Rinderserumalbumin (BSA) durchgeführt. Aufgrund unterschiedlicher Responsefaktoren von BSA und dem Proteingemisch aus dem Zellhomogenat war lediglich eine Abschätzung des Proteingehaltes bzw. ein Vergleich der Proben untereinander möglich. Die Durchführung zur Quantifizierung des Proteingehaltes ist im Anhang unter 8.1.3 beschrieben. Die Kalibrierfunktion ist in Abb. A2 dargestellt.

2.6 QUANTIFIZIERUNG DES HSP70-GEHALTES MITTELS ELEKTROPHORESE

Eine Möglichkeit zur Quantifizierung von Hsp70 ist die spezifische Anfärbung der Moleküle nach elektrophoretischer Trennung und Transfer auf eine Nitrocellulose-(NC)-Membran und anschließende densitometrische Auswertung der gefärbten Banden. Das Verfahren wird üblicherweise zur Hsp70-Bestimmung eingesetzt (WERNER ET AL., 1998; MARTINEZ ET AL., 2000; VARÓ ET AL., 2002; WASHBURN ET AL., 2002).

2.6.1 NATRIUMDODECYLSULFAT-POLYACRYLAMIDGEL-ELEKTROPHORESE

Bei der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) erfolgt die Trennung von Proteingemischen in einem elektrischen Gleichstromfeld nach ihrem MG.

Dazu werden zunächst die Eigenladungen der Proteine durch Beladen mit dem anionischen Detergenz SDS unterdrückt und Disulfidbrücken mit 2-Mercaptoethanol reduktiv gespalten. Es resultieren Protein-Micellen mit einheitlichem Masse/Ladungs-Verhältnis (mit Ausnahme von Glycoproteinen) und einheitlicher Kugelform (GUTTMANN, 1996). Je nach Größe der Micellen werden sie durch die engen Poren der restriktiven Gele mehr oder weniger stark in ihrer Wanderung gehindert, wobei sich die Wanderungsgeschwindigkeit proportional zum MG verhält. Das MG der getrennten Proteine wird anhand von Markerproteinen (Zusammensetzung des MG-Markers s. Tab. A1 in Anhang 8.1.4) abgeschätzt. Die in dieser Arbeit durchgeführte Trennung erfolgte in diskontinuierlichen Gelen mit einem Trennbereich von 2,5 bis 200 kDa.

Die Durchführung der SDS-PAGE ist in Anhang 8.1.4.1 beschrieben.

2.6.2 SEMIDRY-BLOTTING

Durch das Semidry-Blotting werden die elektrophoretisch getrennten Proteine aus dem Trägergel auf eine Membran übertragen. Durch diesen Vorgang werden die Proteine spezifischen Reaktionen zugänglich gemacht (WESTERMEIER, 1990).

Verwendet wurde eine NC-Membran, an die Proteine über hydrophobe Wechselwirkungen binden. Der Semidry-Blot wurde modifiziert nach KHYSE-ANDERSEN (1984) mit zwei vertikalen Graphitelektroden, zwischen denen mit Puffer getränkte Schwämme, die Blottingmembran, sowie das Gel angeordnet sind, durchgeführt (s. Anhang 8.1.4.2).

2.6.3 BRILLIANT BLACK FÄRBUNG

Die Brilliant Black Färbung ist eine Modifikation der Indian Ink Färbung nach HANCOCK UND TSANG (1983). Es werden unspezifisch alle Proteine auf NC-Membranen angefärbt. In dieser Arbeit wurde Brilliant Black zur Färbung des MG-Markers verwendet. Die Durchführung ist im Anhang unter 8.1.4.3 aufgeführt.

2.6.4 IMMUNFÄRBUNG

Bei der Immunfärbung werden Proteine spezifisch über eine Antigen-Antikörper-Reaktion und anschließende Enzym-Substrat-Reaktion detektiert. Die spezifische Proteinfärbung auf Membranen wird auch als Immunoblot (IB) bezeichnet (STOTT, 1989).

Die spezifische Färbung von Hsp70 erfolgte in dieser Arbeit modifiziert nach SCHRÖDER ET AL. (1999) und ist in Abb. 5 schematisch dargestellt. Nach dem

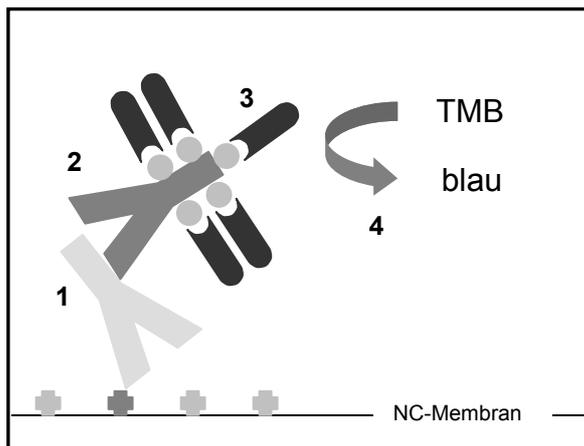


Abb. 5 – Prinzip der Immunfärbung

Transfer der Proteine auf die Membran werden remanente Bindungsstellen mit Milchproteinen blockiert, wodurch unspezifische Farbreaktionen vermieden werden (JOHNSON ET AL., 1984). Zum Nachweis der Hsp70 werden die getrennten und immobilisierten Proteine sequentiell mit Antikörpern unterschiedlicher Spezifität inkubiert. Dabei handelt es sich zunächst um den spezifisch gegen Hsp70 gerichteten monoklonalen Antikörper (1) und anschließend um mehrfach biotinyliertes Anti-Maus-IgG von der Ziege (2).

An das Biotin des sekundären Antikörpers binden mehrere Moleküle des Streptavidin-Myeloperoxidase (HRP)-Konjugates (3), woraus sich ein Verstärkungseffekt ergibt. In einer enzymatischen Farbreaktion wird die farblose Verbindung 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) unter Beteiligung von Dioctylnatriumsuccinat (DONS) und Wasserstoffperoxid durch die Myeloperoxidase zu einem blau gefärbten Radikalkation oxidiert (4). Dieses bindet an die Antigenmoleküle, die als blaugefärbte Banden sichtbar werden. Die Färbung der Proteinbanden ist selbst unter Lichtausschluss nur wenige Tage haltbar (GALLATI UND PRACHT, 1985).

Die Durchführung der Immunfärbung ist im Anhang unter 8.1.4.4 beschrieben.

2.6.5 DENSITOMETRISCHE AUSWERTUNG

Zur Intensitätsmessung der gefärbten Hsp70-Banden wurde ein densitometrisches Verfahren angewandt.

Für die densitometrische Auswertung wurden die gefärbten IB zunächst eingescannt und als digitales Bild gespeichert. Mittels einer speziellen Software (Scan-Pack, Version 3.0) werden die digitalen Bilder in Bilder, die aus mehreren Bildpunkten bestehen, umgewandelt. Den einzelnen Bildpunkten wird je nach Intensität eine Graustufe zugeordnet, über die Graustufen die optische Dichte ermittelt und daraus ein Densitogramm (Kurvendiagramm) erstellt. Durch Integration der Kurven werden Areas ermittelt, die proportional zur optischen Dichte sind.

2.6.6 BERECHNUNG DES HSP70-GEHALTES

Die Berechnung des Hsp70-Gehaltes erfolgte über den externen Hsp70-Standard aus Rinderhirn. Über den Vergleich der Areas von Standard und Probe sowie den zur Elektrophorese eingesetzten Volumina wurde der Hsp70-Gehalt in der Probe berechnet. Um natürliche Schwankungen in den Zellzahlen zu berücksichtigen, wurde der Hsp70-Gehalt auf den Proteingehalt bezogen.

Die Formel zur Berechnung des Hsp70-Gehaltes ist im Anhang unter 8.1.4.5 beschrieben.

2.7 STATISTIK

Für die Auswertung der Ergebnisse wurden unterschiedliche statistische Verfahren angewendet:

Mittels Mittelwert-*t*-Test wurde überprüft, ob Unterschiede zwischen den Hsp70-Gehalten des KW und den Hsp70-Gehalten von Zellen, die einer Stressbelastung ausgesetzt wurden, statistisch signifikant waren. Voraussetzung für den Mittelwert-*t*-Test ist eine Homogenität der Varianzen, die mit dem *F*-Test kontrolliert wurde.

Signifikante Abweichungen im Protein-Gehalt zum KW werden über Signifikanzniveaus (SN) ermittelt. Dazu wird zunächst die mittlere Standardabweichung aus den Differenzen der Proteingehalte der KW und daraus das Konfidenzintervall bestimmt. Über das Konfidenzintervall wird das SN festgelegt (GOTTWALD, 2000).

Der statistische Ansatz zur integrierten Beurteilung der Biotests erfolgte mittels Faktorenanalyse und wurde von Herrn Werner Wosniok, Institut für Statistik der Universität Bremen durchgeführt.

3 ARBEITSPLAN

3.1 VORGEHEN IM METHODISCHEN TEIL

Ziel des methodischen Teils war es zunächst, das üblicherweise für die Hsp70-Bestimmung eingesetzte Verfahren mittels SDS-PAGE/IB mit anschließender densitometrischer Auswertung (WERNER ET AL., 1998; MARTINEZ ET AL., 2000; VARÓ ET AL., 2002; WASHBURN ET AL., 2002) zu etablieren und zu validieren. Die Methode sollte in dieser Arbeit als Standardmethode eingesetzt werden.

Um eine Hsp70-Induktion in Zellen als Marker für Proteotoxizität in der BdF einsetzen zu können, musste die Bestimmung zunächst an die Zelllinie adaptiert werden; dazu gehörte u.a. das Festlegen der Inkubationsbedingungen. Deshalb sollten durch Variation der Parameter Inkubationsdauer und Art der Inkubation (in Kultur- oder in Reaktionsgefäßen) die optimalen Bedingungen ermittelt werden. Dabei sollten Empfindlichkeit der Hsp70-Induktion und Aufwand der Inkubation in einem realistischen Verhältnis zueinander stehen.

Bei den in Sedimenten enthaltenen Schadstoffen handelt es sich größtenteils um mittelpolare bis unpolare Substanzen; da es sich bei Zelltests um wässrige Systeme handelt, muss die Inkubation mit einem Lösungsvermittler durchgeführt werden. Als Voraussetzung für den Lösungsvermittler gilt, dass er selbst im Test keinen Effekt hervorruft. Außerdem werden in der BdF Lösungsmittel unterschiedlichster Art angewendet, die unter Umständen beim Überführen in den Lösungsvermittler noch in geringen Mengen in den zu untersuchenden Extrakten enthalten sein können. Um falsch positive Ergebnisse durch den Lösungsvermittler und Restbestände an Lösungsmitteln auszuschließen, sollten diese ebenfalls auf ihr Potential Hsp70 zu induzieren untersucht werden.

Abschließend sollte im methodischen Teil geklärt werden, ob auf die Bestimmung der Cytotoxizität über die LDH-Aktivität verzichtet und statt dessen eine Abnahme im Proteingehalt als Parameter für die Cytotoxizität herangezogen werden kann.

Im Folgenden sind die Ziele des methodischen Teils noch einmal zusammengefasst:

- Validierung der SDS-PAGE/IB zur Quantifizierung der Hsp70-Gehalte
- Festlegung der Inkubationsbedingungen
- Proteotoxizität von Lösungsvermittler und Lösungsmitteln
- Überprüfung der Option, Abnahmen im Proteingehalt als Parameter für cytotoxische Effekte einzusetzen

3.2 VORGEHEN IM ANALYTISCHEN TEIL

Im analytischen Teil sollte die Hsp70-Induktion zur Detektion von proteotoxischen Effekten in der BdF eingesetzt werden und anhand der Ergebnisse erörtert werden, inwiefern sich die Bestimmung einer Hsp70-Induktion zur Detektion von proteotoxischen Effekten in der BdF eignet.

Zunächst sollten Sedimentrohextrakte der sieben Stationen untersucht und die Stressantwort in Form der Hsp70-Induktion mit der Kontamination der Proben verglichen werden. Dadurch sollte überprüft werden, ob anhand der Hsp70-Induktion eine Abschätzung der Gesamtbelastung und somit die Auswahl besonders toxischer Proben für die BdF möglich ist.

Anschließend sollten die Fraktionen von ausgewählten Proben, die einer BdF unterzogen wurden, untersucht werden, um zu überprüfen, inwiefern sich die Hsp70-Induktion für den Einsatz in der BdF eignet. Dazu wurden unter anderem Vergleiche mit den Ergebnissen anderer Biotestsysteme, die im Projekt durchgeführt wurden, vorgenommen. In diesem Zusammenhang sollten die Ergebnisse der Faktorenanalyse Aufschluss über die Stellung der Hsp70-Induktion in der Biotestbatterie geben, d.h. es wurde überprüft, inwiefern Korrelationen bzw. Redundanzen zu anderen Biotests vorlagen.

Zudem sollte das proteotoxische Potential von Einzelsubstanzen, die in den Fraktionen identifiziert wurden, untersucht und überprüft werden, inwieweit diese Einzelsubstanzen für die gemessenen Effekte verantwortlich sind.

Auch diese Ziele sind im Folgenden noch einmal zusammengefasst:

- Untersuchung des proteotoxischen Potentials von sieben Sedimentrohextrakten und Überprüfung der Korrelation von Stressantwort und Gesamtbelastung
- Untersuchung des proteotoxischen Potentials von Fraktionen aus der BdF und Überprüfung der Eignung einer Hsp70-Induktion zur Detektion von proteotoxischen Effekten in der BdF

4 METHODISCHER TEIL

4.1 VALIDIERUNG DER SDS-PAGE/IB ZUR HSP70-BESTIMMUNG

Grundsätzlich gibt es für die Bestimmung der Hsp70-Gehalte nach dem densitometrischen Verfahren zwei Möglichkeiten:

- Es wird nur das induzierbare Hsp70-Isoform ausgewertet, indem die Hsp70-Isoformen elektrophoretisch getrennt werden (z.B. HASSANEIN ET AL., 1999; SCHRÖDER ET AL., 1999) oder nur das induzierbare Isoform spezifisch Antikörper nachgewiesen wird (z.B. SALMINEN ET AL., 1996).
- Die Hsp70-Isoformen werden durch die Elektrophorese nicht getrennt und es wird ein Antikörper verwendet, der beide Isoformen detektiert, so dass eine Bestimmung des Gesamtgehaltes an Hsp70 erfolgt (z.B. VIJAYAN ET AL., 1998).

Die Trennung der einzelnen Hsp70-Isoformen besitzt den Vorteil, dass die Banden getrennt ausgewertet werden und dadurch Hsp70-Induktionen mit größerer Empfindlichkeit nachgewiesen werden können. HASSANEIN ET AL. (1999) und SCHRÖDER ET AL. (1999) stellten jedoch in Fischen sowohl für die konstitutive Form als auch für die induzierbare Form eine dosisabhängige Induktion fest, so dass die Erfassung des Gesamtgehaltes nicht nachteilig erscheint. Abb. 6 zeigt zunächst das Ergebnis einer SDS-PAGE/IB von aufgearbeiteten Zellen, dem verwendeten Hsp70-Standard und dem MG-Marker. Den spezifisch angefärbten Hsp70-Banden der Probe und des Hsp70-Standards konnte anhand des Markers ein MG von ca. 70 kDa zugeordnet werden. Unter den gewählten Bedingungen war keine Trennung der einzelnen Isoformen der Hsp70-Familie zu erkennen und es wurden auch keine weiteren Proteine detektiert. Da der hier verwendete spezifische Antikörper sowohl die induzierbare als auch die konstitutive Form von Hsp70 detektiert, repräsentieren die dargestellten Banden den Gesamtgehalt an Hsp70.

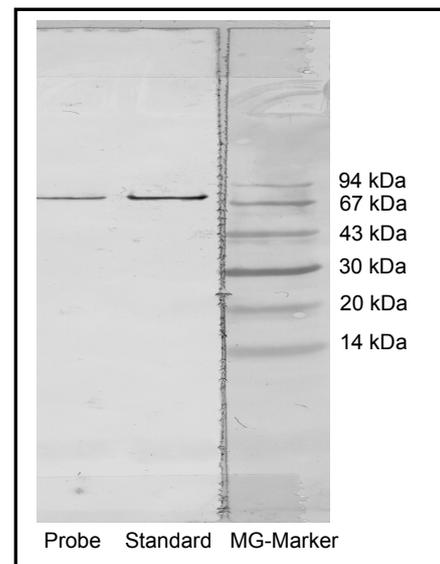


Abb. 6 – IB von Probe und Hsp70-Standard (monoklonaler Antikörper), rechts MG-Marker (Brilliant Black Färbung)

4.1.1 ARBEITSBEREICH UND GRUNDKALIBRIERUNG

Bei der Validierung der Methode wurde anhand des Hsp70-Standards ein Arbeitsbereich von 1-50 ng/ μ L ermittelt (s. Abbildung A4 und A5 in Anhang 8.1.4.6). Unter Berücksichtigung der Aufarbeitung ergab sich für die Proben daraus ein Bereich von 4 bis 200 mg Hsp70/g Protein. Laut RUTHERFORD UND ZUKER (1994) machen die konstitutiven Isoformen 1-2 % des zellulären Gesamtproteingehaltes (entsprechend 10-20 mg/g Protein) aus, so dass die Methode, unter Berücksichtigung der entsprechenden Verdünnungs- und Aufarbeitungsschritte, ausreichend empfindlich war.

4.1.2 REPRODUZIERBARKEIT

Für die Ermittlung des Verfahrensvariationskoeffizienten (CV) wurden fünf Aliquote (Aufarbeitung s. Anhang 8.1.1) ohne Inkubation parallel aufgearbeitet und der Hsp70-Gehalt bestimmt. In Tab. 2 sind die ermittelten Gehalte aufgeführt.

Tab. 2 – Ermittlung des Verfahrensvariationskoeffizienten CV

Probe	Hsp70-Gehalt [mg/g Protein]
1	10,6
2	9,2
3	9,0
4	8,2
5	6,8
Mittelwert	8,8
Standardabweichung	1,4
CV	16 %

Aus den ermittelten Daten ergab sich ein CV von 16 %. Ein ähnlicher CV von 15,4 % wurde für die Hsp70-Bestimmung auch von DE WACHTER ET AL. (1998) beschrieben. Aufgrund des Bezuges der Hsp70-Gehalte auf den Proteingehalt ergaben sich die vorhandenen Schwankungen hauptsächlich aus der Elektrophorese, dem Transfer auf die NC-Membran, der Immunfärbung und der densitometrischen Auswertung. Dies wurde durch den $CV_{\text{Elektrophorese}}$ von 14 % bei den ermittelten Flächeneinheiten aus der Fünffachbestimmung einer einzelnen Probe bestätigt (Einzelwerte s. Anhang 8.1.4.7, Tab. A4).

4.2 FESTLEGUNG DER INKUBATIONSBEDINGUNGEN

Im Folgenden sollte der Einfluss von Art und der Dauer der Inkubation untersucht werden.

Für die Art der Inkubation bestanden die Möglichkeiten, direkt in den Kulturgefäßen zu inkubieren oder die Zellen zunächst zu trypsinieren und zu aliquotieren und anschließend in Reaktionsgefäßen zu inkubieren. In der Literatur wird fast ausnahmslos die Inkubation unter Kulturbedingungen durchgeführt. Der Vorteil der Inkubation in Kulturgefäßen besteht darin, dass die Zellen unter Kulturbedingungen ausschließlich durch die zu testenden Proben gestresst werden und nicht noch einer zusätzlichen Belastung ausgesetzt sind. Nachteilig für den Einsatz in der Routine ist jedoch die Menge an Kulturgefäßen und damit verbunden die Kosten, die für die Inkubation mit Proben, insbesondere wenn es um die Aufnahme von Dosis-Wirkungseffekten geht, notwendig sind. KAMMANN ET AL. (2000) führten mit den EPC-Zellen Untersuchungen zur Genotoxizität von Sedimentextrakten durch, indem sie die zweite Variante für die Inkubation wählten.

Die Dauer der Inkubation war ein weiterer entscheidender Faktor für die Hsp70-Induktion. Für die Bestimmung einer Hsp70-Induktion werden Zellkulturen im Gegensatz zu niederen oder höheren Organismen nur einige Minuten bis wenige Tage Stress in Form von Hitze oder Schadstoffen ausgesetzt. Bei RTG-2-Zellen wurde eine Hsp70-Induktion, ausgelöst durch Arsenite, bereits nach 5 min beobachtet (RYAN, 1997). EDWARDS ET AL. (1990) setzten humane Keratinocyten 90 min unterschiedlichen Stressoren aus. RYAN UND HIGHTOWER (1994) und SALMINEN ET AL. (1996) führten unter anderem an HepG2-Zellen 24stündige Inkubationen durch. KILEMADE UND MOTHERSILL (2000, 2001) exponierten primäre Epidermiszellen der Regenbogenforelle mit 2,4-Dichloranilin sogar über einen Zeitraum von 96 h.

Um die optimalen Bedingungen für die in dieser Arbeit verwendete EPC-Zelllinie zu ermitteln, wurden die Zellen sowohl direkt in Kulturgefäßen als auch in Reaktionsgefäßen über einen Zeitraum von 2, 4 und 24 h inkubiert. Als Auslöser einer Hsp70-Induktion wurde in diesem Versuch zweiwertiges Cadmium gewählt. Die Proteotoxizität von Cadmium ist schon seit Jahrzehnten bekannt und beruht vor allem auf Reaktionen mit vicinalen Thiolgruppen und der Substitution von Zink (VALLEE UND ULMER, 1972). JUNGMANN ET AL. (1993) beobachteten die Bildung von abnormen Proteinen durch Cadmiumbehandlung. Die Hsp70-Induktion durch Cd^{2+} wurde bereits vielfach beschrieben (RYAN UND HIGHTOWER, 1994; OVELGÖNNE ET AL., 1995; SALMINEN ET AL., 1996; WERNER UND NAGEL, 1997).

Für die Inkubation wurde wasserlösliches Cadmiumchlorid-Dihydrat eingesetzt. Die Cd^{2+} -Konzentration betrug 0,1-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, wobei das der Konzentration entspricht, der die Zellen bei der Inkubation ausgesetzt sind. Hsp70-Induktionen wurden von OVELGÖNNE ET AL. (1995), SALMINEN ET AL. (1996) und RYAN (1997) in ähnlichen Bereichen detektiert.

Abb. 7 und Abb. 8 stellen die Ergebnisse der Untersuchungen graphisch dar. Die Einzelergebnisse sind in Anhang 8.3 Tab. A7 und A8 aufgeführt.

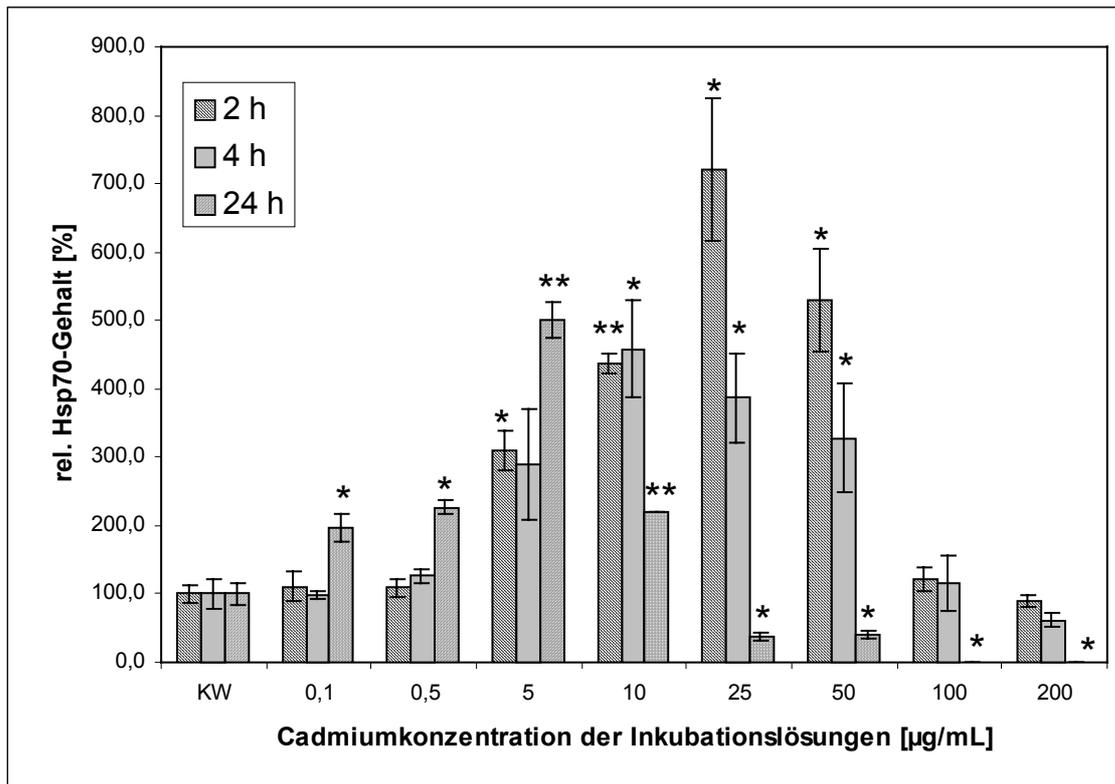


Abb. 7 – Hsp70-Induktion durch Inkubation im Kulturgefäß mit Cadmiumlösungen im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 200 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{mL}$ Inkubationslösung, Inkubationszeit 2, 4 und 24 h. Dargestellt ist der relative Hsp70-Gehalt bezogen auf den KW. Mittelwert \pm Standardabweichung, * Unterschied zum KW wahrscheinlich, jedoch nicht nachweisbar ($P=95\%$), ** Unterschied zum KW signifikant ($P=99\%$).

Bei der zweistündigen Inkubation in den Kulturgefäßen war ein kontinuierlicher Anstieg im Hsp70-Gehalt auf das ca. siebenfache des KW von 5 bis 25 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{mL}$ Inkubationslösung zu beobachten. Die Cadmiumkonzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ führte zu einer nicht signifikant geringeren Hsp70-Induktion gegenüber 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, aus den Cadmiumkonzentrationen von 0,1, 0,5, 100 und 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ resultierten Hsp70-Gehalte, die sich nicht signifikant vom KW unterschieden.

Einen ähnlichen Verlauf nahm die Hsp70-Induktion bei der vierstündigen Inkubation mit denselben Cadmiumkonzentrationen, wobei Hsp70-Gehalte von ca. 500 % des KW induziert wurden. Das Maximum im Hsp70-Gehalt erreichten die Zellen bei einer Konzentration von 10 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{mL}$ Inkubationslösung.

Die Hsp70-Gehalte resultierend aus der 25 und 50 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{mL}$ Inkubation unterschieden sich jedoch nicht signifikant von dem maximal erreichten Wert. Cadmiumkonzentrationen von 0,1, 0,5, 100 und 200 $\mu\text{g/mL}$ induzierten ebenfalls keine signifikante Erhöhung im Hsp70-Gehalt.

Bei der 24stündigen Inkubation resultieren bereits aus Cadmiumkonzentrationen von 0,1 und 0,5 $\mu\text{g/mL}$ signifikant höhere Hsp70-Gehalte. Das Maximum der Hsp70-Induktion wurde bei 5 $\mu\text{g/mL}$ erreicht. 10 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{mL}$ Inkubationslösung führten zu einem signifikant geringeren Hsp70-Gehalt gegenüber dem Maximalwert und bei Konzentrationen ab 25 $\mu\text{g/mL}$ verringerten sich die zellulären Hsp70-Gehalte gegenüber dem KW bis hin zu Gehalten unterhalb der Nachweisgrenze.

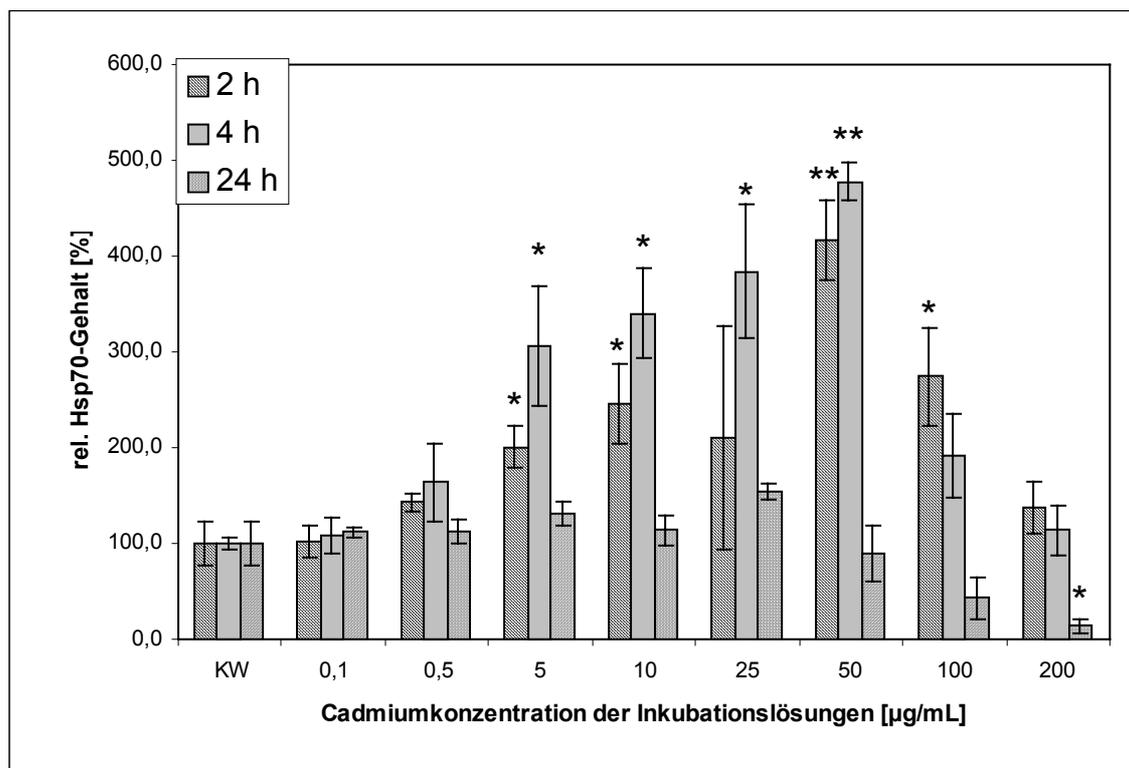


Abb. 8 – Hsp70-Induktion durch Inkubation in Reaktionsgefäßen mit Cadmiumlösungen im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 200 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{mL}$ Inkubationslösung. Inkubationszeit 2, 4 und 24 h. Dargestellt ist der relative Hsp70-Gehalt bezogen auf den KW. Mittelwert \pm Standardabweichung, * Unterschied zum KW wahrscheinlich, jedoch nicht nachweisbar ($P=95\%$), ** Unterschied zum KW signifikant ($P=99\%$)

Bei der zwei- und vierstündigen Inkubation in Reaktionsgefäßen in PBS waren kaum Unterschiede zur zwei- und vierstündigen Inkubation in Kulturgefäßen zu beobachten. Eine Cadmiumkonzentration von 0,5 $\mu\text{g/mL}$ führte schon zu erhöhten Hsp70-Gehalten, die sich jedoch nicht signifikant vom KW unterschieden.

Ein kontinuierlicher Anstieg im Hsp70-Gehalt war bis 50 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{mL}$ Inkubationslösung zu verzeichnen, wobei eine Erhöhung des Hsp70-Gehaltes um 400 % induziert wurde. Eine Ausnahme bildete dabei der Hsp70-Gehalt resultierend aus der zweistündigen Inkubation mit 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Dies ist darauf zurückzuführen, dass bei einem Wert aus der Doppelbestimmung keine Hsp70-Induktion zu beobachten war und somit aus den Werten eine starke Streuung resultierte. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Werten der zwei- und vierstündigen Inkubation bestand nicht.

Ein völlig abweichendes Bild ergab sich bei der 24stündigen Inkubation in den Reaktionsgefäßen in PBS. Hier waren bis zu einer Cadmiumkonzentration von 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nur geringfügig höhere Hsp70-Gehalte bzw. von 50 bis 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ geringere Hsp70-Gehalte bestimmt worden, die sich jedoch mit Ausnahme der Inkubation mit 200 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{mL}$ Inkubationslösung nicht signifikant vom KW unterschieden.

Betrachtet man die Mittelwerte der KW aus den sechs unterschiedlichen Cadmiuminkubationsreihen (s. Tab. 3), so fällt auf, dass sie sich bis auf die 24stündige

Tab. 3 – Mittelwerte der KW der unterschiedlichen Cadmiuminkubationsreihen

Inkubationsart	Mittelwert der KW [$\mu\text{g Hsp70}/\text{mg Protein}$]
Kulturgefäß, 2 h	5,8
Kulturgefäß, 4 h	6,6
Kulturgefäß, 24 h	5,3
Reaktionsgefäß, 2 h	5,7
Reaktionsgefäß, 4 h	7,0
Reaktionsgefäß, 24 h	60,9

Inkubation in PBS in Reaktionsgefäßen nicht unterscheiden. Bei den KW der letztgenannten Inkubationsreihe war ein ca. zehnfach erhöhter Hsp70-Gehalt zu verzeichnen. Das bedeutet, dass das 24stündige Verweilen der Zellen in PBS in den Reaktionsgefäßen einen hohen Stressfaktor darstellte, auf den die Zellen mit einer Hsp70-Induktion reagierten.

Parallel wurden Untersuchungen zum ATP-Gehalt, der zum einen wichtig für die Funktion von Hsp70 als Begleitprotein und zum anderen als Maß für den Energiehaushalt und damit für die Lebensfähigkeit von Zellen anzusehen ist, mittels HPLC durchgeführt. Dabei wurde beobachtet, dass bei der 24stündigen Inkubation in PBS in den Zellen kein ATP mehr nachweisbar war und vollständig zu den energieärmeren Adenosin-5'-di- und -monophosphaten abgebaut wurde (Ergebnisse hier nicht dargestellt).

Die teilweise sehr starke Abnahme des Hsp70-Gehaltes im Vergleich zum KW bei der zwei- und vierstündigen Inkubation in Kulturgefäßen mit 200 µg Cd²⁺/mL, bei der 24stündigen Inkubation in Kulturgefäßen mit 25 bis 200 µg/mL und bei der 24stündigen Inkubation in PBS in den Reaktionsgefäßen mit 50 bis 200 µg/mL geht mit einer Abnahme im Proteingehalt einher (s. Anhang 8.3, Tab. A7 und A8). Die Abnahme im Proteingehalt ist, wie in 4.4 beschrieben, mit cytotoxischen Effekten verbunden. Durch den Verlust der Membranintegrität durch cytotoxische Effekte kommt es zum Ausschleusen von Zellinhaltsstoffen, u.a. auch von Hsp70. Des weiteren ist ebenfalls eine Denaturierung von Stressproteinen denkbar, die möglicherweise dazu führt, dass das Epitop nicht mehr intakt ist und vom Antikörper nicht mehr detektiert wird.

Zusammenfassend hat die Durchführung des Cadmiuminkubationsversuches über 2, 4 und 24 h zum einen in Kulturgefäßen und zum anderen in PBS in Reaktionsgefäßen ergeben, dass die Hsp70-Antwort auf Stress in Form einer Cadmiumbelastung am empfindlichsten bei der 24stündigen Inkubation in den Kulturgefäßen reagiert. Hier werden bereits Zunahmen im Hsp70-Gehalt ab 0,1 µg Cd²⁺/mL Inkubationslösung beobachtet und erstrecken sich bis hin zu einer Cadmiumkonzentration von 10 µg/mL, wobei bei dieser Konzentration schon ein Rückgang in der Hsp70-Induktion zu verzeichnen ist. Diese Art der Inkubation hat jedoch, wie schon erwähnt, den Nachteil, dass nur wenige Proben gleichzeitig vermessen werden können, was den Einsatz in der Routineanalytik erschwert und zudem mit hohen Kosten und einem hohen Zeitaufwand verbunden ist.

Bei den zwei- und vierstündigen Inkubationen ergaben sich sowohl innerhalb einer Inkubationsart als auch zwischen den Inkubationsarten kaum Unterschiede. Die Inkubation in Reaktionsgefäßen über einen Zeitraum von 24 h ist nicht durchführbar, da hier wahrscheinlich die Stressbelastung allein durch PBS zu groß ist und zu stark erhöhten Hsp70-Gehalten führt.

Aufgrund der einfacheren Handhabbarkeit und der damit verbundenen geringeren Kosten wurden die Inkubationsbedingungen zu Lasten der Empfindlichkeit für diese Arbeit auf 2 h und die Inkubation in Reaktionsgefäßen festgelegt. Da bei der BdF mit konzentrierten Sedimentextrakten und daraus hergestellten Fraktionen gearbeitet wird, sollte die Empfindlichkeit des Tests dennoch ausreichend sein.

4.3 PROTEOTOXIZITÄT VOM LÖSUNGSVERMITTLER UND LÖSUNGSMITTELN

4.3.1 DMSO ALS LÖSUNGSVERMITTLER

Die Extraktion und Fraktionierung der Sedimente erfolgt in der BdF von Sedimenten mit einer Anzahl unterschiedlicher Lösungsmittel in einem weiten Polaritätsbereich. Diese besitzen zumeist schon an sich ein toxisches Potential für die meisten Zelltests. Die Extrakte und Fraktionen mussten aus diesem Grund in ein Lösungsmittel überführt werden, in dem das extrahierte Material zum einen löslich ist, das die extrahierten Substanzen in dem wässrigen Zelltest in Lösung zu bringen vermag und das zum anderen in den jeweiligen Tests keine Stressreaktion hervorruft.

Neben beispielsweise Aceton (BRACK ET AL., 1999) und Methanol (HO UND QUINN, 1993) gehört DMSO zu den Lösungsmitteln, die oft bei der BdF als Lösungsvermittler Verwendung finden (SAMOILOFF ET AL., 1983; FERNÁNDEZ ET AL., 1992; MARVIN ET AL., 1999).

Untersuchungen zur Induktion von Hsp70 mit DMSO als Lösungsvermittler wurden bereits von KAR CHOWDHURI ET AL. (1999) bei *Drosophila melanogaster* und von AÏT-AÏSSA ET AL. (2000) in HeLa-Zellen durchgeführt. Für die hier verwendeten EPC-Zellen ist über die Stressreaktion auf DMSO in Form einer Hsp70-Induktion noch nichts bekannt. KAMMANN ET AL. (2001) zeigten in ihren Untersuchungen zur Genotoxizität, dass DMSO-Konzentrationen von bis zu 10 Vol.-% keine genotoxischen Effekte in den EPC-Zellen hervorrufen und setzten 1 % im Test ein. Auch oxidativer Stress kann bis zu dieser Konzentration anhand des Glutathion-Redoxsystems nicht nachgewiesen werden (SIERTS-HERRMANN, 2002).

Im Folgenden sollte daher untersucht werden, inwiefern DMSO proteotoxisches Potential besitzt. Die EPC-Zellen wurden unter den festgelegten Inkubationsbedingungen DMSO-Konzentrationen von 1, 2, 5 und 10 Vol.-% ausgesetzt (Aufarbeitung s. Anhang 8.1.1). Das Ergebnis der Untersuchung ist in Abb. 9 dargestellt, die Einzelwerte sind in Anhang 8.3, Tab. A9 aufgeführt.

Anhand der Ergebnisse wird deutlich, dass die EPC-Zellen DMSO in Konzentrationen bis 2 Vol.-% gut tolerieren. Bei 5 Vol.-% DMSO hingegen wird eine Stressantwort in Form einer Hsp70-Induktion hervorgerufen. Die Stressantwort durch 10 Vol.-% DMSO erscheint etwas geringer, ein signifikanter Unterschied zu der durch 5 Vol.-% ausgelösten Hsp70-Induktion ist jedoch statistisch nicht nachweisbar. Um den Einfluss von DMSO auf die Hsp70-Induktion möglichst gering zu halten, erfolgte die Inkubation der EPC-Zellen mit den Proben anhand eines 1 Vol.-%igen DMSO-Zusatzes.

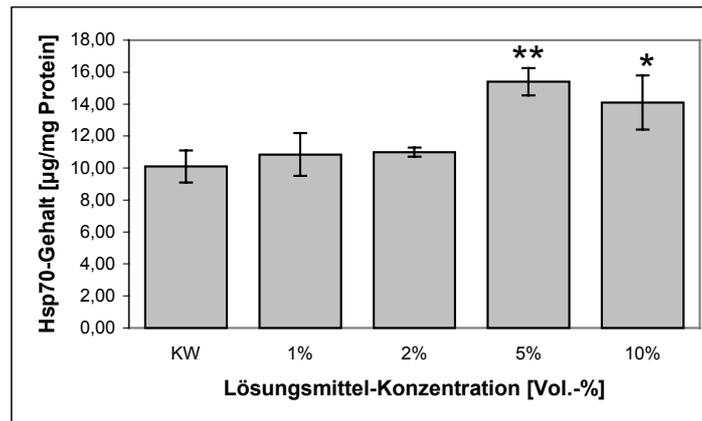


Abb. 9 – Hsp70-Induktion nach Inkubation mit DMSO im Konzentrationsbereich von 1-10 Vol.-%. Dargestellt ist der relative Hsp70-Gehalt bezogen auf den KW. Mittelwert \pm Standardabweichung, * Unterschied zum KW wahrscheinlich, jedoch nicht nachweisbar ($P=95\%$), ** Unterschied zum KW signifikant ($P=99\%$)

4.3.2 TOXIZITÄT DER VERWENDETEN LÖSUNGSMITTEL

In der BdF wurden für die Extraktion und Fraktionierung der Proben die Lösungsmittel Aceton und *n*-Hexan (Sedimentextraktion), Ethylacetat und *cyclo*-Hexan (GPC-Fraktionierung), Dichlormethan sowie Methanol (HPLC-Fraktionierung) verwendet. Beim Überführen der Proben in DMSO wurden die für die Extraktion und Fraktionierung verwendeten Lösungsmittel zunächst am Rotationsverdampfer abgezogen und Lösungsmittelreste anschließend im Stickstoffstrom entfernt. Dennoch können Reste an Lösungsmitteln in den DMSO-Lösungen enthalten sein und aufgrund ihrer z.T. bekannten Toxizität Effekte hervorrufen.

Aceton und Methanol werden häufig auch als Lösungsvermittler in der BdF verwendet. BRACK ET AL. (1999) setzten 1 Vol.-% Aceton im Leuchtbakterientest, beim Grünalgen- und beim Daphnientest ein und WERNER UND NAGEL (1997) verwendeten Aceton darüber hinaus als Lösungsvermittler, um in Amphipoden eine Hsp70-Induktion durch unterschiedliche Schadstoffe wie Fluoranthen und Dieldrin zu bestimmen, so dass für Aceton keine starke Toxizität zu erwarten war.

HO UND QUINN (1993) inkubierten Bakterien mit methanolischen Lösungen. NEUHAUS-STEIMETZ UND RENSING (1997) haben für Methanol eine Hsp70-Induktion und eine einsetzende Cytotoxizität erst bei Konzentrationen größer 1 M (32 mg/mL bzw. 4 Vol.-%) beobachtet, so dass auch hier keine Toxizität zu erwarten war. Demgegenüber stehen jedoch die stark unpolaren Lösungsmittel Dichlormethan, *n*-Hexan und *cyclo*-Hexan, über deren Potentiale Hsp70 zu induzieren bzw. cytotoxisch zu wirken nichts bekannt ist.

Aufgrund dieses Sachverhaltes sollte an dieser Stelle untersucht werden, inwiefern die verwendeten Lösungsmittel eine Hsp70-Induktion bzw. cytotoxische Effekte hervorrufen, um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden.

Für diese Untersuchung wurden die Zellen nach Anhang 8.1.1 mit den in der BdF verwendeten Lösungsmittel jeweils in Konzentrationen von 1 Vol.-%, 0,2 Vol.-%, 0,04 Vol.-% und 0,008 Vol.-% inkubiert. Dafür wurden der Zellsuspension 10 μ L reines Lösungsmittel bzw. jeweils 10 μ L des 1:5, 1:25 und 1:125 (v:v) mit DMSO verdünnten Lösungsmittels zugesetzt. Neben dem Hsp70-Gehalt wurde für die Cytotoxizitätsbestimmung die LDH-Aktivität im Inkubationsüberstand bestimmt (s. Anhang 8.1.2).

Abb. 10 stellt die Ergebnisse der Untersuchung graphisch dar. Die Einzelwerte sind in Anhang 8.3 Tab. A10 aufgeführt.

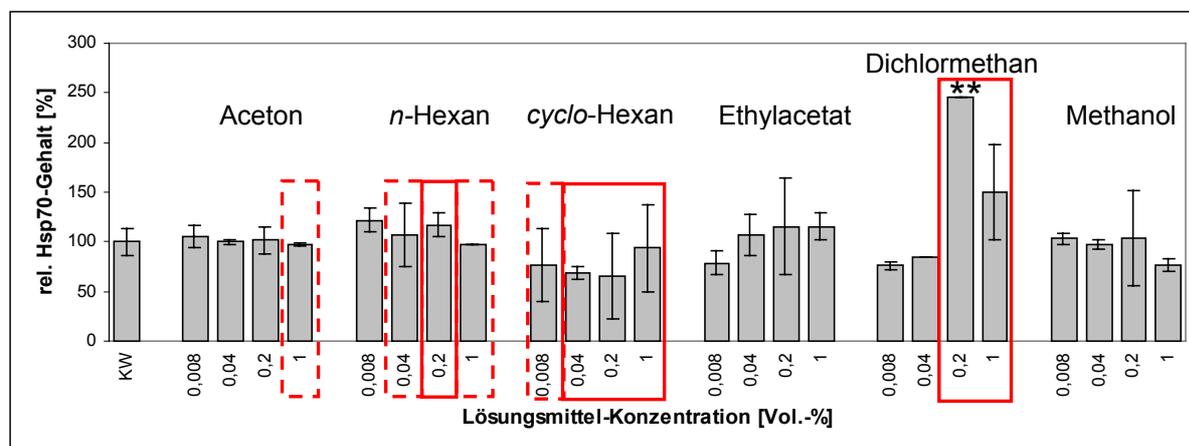


Abb. 10 - Cyto- und proteotoxische Wirkung der zur Extraktion und Fraktionierung eingesetzten Lösungsmittel, KW = Kontrollwert, Mittelwert \pm Standardabweichung, ** Unterschied zum KW signifikant ($P=99\%$), --- schwach cytotoxisch (nur eine Probe cytotoxisch oder LDH-Aktivitäts-Zunahme unter 20 % vom Gesamt-LDH), — stark cytotoxisch

Die Ergebnisse zeigen, dass weder Methanol, Ethylacetat noch Aceton eine Hsp70-Induktion in den Zellen auslösten. Zudem wies von den drei Lösungsmitteln nur 1 Vol.-%iges Aceton in einer Probe eine schwache Cytotoxizität auf.

Die Lösungsmittel *n*-Hexan und *cyclo*-Hexan besaßen starke cytotoxische Wirkungen, ohne dass sie jedoch zu einer Hsp70-Induktion führten. Beide Lösungsmittel sind in DMSO schlecht und in Wasser nicht löslich. Möglicherweise ist durch die schlechte Löslichkeit zu begründen, dass bei einer Konzentration von 1 Vol.-% *n*-Hexan, ohne DMSO-Zusatz, nur eine schwache Cytotoxizität messbar war. *Cyclo*-Hexan dagegen löste bei der höchsten Konzentration schon eine Zunahme der LDH-Aktivität im Inkubationsüberstand auf 20-25 % der Gesamt-LDH-Aktivität aus, die jedoch bei einem Zusatz von 0,2 Vol.-% mit DMSO als Lösungsvermittler noch auf 30-35 % anstieg.

Ähnlich cytotoxisch war auch *n*-Hexan in dieser Konzentration (> 35 % LDH-Aktivität im Inkubationsüberstand). 0,04 Vol.-% *n*-Hexan führten dagegen schon zu einem Rückgang der Cytotoxizität während dies bei *cyclo*-Hexan erst bei 0,008 Vol.-% der Fall war.

Dichlormethan besaß sowohl cyto- als auch proteotoxisches Potential. Im Gegensatz zu Cadmium wurde trotz der auftretenden starken Cytotoxizität bei Konzentrationen von 1 und 0,2 Vol.-% noch Hsp70 induziert. Erwähnenswert ist zur Cytotoxizität von Dichlormethan außerdem, dass es ähnlich wie *cyclo*-Hexan sogar bei einer Konzentration von 1 Vol.-% ohne Zusatz von DMSO stark cytotoxisch wirkte, obwohl es ebenfalls nicht wasserlöslich ist. Die fünffach geringere Konzentration von 0,2 Vol.-% löste einen ähnlich hohen cytotoxischen Effekt aus, während die beiden geringeren Konzentrationen im Vergleich zum KW weder eine Steigerung der LDH-Aktivität im Inkubationsüberstand noch eine Hsp70-Induktion bewirkten.

Aufgrund der teilweise sehr starken Cytotoxizität der für die Extraktion und Fraktionierung eingesetzten Lösungsmittel selbst bei sehr geringen Konzentrationen war ein vollständiges Entfernen der Lösungsmittel im Rotationsverdampfer und anschließend im Stickstoffstrom unbedingt notwendig. Eine Kontrolle für das vollständige Entfernen erfolgte dabei über mitgeführte Blindwerte. Im Falle von cytotoxischen Effekten in Blindwerten und Proben wurden diese nochmals 60 min bei 40 °C mit einem Stickstoffstrom behandelt, um falsch positive Effekte durch Lösungsmittel auszuschließen. Bei Proben, die im Anschluss an diese Behandlung immer noch einen cytotoxischen Effekt aufwiesen, wurde angenommen, dass dieser aus den Probenbestandteilen resultierte. Eine durch Lösungsmittel verursachte Hsp70-Induktion wurde aufgrund der Ergebnisse ausgeschlossen, da diese nur bei Dichlormethan beobachtet wurde und dort mit einer cytotoxischen Wirkung einherging.

4.4 VERGLEICH VON ABNAHME IM PROTEINGEHALT UND FREISETZUNG VON LDH ALS CYTOTOXIZITÄTSPARAMETER

Organismen sind nur bis zu einem gewissen Grade fähig, sich vor Schäden – entstanden aus physiologischem oder schadstoffbedingtem Stress – selbst zu schützen. Wird der äußere Stress zu groß, treten cytotoxische Effekte in Form von Verlust der Membranintegrität, irreparablen Schäden an Zellinhaltsstoffen usw. auf. Diese führen letztendlich zum Absterben. Bei einer einsetzenden Cytotoxizität kommt es zur Überlagerung von subletalen und cytotoxischen Effekten. Im Falle der Hsp70 könnte dieses bedeuten, dass sie aufgrund des Verlustes der Membranintegrität aus der Zelle in die Inkubationslösung entweichen und der Gehalt in

der Zelle abnimmt. Ein Nichterkennen von cytotoxischen Effekten könnte somit zur falschen Interpretation der Ergebnisse führen.

Bei den meisten Untersuchungen von subletalen Effekten werden parallel Cytotoxizitätsmessungen durchgeführt. Diese Messungen bedeuten einen zusätzlichen Arbeitsaufwand und erschweren somit den Einsatz in der Routineanalytik. BIERKENS ET AL. (1998) und AÏT-AÏSSA ET AL. (2000) nutzten eine Abnahme im Proteingehalt, der bei den hier durchgeführten Untersuchungen als Bezugsgröße bestimmt wird, um cytotoxische Effekte zu erkennen. AÏT-AÏSSA ET AL. (2000) konnten nachweisen, dass die Abnahme im Proteingehalt mit dem Test auf Lebensfähigkeit anhand des Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid bei HeLa-Zellen korreliert. Inwieweit die Abnahme im Proteingehalt auch bei den hier untersuchten EPC-Zellen mit cytotoxischen Effekten korreliert, wurde durch einen Vergleich mit der LDH-Aktivitätsbestimmung in der Inkubationslösung untersucht.

Für den Vergleich wurden die Werte aus der Untersuchung zur Toxizität der verwendeten Lösungsmittel herangezogen. In Abb. 11 ist das Ergebnis des Vergleiches dargestellt. Die einzelnen Messwerte sind in Anhang 8.3, Tab. A10 aufgeführt.

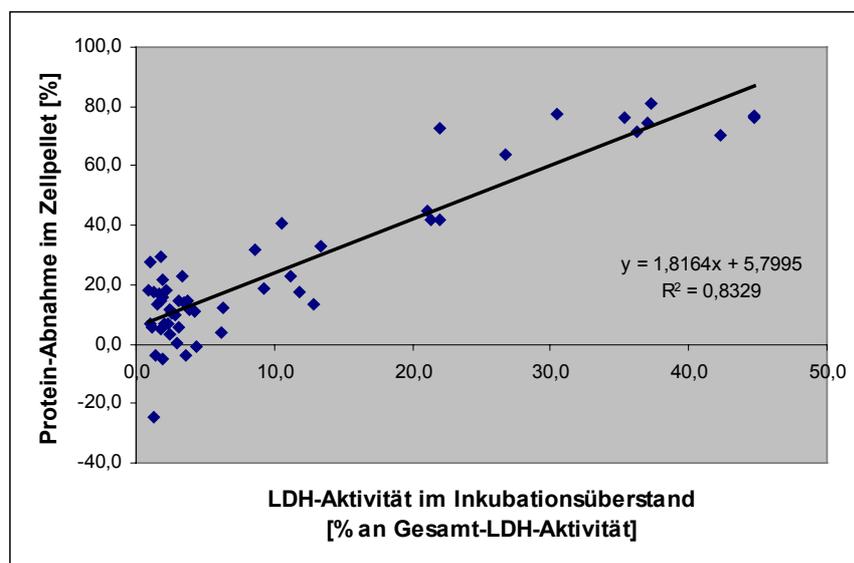


Abb. 11 - Gegenüberstellung von LDH-Aktivität in der Inkubationslösung und der Proteinabnahme im Zellpellet

Auf der Abzisse ist die LDH-Aktivität in der Inkubationslösung in Prozent, bezogen auf die Gesamt-LDH-Aktivität, dargestellt. Auf der Ordinate befindet sich die Abnahme des Proteingehaltes (AP) im Zellpellet, ebenfalls in Prozent. Die Werte für die Proteinabnahme resultieren aus der Differenz zu den Proteingehalten der KW.

Anhand des Korrelationskoeffizienten R^2 von 0,8329 wird deutlich, dass die Abnahme im Proteingehalt mit der Zunahme der LDH-Aktivität im Inkubationsmedium korreliert. Dies resultiert daraus, dass durch die Abnahme der Membranintegrität neben LDH auch weitere Zellinhaltsstoffe wie Proteine aus der Zelle entweichen und zu einer Abnahme des Proteingehaltes im Zellpellet führen, bzw. die Proteine durch die cytotoxischen Effekte so denaturiert werden, dass die Aminofunktion zerstört wird und keine Anlagerung des Farbstoffes mehr erfolgen kann.

Die Steigung der Geraden mit ca. 1,8 zeigt, dass die Abnahme im Proteingehalt schneller erfolgte als die Steigerung der LDH-Aktivität im Inkubationsüberstand. Bei einer Zunahme der LDH-Aktivität um 40 % im Inkubationsmedium nahm der Proteingehalt im Zellpellet bereits um 80 % ab. Möglicherweise war die größere Empfindlichkeit der Cytotoxizitätsbestimmung anhand der Abnahme im Proteingehalt darauf zurückzuführen, dass Proteine mit einem geringeren MG schneller als LDH mit einem MG von 100 bis 150 kDa durch die Membran entweichen konnten. Es ist jedoch auch möglich, dass cytotoxische Effekte jedoch partiell auch eine Inaktivierung der LDH bewirken, so dass sie der Bestimmung nicht mehr zugänglich waren.

Für die Proteinabnahme traten vereinzelt auch negative Werte auf. Diese sind gleichbedeutend mit einer Zunahme des Proteingehaltes im Zellpellet. Geringfügig höhere Gehalte können durch natürliche leichte Schwankungen in den Zellzahlen, die beim Aliquotieren entstehen, erklärt werden. Eine stärkere Zunahme des Proteingehaltes ist dagegen auf die Expression von Stressgenen und der damit verbundenen erhöhten Synthese von Stressproteinen, wie beispielsweise Hsp70, zurückzuführen.

Für die Detektion von cytotoxischen Effekten wurde in den nachfolgend beschriebenen Untersuchungen nur der Proteingehalt herangezogen. Zur Berücksichtigung natürlicher Schwankungen in den Proteingehalten und dem Fehler bei der Quantifizierung wurde aus den Doppelbestimmungen der Werte, die keinen cytotoxischen Effekt aufwiesen, ein SN berechnet. Die für die Berechnung herangezogenen Werte sind in Tab. 4 aufgeführt.

Tab. 4 – Proteingehalte der zur Berechnung des SN herangezogenen inkubierten Zellen

Proteingehalte der Doppelbestimmungen		Quadrat der Differenzen
[mg/L]		[mg/L]
x_1	x_2	$(x_1-x_2)^2$
547,8	531,3	272,25
587,4	592,9	30,25
476,3	531,3	3025
484,0	484,0	0
504,9	486,2	349,69
436,7	526,9	8136,04
525,8	535,7	98,01
499,4	509,3	98,01
587,4	465,3	14908,41
488,4	442,2	2134,44
524,7	462,0	3931,29
500,5	484,0	272,25
467,5	398,2	4802,49
$\bar{x} = 503,1$		$\Sigma = 38058$

Aus der Summe der Quadrate wurde die mittlere Standardabweichung und daraus anschließend das Konfidenzintervall (t -Verteilung, $p=99,9$ %) berechnet. Es ergab sich ein Konfidenzintervall von 82,6 mg/L und damit ein SN von 23 %.

Abnahmen im Proteingehalt, die das SN überschreiten, sind mit einer Wahrscheinlichkeit von 99,9 % auf cytotoxische Effekte zurückzuführen.

5 ERGEBNISSE

Im folgenden Teil ist die Anwendung der Hsp70-Induktion zur Detektion von proteotoxischen Effekten in der BdF beschrieben. Dazu wurden Dosis-Wirkungskurven aufgenommen, da der Verlauf der Hsp70-Induktion nach der Inkubation mit Cadmium zeigte, dass eine fehlende Hsp70-Induktion sowohl auf geringe Toxizität als auch auf hohe Toxizität zurückzuführen sein kann. Falsch negative Ergebnisse sollten dadurch vermieden werden. Zur Überprüfung der Methode wurde bei allen Inkubationsversuchen eine Positivkontrolle (Cadmium, 10 µg/mL; s. Abb. 8) mitgeführt.

An Zellkulturen wurden bislang nur Untersuchungen zur Hsp70-Induktion als Folge von Inkubationen mit einzelnen Substanzen in unterschiedlichen Verdünnungen untersucht. Das proteotoxische Potential von komplexen Stoffgemischen wurde an Zellkulturen bisher nicht bestimmt.

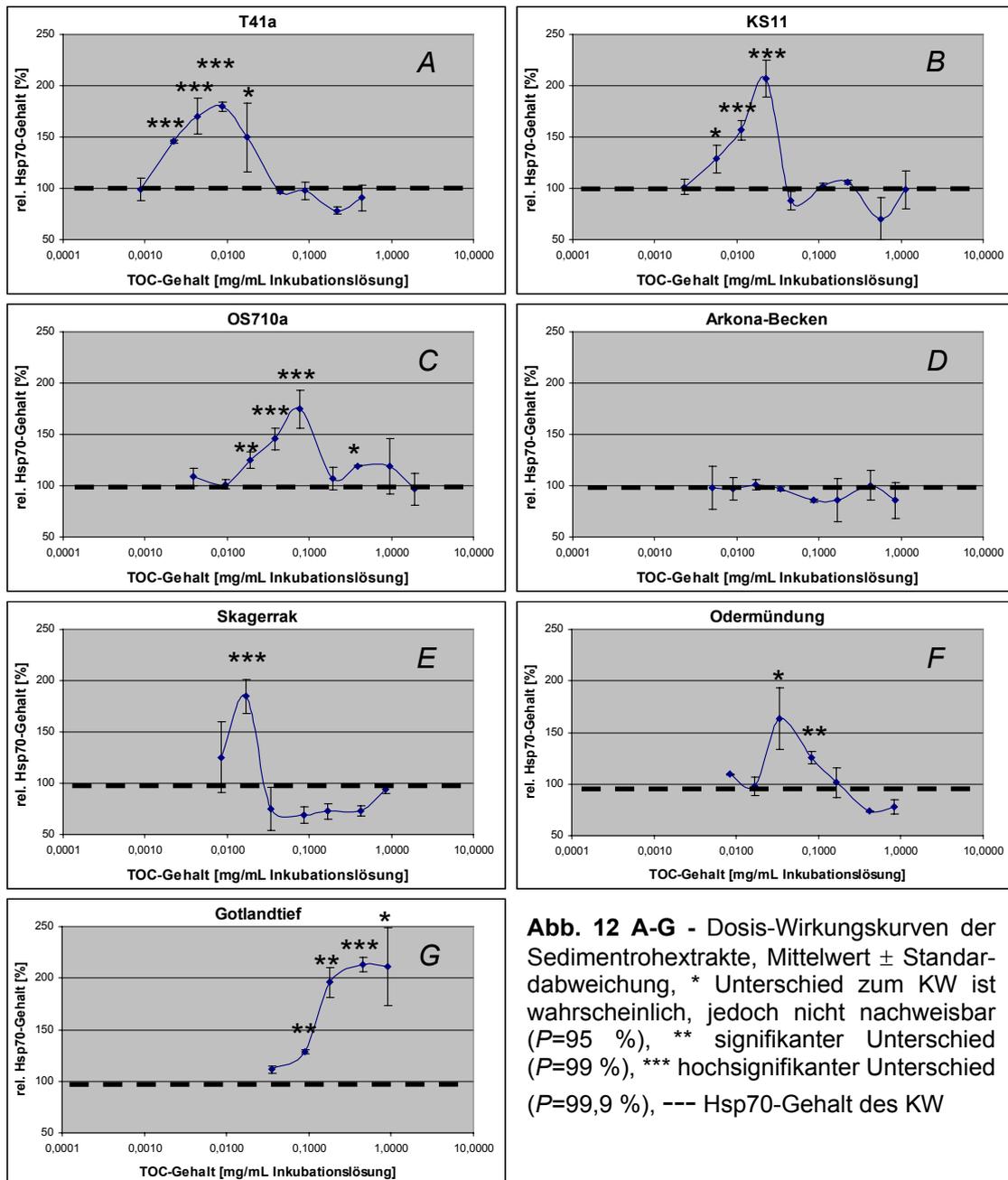
5.1 BLINDWERTE

Die Untersuchung der Blindwerte ergab ausnahmslos keine Hsp70-Induktion. Vereinzelt sind cytotoxische Effekte aufgetreten, die jedoch nach Behandeln der Proben im Stickstoffstrom beseitigt werden konnten und aus diesem Grund auf Lösungsmittelrückstände in den Proben zurückgeführt wurden.

5.2 UNTERSUCHUNG VON SEDIMENTROHEXTRAKTEN

5.2.1 AUFNAHME VON DOSIS-WIRKUNGSKURVEN

Zur Bestimmung des proteotoxischen Potentials wurden von den zur Verfügung stehenden Sedimentrohextrakten mit TOC-Gehalten zwischen 40 und 200 mg/mL (s. Anhang 8.2, Tab. A6) DMSO zunächst Verdünnungsreihen hergestellt und die jeweiligen Verdünnungen dem Test zugeführt. Die einzelnen Proben wurden dabei individuell so weit verdünnt, bis der Hsp70-Gehalt nach Erreichen eines Maximums wieder auf das Niveau des KW (100 %) abgesunken war. In Abb. 12 sind die Dosis-Wirkungskurven der sieben untersuchten Sedimentrohextrakte dargestellt.



Die in dem Test eingesetzten Sedimentmengen in mg TOC/mL Inkubationslösung (Abzisse) wurden den resultierenden Hsp70-Gehalten, bezogen auf den KW (Ordinate), gegenübergestellt. Die Einzeldaten sind dem Anhang 8.3, Tab. A11 zu entnehmen.

Der Sedimentrohextrakt der Station T41a (A) verursachte unverdünnt (0,44 mg TOC/mL) keine Erhöhung des Hsp70-Gehaltes im Vergleich zum KW. Signifikant höhere Hsp70-Gehalte waren im Bereich von 0,002 bis 0,02 mg TOC/mL zu verzeichnen. Das Maximum der Dosis-Wirkungskurve lag bei 0,01 mg TOC/mL. Bei dieser Konzentration wurde ein Anstieg im Hsp70-Gehalt auf ca. 180 % des KW

erreicht. Ähnlich verhielt sich die Dosis-Wirkungskurve der Inkubation mit dem Sedimentrohextrakt von KS11 (**B**). Im Gegensatz zu der vorherigen Kurve war jedoch zwischen dem Maximum der Kurve und der nächsthöheren Konzentration ein Abfall des Hsp70-Gehaltes auf das Niveau des KW zu verzeichnen. Der höchste Hsp70-Gehalt mit 207 %, bezogen auf den KW, wurde bei einer Konzentration von 0,023 mg TOC/mL Testlösung gemessen.

Die Inkubation mit dem Sedimentrohextrakt der Station OS710a (**C**) führte unverdünnt (1,92 mg/mL Inkubationslösung) ebenfalls zu keinem signifikanten Anstieg des Hsp70-Gehaltes. Der Hsp70-Gehalt war nach der Inkubation mit dem 1:5 verdünnten Rohextrakt geringfügig erhöht, fiel jedoch bei der Inkubation mit dem 1:10 verdünnten Rohextrakt wieder auf das Grundniveau zurück. Ein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Hsp70-Gehalten bestand nicht. Die weitere Verdünnung des Rohextraktes auf TOC-Gehalte zwischen 0,02 und 0,08 mg/mL Inkubationslösung führte zu signifikant bzw. hochsignifikant erhöhten Hsp70-Gehalten in den Zellen mit einem Maximum von 175 %, bezogen auf den KW, bei 0,08 mg TOC/mL Inkubationslösung.

Ein vollständig abweichendes Bild ergab die Dosis-Wirkungskurve resultierend aus der Inkubation mit dem Sedimentrohextrakt aus dem Arkona-Becken (**D**). Im gesamten Bereich zwischen 0,85 und 0,005 mg TOC/mL Inkubationslösung war kein Anstieg des Hsp70-Gehaltes gegenüber dem KW zu verzeichnen.

Der Sedimentrohextrakt aus dem Skagerrak (**E**) führte unverdünnt (0,85 mg TOC/mL Inkubationslösung) bis zu einer Verdünnung von 1:25 (0,03 mg TOC/mL Inkubationslösung) nach der Inkubation nicht zu signifikant erhöhten Hsp70-Gehalten. Erst bei der 1:50-Verdünnung (0,017 mg TOC/mL Inkubationslösung) war sprunghaft ein hochsignifikanter Anstieg gegenüber dem KW zu beobachten. Anschließend nahm der Hsp70-Gehalt wieder ab und aufgrund der großen Streuung bei der Inkubation mit der 1:100-Verdünnung des Rohextraktes (0,009 mg TOC/mL Inkubationslösung) war ein Unterschied zum KW nicht mehr nachweisbar.

Die Inkubation mit dem Sedimentrohextrakt aus der Odermündung (**F**) führte nur bei TOC-Gehalten von 0,08 und 0,03 mg/mL Inkubationslösung zu erhöhten Hsp70-Gehalten. Das Maximum mit 164 %, bezogen auf den KW, wurde bei 0,03 mg/mL erreicht. Bei weiterer Verdünnung wurde keine Hsp70-Induktion gemessen.

Einzig der Sedimentrohextrakt des Gotlandtiefs (**G**) führte unverdünnt (ca. 1 mg TOC/mL Inkubationslösung) zu einem erhöhten Hsp70-Gehalt, der mit geringerer TOC-Konzentration abnahm und bei 0,1 mg/mL das Niveau des KW erreichte.

5.3 UNTERSUCHUNG VON FRAKTIONEN AUS DER BDF

Im Folgenden sollen die Ergebnisse der Hsp70-Bestimmung aus den Inkubationsversuchen mit den Fraktionen aus der Bdf vorgestellt und diskutiert werden. Dies erfolgt exemplarisch an den Proben von KS11 und OS710a, da nur diese allen Fraktionierungsschritten unterzogen wurden. In Abb. 13 sind die Hsp70-Gehalte, die nach Inkubation mit den Extrakten und Fraktionen der Stufen I bis IV von den Stationen KS11 und OS710a in den Zellen ermittelt wurden, dargestellt. Die Hsp70-Gehalte sind bezogen auf den KW in % angegeben, das Hsp70-Grundniveau des KW ist als durchbrochene Linie dargestellt. Aufgeführt sind nur die maximalen Hsp70-Gehalte, die in den Dosis-Wirkungskurven erreicht wurden. Weiterhin angegeben sind die im Test eingesetzten Sedimentmengen als TOC-Gehalte in mg/mL, die zu den maximalen Hsp70-Gehalten führten. Diese Werte resultieren aus der Sedimentmenge als TOC, die zur Gewinnung des Rohextraktes eingesetzt wurde, und dem DMSO-Volumen, in dem die Extrakte und Fraktionen letztendlich aufgenommen wurden. Es ist somit eine theoretische Größe und stellt demnach nicht die absolute Menge, die in den Extrakten und Fraktionen enthalten sind, dar. Da mit jedem Fraktionierungsschritt die Komplexität der Probe verringert wurde, war weniger DMSO zum Lösen der Probeninhaltsstoffe notwendig, woraus sich im Laufe der Fraktionierung höhere TOC-Gehalte in den Fraktionen ergeben. Die Einzeldaten befinden sich im Anhang 8.3 in Tab. A12 und A13. Mit Ausnahme der Rohextrakte und der GPC-HF sowie der Fraktion F4 der HPLC-Fraktionierung wurden die höchsten Hsp70-Induktionen in den unverdünnten Extrakten und Fraktionen mit den höchsten TOC-Gehalten beobachtet. Beim Rohextrakt und der GPC-HF von KS11 war jeweils eine 1:50-Verdünnung erforderlich, beim Rohextrakt und der GPC-HF von OS710a jeweils eine 1:25-Verdünnung. Die Fraktion F4 von KS11 induzierte den höchsten Hsp70-Gehalt bei einer 1:4-Verdünnung.

5.3.1 HSP70-INDUKTION DURCH DIE ROHEXTRAKTE (STUFE I)

Die Inkubation mit den Rohextrakten beider Proben wurde schon im vorigen Kapitel ausführlich beschrieben und soll hier nur kurz dargestellt werden. Die Inkubation führte jeweils zu hochsignifikant erhöhten Hsp70-Gehalten auf ca. das Doppelte des KW. Bei der Probe KS11 wurde die dargestellte Hsp70-Induktion erst bei Verdünnung auf einen TOC-Gehalt von 0,023 mg/mL beobachtet, während beim Rohextrakt von OS710a schon eine Verdünnung auf 0,077 mg TOC/mL ausreichte, um die maximale Hsp70-Induktion auszulösen.

5.3.2 HSP70-INDUKTION DURCH DIE GPC-FRAKTIONEN DER STUFE II

Durch die GPC-Fraktionierung wurden hochmolekulare Probenbestandteile zu meist biogenen Ursprungs sowie niedermolekularer Schwefel abgetrennt. Die Abtrennung des Schwefels war notwendig, da mehrere Tests wie beispielsweise der Leuchtbakterientest (BRACK ET AL., 1999) und der Glutathiontest zur Detektion von oxidativem Stress (SIERTS-HERRMANN, 2002) positiv auf Schwefel ansprechen. Eine Hsp70-Induktion durch Schwefel konnte nicht nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Bei der Probe KS11 wurde der Schwefel aus der NF zusätzlich noch durch aktiviertes Kupferpulver entfernt, um eine Toxizität durch Reste an anthropogenen Substanzen erfassen zu können. In der HF sollte sich der Großteil der anthropogenen Schadstoffe befinden.

Wie Abb. 13 zu entnehmen ist, wurden bei allen Fraktionen aus der GPC-Fraktionierung z.T. signifikant bis hochsignifikant erhöhte Hsp70-Gehalte gemessen.

Zwischen den beiden untersuchten Proben war nach Inkubation mit der VF bzw. mit der NF kein signifikanter Unterschied feststellbar. Die eingesetzte TOC-Menge war bei der Probe von OS710a jedoch ca. doppelt so hoch wie die von KS11. Da die TOC-Menge im Vergleich zu den Konzentrationen, die vom Rohextrakt oder den HF eingesetzt wurden, insgesamt sehr hoch waren, ist die proteotoxische Wirkung der VF und der NF gegenüber der Wirkung des Rohextraktes als relativ gering zu bewerten.

Das hauptsächliche Interesse lag bei den GPC-HF der beiden Proben, da hier der größte Teil der Schadstoffe enthalten sein sollte. Die Ergebnisse der Inkubation mit den HF spiegelten in etwa die Ergebnisse der Inkubation mit den Rohextrakten wieder. Der TOC-Gehalt von 0,026 mg/mL, bei dem die maximale Hsp70-Induktion in der HF der Station KS11 beobachtet wurde, war nur unwesentlich höher als der TOC-Gehalt von 0,023 mg/mL, bei dem die maximale Hsp70-Induktion beim Rohextrakt ermittelt wurde. Bei der Probe OS710a stand ein TOC-Gehalt von 0,11 mg/mL der HF einem Gehalt von 0,077 mg/mL des Rohextraktes gegenüber. Diese Werte zeigten, dass das proteotoxische Potential der Rohextrakte zum größten Teil auf die in der HF enthaltenen Substanzen zurückzuführen war. Dafür sprach auch, dass die TOC-Gehalte der VF und der NF, die die maximale Hsp70-Induktion in den Zellen auslösten, im Vergleich zu den TOC-Mengen der HF sehr hoch waren und bei den Verdünnungen dieser Fraktionen auf TOC-Gehalte, die ungefähr im Bereich der HF oder des Rohextraktes lagen, keine Effekte mehr auftraten.

Bei der Station KS11 fiel auf, dass die Hsp70-Induktion durch die HF im Gegensatz zu der Induktion durch den Rohextrakt bzw. zu der durch die HF von OS710a sehr viel stärker ausgeprägt war. Mit ca. 500 %, bezogen auf den KW, fand die Hsp70-Induktion in einem Maße statt, wie sie ansonsten in dieser Arbeit bisher nur bei Cadmium beobachtet wurde.

5.3.3 HSP70-INDUKTION DURCH DIE HPLC-FRAKTIONEN DER STUFE III

Durch die HPLC-Fraktionierung der HF sollte die Komplexität der Probe weiter verringert und möglichst Fraktionen mit einzelnen Substanzklassen erhalten werden.

Die Untersuchung der einzelnen Fraktionen (F1-F6) auf ihre Proteotoxizität zeigte bei beiden Proben ein übereinstimmendes Bild. Signifikant bis hochsignifikant höhere Hsp70-Gehalte wurden in beiden Fällen durch die Inkubation mit F4 und F6 erhalten. Die Aufnahme von Dosis-Wirkungskurven zeigte nur bei F4 in den Verdünnungen noch Effekte, wobei diese Effekte bei der Probe KS11 im Vergleich zu der unverdünnten Lösung noch anstiegen. F6 löste dagegen nur einen Effekt durch Inkubation mit der unverdünnten Lösung aus. Alle anderen Fraktionen zeigten auch in den Verdünnungen keinen Effekt bzw. nur geringfügig erhöhte Hsp70-Gehalte, die sich jedoch nicht signifikant vom KW unterschieden.

Das größte proteotoxische Potential besaß demnach F4, insbesondere der Station KS11. Im Vergleich zu der GPC-HF sind die TOC-Gehalte von F4, die eine Hsp70-Induktion auslösten, um das 30fache (KS11) bzw. um das 60fache (OS710a) erhöht.

5.3.4 HSP70-INDUKTION DURCH DIE HPLC-FEINFRAKTIONEN DER STUFE IV

Aufgrund der Ergebnisse aus der Biotestbatterie des Projektes (s. Abschnitt 6.4.2) wurde in erster Linie die Fraktion F4 für die HPLC-Feinfraktionierung ausgewählt, um die Effekte durch Kombination von Analytik und Biotests auf bestimmte Substanzen einschränken zu können. Erst an dieser Stelle kam das Prinzip der BdF zum Tragen.

Die Hsp70-Bestimmung nach der Inkubation mit den einzelnen Fraktionen der Station KS11 (F4.1-F4.10) ergab folgendes Ergebnis: Es wurden in acht der zehn Fraktionen signifikant bis hochsignifikant erhöhte Hsp70-Gehalte beobachtet. Lediglich die Fraktion F4.1 löste keine Hsp70-Induktion aus und aus der Inkubation mit der Fraktion F4.7 resultierte ein wahrscheinlicher jedoch nicht nachweisbarer Anstieg im Hsp70-Gehalt. Die höchsten Hsp70-Gehalte zwischen 250 und 300 % wurden in den Fraktionen F4.3, F4.5 und F4.10 beobachtet. Aus der Inkubation mit den Fraktionen F4.2, F4.4, F4.6, F4.8 und F4.9 resultierten dagegen Hsp70-

Gehalte zwischen 150 und 200 %, bezogen auf den KW. Diese Hsp70-Gehalte sind z.T. erheblich höher als die durch die Extrakte und Fraktionen der vorherigen Untersuchungsstufen ausgelösten Hsp70-Induktionen.

Betrachtet man die TOC-Gehalte, die jeweils in dem Test eingesetzt wurden, so ergibt sich im Vergleich zu F4 der dritten Untersuchungsstufe eine um den Faktor acht größere Menge, die diese Effekte auslöste. Die höchsten Hsp70-Induktionen wurden nur durch die unverdünnten Fraktionen verursacht.

Bei der Station OS710a, bei der bereits eine größere TOC-Menge benötigt wurde, um den maximalen Effekt in der Fraktion F4 der HPLC-Fraktionierung auszulösen, ergaben sich durch Inkubation mit den HPLC-Feinfraktionen aufgrund der zusätzlichen Verteilung dementsprechend weitaus geringere Effekte. Ein signifikant erhöhter Hsp70-Gehalt war nur in den Fraktionen F4.3 zu beobachten. Wahrscheinliche, jedoch nicht nachweisbare Effekte ergaben sich aus den Inkubationen mit den Fraktionen F4.4 und F4.5. Die ermittelten Hsp70-Gehalte lagen dabei alle unter 200 %, bezogen auf den KW (s. Anhang 8.3, Tab. A12 und A13).

5.4 PROTEOTOXIZITÄT VON AUSGEWÄHLTEN EINZELSUBSTANZEN AUS DEN PROBEN

Der letzte Schritt der an das TIE-Konzept angelehnten BdF sollte die Verifizierung der Resultate sein. Da in diesem Fall aufgrund der immer noch zu großen Komplexität in den Fraktionen jedoch keine Zuordnung der Effekte zu einzelnen Substanzen möglich war, wurden aus der Vielzahl an Substanzen, die in den Proben bzw. in den Fraktionen detektiert wurden (HEINZEL, 2002), einige Substanzen unterschiedlicher Substanzklassen ausgewählt und auf ihr proteotoxisches Potential untersucht. Dabei handelte es sich vor allem um Substanzen, die entweder mengenmäßig stark vertreten waren oder als potentielle Verursacher vor allem für die beobachteten Effekte in der Fraktion F4 und deren Unterfraktionen in Frage kamen. Zudem wurden einige weiterhin weit verbreitete Schadstoffe untersucht. Tab. 5 gibt einen Überblick über Substanzen, die in den Proben identifiziert wurden.

Tab. 5 - Verteilung der Substanzklassen und einzelner Verbindungen auf die sechs Fraktionen nach der HPLC-Fraktionierung (HEINZEL, 2002). Unterschiede zwischen den beiden Proben sind grau unterlegt.

Fraktion	KS11	OS710a
F1	cyclische Di- und Triterpenoide; decarboxylierte Metabolite der Abietinsäure	
F2	Alkylbenzole (C2 bis C5); PAK (≤ 4 Ringe); Heteroaromaten (Dibenzofuran, Dibenzothiofphen und deren methylierte Homologe); chlorierte Aromaten, z.T. höherkondensierte PAK, Hauptkontaminanten: Fluoranthen und Pyren	
	größere Vielfalt an chlorierten Aromaten	mengenmäßig mehr chlorierte Aromaten und erheblich größere Mengen an PAK
F3	höherkondensierte PAK (Benzofluoranthene und Benzopyrene)	
	<i>p,p'</i> -DDD (1,1-Dichlor-2,2-bis(<i>p</i> -chlorphenyl)ethen) und seine Metaboliten	höhere Gehalte an höherkondensierten PAK
F4	Butylphthalate (<i>iso</i> - und <i>n</i> -) und Bis(2-ethylhexyl)phthalat; Heteroaromaten (Carbazol, Benz- und Dibenzcarbazol, Benzanthron); Ketone der Steranreihe	
	N,N'-Diethyl-N,N'-diphenylharnstoff, Bromphenol, Phosphorsäureester, Octyl- und Nonylphthalate	
F5	Übergangsfraction: sämtliche Komponenten auch in der vierten bzw. sechsten Fraktion vorhanden	
F6	Dehydroabietinsäure; Fettsäuren	
	Morpholin	

Ausgewählte Substanzen wurden in DMSO gelöst, so dass eine Konzentration von 1 g/L resultierte. Für den Hsp70-Test entspricht dies unter Berücksichtigung des 1 %igen DMSO-Zusatzes einer Konzentration von 10 µg Substanz/mL. Höhere Konzentrationen wurden nicht gewählt, da der Zusammenhang zu den Proben gewahrt bleiben sollte.

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Untersuchungen getrennt nach den einzelnen Substanzklassen dargestellt.

5.4.1 PROTEOTOXIZITÄT VON PAK, HETERO-PAK UND DEREN ABBAUPRODUKTEN

Tab. 6 gibt einen Überblick über die in dem Test eingesetzten PAK, Hetero-PAK sowie einige Abbauprodukte. Zudem sind Verwendungszweck, Strukturformeln und die Fraktionen, in denen sie vorkommen, angegeben.

Tab. 6 – Überblick über die ausgewählten PAK, Hetero-PAK sowie deren Derivate

Substanz	Strukturformel	Verwendung/Herkunft	Vorkommen
9,10-Dihydroanthracen			F2
9,10-Anthrachinon			F4
Anthron		PAK und Hetero-PAK werden bei unvollständiger Verbrennung aus fast allen organischen Stoffen gebildet (Verbrennungsmotoren, Großfeuerungsanlagen, Metallverarbeitung, aus Huminsäuren durch Kondensation).	F4
Xanthon			F3
Benzanthron			F4 F4.3-5
Phenanthren		Sie kommen in Mineralölen, Abgasen usw. vor. Eine Belastung erfolgt durch Deposition aus der Luft. Starke Kontaminationen treten an Altstandorten (Mineralöllager) oder alten Deponien auf.	F2
9,10-Dihydrophenanthren			F2
9,10-Phenanthrenchinon			F4
Carbazol		Die Derivate werden zumeist durch Oxidationsprozesse im Laufe der Zeit aus den PAK gebildet.	F4 F4.3-5
3-Methylchinolin			F4
Pyren			F2/F3
Fluoranthren			F2/F3

Bei den ausgewählten PAK, Hetero-PAK und deren Abbauprodukte handelt es sich zum großen Teil um Anthracen und Phenanthren, deren Abbauprodukte, um die beiden Hauptkontaminanten Pyren und Fluoranthren sowie um die beiden Hetero-PAK Carbazol und 3-Methylchinolin.

Die EPC-Zellen wurden mit allen Verbindungen inkubiert. In Abb. 14 sind die Dosis-Wirkungskurven von Pyren und Fluoranthen dargestellt. Auf die Abbildung anderer Dosis-Wirkungskurven wurde verzichtet. Die Ergebnisse aller untersuchten Substanzen sind zusammenfassend in Tab. 7 aufgeführt. Die Einzelergebnisse befinden sich im Anhang 8.3, Tab. A14.

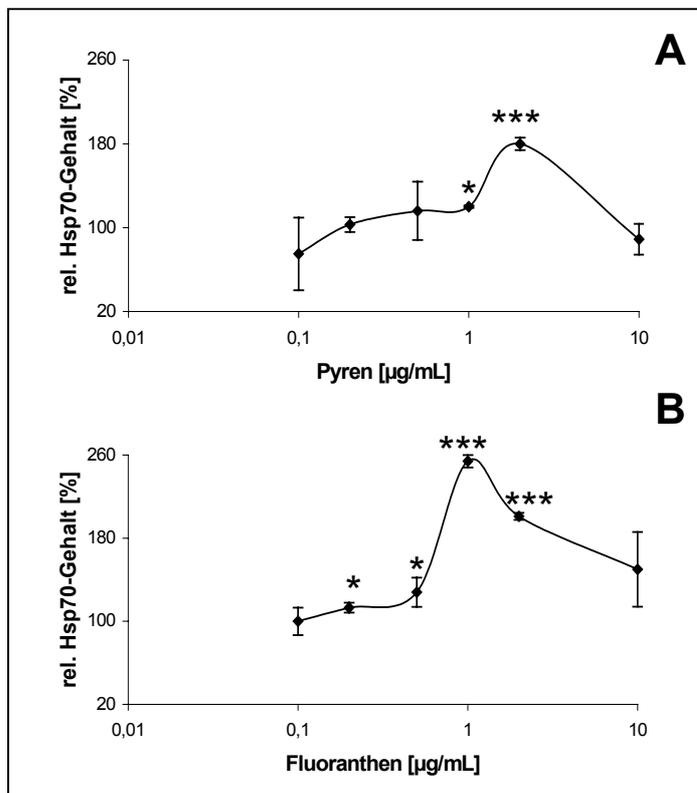


Abb. 14 - Dosis-Wirkungskurven aus der Inkubation mit Pyren (**A**) und Fluoranthen (**B**). Mittelwert \pm Standardabweichung. * Unterschied zum KW wahrscheinlich, jedoch nicht nachweisbar; ** Unterschied zum KW signifikant; *** Unterschied zum KW hochsignifikant

Die Inkubation mit den beiden dargestellten Substanzen resultierten in ähnlichen Dosis-Wirkungskurven wie die Inkubation mit Cadmium. Im Gegensatz zur Inkubation mit Cadmium, bei der eine Hsp70-Induktion ab 5 µg/mL beobachtet wurde, wurde eine Hsp70-Induktion bei Pyren schon ab 1 µg/mL und durch Fluoranthen schon bei 0,2 µg/mL ausgelöst. Die Maxima der Dosis-Wirkungskurven lagen im Gegensatz zur Inkubation mit Cadmium (25 µg/mL) für Pyren bei 2 µg/mL und für Fluoranthen bei 1 µg/mL. Beide Substanzen scheinen demnach ein größeres proteotoxisches Potential als Cadmium zu besitzen, wobei das proteotoxische Potential von Pyren zu Fluoranthen zunimmt. Im Vergleich zur Hsp70-Induktion durch Cadmium ist hier jedoch kaum ein linearer Zusammenhang zwischen Substanzmenge und Ausmaß der Hsp70-Induktion feststellbar: Nachdem die Hsp70-Gehalte zunächst nur langsam ansteigen, folgt ein sehr starker Anstieg auf das Maximum und anschließend fallen die Gehalte langsam ab.

In Tab. 7 sind für die weiterhin getesteten PAK, Hetero-PAK und deren Abbauprodukte die maximal induzierten Hsp70-Gehalte, sowie die Substanzmengen, die die maximale Hsp70-Induktion auslösten, und die Bereiche, in denen ein Effekt zu beobachten war, aufgeführt.

Tab. 7 - Hsp70-Induktion durch PAK, Hetero-PAK sowie deren Derivate. D/W-Kurve: Dosis-Wirkungskurve

Substanz	Hsp70-Induktion/ Cyto-toxizität	Max. Hsp70-Induktion [% bezogen auf KW]	Konzentration	
			[µg/mL]	Bereich
9,10-Dihydroanthracen	nein / nein	-	-	
9,10-Anthrachinon	nein / nein	-	-	
Anthron	ja / nein	149	5	5-10
Xanthon	nein / nein	-	-	-
Benzanthron	ja / ja	148	5	5
Phenanthren	ja / nein	154	10	5-10
9,10-Dihydrophenanthren	nein / nein	-	-	-
9,10-Phenanthrenchinon	ja / nein	180	10	5-10
Carbazol	ja / nein	144	10	5-10
3-Methylchinolin	ja / nein	232	5	2-10
Pyren	ja / nein	180	2	1-5
Fluoranthren	ja / nein	254	1	0,2-5

Ein cytotoxischer Effekt wurde nur bei der Inkubation mit 10 µg/mL Benzanthron beobachtet. Dieser Effekt ging mit einem signifikant geringeren Hsp70-Gehalt einher.

Von den insgesamt zwölf untersuchten Verbindungen lösten nur vier keine Hsp70-Induktion aus. Bei den Verbindungen handelte es sich um die beiden Dihydroverbindungen 9,10-Dihydroanthracen und 9,10-Dihydrophenanthren sowie die chinoid-Verbindung 9,10-Anthrachinon und den Hetero-PAK Xanthon.

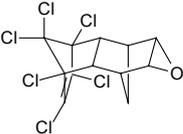
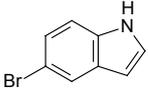
Die Verbindungen Anthron, Benzanthron, Phenanthren, 9,10-Phenanthrenchinon, 3-Methylchinolin sowie Carbazol führten zu einem Anstieg im Hsp70-Gehalt vergleichbar mit dem Anstieg ausgelöst durch die Cadmiuminkubation. Wie beim Cadmium führten 5 und 10 µg/mL Substanz mit Ausnahme von Benzanthron zu einer messbaren Erhöhung des Hsp70-Gehaltes, wobei das Ausmaß der Induktion bei Cadmium z.T. jedoch bis zu 300 % und bei größeren Cadmiummengen bis zu 600 % betrug und hier deutlich geringere Hsp70-Induktionen beobachtet wurden. Bei 3-Methylchinolin wurde zudem ein signifikanter Anstieg bei 2 µg/mL beobachtet.

Wie bei den beiden abgebildeten Dosis-Wirkungskurven lagen bei 3-Methylchinolin, Anthron und Benzanthron die Maxima nicht bei der größten Schadstoffmenge. Gehalte oberhalb der Schadstoffkonzentration im Maximum führten zu niedrigeren Hsp70-Induktionen (3-Methylchinolin, Anthron) bzw. zu einer Abnahme im Hsp70-Gehalt aufgrund der cytotoxischen Effekte (Benzanthron).

5.4.2 PROTEOTOXIZITÄT VON CHLORIERTEN UND BROMIERTEN VERBINDUNGEN

In Tab. 8 sind zunächst die ausgewählten Verbindungen, ihre Verwendung, die Strukturformeln sowie das Vorkommen aufgeführt.

Tab. 8 – Überblick über die ausgewählten chlorierten und bromierten Verbindungen

Substanz	Strukturformel	Verwendung/Herkunft	Vorkommen
Dieldrin		Insektizid	F2 (OS710a)
5-Bromindol		biogen ?	F4/5 F4.3-5
4-Bromphenol		biogen ?	F4/5 (KS11)

Bei den ausgewählten Substanzen handelt es sich um einen Vertreter der Chlor-Insektizide sowie zwei Substanzen wahrscheinlich biogenen Ursprungs, die in auffälligen Konzentrationen vor allem in der Station T41a und KS11 identifiziert wurden.

Auf die Darstellung von Dosis-Wirkungskurven wurde an dieser Stelle verzichtet und statt dessen die Ergebnisse tabellarisch in Tab. 9 aufgeführt. Angegeben sind hier ebenfalls das Ausmaß der Hsp70-Induktion im Maximum der Dosis-Wirkungskurve, sowie die Substanzmenge, die den maximalen Effekt auslöste, bzw. der Bereich, in dem Effekte beobachtet wurden. Die Einzelergebnisse sind im Anhang 8.3 Tab. A14 aufgeführt.

Tab. 9 - Hsp70-Induktion durch chlorierte und bromierte Verbindungen. D/W-Kurve: Dosis-Wirkungskurve

Substanz	Hsp70-Induktion/ Cyto-toxizität	Max. Hsp70-Induktion [% bezogen auf KW]	Substanzmenge [µg/mL]	
			im Maximum der D/W-Kurve	Bereich
Dieldrin	ja / nein	183	2	1-2
5-Bromindol	ja / nein	206	2	1-10
4-Bromphenol	ja / nein	153	10	10

Für alle drei untersuchten chlorierten und bromierten Verbindungen wurde ein proteotoxisches Potential nachgewiesen.

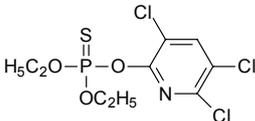
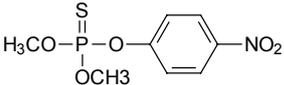
Dieldrin und 5-Bromindol führten jeweils zu einer Hsp70-Induktion von ca. 200 %, bezogen auf den KW, bei 2 µg eingesetzter Substanz/mL Inkubationslösung. Größere Substanzmengen resultierten jeweils in geringeren Effekten.

Bei 4-Bromphenol konnte nur bei der größten Substanzmenge eine relativ schwache Hsp70-Induktion beobachtet werden. Geringere Mengen lösten keine Stressproteinantwort aus. Cytotoxische Effekte wurden bei keiner der durchgeführten Inkubationen beobachtet.

5.4.3 PROTEOTOXIZITÄT VON PHOSPHORORGANISCHEN VERBINDUNGEN

In der folgenden Tab. 10 sind die ausgewählten phosphororganischen Verbindungen, ihre Verwendung, die Strukturformeln sowie Vorkommen aufgeführt.

Tab. 10 – Übersicht über die ausgewählten phosphororganischen Verbindungen

Substanz	Strukturformel	Verwendung/Herkunft	Vorkommen
Tris(2-chlorethyl)phosphat	$(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})\text{PO}_4$	Weichmacher, Flammschutzmittel	F4/5 (KS11)
Chlorpyrifos		Insektizid	
Ethylparathion (E 605)		Insektizid	

Bei den ausgewählten Substanzen handelt es sich um das als Weichmacher eingesetzte Tris(2-chlorethyl)phosphat, das in den Fraktionen F4 und F5 von KS11 vorkommt, sowie um zwei Organophosphat-Pestizide, die jedoch in den Proben nicht identifiziert wurden. Diese wurden ausgewählt, um den Einfluss weiterer phosphororganischer Verbindungen auf die Hsp70-Induktion zu untersuchen. Beide Organophosphatpestizide sind bekannt für ihre neurotoxische Wirkung (OLIVIER ET AL., 2001; PHILIPS ET AL., 2002).

Tris(2-chlorethyl)phosphat ist in der TRGS 905 „Verzeichnis krebserzeugender, erbgutverändernder oder fortpflanzungsgefährdender Stoffe“ als krebserregend aufgeführt.

Die nachstehende Tab. 11 fasst die Ergebnisse der Inkubation mit diesen Verbindungen zusammen. Wie auch schon bei den vorherigen Übersichten sind auch hier das Ausmaß der Hsp70-Induktion im Maximum der Dosis-Wirkungskurve, sowie die Substanzmenge, die den maximalen Effekt auslöste, bzw. der Substanzmengenbereich, der einen Effekt verursachte, aufgeführt. Die Einzeldaten sind im Anhang 8.3 Tab. A14 aufgeführt.

Tab. 11 - Hsp70-Induktion durch phosphororganische Verbindungen. D/W-Kurve: Dosis-Wirkungskurve

Substanz	Hsp70-Induktion/ Cytotoxizität	Max. Hsp70-Induktion [% bezogen auf KW]	Substanzmenge [µg/mL]	
			im Maximum der D/W-Kurve	Bereich
Tris(2-chlorethyl)phosphat	ja / nein	525	10	0,2-10
Chlorpyrifos	ja / nein	135	10	10
Ethylparathion (E 605)	nein / nein	-	-	-

Die Ergebnisse zeigen, dass nur Tris(2-chlorethyl)phosphat und Chlorpyrifos im untersuchten Konzentrationsbereich eine Hsp70-Induktion auslösten. Der Anstieg des Hsp70-Gehaltes bei Inkubation mit Chlorpyrifos war nur schwach ausgeprägt und erfolgte nur bei einer Substanzmenge von 10 µg/mL. Die Inkubation mit Tris(2-chlorethyl)phosphat führte dagegen zu erhöhten Hsp70-Gehalten bis zu 525 %, bezogen auf den KW, und die Induktion erfolgte in einem Bereich von 0,2 bis 10 µg/mL.

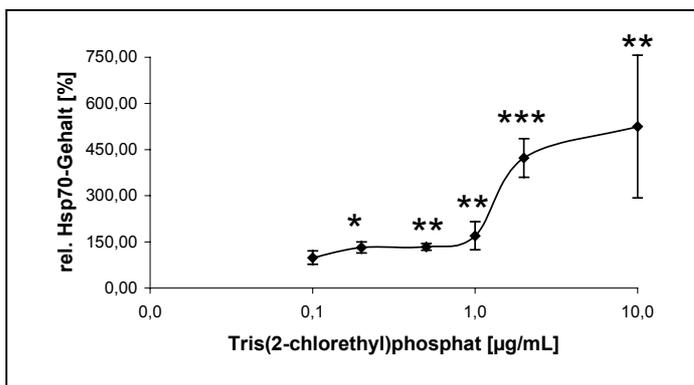


Abb. 15 - Dosis-Wirkungskurve aus der Inkubation mit Tris(2-chlorethyl)phosphat). Mittelwert \pm Standardabweichung. * Unterschied zum KW wahrscheinlich, jedoch nicht nachweisbar; ** Unterschied zum KW signifikant; *** Unterschied zum KW hochsignifikant

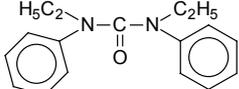
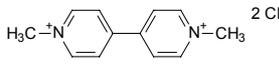
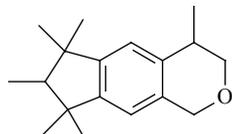
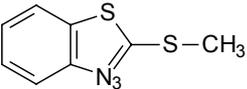
Die Dosis-Wirkungskurve für Tris(2-chlorethyl)phosphat ist in Abb. 15 dargestellt.

Es ist zu erkennen, dass zunächst nur ein marginaler, jedoch signifikanter Anstieg im Hsp70-Gehalt zu verzeichnen war. Im Anschluss daran erfolgte zwischen 1 und 2 µg/mL ein starker Anstieg, der dann bis 10 µg/mL wieder abflachte.

5.4.4 PROTEOTOXIZITÄT WEITERER SUBSTANZEN

Neben den Verbindungen, die in Substanzklassen zusammengefasst wurden, sollen an dieser Stelle noch Substanzen Erwähnung finden, die keiner Substanzklasse zugeordnet werden konnten bzw. als alleinige Vertreter ihrer Klasse in dieser Arbeit untersucht wurden. In Tab. 12 sind auch hier Strukturformel, Verwendung der Substanzen und ihr Vorkommen in den Fraktionen aufgeführt.

Tab. 12 – Übersicht über weiterhin ausgewählte Substanzen

Substanz	Strukturformel	Verwendung	Vorkommen
N,N'-Diethyl-N,N'-diphenylharnstoff		Industrieprodukt, Explosivstoff	F4 (KS11)
Paraquat		Herbizid	
Galaxolid		Moschus-Duftstoff	(F2)/F3
2-Methylthiobenzothiazol		Vulkanisationsbeschleuniger	T41a

Die Verbindung Paraquat wurde nicht in den Proben identifiziert, stellt jedoch ein vielfach angewendetes Herbizid dar. Bei den anderen drei Substanzen handelte es sich um Verbindungen, die in den Proben identifiziert wurden. Die Ergebnisse der Inkubationsversuche sind in Tab. 13 zusammengefasst. Aufgeführt sind das Ausmaß und die Substanzmenge im Maximum der resultierten Dosis-Wirkungskurven sowie der Substanzmengenbereich, in dem ein Effekt beobachtet wurde. Die Einzeldaten sind im Anhang 8.3 Tab. A14 aufgeführt.

Tab. 13 - Hsp70-Induktion durch weiterhin ausgewählte Verbindungen. D/W-Kurve: Dosis-Wirkungskurve

Substanz	Hsp70-Induktion/ Cyto-toxizität	Max. Hsp70-Induktion [% bezogen auf KW]	Substanzmenge [µg/mL]	
			im Maximum der D/W-Kurve	Bereich
N,N'-Diethyl-N,N'-diphenylharnstoff	nein / nein	-	-	-
Paraquat	ja / nein	190	0,1	0,1 ^{a)}
Galaxolid	nein / ja	-	-	-
2-Methylthiobenzothiazol	ja / nein	2190	2	< 0,1 ^{a)} -10

^{a)} von dieser Substanz wurden keine weiteren Verdünnungen untersucht

Von den untersuchten Substanzen lösten nur Paraquat und 2-Methylthiobenzothiazol proteotoxische Effekte aus. Auffällig ist vor allem Paraquat, welches erst bei der geringsten Substanzmenge von 0,1 µg/mL eine verstärkte Hsp70-Synthese induzierte. Bei 2-Methylthiobenzothiazol führten 10 µg Substanz /mL zu einer geringeren Hsp70-Induktion als bei 2 µg/mL. 2-Methylthiobenzothiazol induzierte wie Tris(2-chlorethyl)phosphat über einen vergleichsweise weiten Konzentrationsbereich von 0,1 bis 10 µg/mL eine verstärkte Hsp70-Synthese in den EPC-Zellen. Die Dosis-Wirkungskurve ist in Abb. 16 dargestellt. Im Vergleich zu den

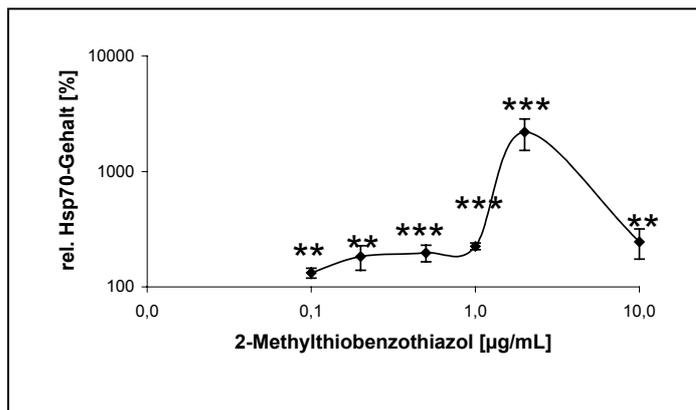


Abb. 16 - Dosis-Wirkungskurve aus der Inkubation mit 2-Methylthiobenzothiazol. Mittelwert \pm Standardabweichung. ** Unterschied zum KW signifikant; *** Unterschied zum KW hochsignifikant

anderen Darstellungen der Dosis-Wirkungskurven ist die Ordinate aufgrund der hohen Hsp70-Induktion logarithmisch dargestellt. Im Bereich von 0,1 bis 1 $\mu\text{g/mL}$ ist ein annähernd linearer Anstieg zu erkennen. Von 1 auf 2 $\mu\text{g/mL}$ ist ein starker Anstieg im Hsp70-Gehalt auf das ca. 20fache vom KW zu verzeichnen. Bei höheren Konzentrationen

kommt es anschließend wieder zu einer geringeren Hsp70-Induktion. Im Vergleich zu den bisher untersuchten Substanzen wurde bei 2-Methylthiobenzothiazol das höchste Ausmaß einer Hsp70-Induktion beobachtet.

N,N'-Diethyl-N,N'-diphenylharnstoff und Galaxolid führten nach Inkubation in dem untersuchten Konzentrationsbereich zu keiner signifikanten Erhöhung des Hsp70-Gehaltes. Galaxolid wirkte in der höchsten Konzentration cytotoxisch, besaß jedoch kein proteotoxisches Potential.

5.5 BEITRAG DER ALS PROTEOTOXISCH IDENTIFIZIERTEN SUBSTANZEN ZU DEN EFFEKTEN IN DEN FRAKTIONEN

In dem vorherigen Abschnitt wurden für einige der in den Fraktionen identifizierten Substanzen ein proteotoxisches Potential nachgewiesen. Inwiefern diese Substanzen für die gemessenen Effekte in den Fraktionen verantwortlich waren, soll im Folgenden durch Gegenüberstellung der z.T. bestimmten Konzentrationen in den Fraktionen und den Konzentrationen, bei denen gerade noch ein Effekt beobachtet wurde, bestimmt werden. Diese Gegenüberstellung wird an der Untersuchungsstufe III vorgenommen, da bei der Feinfraktionierung (Untersuchungsstufe IV) die Substanzen über mehrere Fraktionen verteilt waren bzw. sich die Substanzen z.T. an der Nachweisgrenze befanden. Die Konzentrationen sind in Tab. 14 und 15 aufgeführt.

Tab. 14 – Gegenüberstellung der Konzentrationen in den Proben (C_{Station}) und der Konzentrationen (C_{Effekt}), die noch eine Hsp70-Induktion hervorrufen, für die Fraktion F2

Substanz	C_{Effekt}	C_{KS11} ^{a)}	C_{OS710a} ^{a)}	Faktor	
	[ng/mL]	[ng/mL]	[ng/mL]	$C_{\text{Effekt}} : C_{\text{KS11}}$	$C_{\text{Effekt}} : C_{\text{OS710a}}$
Phenanthren	5000	28	94	200	50
Pyren	1000	38	320	30	3
Fluoranthren	200	48	280	4	0,7
Dieldrin	1000	-	0,25	-	4000

^{a)} BISELLI, 2002

Tab. 14 enthält für jede Substanz neben der Konzentration, die noch eine signifikante Hsp70-Induktion hervorrief (C_{Effekt}), und den Konzentrationen, die in den Fraktionen der Station KS11 und OS710a enthalten sind (C_{Station}), außerdem Faktoren, die den Quotienten aus beiden Konzentrationen darstellen. Dabei muss berücksichtigt werden, dass vor allem die PAK zu einem gewissen Teil auch in der Fraktion 3 enthalten sind, so dass alle Werte nur Anhaltspunkte sind.

Faktoren > 1 bedeuten, dass die in der Probe enthaltene Konzentration nicht ausreicht, allein eine Hsp70-Induktion hervorzurufen. Faktoren < 1 müssten dagegen eine Hsp70-Induktion in den Zellen auslösen.

Die Faktoren für die Station KS11 zeigen, dass keine der Substanzen alleine eine Hsp70-Induktion auszulösen vermag. Die Fluoranthrenkonzentration in der zum Test eingesetzten Menge liegt jedoch nur um den Faktor 4 unter der Konzentration, die einen Effekt bei der Inkubation mit der Einzelsubstanz ausgelöst hat. Auch Pyren, das ca. Faktor 30 unter der Effektkonzentration liegt, könnte zu einer Hsp70-Induktion, die aufgrund von additiven Wirkungen erfolgt, beitragen. Unter Berücksichtigung der vielen anderen Substanzen, die in dieser Fraktion enthalten sind und die möglicherweise ebenfalls proteotoxisches Potential besitzen können, wäre eine Hsp70-Induktion nicht auszuschließen.

Noch deutlicher wird dieser Sachverhalt an der Station OS710a, bei der Fluoranthren in der zum Test eingesetzten Menge in einer Konzentration vorhanden ist, die über der Konzentration liegt, die bei der Inkubation mit der Einzelsubstanz eine Hsp70-Induktion hervorgerufen hat, so dass allein aufgrund dieser Substanz ein Effekt durch Inkubation mit der Fraktion F2 zu erwarten gewesen wäre.

In der folgenden Tab. 15 wurde die Gegenüberstellung der Konzentrationen für die Fraktion F4 vorgenommen. Auch hier sind wieder für jede Substanz neben der Konzentration, die noch eine Hsp70-Induktion hervorrief (C_{Effekt}), und den Konzentrationen, die in der zum Test eingesetzten Menge der Fraktionen von KS11 und OS710a enthalten sind (C_{Station}), die Faktoren, die den Quotienten aus beiden Konzentrationen darstellen, aufgeführt.

Tab. 15 – Gegenüberstellung der Konzentrationen in den Proben (C_{Station}) und der Konzentrationen (C_{Effekt}), die noch eine Hsp70-Induktion hervorrufen, für die Fraktion F4

Substanz	C_{Effekt} [ng/mL]	$C_{\text{KS11}}^{\text{c)}$ [ng/mL]	$C_{\text{OS710a}}^{\text{c)}$ [ng/mL]	Faktor	
				$C_{\text{Effekt}} : C_{\text{KS11}}$	$C_{\text{Effekt}} : C_{\text{OS710a}}$
Anthron	5000	a)	a)	-	-
Benzanthron	5000	a)	a)	-	-
Phenanthrenchinon	5000	a)	a)	-	-
Carbazol	5000	a)	a)	-	-
3-Methylchinolin	2000	a)	a)	-	-
(5-)Bromindol ^{b)}	1000	-	0,4	-	2500
4-Bromphenol	10000	3,3	-	3000	-
Tris(2-chlorethyl)phosphat	200	2,5	-	75	-

^{a)} Substanzen wurden bei einem Non-Target-Screening identifiziert, jedoch nicht quantifiziert. Konzentrationen lagen jedoch im Spurenbereich

^{b)} In der Probe waren 4- bzw. 6-Bromindol enthalten, die jedoch als Standard für den Biotest nicht zur Verfügung standen, so dass als Referenzsubstanz 5-Bromindol gewählt wurde.

^{c)} Heinzl, 2002; Reineke, 2002

Bei Betrachtung der Faktoren wird deutlich, dass weder bei der Probe KS11 noch bei der Probe OS710a die untersuchten Substanzen allein für die Effekte verantwortlich sein können. Auch ein Beitrag der untersuchten Substanzen - evtl. mit Ausnahme von Tris(2-chlorethylphosphat) - zu den beobachteten Effekten in der Fraktion F4 ist aufgrund der sehr geringen Konzentrationen unwahrscheinlich. Das Mitwirken von Tris(2-chlorethylphosphat) ist aufgrund des Faktors von 75 als möglich anzusehen.

Betrachtet man die Untersuchungsstufe IV, bei der für KS11 die ca. 8fache TOC-Menge und für OS710a etwa die gleiche TOC-Menge eingesetzt wurde, so ist auch hier eine Beteiligung von Tris(2-chlorethyl)phosphat möglich.

2-Methylthiobenzothiazol spielt für die Effekte in den beiden untersuchten Proben keine Rolle, da es nur in der Probe T41a identifiziert wurde.

6 DISKUSSION

6.1 EIGNUNG DER EPC-ZELLINIE

6.1.1 VERGLEICH DER EMPFINDLICHKEIT MIT LITERATURDATEN

Die Untersuchung einzelner Substanzen hinsichtlich ihres Potentials, Hsp70 in Zellen zu induzieren, sind in der Literatur sehr häufig beschrieben. Vor allem Cadmium war als bekannter Stressor oft Gegenstand solcher Untersuchungen, so dass die Beurteilung der Empfindlichkeit in erster Linie am Beispiel von Cadmium vorgenommen werden sollte.

Inkubationen mit Cadmium erfolgten in dieser Arbeit zum einen in Kulturgefäßen und zum anderen in Reaktionsgefäßen über 2, 4 und 24 h. Unter den ausgewählten Inkubationsbedingungen (2 h, in Reaktionsgefäßen) zeigten die EPC-Zellen nach Inkubation mit Cadmium signifikant erhöhte Hsp70-Gehalte zwischen 5 und 100 µg/mL bis auf 500 % des KW.

Vergleichbare Untersuchungen an Zellen wurden beispielsweise von OVELGÖNNE ET AL. (1995), SALMINEN ET AL. (1996) und RYAN (1997) durchgeführt. RYAN (1997) erzielte bei einer dreistündigen Inkubation in Kulturgefäßen mit einer Cadmiumkonzentration von 2,5 µg/mL bei CHSE-214-Zellen einen Anstieg des Hsp70-Gehaltes auf 226 %. In dieser Arbeit wurde sowohl bei der zwei- als auch bei der vierstündigen Inkubation in Kulturgefäßen ein relativer Hsp70-Gehalt von ca. 300 % beobachtet, so dass die Ergebnisse durchaus vergleichbar sind. Unter den gewählten Inkubationsbedingungen wurden ähnliche Hsp70-Gehalte wie bei RYAN (1997) bei Inkubation mit 5 µg/mL induziert.

SALMINEN ET AL. (1996) beobachteten bei einer Cadmiumkonzentration von 50 µM (5,6 µg/mL) eine mit diesen Ergebnissen vergleichbare mittlere Hsp70-Induktion von ca. 350 % innerhalb von 24 Stunden in HepG2-Zellen. OVELGÖNNE ET AL. (1995) exponierten Leberzellen von Ratten (Reuber H35) mit Cadmium in einem Konzentrationsbereich von 1-300 µM Cadmium (entsprechend 0,11-33 µg/mL) über Zeiträume von 1 bis 6 h. Eine Cadmiumkonzentration von 1 µM (0,11 µg/mL) führte über den gesamten Zeitraum zu keiner Hsp70-Expression. Dieses Ergebnis stimmt insofern mit den hier präsentierten Ergebnissen überein, als dass bei einer Cadmiumkonzentrationen von 0,1 µg/mL erst nach 24 h eine Hsp70-Induktion zu beobachten war. Jedoch führten auch Cadmiumgehalte von 0,5 µg/mL erst nach 24 h Stunden zu einer Hsp70-Expression, während von OVELGÖNNE ET AL. (1995) bei 0,33 µg/mL bereits nach 4 Stunden eine Zunahme im Hsp70-Gehalt bestimmt wurde. Konzentrationen von 30 µM (3,3 µg/mL) resultierten nach 3 h in einer Hsp70-Induktion; auch in den hier dargestellten Ergebnissen waren bei einer Konzentration von 5 µg/mL nach 2 und 4 h bereits signifikant höhere Hsp70-Gehalte

zu verzeichnen. Inkubationen mit 100 μM (11 $\mu\text{g}/\text{mL}$) und 300 μM (33 $\mu\text{g}/\text{mL}$) führten bei OVELGÖNNE ET AL. (1995) bereits nach 1 bis 2 Stunden gegenüber der Kontrolle zu erhöhten Hsp70-Gehalten. Bei den EPC-Zellen war nach 2 h bei 10 und 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ebenfalls eine Hsp70-Induktion messbar. Über das Ausmaß der Hsp70-Expression bei OVELGÖNNE ET AL. (1995) kann keine Aussage getroffen werden, da dies aus der zitierten Quelle nicht hervorgeht. Zu bemerken ist außerdem, dass bei höheren Konzentrationen von ihnen kein Rückgang der Hsp70-Induktion beobachtet wurde. Jedoch ist auch bei den Ergebnissen dieser Arbeit ein deutlicher Rückgang erst nach 24 h oder bei höheren Cadmiumkonzentrationen zu verzeichnen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die EPC-Zelllinie hinsichtlich der Empfindlichkeit mit anderen in der Literatur beschriebenen Zelllinien vergleichbar ist und somit für derartige Untersuchungen geeignet erscheint.

6.2 VERLAUF DER DOSIS-WIRKUNGSKURVEN

Die aufgenommenen Dosis-Wirkungskurven zeigten größtenteils einen ähnlichen Verlauf: Ab einer bestimmten Konzentration kommt es zu einer Hsp70-Induktion, die mit zunehmender Schadstoffkonzentration ein Maximum erreicht und anschließend wieder auf das Niveau des KW abnimmt. Bei der Inkubation mit Cadmium unter den ausgewählten Bedingungen kam es ab einer Konzentration von 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ zu einer Hsp70-Induktion bis auf 500 % des KW. Konzentrationen größer 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ führten schließlich zu einer Abnahme bis auf den KW. Längere Inkubationszeiten führten bei hohen Cadmiumkonzentrationen sogar zu Abnahmen des Hsp70-Gehaltes im Vergleich zum KW einhergehend mit cytotoxischen Effekten.

Einen ähnlichen Verlauf zeigten die Dosis-Wirkungskurven aus der Inkubation mit den Sedimentrohextrakten mit Ausnahme der Kurven des Arkona-Beckens (s. Abb. 12D) und des Gotlandtiefs (Abb. 12G). Jedoch verblieb hier der Hsp70-Gehalt nach Erreichen des Maximums und dem Absinken auf das Grundniveau über einen sehr weiten Konzentrationsbereich (1-2 Zehnerpotenzen) auf diesem Niveau, ohne weiter abzunehmen.

Ein solcher Verlauf von Dosis-Wirkungskurven wird bei biologischen Testsystemen nur selten beobachtet. In der Regel führen Schadstoffe ab einem bestimmten Schwellenwert zu einem Anstieg im Effekt bis zum Erreichen eines maximalen Effektes, wie z.B. der 100 %igen Hemmung des Leuchtens im Leuchtbakterientest (REINEKE, 2002). Die Ursache für die bei Hsp70 abweichende Dosis-Wirkungskurve liegt darin, dass bei höheren Schadstoffkonzentrationen auch wichtige Zellfunktionen in Mitleidenschaft gezogen werden, für die

Hsp70-Synthese jedoch ein funktionierender Zellmetabolismus unbedingt notwendig ist (MEYER ET AL., 1995).

Der Verlauf der Hsp70-Induktion mit kontinuierlich ansteigenden Hsp70-Gehalten bis zum Erreichen eines Maximums und der anschließend wieder abnehmenden Hsp70-Induktion bis hin zu einer Abnahme im Hsp70-Gehalt gegenüber den KW, wie er bei der Cadmiumexposition zu beobachten war (s. 4.2), wurde bereits von ECKWERT ET AL. (1997) für Schwermetalle, von NEUHAUS-STEINMETZ UND RENSING (1997) für Paracetamol, für SDS von VIJAYAN ET AL. (1998), für Oxyfluorfen von HASSANEIN ET AL. (1999) und für Natriumarsenit von EDWARDS ET AL. (1990) beschrieben.

ECKWERT ET AL. (1997) untersuchten an der Isopodenart *Oniscus asellus* die Hsp70-Induktion durch die Schwermetalle Cadmium, Blei und Zink einzeln und als Mischungen und teilten den Verlauf in drei Zonen ein (s. Abb. 17).

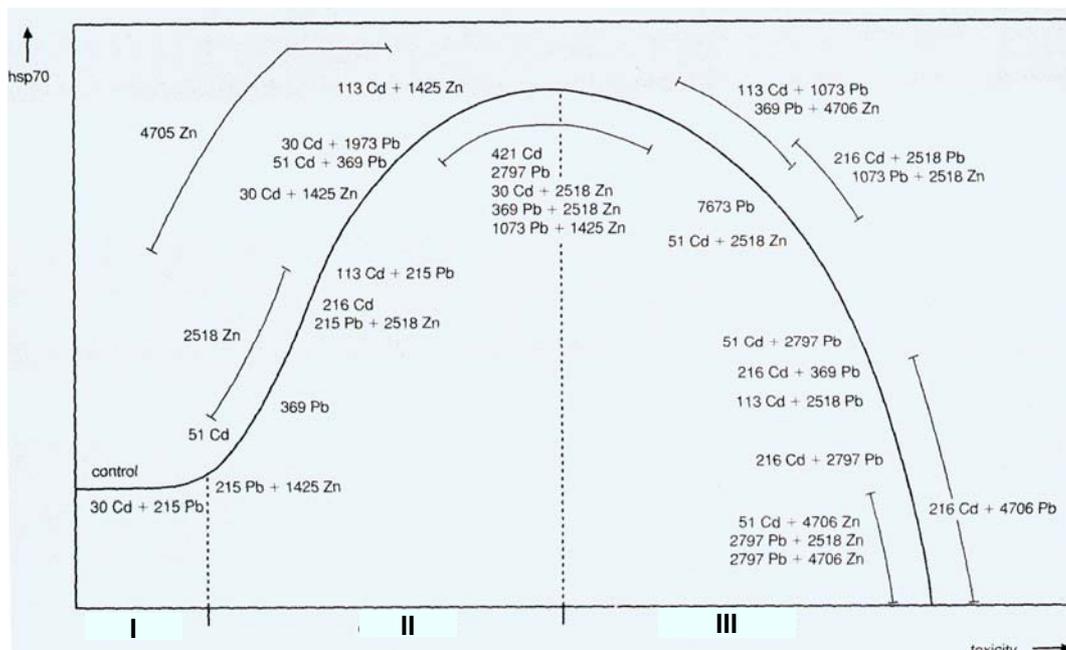


Abb. 17 – Verlauf der Hsp70-Induktion mit zunehmender Toxizität. I Homeostase, II Toxizität kompensierbar, III Toxizität nicht mehr kompensierbar (aus ECKWERT ET AL., 1997)

Zone I zeigt den Bereich der zellulären Homeostase. Der Gehalt an zellulären Hsp70 ist ausreichend, die durch geringe Konzentrationen an Schwermetallen auftretende Toxizität zu kompensieren. Es ist nur eine marginale Stressreaktion zu beobachten. In der zweiten Zone wird aufgrund der Stressantwort der Hsp70-Gehalt in der Zelle drastisch erhöht und erreicht am Ende der Zone ein Maximum. Ein weiterer Anstieg der Toxizität führt zu einer schwerwiegenden Schädigung des zellulären Proteinbiosynthese-Apparates bis hin zu cytotoxischen Schäden und somit zu einer Abnahme der Hsp70-Induktion in Zone III. Im höherkonzentrierten

Expositionsbereich (Zone III) kann die Toxizität nicht mehr durch die Hsp70-Bildung kompensiert werden. Bei höheren Expositionsdosen nimmt der Abbau von Hsp70 gegenüber der Neusynthese aufgrund von pathologischen Schäden zu und es kommt zu abnehmenden Hsp70-Induktionen (PAWERT ET AL., 1996; TRIEBSKORN UND KÖHLER, 1996) bzw. aufgrund von Membranschäden durch cytotoxische Effekte sogar zur Verringerung des Hsp70-Grundgehaltes (KÖHLER ET AL., 1996).

Bei der Inkubation mit den Sedimentrohextrakten kam es im Gegensatz zur Cadmiuminkubation nicht zu abnehmenden Hsp70-Gehalten im Vergleich zum KW. Nach Erreichen des KW-Gehaltes verblieben die Gehalte auf diesem Niveau. Dies stand in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Cytotoxizitätsbestimmung; mit Ausnahme des unverdünnten Rohextraktes des Sediments aus dem Skagerrak traten keine cytotoxischen Effekte bei den Proben auf. Aus diesem Grund spielen möglicherweise bei komplexen Stoffgemischen, wie z.B. Sedimentextrakten, weitere Faktoren eine Rolle. Eine Erklärung wäre, dass die Zellen durch die Intoxikation nicht mehr zu aktiven Stoffwechselprozessen fähig sind, so dass keine Hsp70-Transkription erfolgen kann, oder dass einzelne Substanzen z.B. die Transkription inhibieren.

Ähnliche Vermutungen stellten WERNER ET AL. (1998) bei der Exposition von Amphipoden (*Ampelisca abdita*) an 23 unterschiedlich belasteten Sedimenten aus der Bucht von San Fransisco an. Sie beobachteten eine negative Korrelation zwischen einer Hsp60-Induktion und einigen Organozinnverbindungen, sowie zwischen einer Hsp70-Induktion und Benzo[b]fluoranthen, Benzo[k]fluoranthen und Benzo[ghi]perylen. Diese negative Korrelation weist möglicherweise auf einen inhibierenden Effekt dieser Substanzen auf die Stressprotein-Induktion hin.

Inhibierende Effekte von unterschiedlichen Substanzen auf die Hsp70-Induktion wurden bereits mehrfach beschrieben. EDINGTON ET AL. (1989) haben in humanen Zellkulturen den inhibierenden Effekt von Glycerin auf die Stressprotein-Induktion nachgewiesen und SANDERS UND MARTIN (1994) zeigten, dass Kupfer die Hitzechockantwort in Seegurkenembryonen unterdrückt. Einige Flavonoide wie Quercetin, Genistein und Luteolin inhibierten die Induktion der wichtigsten Stressproteine u.a. Hsp90 und Hsp70 in humanen Krebszellen, während die Synthese anderer Proteine nicht beeinflusst wurde (HOSOKAWA ET AL., 1990).

Eine Inhibition der Hsp70-Synthese in den komplexen Schadstoffgemischen, die in den Sedimentextrakten vorlagen, ist möglicherweise der Grund dafür, dass es bei der Inkubation mit den Sedimentrohextrakten im höherkonzentrierten Bereich zu keiner Hsp70-Induktion führt, obwohl keine cytotoxischen Effekte zu beobachten waren. Bei der Verdünnung der Extrakte könnte sich der inhibierende Effekt möglicherweise verringert haben, so dass es dann zu einer Hsp70-Induktion kam.

Vor diesem Hintergrund muss auch das Ergebnis der Inkubation mit dem Sedimentrohextrakt des Arkona-Beckens betrachtet werden. Ob die Probe kein proteotoxisches Potential besaß und aus diesem Grund keine Hsp70-Induktion auslöste

oder evtl. vorhandene Inhibitoren keine Hsp70-Induktion ermöglichten, kann aufgrund der Datenlage an dieser Stelle nicht beurteilt werden.

Bei der Inkubation mit Dichlormethan traten im Widerspruch zu dem von ECKWERT ET AL. (1997) postulierten Modell Hsp70-Induktionen bei gleichzeitig cytotoxischen Effekten auf. AIT-AÏSSA ET AL. (2000) haben bei Chlorphenol-Derivaten, 3,4-Dichloranilin und Ethylparathion in HeLa-Zellen ebenfalls noch Hsp70-Induktionen bei cytotoxischen Konzentrationen beobachtet. Die höchsten Induktionen wurden z.B. bei Pentachlorphenol und 3,5-Dichlorphenol erst bei Konzentrationen gemessen, die eine Reduzierung des Gesamtproteingehaltes auf ca. 25 %, bei 2,4,5-Trichlorphenol sogar auf 8 % des KW zufolge hatten. Vergleichsweise beträgt der Proteingehalt bei den mit 1 und 0,2 Vol.-% Dichlormethan inkubierten EPC-Zellen ebenfalls nur noch 20-30 % im Vergleich zum KW. AIT-AÏSSA ET AL. (2000) führten die Unterschiede der Substanzen in ihrem Hsp70-Induktionsvermögen darauf zurück, dass Hsp70 durch unterschiedliche Toxizitätsmechanismen induziert werden: Die Reaktion von Schwermetallen mit Thiolgruppen von Proteinen, resultierend in einer veränderten Struktur, ist bekannt. Diese Proteotoxizität erfolgt möglicherweise als ein primärer Effekt, wodurch eine Hsp70-Induktion schon bei subletalen Konzentrationen zu beobachten ist. Bei stark hydrophoben Substanzen wie z.B. auch Dichlormethan ist die Veränderung von Proteinstrukturen möglicherweise erst ein sekundärer Effekt, nachdem diese Substanzen zunächst lebenswichtige zelluläre Funktionen zerstört haben.

6.3 UNTERSUCHUNG DER SEDIMENTROHEXTRAKTE

Das Ausmaß der Hsp70-Induktion nach Inkubation mit den Sedimentrohextrakten auf 164-213 % vom KW ist insgesamt als relativ gering zu bewerten, da bei der Inkubation mit Cadmium, Tris (2-chlorethyl)phosphat und 2-Methylthiobenzothiazol deutlich höhere Hsp70-Gehalte von bis zu 2200 % beobachtet wurden. Zudem fand die Hsp70-Induktion z.T. nur in sehr engen Konzentrationsbereichen statt. Hier sind vor allem die Inkubationen mit den Sedimentrohextrakten aus dem Skagerrak und der Odermündung (s. Abb. **12E** und **F**) zu nennen, die nur bei ein bzw. zwei Konzentrationen zu signifikant erhöhten Hsp70-Gehalten führten, während die zweifache bzw. halbe TOC-Konzentration bereits keine Hsp70-Induktion mehr auslöste. Möglicherweise sind die oben aufgeführten Faktoren für diese Effekte verantwortlich.

6.3.1 VERGLEICH DES PROTEOTOXISCHEN POTENTIALS DER SEDIMENTROHEXTRAKTE

Um Proben hinsichtlich ihrer Toxizität zu vergleichen, wird in der Literatur für viele Tests empirisch aus der Aufnahme von Dosis-Wirkungskurven der EC_x -Wert (EC = effect concentration) bestimmt. Dieser Wert gibt die Konzentration an, bei der x % des maximalen Effektes erreicht werden. Je geringer diese Konzentration ist, desto toxischer ist die untersuchte Probe. Diese Angabe setzt jedoch voraus, dass der maximale Effekt unabhängig von der Probe immer gleich groß ist.

Bei Testsystemen, die auf der Induktion von Proteinen oder Enzymaktivitäten beruhen, besteht zum einen das Problem, dass durch sehr komplexe Proben eine Inhibition des Effektes möglich ist und zum anderen, dass es zur Überlagerung mit Effekten, die letztendlich zur Zerstörung wichtiger Zellfunktionen wie der Proteinbiosynthese führen, kommen kann. Aus diesem Grund ist die Bestimmung eines maximalen Effektes nicht möglich. Dies zeigte sich auch in den unterschiedlichen Ausmaßen, in denen die Hsp70-Induktion bei den Untersuchungen erfolgte.

Eine zweite Möglichkeit, einen Vergleich durchzuführen, besteht darin, das Ausmaß des Effektes bei einer bestimmten Konzentration zu vergleichen. Aber auch diese Möglichkeit ist für die Bestimmung der Proteotoxizität anhand der Hsp70-Induktion aufgrund der Überlagerung von Effekten und des Verlaufs der Dosis-Wirkungskurven nicht sinnvoll.

Des Weiteren ist es möglich, einen Vergleich über sogenannte „Benchmark“-Konzentrationen vorzunehmen. Dabei werden aus den Dosis-Wirkungskurven die Stoffmengenkonzentrationen ermittelt, die einen zuvor festgelegten Effekt verursachen. Im Fall der hier durchgeführten Untersuchungen wurde als „Benchmark“ eine Hsp70-Induktion von 150 % bezogen auf den KW zugrunde gelegt, wobei nur die Zone II der Dosis-Wirkungskurven betrachtet wurde. Hsp70-Induktionen dieser Größenordnung waren in der Regel signifikant gegenüber dem KW erhöht. Aus den Dosis-Wirkungskurven der Sedimentrohextrakte (s. Abb. 12 A-G) wurde die zugehörige TOC-Konzentration abgelesen und diese wiederum für den Vergleich der Rohextrakte hinsichtlich ihres proteotoxischen Potentials herangezogen. Dabei galt: je niedriger die TOC-Konzentration, die eine 150 %ige Hsp70-Induktion auslöst ist, desto größer ist das proteotoxische Potential der Probe. Anhand dieses Kriteriums ergab sich für die untersuchten Rohextrakte folgende Reihenfolge:

T41a > KS11 = Skagerrak > Odermündung = OS710a > Gotlandtief

Diese Reihenfolge schließt die Probe aus dem Arkona-Becken nicht ein, da keine Aussage getroffen werden kann, ob die fehlende Hsp70-Induktion auf eine geringe Proteotoxizität oder das Vorherrschen von inhibierenden Effekten zurückzuführen ist.

Der Rohextrakt von T41a führte bereits bei einem TOC-Gehalt von 0,002 mg/mL Inkubationslösung zu einer 150 %igen Hsp70-Induktion, während von den Rohextrakten der Stationen KS11 und dem Skagerrak bereits die fünffache Konzentration für eine Erhöhung des Hsp70-Gehaltes um 50 % erforderlich war. Die Sedimentrohextrakte aus der Odermündung und der Station OS710a schlossen sich mit TOC-Konzentrationen von ca. 0,035 mg/mL Inkubationslösung an. Die Probe aus dem Gotlandtief führte erst bei einem TOC-Gehalt von 0,1 mg TOC/mL Inkubationslösung zu einer 150 %igen Hsp70-Induktion. Anhand der Werte wird deutlich, dass ein erheblicher Unterschied zwischen den untersuchten Sedimentrohextrakten besteht. Inwiefern diese Beurteilung des proteotoxischen Potentials aufgrund der verschiedenen Einflussfaktoren überhaupt möglich ist, soll im Folgenden über den Vergleich mit der Schadstoffbelastung geklärt werden.

6.3.2 KORRELATION ZWISCHEN PROTEOTOXIZITÄT UND SCHADSTOFFBELASTUNG

In Tab. 16 sind die Gehalte an PAK und chlorierten Kohlenwasserstoffen (CKW) sowie an den ebenfalls im Projekt untersuchten Phosphorsäureestern und bromorganischen Verbindungen in den sieben Sedimenten aufgeführt.

Bei den beiden erstgenannten Stoffgruppen handelt es sich um „klassische“ Kontaminanten, die zum großen Teil Bestandteil von Monitoringuntersuchungen sind. Bei den PAK handelte es sich um die 16 standardmäßig untersuchten US EPA-PAK und aus der Gruppe der CKW wurden 10 polychlorierte Biphenyle (PCB) sowie 9 chlorierte Pestizide untersucht. Aus der Substanzklasse der Phosphorsäureester wurden zwei als Weichmacher eingesetzte Substanzen (Tris(2-chlorethyl)phosphat und Triphenylphosphat) sowie ein Insektizid (Parathion-methyl) bestimmt. Bei den bromorganischen Verbindungen handelt es sich vermutlich nicht um Substanzen anthropogenen Ursprungs. Diese Verbindungen werden durch eine Reihe mariner Organismen natürlicherweise produziert und können in sehr hohen Konzentrationen auftreten (FIELMAN ET AL., 2001). Quantifiziert wurden hier sechs mono- und dibromierte Indole und Phenole.

Die Reihenfolge der Proben in der Tabelle entspricht der oben aufgeführten Reihenfolge entsprechend ihrer angenommenen Proteotoxizität. Zusätzlich sind die Gehalte für das Sediment aus dem Arkona-Becken aufgeführt.

Tab. 16 - Gehalte einzelner Schadstoffgruppen in den Sedimenten (BISELLI, 2002; REINEKE, 2002)

Probe	PAK [µg/g TOC]	CKW [µg/g TOC]	Phosphor- säureester [µg/g TOC]	Bromorganische Verbindungen [µg/g TOC]
T41a	34	0,56	20	54
KS11	68	0,66	0,75	0,92
Skagerrak	43	0,5	0,03	2,3
Odermündung	41	1,1	0,10	0,24
OS710a	200	1,8	< BG	0,09
Gotlandtief	25	0,4	< BG	n.n.
Arkona- Becken	42	0,3	< BG	0,01

n.n.: nicht nachweisbar, < BG: unter der Bestimmungsgrenze

Eine Induktion von Hsp70 durch PAK wie Fluoranthren, Pyren und Phenanthren wurde bei der Untersuchung des proteotoxischen Potentials von Einzelsubstanzen in dieser Arbeit bereits nachgewiesen. Betrachtet man jedoch den Gesamt-PAK-Gehalt der Proben, so ist nur z.T. eine Korrelation zur Proteotoxizität erkennbar. Lediglich bei den Proben der Stationen KS11 und des Gotlandtiefs korrelieren Proteotoxizität, bewertet nach dem oben beschriebenen Verfahren, und PAK-Belastung. Das Sediment aus dem Gotlandtief mit der geringsten Proteotoxizität wies mit ca. 25 µg/g TOC die geringste Belastung an PAK auf, während der Gehalt im Sediment der Station KS11 vergleichsweise hoch war und diese Probe ebenfalls ein relativ hohes proteotoxisches Potential besaß. Auffällig ist vor allem der hohe PAK-Gehalt der Probe OS710a mit 200 µg/g TOC, wobei die Proteotoxizität dieser Probe vergleichbar mit der der Probe aus der Odermündung war. Die PAK-Belastung dieser Probe war jedoch mit ca. 40 µg/g TOC deutlich geringer. Die Probe T41a mit dem größten proteotoxischen Potential besaß eine relativ geringe Belastung an PAK. Ähnlich hohe PAK-Gehalte wie die Proben aus dem Skagerrak und der Odermündung wies die Probe aus dem Arkona-Becken auf, eine Hsp70-Induktion war hier im Gegensatz zu den beiden anderen Proben jedoch nicht zu beobachten.

Das Vermögen, Hsp70 zu induzieren, ist für einige CKW bekannt. WERNER UND NAGEL (1997) haben für das Pestizid Dieldrin nachgewiesen, dass es in der Amphipode *Hyallela azteca* eine dosisabhängige Hsp70-Induktion auslöst. Dies konnte mit den Ergebnissen dieser Arbeit bestätigt werden. SCHRÖDER ET AL. (1999) haben diesen Nachweis für PCB 77, PCB 118 und PCB 153 im Schwamm *Suberitis domuncula* Olivi geführt. Die dosisabhängige Hsp70-Induktion durch Lindan (γ -1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan, γ -HCH) in der Grünalge *Raphidocelis subcapitata* wurde von BIERKENS ET AL. (1998) beschrieben. KAR CHOWDHURI ET AL. (1999) haben neben Lindan auch die Stereoisomere α -HCH, β -HCH und δ -HCH untersucht und nach Inkubation mit allen Stereoisomeren erhöhte Hsp70-Gehalte

bestimmt. Von den beschriebenen Substanzen wurden Dieldrin, PCB 118, PCB 153, Lindan und α -HCH in den Sedimenten quantifiziert.

Bei der Belastung der Sedimente mit CKW ergab sich ein sehr ähnliches Muster wie bei der Belastung mit PAK. Auch hier wies das Sediment der Station OS710a mit 1,8 $\mu\text{g/g}$ TOC die höchste Belastung auf. Die Sedimente der Stationen T41a, KS11 und aus dem Skagerrak waren mit 0,5 bis 0,66 $\mu\text{g/g}$ etwa gleich hoch belastet und die geringste Belastung war bei den Stationen aus dem Gotlandtief und dem Arkonabecken zu finden. Das Sediment aus der Odermündung war im Vergleich zu der PAK-Belastung, die in etwa der der Proben aus dem Skagerrak und dem Arkona-Becken entspricht, relativ stark mit CKW kontaminiert. Auch bei den CKW korreliert die geringe Belastung der Probe aus dem Gotlandtief mit der vergleichsweise geringen Proteotoxizität, während ansonsten keine Korrelation zwischen proteotoxischen Potential und CKW-Belastung zu erkennen ist.

Von den beiden weiterhin aufgeführten Substanzklassen der Phosphorsäureester und der bromorganischen Verbindungen konnte für einen Vertreter der Phosphorsäureester und für zwei Vertreter der bromorganischen Verbindungen ein proteotoxisches Potential nachgewiesen werden. Hier ist vor allem das Tris(2-chlorethyl)phosphat zu nennen, das in einem weiten Konzentrationsbereich und im starken Ausmaß eine verstärkte Hsp70-Synthese induzierte. Das Hsp70-Induktionsvermögen von 5-Bromindol sowie 4-Bromphenol dagegen war deutlich geringer.

Im Gegensatz zu der Belastung mit PAK und CKW ergibt sich für die Belastung der Sedimentproben mit diesen Substanzklassen ein völlig abweichendes Bild. Die größten Gehalte, bezogen auf den TOC-Gehalt, waren jeweils im Sediment der Station T41a zu finden, dessen Rohextrakt auch schon bei sehr geringen Konzentrationen eine Hsp70-Induktion hervorrief. Die weiteren Proben waren im Gegensatz dazu mit 0,1-5 % bezogen auf die Gehalte in der Probe T41a nur sehr gering mit diesen Substanzklassen belastet. Eine Korrelation zwischen Belastungsgrad und Proteotoxizität dieser Proben ist auch hier nicht zu erkennen.

Möglich ist, wie schon oben erwähnt, für den Rohextrakt der Probe T41a eine Beteiligung des Tris(2-chlorethyl)phosphat, das Hauptbestandteil der Phosphorsäureester ist, an den beobachteten Effekten. Aufgrund der sehr starken Verdünnungen, bei denen bei den Rohextrakten noch Effekte zu beobachten waren (0,002 mg TOC/mL Inkubationslösung für die Station T41a) kann dieser Beitrag jedoch nur als äußerst gering angesehen werden. Bei den bromorganischen Verbindungen handelte es sich hauptsächlich um 4-Bromphenol. Dieses löste jedoch nur in der höchsten Konzentration eine schwache Hsp70-Induktion aus, so dass auch hier eine Beteiligung an den beobachteten Effekten unwahrscheinlich ist.

In den Sedimentproben sind noch eine Reihe weiterer Substanzen und Substanzgruppen enthalten, die an dieser Stelle nicht betrachtet wurden. Diese Substanzen und Substanzklassen waren jedoch meist nur in geringen Konzentrationen bzw. in Spuren in den Proben vorhanden.

Bei den hier beschriebenen Substanzklassen handelte es sich jedoch um Hauptkontaminanten, die durch besonders hohe Konzentrationen auffielen und daher einen Großteil der Belastung ausmachten.

Ähnliche Ergebnisse bezüglich der Korrelation von Schadstoffbelastung und beobachtetem Effekt wurden auch von WERNER ET AL. (1998) publiziert. Sie bestimmten nach 10tägiger Exposition von Amphipoden zu Sedimenten parallel zu den Hsp60- und den Hsp70-Gehalten unter anderem ebenfalls die Gehalte an PAK, Organozinnverbindungen, Phthalaten und PCB. Die PCB-Gehalte befanden sich bei den untersuchten Proben unterhalb der Nachweisgrenze, so dass diese keine weitere Beachtung fanden. Tendenziell wurde beobachtet, dass die Stressprotein-Induktion mit einigen Ausnahmen bei Sedimenten mit einer hohen Belastung an Phthalaten, PAK und Organozinnverbindungen am größten war. Erhöhte Hsp70-Gehalte wurden bei drei Sedimenten beobachtet, die hohe Gehalte an

Organozinnverbindungen (ca. 15-30 µg/kg Sediment) aufwiesen. Andere Sedimente mit vergleichbaren Gehalten an Organozinnverbindungen führten dagegen wiederum nicht zur Hsp70-Induktion. Der höchste Hsp60-Gehalt wurde in einem Sediment mit relativ hohen PAK-Gehalten gemessen, das Sediment mit den höchsten Gehalten an PAK und Organozinnverbindungen rief dagegen weder eine Hsp60- noch eine Hsp70-Induktion hervor. Korrelationen von *Substanzklassen* mit der Hsp60- oder Hsp70-Induktion ergaben in Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit präsentierten Ergebnissen keine signifikanten Zusammenhänge. Jedoch ergaben sich, wie schon erwähnt, negative Korrelationen zwischen *Einzelsubstanzen* und der Hsp-Induktion, die auf eine mögliche Inhibition der Induktion durch diese Substanzen zurückgeführt wurden. Als möglicherweise inhibierende Substanzen einer Hsp70-Induktion wurden dabei die PAK Benzo[b]fluoranthren, Benzo[k]fluoranthren und Benzo[ghi]perylen angesehen. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass die Stressproteininduktion allein kein geeignetes Maß für Stress, der durch komplexe Schadstoffgemische verursacht wird, darstellt. Die Antwort in Form von Bildung von Stressproteinen reagiert zwar empfindlich auf eine Reihe von Xenobiotika, über inhibierende, synergistische und antagonistische Effekte ist für diesen Zweck jedoch noch zu wenig bekannt.

Auch SANDERS UND STEINERT (1996) schlossen aus ihren Ergebnissen einer Feldstudie, dass die Stressprotein-Induktion stark von der Art der vorhandenen Schad

stoffe abhängig ist und nicht mit der Gesamtbelastung korreliert. Zu diesem Schluss kamen ebenfalls PEDERSEN UND LUNDEBYE (1996), die keine Korrelation von Hsp70-Gehalten in Krabben (*Carcinus maenas*) und den akkumulierten Schwermetallgehalten beobachteten, nachdem sie die Krabben schwermetallhaltigen Sedimenten ausgesetzt haben. KÖHLER ET AL. (1999), die die Hsp70-Induktion in Springschwänzen (*Orchesella bifasciata*) entlang eines Kupfer- und Zinkgradienten in der Nähe eines Messingwerks in Schweden bestimmten, haben ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen Schwermetallbelastung und Hsp70-Induktion entdecken können. Sie fanden gering, jedoch nicht signifikant erhöhte Hsp70-Gehalte in der Mitte des Gradienten, nicht jedoch am Ende des Gradienten mit der höchsten Schwermetallkonzentration.

Zur Untersuchung der Sedimentrohextrakte kann abschließend gesagt werden, dass die Hsp70-Induktion, trotzdem sie einen relativ unspezifischen Stressindikator darstellt, nicht geeignet ist, eine Aussage über die Gesamtbelastung der Probe zu treffen. Die hier präsentierten Ergebnisse stimmen in diesem Punkt mit den Ergebnissen aus der Literatur überein.

Das Problem liegt, wie schon im vorherigen Abschnitt erwähnt, zum einen in synergistischen und antagonistischen Effekten auf die Stressproteinexpression, die die Analyse von komplexen Schadstoffgemischen erschweren. Zum anderen kommt es zu Überlagerungen mit anderen Effekten, so dass aufgrund der starken Intoxikation entweder proteotoxische Schäden dazu führen, dass Stressproteine selbst denaturiert oder abgebaut werden, oder die Zelle nicht mehr zur Proteinbiosynthese fähig ist. Für den Einsatz von Hsp70 als Indikator für eine proteotoxische Wirkung ist ein vollständig funktionierender „Zellapparat“ jedoch unbedingt notwendig (MEYER ET AL., 1995). Vor diesem Hintergrund ist die Bestimmung einer Hsp70-Induktion nicht zur Beurteilung des toxischen Potentials von komplexen Proben und damit zur Auswahl von Proben mit starker Gesamtbelastung für die Anwendung der BdF geeignet.

6.4 UNTERSUCHUNG DER EXTRAKTE UND FRAKTIONEN AUS DER BdF

In diesem Abschnitt sollen die Ergebnisse der Inkubation der EPC-Zellen mit den Extrakten und Fraktionen aus der BdF anhand der Ergebnisse aus der Inkubation mit den Einzelsubstanzen und des Vergleiches mit der Schadstoffbelastung der einzelnen Fraktionen diskutiert werden.

Die Ergebnisse aus der Inkubation mit den Sedimentrohextrakten wurden schon im vorherigen Abschnitt diskutiert, so dass an dieser Stelle darauf verzichtet wird.

6.4.1 GPC-FRAKTIONEN

Die Inkubation mit den GPC-Fractionen führte in jedem Fall zu einer Hsp70-Induktion, wobei die Induktion durch die VF und NF jedoch im Vergleich zur Induktion durch die HF als gering zu bewerten war.

Die chemisch-analytischen Untersuchungen der VF haben ergeben, dass als Substanzen anthropogenen Ursprungs die Gruppe der Phenylalkane als Neben- oder Abbauprodukt von Alkylbenzolsulfonaten (Detergentien), sowie niedere Alkane (C₁₂-C₂₂), die auf einen petrogenen Eintrag hinweisen, enthalten sind. Ansonsten handelte es sich bei den Inhaltsstoffen um Substanzen biogener Herkunft wie beispielsweise Hopanoide (durch Bakterien abgebautes, abgestorbenes organisches Material), Fettsäuren sowie eine Reihe von Steroiden. Qualitativ und quantitativ waren zwischen den Inhaltsstoffen der VF beider Proben keine bzw. kaum Unterschiede auszumachen (HEINZEL, 2002). Eine Aussage, welche Substanzen letztendlich für die Effekte verantwortlich waren, kann aufgrund der Daten nicht getroffen werden. Aufgrund der sehr hohen Substanzkonzentrationen bei gleichzeitig relativ geringen Effekten erscheint eine Aufklärung auch nicht zwingend notwendig zu sein.

Die Hsp70-Induktionen, ausgelöst durch Inkubation mit den NF, sind möglicherweise auf Reste an höheren PAK wie z.B. Fluoranthen und Pyren zurückzuführen, die in den NF z.T. noch vorhanden waren (HEINZEL, 2002) und für die eine Pro- teotoxizität bereits nachgewiesen wurde. Auch hier ist die Aufklärung der Effekte eher von nebensächlicher Bedeutung, da die Effekte im Vergleich zu den Effekten aus der HF äußerst gering waren und nur ein geringer Teil der höher kondensierten PAK vorhanden war.

6.4.2 HPLC-FRAKTIONIERUNG

Nach Inkubation mit den HPLC-Fractionen wurden nur in den Fraktionen F4 und F6 signifikant bis hochsignifikant erhöhte Hsp70-Gehalte detektiert. Die Schadstoffverteilung auf die sechs Fraktionen ist in Tab. 5 (Abschnitt 5.4) aufgeführt.

Beim Vergleich der Verteilung der Substanzen in den beiden Proben fällt auf, dass sich die Probe OS710a vor allem durch eine sehr hohe PAK-Belastung auszeichnete und die Probe KS11 statt dessen aufgrund ihrer größeren Substanzvielfalt hervorzuheben ist. Die in F4 vorhandenen *iso*- und *n*-Butylphthalate sowie Bis(2-ethylhexyl)phthalat waren als Laborkontaminanten auch in den anderen Fraktionen zu finden, fielen in dieser Fraktion mengenmäßig jedoch stark auf, so dass davon auszugehen ist, dass es sich nicht nur um bei der Aufarbeitung verschleppte Kontaminanten, sondern um reale Probeninhaltsstoffe handelte.

F1 zeichnet sich vor allem durch Substanzen biogenen Ursprungs wie beispielsweise Hopanoide aus, die zum größten Teil schon in der GPC-VF enthalten waren. Da die VF nur geringes proteotoxisches Potential aufwies und weitaus höhere Gehalte an Hopanoiden enthielt, war für diese Fraktion kein proteotoxisches Potential zu erwarten. In Übereinstimmung mit dieser Überlegung wurde keine Hsp70-Induktion beobachtet.

Für die Fraktion **F2** wurde aufgrund der Gegenüberstellung der Konzentrationen an Fluoranthen, Pyren, Phenanthren sowie Fluoranthen, die in den Fraktionen enthalten waren und den Konzentrationen, die noch eine Hsp70-Induktion auslösten, eine Hsp70-Induktion erwartet (Tab. 14). Neben diesen Substanzen waren außerdem noch weitere Substanzen wie PCB 118 und PCB 153, Lindan und α -HCH enthalten, deren Vermögen, Hsp70 zu induzieren, bereits beschrieben wurde (WERNER UND NAGEL, 1997; BIERKENS ET AL., 1998; SCHRÖDER ET AL., 1999; KAR CHOWDHURI ET AL., 1999). Da jedoch entgegen den theoretischen Überlegungen keine Hsp70-Induktion beobachtet wurde, musste darauf geschlossen werden, dass weitere Effekte, wie z.B. Inhibitionen, eine Rolle spielen. Die von WERNER ET AL. (1998) beschriebenen potentiellen Inhibitoren Benzo[b]fluoranthen, Benzo[k]fluoranthen und Benzo[ghi]perylen, die z.T. auch in dieser Fraktion vorhanden sind, könnten in diesem Fall die Ursache für die inhibierenden Effekte sein. Für das Verständnis dieser Ergebnisse wären Untersuchungen von weiteren Einzelsubstanzen und von Substanzmischungen erforderlich.

Ähnliche Sachverhalte wurden auch schon von PEDERSEN UND LUNDEBYE (1996) und KÖHLER ET AL. (1999) beschrieben. Sie konnten bei Freilandversuchen jeweils keinen Zusammenhang zwischen Schwermetallexpositionen und Hsp70-Induktion feststellen, obwohl Schwermetalle als Auslöser einer Hsp70-Induktion bekannt sind.

F3 zeichnet sich vor allem durch höhere PAK (> 4 Ringe), u.a. Benzo[b]fluoranthen, Benzo[k]fluoranthen und Benzo[ghi]perylen, sowie einige Pestizide aus. Eine fehlende Stressantwort ist entweder auf die von WERNER ET AL. (1998) angenommenen inhibierenden Wirkungen der genannten Substanzen oder auf zu geringe Gehalte oder gänzlichliches Fehlen von Hsp70-induzierenden Substanzen zurückzuführen.

In der Fraktion **F4**, und hier besonders bei der Station KS11, sind eine Reihe unterschiedlicher Substanzen enthalten, für die z.T. ein proteotoxisches Potential in dieser Arbeit nachgewiesen wurde. Die Gegenüberstellung der Konzentrationen dieser untersuchten Substanzen in den Fraktionen mit den Konzentrationen, die

noch eine Hsp70-Induktion auslösten (Tab. 15) hat ergeben, dass vor allem Tris(2-chlorethyl)phosphat möglicherweise an dem Effekt beteiligt ist, diesen jedoch nicht allein hervorgerufen haben kann.

Für weiterhin in dieser Fraktion enthaltene Substanzen sind in der Literatur nur Untersuchungen für die Gruppe der Phthalate beschrieben. WERNER ET AL. (1998) stellten in ihren Untersuchungen z.T. erhöhte Hsp60- und Hsp70-Gehalte bei hohen Gehalten an Phthalaten fest, konnten jedoch auch hier keine Korrelation feststellen. In ihren Studien wurden die Gehalte an Dimethylphthalat, Diethylphthalat, Di-*n*-butyl-phthalat, Butylbenzylphthalat, Bis(2-ethylhexyl)phthalat und Di-*n*-octylphthalat bestimmt. BLOM ET AL. (1992) haben dagegen in *Escherichia coli* eine Hsp70-Induktion, ausgelöst durch Inkubation mit Di-*n*-octylphthalat, nachweisen können. Dass die durch die Aufarbeitung verschleppten Phthalate nicht für die Hsp70-Induktion in den Fraktionen verantwortlich sind, ist durch die mitgeführten Blindwerte, die allesamt keinen positiven Effekt hervorriefen, sichergestellt. Ein Beitrag zur Hsp70-Induktion durch die erhöhten Gehalte an Phthalaten und insbesondere an den Octylphthalaten in F4 ist jedoch nicht auszuschließen.

Der Unterschied zwischen den beiden Stationen bezüglich der Vielfalt der Substanzklassen könnte möglicherweise die Begründung dafür sein, dass bei KS11 geringere TOC-Mengen für eine Hsp70-Induktion ausreichen. Dafür müsste jedoch der Nachweis geführt werden, dass noch weitere der identifizierten Substanzen eine Stressantwort in Form der Hsp70-Induktion hervorrufen.

F5 enthielt keine Verbindungen, die nicht auch in F4 bzw. F6 vorhanden waren. Die Belastung dieser Fraktion war jedoch im Vergleich zu den anderen beiden Fraktionen sehr gering. In Übereinstimmung mit der geringen Belastung wurde durch Inkubation mit dieser Fraktion auch keine Hsp70-Induktion ausgelöst.

Die Fraktion **F6** beider Stationen löste unverdünnt nach Inkubation jeweils eine signifikante bzw. hochsignifikante Hsp70-Induktion aus. Hauptkomponente in F6 war die Dehydroabietinsäure, die sowohl aus petrochemischen, biogenen oder industriellen Quellen stammen kann. Über eine mögliche proteotoxische Wirkung dieser Verbindung ist jedoch nichts bekannt.

Des Weiteren sind in dieser Fraktion noch Restgehalte an Fettsäuren enthalten, die bei der GPC-Fraktionierung nicht vollständig abgetrennt wurden. Da in der GPC-VF, die sehr hohe Gehalte an Fettsäuren aufwies, ebenfalls signifikant erhöhte Hsp70-Gehalte zu beobachten waren, ist ein Einfluss der Fettsäuren nicht auszuschließen. Eine toxische Wirkung von erhöhten Gehalten an ungesättigten Fettsäuren wurde im Leuchtbakterientest mit *Vibrio fischeri* bereits nachgewiesen (CETKAUSKAITÈ ET AL., 2002). Es erscheint jedoch unwahrscheinlich, dass die Proteotoxizität allein auf die Fettsäuren zurückzuführen ist, da die Effekte, die durch

die Fraktionen F6 ausgelöst wurden, vergleichbar mit denen der GPC-VF waren. Im Gegensatz zur GPC-VF waren die Fettsäuregehalte jedoch wesentlich geringer.

In der Fraktion F6 der Station KS11 war weiterhin noch Morpholin enthalten. Aufgrund der stärkeren proteotoxischen Wirkung von F6 der Station OS710a, in der kein Morpholin enthalten war, erschien ein großer Einfluss von Morpholin auf die Proteotoxizität jedoch unwahrscheinlich.

Da in der Fraktion F6 die polarerer Verbindungen enthalten waren, ist es möglich, dass durch die gaschromatographische Untersuchung trotz Derivatisierung nicht alle Substanzen analytisch erfasst wurden. Weitere Untersuchungen evtl. mittels HPLC und massenspektrometrischer Detektion wären aufgrund der hier präsentierten Ergebnisse und der Ergebnisse der anderen Biotests (s. 6.6) sehr interessant.

6.4.3 HPLC-FEINFRAKTIONIERUNG

Nach der Inkubation mit den HPLC-Feinfraktionen wurden bei der Probe KS11 in nahezu allen Fraktionen bis auf F4.1 und F4.7 signifikant bis hochsignifikant erhöhte Hsp70-Gehalte beobachtet. Von der Probe OS710a löste nur die Fraktion F4.3 einen signifikanten Effekt aus; Effekte in den Fraktionen F4.4 und F4.5 waren wahrscheinlich, jedoch nicht nachweisbar.

Die chemisch-analytische Untersuchung der Feinfraktionen zeigte, dass durch die Fraktionierung keine Verteilung der in F4 identifizierten Substanzen auf einzelne Fraktionen erfolgt war. Verbindungen wie Benzanthron, Carbazole und Bromindol wurden in 3-5 Unterfraktionen nachgewiesen. Dieser Sachverhalt war darauf zurückzuführen, dass die Methode für die Fraktionierung der HF entwickelt wurde und für die Feinfraktionierung nicht weiter optimiert wurde. Die Fraktionen resultierten lediglich daraus, dass in dem Bereich von F4 aus der dritten Untersuchungsstufe in geringeren Zeitabständen fraktioniert wurde. Aus diesem Umstand ergibt sich ein Verdünnungseffekt für die einzelnen Substanzen; zudem waren einige wenige Substanzen, die in F4 nur in Spuren enthalten waren, nach der Feinfraktionierung nicht mehr nachweisbar.

Die Verteilung der Substanzen auf mehrere Fraktionen spiegelt sich in der Proteotoxizität der einzelnen Fraktionen wieder: Die Effekte konzentrierten sich nicht auf einzelne Fraktionen, sondern verteilten sich auf fast den gesamten Bereich. Da in der Untersuchungsstufe IV der Station KS11 im Vergleich zur Fraktion F4 ungefähr die achtfache TOC-Menge eingesetzt wurde, ist eine Beteiligung der oben aufgeführten Substanzen möglich, jedoch muss berücksichtigt werden, dass die Substanzen sich auf mehrere Fraktionen verteilen. Bei der Station OS710a

wurde in der Untersuchungsstufe IV im Vergleich zur Untersuchungsstufe III ungefähr die gleiche TOC-Menge im Test eingesetzt, so dass die Beteiligung der Substanzen am Effekt eher unwahrscheinlich ist.

Die starke Konzentrierung der Proben nach der Fraktionierung führte zudem zu einer großen Anreicherung von Laborkontaminanten in den einzelnen Fraktionen. Die Unterschiede in den proteotoxischen Potentialen der Fraktionen und der Vergleich mit den Ergebnissen der Station OS710a zeigt jedoch, dass diese Substanzen nicht ausschließlich für diesen Effekt verantwortlich sind. Ein Beitrag zu den beobachteten Effekten kann jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Da die Fraktionierung für die Untersuchungsstufe IV nicht die gewünschte Trennschärfe besaß und zu einer Verteilung der Substanzen auf mehrere Fraktionen führte, wurde an dieser Stelle auf eine weitere Diskussion der Ergebnisse verzichtet.

6.5 PROTEOTOXIZITÄT VON EINZELSUBSTANZEN

Im Folgenden sollen die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse bezüglich der Proteotoxizität von Einzelsubstanzen mit Literaturdaten verglichen werden. Von den untersuchten Einzelsubstanzen wurden bisher nur einige hinsichtlich ihres proteotoxischen Potentials beschrieben.

6.5.1 PAK, HETERO-PAK UND DEREN ABBAUPRODUKTE

Für Fluoranthen wurde im Konzentrationsbereich von 0,2-5 µg/mL eine Hsp70-Induktion in den EPC-Zellen beobachtet. WERNER und NAGEL (1997) exponierten drei unterschiedliche Amphipodenarten unterschiedlichen Fluoranthenkonzentrationen im Bereich von 0,035 bis 500 ng/mL über einen Zeitraum von 24 h. Es konnte jedoch keine Hsp70-Induktion durch Fluoranthen festgestellt werden. Bei der höchsten Fluoranthenkonzentration von 500 ng/mL wurde bei den EPC-Zellen bereits bei einer Inkubationszeit von zwei Stunden ein wahrscheinlicher, jedoch nicht signifikanter Anstieg im Hsp70-Gehalt beobachtet.

Ein direkter Vergleich der Ergebnisse ist jedoch nicht möglich, da es sich um unterschiedliche Testorganismen sowie um unterschiedliche Inkubationsbedingungen handelte. Während die für diese Arbeit verwendete permanente EPC-Zelllinie aufgrund eingeschränkt funktionierender Enzymsysteme kaum noch zur Metabolisierung befähigt ist, handelt es sich bei den Amphipoden um „vollständige“ Organismen mit uneingeschränktem Metabolismus. Die Metabolisierung von PAK wird

durch die Cytochrom P-450-abhängige mischfunktionelle Oxidase eingeleitet. Die dabei gebildeten Epoxide oder Phenole werden größtenteils als Sulfate, Glucuronide oder Glutathion-Konjugate über Harn oder Faeces ausgeschieden und sind nicht weiter toxisch; einige Epoxide werden dagegen zu Dihydrodiolen oder Diol-Epoxiden metabolisiert und wirken zusätzlich noch carcinogen. So wirkt Benz[a]pyren beispielsweise erst nach Metabolisierung toxisch (PAYNE ET AL., 1988). Die Ergebnisse von VAHL (2002) zur Mutagenität der im Projekt untersuchten Proben zeigten, dass eine externe Metabolisierung im Vergleich zur Durchführung des Tests ohne Metabolisierung sowohl eine Zunahme als auch eine Abnahme der Mutagenität der untersuchten Proben bewirken kann. Das Cytochrom P-450 Enzymsystem ist in der verwendeten EPC-Zelllinie nicht mehr funktionsfähig, so dass keine Entgiftung der PAK erfolgen kann und dies möglicherweise der Grund für die Hsp70-Induktion ist.

Neben Fluoranthren induzierten auch die beiden anderen PAK Pyren (1-5 µg/mL) und Phenanthren (5-10 µg/mL) eine verstärkte Hsp70-Synthese. MCCONKEY ET AL. (1997) haben sowohl für Phenanthren als auch für das Oxidationsprodukt Phenanthrenchinon eine allgemeine Toxizität nachweisen können und LOTUFO UND FLEEGER (1996) haben für Phenanthren und Pyren ebenfalls eine allgemeine Toxizität beobachtet. Auch für Fluoranthren ist eine allgemeine Toxizität bekannt (DUAN ET AL., 2000). WERNER ET AL. (1998) konnten bei ihren bereits mehrfach erwähnten Untersuchungen keine Korrelation zwischen PAK-Belastung und einer Hsp70-Induktion feststellen. Möglicherweise ist dieses Ergebnis auf die fehlende Proteotoxizität für Amphipoden zurückzuführen, wie sie für Fluoranthren in WERNER UND NAGEL (1997) nachgewiesen und bereits diskutiert wurde. Zusätzlich beobachteten sie jedoch auch eine negative Korrelation zwischen einer Hsp70-Induktion und den PAK Benzo[b]fluoranthren, Benzo[k]fluoranthren und Benzo[ghi]perylen und vermuteten einen inhibierenden Effekt dieser Substanzen auf die Hsp70-Synthese. Eine Inhibition wäre eine weitere mögliche Erklärung für die fehlende Korrelation zwischen PAK-Belastung und Hsp70-Induktion in ihren Arbeiten und den hier dargestellten Ergebnissen. Jedoch kommen die bei WERNER ET AL. (1998) aufgeführten potentiellen Inhibitoren für eine Inhibition in der Fraktion F2 nicht in Frage, da diese nur in der Fraktion F3 vorkommen.

Im Vergleich zu den „reinen“ PAK verhielten sich die Derivate sowie die Hetero-PAK sehr unterschiedlich. Die Dihydroverbindungen lösten übereinstimmend keine Hsp70-Induktion aus; Untersuchungen zur Toxizität dieser beiden Substanzen sind auch nicht bekannt. Die beiden chinoiden Verbindungen 9,10-Anthrachinon und 9,10-Phenanthrenchinon unterschieden sich dagegen in ihrem Potential Hsp70 zu induzieren. Bei 9,10-Anthrachinon war kein erhöhter Hsp70-Gehalt zu beobachten, während 9,10-Phenanthrenchinon die Hsp70-Synthese induzierte.

Ein Unterschied dieser beiden Substanzen bezüglich ihrer Toxizität wurde auch anhand des Glutathiontests auf oxidativen Stress festgestellt (SIERTS-HERRMANN, 2002). Chinoide Verbindungen sind als Auslöser für oxidativen Stress bekannt (SMITH ET AL., 1985); jedoch besitzt 9,10-Anthrachinon keinen echten Chinon-Charakter, sondern nimmt eine Mittelstellung zwischen Chinon und Diketon ein, so dass ihre unterschiedliche Toxizität in dem Glutathiontest und auch bei der Hsp70-Induktion darauf zurückgeführt wurde.

Die beiden Carbonylverbindungen Anthron und Benzanthron, die sich nur durch einen weiteren aromatischen Ring beim Benzanthron unterscheiden, besitzen beide proteotoxisches Potential. Dagegen wurde durch Inkubation mit Xanthon, das sich im Gegensatz zu den anderen beiden Carbonylverbindungen durch ein Heteroatom im Ringsystem auszeichnet, keine Hsp70-Induktion ausgelöst. Die heterocyclischen Verbindungen 3-Methylchinolin und Carbazol dagegen führten wieder zu erhöhten Hsp70-Gehalten.

Für Benzanthron wurde eine oxidative Wirksamkeit nachgewiesen (DAS ET AL., 1994; DWIVEDI ET AL., 2001). Carbazol wird eine mutagene Wirkung nachgesagt (DUTSON ET AL., 1997).

Klare Zusammenhänge zwischen funktionellen Gruppen und dem Potential, eine Hsp70-Synthese zu induzieren, werden in der Substanzgruppe nicht erkannt und können nur durch Untersuchung weiterer Verbindungen und einer Analyse von Struktur-Wirkungsbeziehungen ermittelt werden.

6.5.2 HALOGENIERTE VERBINDUNGEN

Für die in dieser Arbeit untersuchten halogenierten Verbindungen lösten sowohl Dieldrin (1-2 µg/mL) als auch 5-Bromindol (1-10 µg/mL) und 4-Bromphenol (10 µg/mL) eine Hsp70-Induktion in den EPC-Zellen aus.

Vergleichbare Untersuchungen sind in der Literatur nur für Dieldrin beschrieben. WERNER UND NAGEL (1997) beobachteten bei der Amphipodenart *Hyallella azteca* nach einer 24stündigen Inkubation bei Dieldrinkonzentrationen von 0,006 und 0,06 ng/mL erhöhte Hsp70-Gehalte. Höhere Konzentrationen führten hingegen zu einer Abnahme der Hsp70-Induktion bis auf Werte unterhalb des KW. Bei zwei anderen Arten wurde durch Inkubation mit Dieldrin keine erhöhte Hsp70-Synthese induziert. Im Vergleich zu den dort beschriebenen Untersuchungen wurde eine Hsp70-Induktion in den EPC-Zellen erst bei weitaus höheren Dieldrinkonzentrationen beobachtet. Die geringste Dieldrinkonzentration, die zu einer Hsp70-Induktion führte, betrug 1 µg/mL. Auch unter Berücksichtigung der längeren Inkubationsdauer ist die Substanzmenge im Vergleich um den Faktor 10.000 höher. Die voneinander abweichende Reaktion der Amphipodenarten zeigt, wie unterschiedlich Organismen auf Stress in Form einer Stressproteinsynthese reagieren. Da für die

Untersuchung von Dieldrin keine weiteren Daten vorliegen, wird der Unterschied in den Konzentrationen, die eine Hsp70-Induktion hervorrufen, ebenfalls auf die unterschiedlichen Organismen mit abweichenden Stoffwechseleigenschaften zurückgeführt. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von WERNER UND NAGEL (1997) wurde nach Erreichen des Maximums ebenfalls ein Rückgang der Hsp70-Induktion beobachtet. Zudem wurde für Dieldrin nachgewiesen, dass es in Organismen oxidativen Stress auslöst (BACHOWSKI ET AL., 1998; KITAZAWA ET AL., 2001). Andere chlorierte Verbindungen waren bereits häufig Gegenstand von Untersuchungen zu proteotoxischen Effekten. Zu den Verbindungen, die eine Hsp70-Induktion auslösen, gehören unterschiedliche Pestizide wie Pentachlorphenol, Lindan und verschiedene PCB in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen (DYER ET AL., 1993; BAGCHI ET AL., 1996a; BIERKENS ET AL., 1998; AÏT-AÏSSA ET AL., 2000).

Die Untersuchung bromierter Verbindungen hinsichtlich ihrer Proteotoxizität wird in der Literatur selten beschrieben. SALMINEN ET AL. (1996) inkubierten HepG2-Zellen über einen Zeitraum von 24 Stunden mit Brombenzol in einer Konzentration von 1,5 mM (ca. 240 µg/mL) und beobachteten ca. dreifach erhöhte Hsp70-Gehalte. Die hier untersuchten bromierten Verbindungen wurden in vergleichsweise geringen Konzentrationen (max. 10 µg/mL) eingesetzt und führten zu einer Hsp70-Induktion von bis zu 200 %, bezogen auf den KW. Da es sich bei den untersuchten Verbindungen jedoch um unterschiedliche Substanzen handelt, kann kein Vergleich gezogen werden.

6.5.3 PHOSPHORORGANISCHE VERBINDUNGEN

Von den drei untersuchten phosphororganischen Verbindungen wiesen zwei proteotoxisches Potential auf. Tris(2-chlorethyl)phosphat induzierte in einem Konzentrationsbereich von 0,2-10 µg/mL eine verstärkte Hsp70-Expression und für Chlorpyrifos wurden erhöhte Hsp70-Gehalte bei 10 µg/mL beobachtet.

Untersuchungen zum Hsp-Induktionsvermögen von phosphororganischen Verbindungen wurden bereits häufig beschrieben (BLOM ET AL., 1992; DYER ET AL., 1993; BAGCHI ET AL., 1996a; WERNER UND NAGEL, 1997; AÏT-AÏSSA ET AL., 2000). Proteotoxisches Potential wurde für fast alle Verbindungen nachgewiesen.

AÏT-AÏSSA ET AL. (2000) exponierten HeLa-Zellen über einen Zeitraum von 16 Stunden mit 1 bis 500 µM (ca. 0,3-150 µg/mL) Ethylparathion. Sie beobachteten eine signifikante Induktion erst ab einer Konzentration von 250 µM (ca. 75 µg/mL) bei einer leichten Abnahme des Proteingehaltes gleichbedeutend mit cytotoxischen Effekten. Die Inkubationszeit war gegenüber den hier präsentierten Unter

suchungen deutlich erhöht, zudem lag die Konzentration um einen Faktor von ca. 8 über der hier getesteten Konzentration. Dieser Konzentrationsbereich besitzt in der Anwendung der BdF auf marine Sedimente keine Bedeutung. Eine Cytotoxizität wurde in dem getesteten Konzentrationsbereich ebenfalls nicht beobachtet. Ein direkter Vergleich ist hier nicht möglich, da sie anstatt der Hsp70-Induktion die Aktivierung des Hsp70-Promotors über das Chloramphenicolacetyl-Transferase-Gen bestimmten. Diese Bestimmung ist aber im Vergleich zur Messung der Hsp70-Induktion eher als empfindlicher anzusehen.

Von Chlorpyrifos ist bekannt, dass sie oxidative Schäden wie DNA-Strangbrüche in unterschiedlichen Geweben hervorrufen (BAGCHI ET AL., 1996b). Zudem wurde von dieser Arbeitsgruppe die Expression von Hsp90-Genen in PC-12-Zellen nach einer 24stündigen Inkubation mit 50-200 nM (entsprechend 20-70 ng/mL) beobachtet (BAGCHI ET AL., 1996a). Dieser Konzentrationsbereich liegt weit unter dem hier getesteten, jedoch wurde auch über einen wesentlich längeren Zeitraum inkubiert, so dass die größere Empfindlichkeit möglicherweise darüber erklärbar ist. Untersuchungen zur Proteinexpression durch Inkubation mit Chlorpyrifos wurden ebenfalls von BLOM ET AL. (1992) durchgeführt. Sie beobachteten in *Escherichia coli* sowohl die Expression unterschiedlicher Proteine als auch eine Wachstumshemmung bei einer bis zu dreistündigen Inkubation mit 390 µg/mL Chlorpyrifos. Die Proteine, die verstärkt gebildet wurden, besaßen MG zwischen 5 und 60 kDa. Die Expression eines 70 kDa-Proteins wurde dagegen nicht beobachtet. Die Konzentration liegt um einen Faktor von ca. 40 über der hier eingesetzten maximalen Konzentration. Eine Hsp70-Induktion in Fischen wurde von VARÓ ET AL. (2002) nach Anreicherung von Chlorpyrifos über eine nachgestellte Nahrungskette beobachtet. Auf einen Vergleich der Konzentrationen wird hier verzichtet, da zwischen Organismen, Aufnahmeweg und Testbedingungen erhebliche Unterschiede bestehen.

Über Untersuchungen zur Proteotoxizität von Tris(2-chlorethyl)phosphat ist nichts bekannt.

6.5.4 WEITERE SUBSTANZEN

Über ein proteotoxisches Potential bzw. andere toxische Effekte der untersuchten Verbindungen 2-Methylthiobenzothiazol, Galaxolid und N,N'-Diethyl-N,N'-diphenylharnstoff ist nichts bekannt.

Für Paraquat wurden Untersuchungen zu einer Proteinexpression in Form einer Hsp16-Genexpression von STRINGHAM UND CANDIDO (1994) durchgeführt. Sie beobachteten in dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* eine verstärkte Genexpression nach 24stündiger Inkubation mit Paraquat in Konzentrationen von 1mM

(entsprechend 0,26 mg/mL). In weitaus geringeren Konzentrationen (ca. Faktor 1000) wurde in diesen Untersuchungen eine Hsp70-Induktion in den EPC-Zellen bereits nach 2 Stunden beobachtet. Auch hier muss jedoch wieder beachtet werden, dass es sich zum einen um einen anderen Endpunkt und zum anderen um einen anderen Testorganismus und andere Testbedingungen handelt. NAKAGAWA ET AL. (1998) und TSUKAMOTO ET AL. (2001) haben für Paraquat nachgewiesen, dass es in Organismen oxidativen Stress auslöst.

Über eine Toxizität oder mögliche Hsp70-Induktion durch 2-Methylthiobenzothiazol ist in der Literatur nichts beschrieben. Diese Substanz stellte sich jedoch gerade in den hier durchgeführten Untersuchungen als besonders proteotoxisch heraus und führte zu Hsp70-Gehalten, die in diesem Ausmaß bei keiner anderen Substanz beobachtet wurden.

Da einige der untersuchten Substanzen zu keiner Hsp70-Induktion führten, wurde zunächst angenommen, dass diese kein proteotoxisches Potential besitzen. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Untersuchungen nur in einem relativ kleinen Konzentrationsbereich durchgeführt wurden und es nicht auszuschließen ist, dass höhere Konzentrationen oder auch geringere Konzentrationen zu einer Hsp70-Induktion führen. Vor allem letzteres ist aufgrund des Verlaufes der Dosis-Wirkungskurven möglich.

Weitere Möglichkeiten für das Ausbleiben einer Stressproteinantwort bestehen darin, dass die Substanzen zunächst eine Metabolisierung erfahren müssen, um ihre Toxizität zu entfalten. Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei den verwendeten EPC-Zellen um eine permanente Zelllinie mit stark eingeschränkten Metabolisierungsfähigkeiten handelt, werden solche Substanzen hier nicht mit erfasst. Weiterhin ist es möglich, dass die Substanzen direkt mit den Hsp-Genen interferieren oder die Translokalisierung verhindern und somit die Hsp70-Induktion unterbinden (RYAN, 1997).

6.6 HSP70-INDUKTION ALS BESTANDTEIL EINER BIOTESTBATTERIE

In diesem Abschnitt soll die Hsp70-Induktion zur Bestimmung von proteotoxischen Effekten als Bestandteil einer Biotestbatterie betrachtet werden. Dazu wurde zum einen ein Vergleich der Ergebnisse der unterschiedlichen Biotests vorgenommen, um Korrelationen zu anderen Tests zu erkennen. Zum anderen wurden die Ergebnisse einer Faktorenanalyse herangezogen, um die Stellung des Testsystems in der im Projekt verwendeten Biotestbatterie beurteilen zu können.

6.6.1 VERGLEICH DER ERGEBNISSE MIT DEN ERGEBNISSEN ANDERER BIOTESTS

Der Vergleich der Ergebnisse aus der Untersuchung der Einzelsubstanzen mit Literaturdaten hat gezeigt, dass z.T. Korrelationen zu anderen Effekten wie beispielsweise oxidativem Stress auftraten.

Ein Vergleich mit den Ergebnissen anderer Biotests, in denen die Fraktionen aus den Untersuchungsstufen III und IV ebenfalls eingesetzt wurden, sollte zeigen, inwiefern die Proteotoxizität auch hier mit anderen Effekten korreliert. Möglicherweise ergeben sich durch derartige Vergleiche Ansätze zur Aufklärung von Wirkmechanismen.

Die Ergebnisse der Biotests für die Fraktionen aus der Untersuchungsstufe III sind in Tab. 17 dargestellt.

Tab. 17 – Toxische Wirkungen der Fraktionen F1-F6 der Stationen KS11 und OS710a in unterschiedlichen Biotests. +: Effekt messbar, - kein Effekt messbar, n.a.: nicht auswertbar

Wirkung (Testsystem)	Effekte (KS11 / OS710a)					
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Proteotoxizität (Hsp70-Induktion)	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-	+/+
Mutagenität^{a)} (Arabinose-Resistenztest) a) ohne b) mit Metabolisierung	a) -/- b) -/-	a) +/+ b) -/+	a) -/+ b) -/+	a) -/- b) -/-	a) -/+ b) -/-	a) -/- b) -/-
Genotoxizität^{b)} (Comet-Assay)	-/-	-/-	-/-	-/+	-/+	+/+
Oxidativer Stress^{c)} (Glutathiontest)	-/+	-/-	-/-	+/+	-/-	+/+
Allgemeine Toxizität^{d)} (Leuchtbakterientest)	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	n.a./n.a.
Embryotoxizität^{e)} (Fischartigkeit) a) Mortalität, b) Missbildungen	a) +/- b) -/-	a) -/- b) -/-	a) -/- b) +/-	a) +/+ b) -/+	a) +/+ b) -/-	a) +/- b) +/+
Neurotoxizität^{e)} (Acetylcholinesterase-Hemmtest)	-/-	-/-	-/-	+/+	-/+	+/+

^{a)} VAHL, 2002; ^{b)} KAMMANN, 2002; ^{c)} SIERTS-HERRMANN, 2002; ^{d)} REINEKE, 2002; ^{e)} DANISCHEWSKI, 2002

Die Inkubation mit den HPLC-Fraktionen zeigte z.T. auch in anderen Testsystemen ein ähnliches Ergebnis wie bei der Untersuchung zum proteotoxischen Potential. Während die ersten drei Fraktionen nur in jeweils zwei Testsystemen einen positiven Effekt auslösten, konzentrierte sich die Mehrheit der Effekte auf die Fraktionen F4-F6, in denen jeweils 5 von 6 bzw. 4 von 5 Testsystemen eine Antwort zeigten. Bei den Biotests, die auf die ersten drei Fraktionen ansprachen, handelte es sich bei zwei Fraktionen um den unspezifischen, jedoch sehr empfindlichen Leuchtbakterientest und bei zwei Fraktionen um den sehr spezifischen Arabinose-Resistenztest, der auf mutagene Wirkungen von Substanzen anspricht.

Letzterer reagierte positiv nach Inkubation mit den Fraktionen F2 und F3, die durch hohe Gehalte an PAK geprägt waren. PAK wurden oft mit Mutagenität in Zusammenhang gebracht und mutagene Wirkungen für einige PAK in der BdF von Sedimenten auch nachgewiesen (MARVIN ET AL., 1994; MARVIN ET AL., 1999).

Des Weiteren wurden in einem bzw. zwei Fällen schwache oxidativ schädigende und schwach embryotoxische Wirkungen detektiert.

Bezüglich der Fraktion F4 wurden bei der Station OS710a mehr Effekte als bei der Station KS11 beobachtet. Dies steht im Gegensatz zu den hier dargestellten Ergebnissen, nach denen die Station KS11 zumindest das stärkere proteotoxische Potential besitzt. Aufgrund der abweichenden stofflichen Zusammensetzung der Proben sind Unterschiede in den Ergebnissen der Tests, die verschiedene Wirkmechanismen detektieren, nicht ungewöhnlich.

Bei der Fraktion F6 zeigten alle Tests mit Ausnahme der Mortalitätsrate im Fischeitest positive Effekte für beide Proben.

Ein anderes Bild ergibt sich für die Fraktion F5, die für die Station KS11 nur in zwei Tests Effekte auslöste und für die Station OS710a dagegen in fast allen Tests.

In der Untersuchungsstufe IV machte sich der Verdünnungseffekt auch in den Ergebnissen der Biotests bemerkbar: Tests, die z.T. schon in der dritten Untersuchungsstufe nur schwache Effekte zeigten, detektierten in der vierten Untersuchungsstufe keine Effekte mehr.

Bei der Probe der Station KS11 zeigte bis auf den Leuchtbakterientest keiner der anderen Testsysteme positive Effekte. Die schwachen Effekte im Leuchtbakterientest verteilten sich ähnlich wie bei der Bestimmung der proteotoxischen Wirkung auf nahezu alle Fraktionen, was wahrscheinlich auf die Verteilung der Substanzen auf mehrere Fraktionen zurückzuführen ist. Lediglich nach der Inkubation mit den Fraktionen F4.6 und F4.10 wurde kein Effekt beobachtet.

Zu übereinstimmenden Ergebnissen mit den Ergebnissen dieser Arbeit führte auch die Untersuchung der Fraktionen von OS710a im Leuchtbakterientest. Dort zeigten ebenfalls die Fraktionen F4.3 bis F4.5 einen schwachen Effekt, zusätzlich jedoch auch die Fraktion F4.9, die ebenfalls im Glutathiontest oxidatives Potential aufwies. In F4.9 waren noch geringe Reste von Schwefel nachweisbar, so dass der Effekt im Leuchtbakterien- und im Glutathiontest, die beide sehr empfindlich auf Schwefel reagieren, darauf zurückgeführt wurden. In einer Fraktion (F4.5) wurde weiterhin genotoxisches Potential beobachtet.

Bei Betrachtung der Ergebnisse der einzelnen Testsysteme in der Stufe III besteht die größte Übereinstimmung des in dieser Arbeit durchgeführten Tests mit den Tests zur Detektion von oxidativem Stress, von Geno- und von Neurotoxizität. Alle Testsysteme detektierten jedoch im Falle der Station OS710a in einer weiteren Fraktion toxisches Potential bzw. im Fall der Genotoxizität für die Fraktion F4 der Probe KS11 keinen Effekt.

Ein Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und proteotoxischen Wirkungen wird in der Literatur vielfach beschrieben (CALABRESE ET AL., 2000; GOSSLAU ET AL., 2001; SNYDER ET AL., 2001) und konnte auch in den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen oft bestätigt werden. Neben der Übereinstimmung in den Ergebnissen aus der Inkubation mit den Fraktionen der Untersuchungsstufe III wurde eine Proteotoxizität auch für 9,10-Phenanthrenchinon, das einen starken Effekt im Glutathiontest auslöste, festgestellt. Zudem wurde ein proteotoxisches Potential auch für viele weitere Substanzen, die in der Literatur als Auslöser von oxidativem Stress beschrieben werden, nachgewiesen.

Der Zusammenhang ist darauf zurückzuführen, dass oxidativer Stress durch die Generierung von Radikalen unter anderem auch zu einer Schädigung von Proteinstrukturen in Form einer Oxidation von Thiolgruppen führen kann und dadurch eine Hsp70-Expression eingeleitet wird.

Vor diesem Hintergrund ist auch erklärbar, warum bei Inkubation der EPC-Zellen mit Schwefel keine Hsp70-Induktion beobachtet wurde. Der Effekt von Schwefel im Glutathiontest erfolgt nicht bzw. kaum über die Generierung von Radikalen, sondern hauptsächlich über direkte Oxidation des Glutathions, die wahrscheinlich auf einen ungerichteten Vorgang zurückzuführen ist (SIERTS-HERRMANN, 2002).

Zusammenhänge werden z.T. auch zu neurotoxischen Effekten beschrieben. Das Organophosphatpestizid Chlorpyrifos, für das ebenfalls ein proteotoxisches Potential nachgewiesen wurde, ist bekannt für die neurotoxische Wirkung (OLIVIER ET AL., 2001; PHILIPS ET AL., 2002). RAJDEV UND SHARP (2000) beobachteten bei neurotoxischen Effekten ebenfalls eine gleichzeitige Hsp70-Induktion.

Proteinschäden werden jedoch insgesamt durch eine Vielzahl von Effekten hervorgerufen. Vor allem die Ergebnisse der Untersuchungsstufe IV zeigen in gewissem Maße eine Korrelation zu den Ergebnissen des sehr unspezifischen Leuchtbakterientests. Weitere Übereinstimmungen zu diesem Test traten z.B. auch bei der Untersuchung der bromierten Verbindungen auf (REINEKE, 2002). Auch hier ist die Toxizität von 5-Bromindol größer als die von 4-Bromphenol. Effekte wurden hier jedoch noch bis zu 3 ng/mL für 5-Bromindol und bis zu 15 ng/mL für

4-Bromphenol beobachtet. Der Test reagiert damit erheblich empfindlicher auf die bromierten Verbindungen als die Hsp70-Induktion.

Unterschiede zu den Ergebnissen des Leuchtbakterientests traten vor allem in der dritten Untersuchungsstufe auf. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Hsp70-Bestimmung bezüglich der Spezifität zwischen dem unspezifischen Leuchtbakterientest und spezifischen Testsystemen anzusiedeln ist. Möglicherweise dominieren in der dritten Untersuchungsstufe jedoch auch inhibierende Effekte, die eine Hsp70-Induktion unterbinden und somit die Unterschiede zwischen den Ergebnissen beider Testsysteme erklären. Dafür spräche auch die fehlende Hsp70-Induktion durch die Fraktion F2 der beiden Proben KS11 und OS710a, die aufgrund der hohen Fluoranthen- und Pyrengelhalte nicht zu erwarten war.

6.6.2 STELLUNG DER HSP70-INDUKTION IN DER BIOTESTBATTERIE

Für den statistischen Ansatz einer integrierten Beurteilung der Biotests wurde von Herrn Wosniok, Universität Bremen, eine Faktorenanalyse durchgeführt.

Ziel der integrierten Beurteilung war dabei eine Zusammenfassung der zahlreichen Testergebnisse pro Probe auf einen oder mehrere Indices und somit eine komprimierte Charakterisierung der Proben sowie eine Empfehlung für eine Testbatterie bestehend aus einem minimalen Test-Set ohne Redundanzen.

Als Grundlage für die Faktorenanalyse wurden die Ergebnisse der schon mehrfach aufgeführten Testsysteme der Biotestbatterie für die dritte Untersuchungsstufe der Proben KS11, OS710a und Odermündung herangezogen.

Die Anzahl der Indices zur Probencharakterisierung wurde so gewählt, dass mindestens 75 % der Originalinformation enthalten waren, um den Informationsverlust möglichst gering zu halten. Anhand von drei Indices konnten dabei 77 % der Originalinformation wiedergespiegelt werden (Index 1: 28,8 %, Index 2: 26,7 %, Index 3: 21,5 %) (WOSNIOK, 2002).

Mit Hilfe der Faktorenanalyse wurden *Gewichte* (Ladungen) bestimmt, mit denen die Test-Ergebnisse an den drei Indices beteiligt sind. In Tab. 18 sind die *Gewichte* für die einzelnen Testsysteme und die drei Indices aufgeführt. *Gewichte* größer $\pm 0,7$ (grau unterlegt) geben Hinweise auf notwendige Testsysteme.

Es ist ersichtlich, dass die Ergebnisse der Hsp70-Induktion zur Bestimmung von proteotoxischen Effekten maßgeblich am Index 3 beteiligt sind, während die Beteiligung an den Indices 1 und 2 von geringfügiger Bedeutung ist. Ebenfalls am Index 3 maßgeblich beteiligt sind die Ergebnisse des Leuchtbakterientests. Auch hier spiegelt sich die Korrelation von Leuchtbakterientest und Hsp70-Induktion wider.

Tab. 18 – Zusammensetzung der Indices (WOSNIOK, 2002)

Testsystem	Index 1	Index 2	Index 3
Hsp70	0,17414	-0,24970	0,92254
Arabinose-Resistenztest	a) -0,09109	a) 0,95536	a) 0,02724
a) ohne b) mit Metabolisierung	b) -0,45274	b) 0,71060	b) 0,30824
Comet-Assay	0,88542	0,09159	0,15632
Glutathiontest	0,49246	-0,37448	0,60177
Leuchtbakterientest	0,12276	0,31667	0,80900
Fischeitest	a) 0,57676	a) -0,01451	a) 0,44499
a) Mortalität, b) Missbildungen	b) 0,88237	b) -0,06338	b) 0,03669
Acetylcholinesterase-Hemmtest	0,61468	-0,43345	0,31038
Wirkung auf den Östrogenrezeptor	0,07327	0,91240	-0,19993
Wirkung auf den Arylhydrocarbonrezeptor	-0,62561	0,42351	-0,19708

Am Index 1 sind dagegen hauptsächlich der Comet-Assay sowie der Fischeitest hinsichtlich der Missbildungen beteiligt und am Index 2 der Arabinose-Resistenztest sowie die Wirkungen auf den Östrogenrezeptor. Eine Biotestbatterie sollte demnach diese Testsysteme enthalten.

Eine weitere Reduktion der Testsysteme für eine Biotestbatterie, wie z.B. die alleinige Durchführung von Hsp70-Messungen oder Leuchtbakterientest, zugunsten eines geringeren Aufwandes ist aus statistischer Sicht denkbar, da die Beteiligung an demselben Index eine Folge von parallelem Verhalten ist.

Bei der Zusammenstellung einer Biotestbatterie aufgrund dieses statistischen Ansatzes muss jedoch beachtet werden, dass die unterschiedlichen Wirkungen, die durch die verschiedenen Testsysteme detektiert werden, völlig außer acht gelassen werden. Für Fragestellungen, die auf die Aufklärung von Wirkmechanismen oder auf die Identifizierung von Substanzen mit bestimmter Wirkung abzielen, besitzt dieser Ansatz keine Gültigkeit und die Biotestbatterie ist in dem Fall an die jeweilige Fragestellung anzupassen.

6.7 HSP70-INDUKTION ALS INDIKATOR EINER PROTEOTOXIZITÄT IN DER BdF

Die Anwendung des Hsp70-Testsystems zur Detektion von proteotoxischen Effekten in der BdF wurde zum ersten Mal im Rahmen dieser Arbeit vorgenommen.

Anhand der vorgestellten Ergebnisse soll in diesem Abschnitt erörtert werden, inwiefern sich die Untersuchung der Hsp70-Induktion als Indikator für die Bestimmung von proteotoxischen Effekten in der BdF eignet.

Dazu müssen zwei Fragen beantwortet werden:

- Ist die Hsp70-Induktion als Messparameter geeignet, stark belastete Proben für die BdF auszuwählen?
- Ist das Testsystem sensitiv genug, um in der BdF angewendet werden zu können?

Die erste Frage muss mit „Nein“ beantwortet werden. Die Untersuchung von sieben Sedimentrohextrakten bezüglich ihres proteotoxischen Potentials ließ keine Korrelation zwischen Schadstoffbelastung und Hsp70-Induktion erkennen, so dass die Auswahl von stark belasteten Proben anhand der Hsp70-Induktion nicht möglich ist. Ähnliche Sachverhalte wurden bereits von PEDERSEN UND LUNDEBYE (1996), WERNER ET AL. (1998) und KÖHLER ET AL. (1999) bei der Untersuchung von komplexen Proben festgestellt.

Als Ursache wird die hohe Komplexität der Proben und damit verbundene synergistische, antagonistische und inhibierende Effekte angesehen. Ein weiteres Problem liegt darin, dass die Hsp70-Expression einen funktionierenden Zellstoffwechsel erfordert (MEYER ET AL., 1995), der durch die Vielzahl an Substanzen in komplexen Proben erheblich gestört werden kann. Weiterhin führen zu hohe Expositionsdosen aufgrund von pathologischen Schäden zum Abbau von Hsp70 und es kommt zu abnehmenden Hsp70-Induktionen (PAWERT ET AL., 1996; TRIESKORN UND KÖHLER, 1996) bzw. aufgrund von Membranschäden durch cytotoxische Effekte sogar zur Verringerung des Hsp70-Grundgehaltes (KÖHLER ET AL., 1996).

Bezüglich der zweiten Frage zeigten vor allem die Ergebnisse aus der Untersuchungsstufe IV, dass es sich um ein empfindliches Testsystem handelt. Obwohl es sich bei den untersuchten Proben um marine Sedimente handelte, die im Vergleich zu limnischen Proben deutlich geringer belastet sind, war es möglich vor allem in den Stufen III und IV noch deutliche Effekte zu beobachten. Nur wenige der aufgeführten Testsysteme aus dem Projekt, die zur Untersuchung der Fraktionen der BdF eingesetzt wurden, waren in der Lage, in den Fraktionen der Untersuchungsstufe IV noch Effekte zu detektieren. Dies hängt jedoch auch damit zu

sammen, dass es sich bei dem Hsp70-Testsystem um ein eher unspezifisches Testsystem handelt. Schäden an Proteinen beinhalten beispielsweise aufgrund der Oxidation von Thiolgruppen auch oxidative Schäden, was z.T. durch Korrelation von gemessenen Effekten mit oxidativen Schäden bestätigt wurde. Neben dem Hsp70-Testsystem wurden in der Untersuchungsstufe IV hauptsächlich Effekte durch den Leuchtbakterientest detektiert, der als sehr unspezifisch gilt.

Der Vergleich mit in der Literatur beschriebenen Untersuchungen zur Hsp70-Induktion in anderen Zelllinien oder auch Organismen zeigte, dass die EPC-Zellen bei der Untersuchung von Einzelsubstanzen oft ähnlich empfindlich, z.T. auch empfindlicher oder weniger empfindlich, reagierten.

Aufgrund der Probleme bei der Untersuchung von komplexen Proben ist der Einsatz des Testsystems erst bei einer deutlichen Verringerung der Komplexität sinnvoll. In dem Fall stellt die Hsp70-Induktion als Indikator für proteotoxische Effekte aufgrund der hohen Sensitivität eine gute Ergänzung zu anderen Testsystemen in der BdF dar und kann in Kombination mit spezifischeren Testsystemen Hinweise auf die Wirkungsweise von Substanzen geben.

7 ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY

7.1 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit sollte die Eignung der Hitzeschockprotein70 (Hsp70)-Induktion als Indikator für proteotoxische Effekte in der Biotest-geleiteten Fraktionierung überprüft werden. Die Untersuchungen wurden an der permanenten EPC-Zelllinie (*Epithelioma papulosum cyprini*) durchgeführt.

Dazu wurden zunächst Inkubationsversuche mit Cadmium(II)-chlorid durchgeführt, um die Eignung und Empfindlichkeit der EPC-Zelllinie zu überprüfen.

Anschließend wurden Sedimentrohextrakte von sieben Stationen in Nord- und Ostsee mit unterschiedlichem Belastungsgrad an Schadstoffen auf ihr proteotoxisches Potential untersucht und das Ergebnis mit der Gesamtbelastung verglichen. Ferner wurde an ausgewählten Proben, die einer Biotest-geleiteten Fraktionierung unterzogen wurden, die Verteilung der Proteotoxizität auf einzelne Fraktionen bestimmt. Durch die abschließende Untersuchung von einzelnen Substanzen, die in den Proben identifiziert wurden, sollte festgestellt werden, inwiefern diese Substanzen an den beobachteten Effekten beteiligt waren.

Die Bestimmung der Hsp70-Gehalte erfolgte mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese/Immunoblot und anschließender densitometrischer Auswertung der angefärbten Hsp70-Banden. Den Untersuchungen zur Hsp70-Induktion wurde die Optimierung der Methoden und die Auswahl geeigneter Inkubationsbedingungen vorangestellt.

Die Untersuchung der Sedimentrohextrakte zeigte in fast allen Fällen, dass eine Hsp70-Induktion erst nach erheblichen Verdünnungen der Sedimentrohextrakte auf z.T. bis zu 0,002 mg Gesamtkohlenstoff/mL Inkubationslösung erzielt wurde. Die Inkubation mit den unverdünnten Rohextrakten ergab fast ausschließlich keine Effekte. Dieser Umstand wurde auf inhibierende Wirkungen von in den Sedimenten enthaltenen Substanzen zurückgeführt.

Zwischen den einzelnen Sedimentrohextrakten wurden erhebliche Unterschiede in ihrem Potential, eine Hsp70-Induktion auszulösen, beobachtet. Beim Vergleich mit der Gesamtbelastung der Sedimente wurde jedoch kein Zusammenhang zwischen der Schadstoffbelastung und dem proteotoxischen Potential festgestellt. Korrelationen zu den „klassischen“ Schadstoffklassen wie chlorierten Kohlenwasserstoffen und polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen bestanden nicht, obwohl nach Inkubation mit vereinzelt Vertretern dieser Klassen eine Hsp70-Induktion in den EPC-Zellen nachgewiesen wurde.

Bei der Untersuchung der Fraktionen zweier ausgewählter Proben, auf die das Prinzip der BdF angewendet wurde, wurden im Gegensatz zu den meisten anderen im Projekt durchgeführten Testsystemen in jeder Stufe proteotoxische Effekte nachgewiesen.

Differenzierte Effekte wurden erst in der dritten Fraktionierungsstufe, die in einer Verteilung der Schadstoffe auf mehrere Fraktionen resultierte, beobachtet. Hier wiesen nur zwei der sechs Fraktionen proteotoxisches Potential auf.

Nach weiterer Fraktionierung von einer dieser Fraktionen ergab sich keine weitere Konzentrierung der Effekte auf einzelne Feinfraktionen. Dieser Umstand war jedoch auf eine unzureichende Trennung im letzten Fraktionierungsschritt zurückzuführen. Aus diesem Grund war es nicht möglich, die beobachteten Effekte einer einzelnen Substanz bzw. Substanzklasse zuzuschreiben.

Bei der Untersuchung einzelner chemischer Stressoren hinsichtlich ihrer Fähigkeit, Hsp70 in EPC-Zellen zu induzieren, wurde für eine Reihe von unterschiedlichen Verbindungen wie z.B. aus den Substanzklassen der polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffe, der Pestizide, phosphororganischer und halogener Verbindungen ein proteotoxisches Potential im Konzentrationsbereich von 0,1-10 µg/mL Inkubationslösung nachgewiesen. Die meisten dieser Verbindungen waren jedoch nur in Konzentrationen in den Proben enthalten, die weit unter den Konzentrationen ausreichend für eine Hsp70-Induktion lagen, so dass sie lediglich einen geringen Beitrag an den Effekten besitzen konnten.

Eine Eignung der Hsp70-Induktion als Indikator von proteotoxischen Effekten in der Biotest-geleiteten Fraktionierung ist nur bedingt gegeben. Aufgrund der Probleme bei der Untersuchung von komplexen Proben ist keine Auswahl von stark belasteten Proben möglich. Der Einsatz des Testsystems ist erst bei einer deutlichen Verringerung der Komplexität sinnvoll. In dem Fall stellt die Hsp70-Induktion jedoch aufgrund der hohen Sensitivität eine gute Ergänzung zu anderen Testsystemen dar.

7.2 SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the suitability of the induction of heat shock protein 70 (Hsp70) as a marker for proteotoxic effects in a bioassay directed fractionation. Investigations were carried out using the permanent cell line *Epithelioma papulosum cyprini*.

In a first step investigations with cadmium(II)-chloride were performed to verify the suitability and sensitivity of the chosen cell line.

Subsequently, sediment crude extracts of seven different contaminated stations of the North Sea and the Baltic Sea were analysed for their proteotoxicity. The results of the investigations were compared with the overall grade of contamination. In further experiments with selected sediments, separated by bioassay directed fractionation, the distribution of proteotoxic effects to distinct fractions was determined. Final examinations of purified substances identified in investigated sediments should show the participation of these substances in the observed effects.

Determination of Hsp70-contents was performed by sodiumdodecylsulfate polyacrylamid gel electrophoresis with western immunoblotting and subsequent densitometric analysis. Previously, methods were optimised and suitable conditions for incubation were ascertained.

Following incubation with sediment crude extracts, elevated Hsp70 contents were usually observed only after several dilution steps. Even at total organic carbon concentrations of 0,002 mg/mL test solution an induction of Hsp70 was measured. Undiluted crude extracts led to measurable effects in just one case. This fact was ascribed to inhibitory effects of substances present in sediments.

Between the investigated crude extracts considerable differences in their Hsp70 inducing ability were determined. However no correlation between the overall grade of contamination and the proteotoxic activity was observed. Furthermore, an appropriate correlation was not detected regarding known groups of contaminants like chlorinated or polycyclic aromatic hydrocarbons even though single substances led to elevated Hsp70-contents.

Two selected sediment samples were investigated in more detail by applying them to bioassay directed fractionation. Proteotoxic effects were detected in every step of fractionation. This is contrary to most other performed biotests with exception of the bacteria bioluminescence assay.

Differentiated effects were observed at the third fractionation step for the first time. This step led to six subfractions, each containing certain classes of contaminants. Only two of these fractions showed proteotoxic potential.

After further fractionation of positive fractions no concentration of effects to distinct fractions was detected. This fact was ascribed to an inadequate separation of substances. Therefore an allocation of observed effects to a distinct contaminant or group of contaminants was not possible.

An Hsp70-inducing ability was verified for a couple of substances of different groups of contaminants like polycyclic aromatic hydrocarbons, pesticides, phosphororganic and halogenated compounds. The tested concentration range was between 0,1-10 µg/mL test solution. However, concentration of most of the identified proteotoxic compounds in the samples were much lower. Therefore, these compounds were only partially responsible for the observed effects.

The suitability of the Hsp70-induction as a marker for proteotoxic effects in bioassay directed fractionation is restricted. A sample classification due to the toxic ability is not possible. This can be ascribed to the nature of complex mixtures leading e.g. to inhibitory effects. An application is only useful after an obvious decrease in complexity. However, in that case it is a good completion to other bio-tests because of its high sensitivity.

8 ANHANG

8.1 METHODEN

8.1.1 AUFARBEITUNG UND INKUBATION DER ZELLEN (MODIFIZIERT NACH SALMINEN ET AL., 1996 UND KAMMANN ET AL., 2001)

Reagenzien

<u>EDTA-Trypsin-Lösung</u>	gebrauchsfertige Lösung
<u>FKS</u>	gebrauchsfertige Lösung
<u>PBS (pH 7,2)</u>	
0,01 M K ₂ HPO ₄	7,95 g NaCl
0,15 M NaCl	1,44 g Na ₂ HPO ₄
	0,20 g KCl
	0,20 g KH ₂ PO ₄ ad 1000 mL mit bidest. Wasser
<u>Homogenisationspuffer</u>	
1 mM PMSF	17,40 mg PMSF ad 100 mL mit PBS

a) Inkubation in Reaktionsgefäßen nach Ablösen der Zellen

- Nährmedium aus den Kulturflaschen abgießen und verwerfen
- zum Ablösen der Zellen 3 mL EDTA-Trypsin-Lösung hinzufügen, Zellen nach ca. 5-10 min durch leichtes Schwenken der Flasche ablösen
- 3 mL FKS zufügen
- Zellsuspension auf 8-10 Reaktionsgefäße verteilen und 4 min bei 300 x g zentrifugieren
- Überstand absaugen und verwerfen
- Zellpellet mit 1 mL PBS waschen und durchmischen (Vortex), erneut zentrifugieren
- Überstand absaugen und verwerfen, 1 mL PBS zufügen
- 10 µL der Testlösung in DMSO oder Wasser hinzufügen und durchmischen (Ansatz als Doppelbestimmung, für KW kein Zusatz, evtl. für Gesamt-LDH-Bestimmung zwei weitere KW (s. 8.1.2))
- nach Ablauf der Inkubationszeit (2 bzw. 4 oder 24 h bei RT) zentrifugieren
- Überstand absaugen und verwerfen (evtl. für LDH-Bestimmung 120 µL des Überstandes abnehmen (s. 8.1.2))
- Waschschrift wie oben, anschließend 0,5 mL Homogenisationspuffer zufügen (bis auf KW für Gesamt-LDH-Bestimmung (s. 8.1.2))
- mittels Ultraschall 10 s homogenisieren
- Proteingehalt aus jedem Gefäß bestimmen (s. Anh. 8.1.3)
- Zellhomogenat bis zur weiteren Messung bei -80 °C lagern

b) Inkubation in Zellkulturflaschen

- bei 6 mL Nährmedium 60 µL der Testlösung in DMSO oder Wasser hinzufügen und durchmischen (Ansatz als Doppelbestimmung, für KW kein Zusatz)
 - nach Ablauf der Inkubationszeit (2, 4 oder 24 h) Nährmedium abdekantieren und verwerfen
 - zum Ablösen der Zellen 3 mL EDTA-Trypsin-Lösung hinzufügen, Zellen nach ca. 5-10 Minuten durch leichtes Schwenken der Flasche ablösen
 - 3 mL FKS zufügen
 - von der Zellsuspension je nach Zellmaterial 0,5 – 2 mL in ein Reaktionsgefäß pipettieren und 4 min bei 300 x g zentrifugieren
 - Überstand absaugen und verwerfen
 - Zellpellet mit 1 mL PBS waschen und durchmischen (Vortex), erneut zentrifugieren
 - Überstand absaugen und verwerfen
 - 0,5 mL Homogenisationspuffer hinzufügen
 - mittels Ultraschall 10 s homogenisieren
 - Proteingehalt aus jedem Gefäß bestimmen (s. Anh. 8.1.3)
 - Zellhomogenat bis zur weiteren Messung bei –80 °C lagern
- (eine LDH-Bestimmung ist hier aufgrund des gefärbten Nährmediums nicht möglich)

8.1.2 LACTATDEHYDROGENASE(LDH)-BESTIMMUNG (Testkit der Fa. Sigma)**Reagenzien**Testkit der Fa. Sigma bestehend aus:

Substratlösung
 Enzympräparat
 Färbelösung
 Lysislösung

PBS (pH 7,2)

0,01 M K ₂ HPO ₄	7,95 g NaCl
0,15 M NaCl	1,44 g Na ₂ HPO ₄
	0,20 g KCl
	0,20 g KH ₂ PO ₄ ad 1000 mL mit bidest. Wasser

Salzsäure (1M) 20,8 mL konz. HCl ad 20 mL mit bidest. Wasser

LDH-Stammlösung (200 U/L)

(frisch ansetzen) 4,8 µL LDH ad 100 mL mit PBS

LDH-Kalibrierlösungen

125 U/L	
100 U/L	
75 U/L	
50 U/L	
25 U/L	
10 U/L	(in PBS)

Durchführung

- für die Bestimmung der Gesamt-LDH zunächst Zellpellets der KW (s. 8.1.1) mit 100 µL Lysislösung und 140 µL PBS versetzen, kräftig schütteln und 40 min inkubieren, anschließend 1:20 verdünnen
- 20 µL Substratlösung, 20 µL Enzymlösung und 20 µL Färbelösung in je eine Kavität einer Mikrotiterplatte pipettieren
- Reaktion durch Zugabe von 120 µL Probe (s. 8.1.1), 120 µL des verdünnten lysierten Zellpellets für die Bestimmung der Gesamt-LDH bzw. 120 µL der Kalibrierlösungen starten (für den Blindwert 120 µL PBS)
- nach 20 min Inkubation im Dunkeln Reaktion durch Zugabe von 20 µL Salzsäure stoppen
- im Mikrotiterplattenreader bei 490 nm gegen den Blindwert vermessen

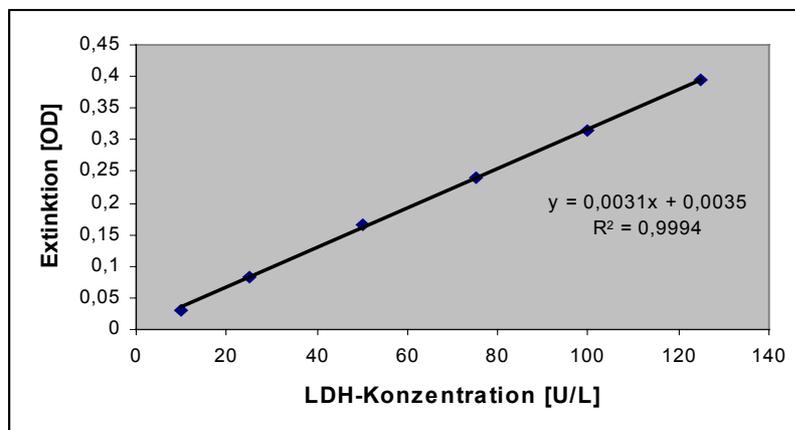
Kalibrierfunktion

Abb. A1 – Kalibrierfunktion der LDH-Bestimmung

8.1.3 PROTEINBESTIMMUNG (BRADFORD, 1976)**Reagenzien****Lösung 1**

35 mg Coomassie Brilliant Blue G-250
 10 mL Ethanol (96 %)
 20 mL o-Phosphorsäure (88 %)

Lösung 2

3,0 mL Lösung 1
 3,0 mL o-Phosphorsäure (88 %)
 1,5 mL Ethanol (96 %)
 ad 50 mL mit bidest. Wasser
 bei RT unter Lichtausschluss aufbewahren

BSA-Kalibrierlösungen

200 mg/L
 100 mg/L
 50 mg/L
 20 mg/L
 10 mg/L (in bidest. Wasser)

Durchführung

- 50 µL der Kalibrierlösungen in je eine Kavität einer Mikrotiterplatte geben (für den Blindwert 50 µL bidest. Wasser)
- von den Zellhomogenaten (s. 8.1.1) 10 µL in je eine Kavität pipettieren und mit 40 µL bidest. Wasser versetzen (1:5 Verdünnung)
- jeweils 200 µL Lösung 2 hinzugeben
- im Mikrotiterplattenreader bei 590 nm gegen den Blindwert vermessen

Kalibrierfunktion

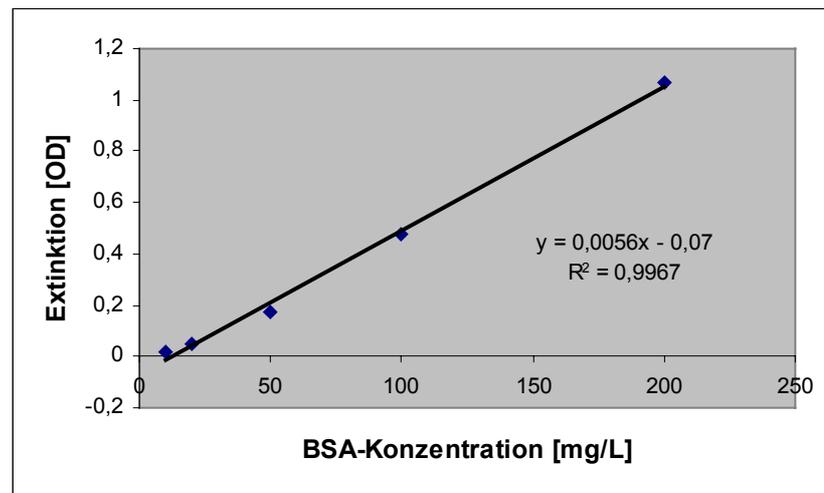


Abb. A2 – Kalibrierfunktion der Proteinbestimmung

8.1.4 HSP70-BESTIMMUNG MITTELS SDS-PAGE/IB

8.1.4.1 SDS-PAGE

Reagenzien

Probenpuffer (pH 6,8) (VIETHS ET AL, 1992)

3,03 g Tris-hydroxymethylaminomethan (Tris)
 2,50 mL β-Mercaptoethanol
 5,00 mL Glycerin
 2,00 g SDS
 0,01 g Bromphenolblau
 150 µL Pyronin Y-Lösung (1 %ig in Wasser, w:v)
 mit 40 mL bidest. Wasser versetzen,
 mit 4 M HCl ad pH 6,8,
 ad 50 mL mit bidest. Wasser

Elektrodenpuffer

Konzentrat 1:20 mit bidest. Wasser verdünnen

Hsp70-Stammlösung

100 mg/L 200 µg Hsp70
 1 mL bidest. Wasser
 1 mL Glycerin
 bei -20 °C aufbewahren

Hsp70-Kalibrierlösung

5 mg/L Hsp70-Stammlösung 1:20 mit Probenpuffer verdünnen
 und reduzieren

*Molekulargewichtsmarker***Tab. A1 – Zusammensetzung des Molekulargewichtsmarkers**

Protein	MG [Da]
Phosphorylase B	94 000
BSA	67 000
Ovalbumin	43 000
Carboanhydrase	30 000
Trypsininhibitor	20 100
α-Lactalbumin	14 400

Ein Aliquot des Molekulargewichtsmarkers wird mit 1 mL Probenpuffer versetzt und reduziert.

Probenvorbereitung

- Proben mit Reduktionspuffer auf einen Proteingehalt von ca. 250 – 300 mg/L verdünnen (ca. 1:2-Verdünnung)
- Proben, Hsp70-Kalibrierlösung und Molekulargewichtsmarker 3 min bei 90 °C reduzieren

Durchführung

- Fertiggele nach Entfernen des Kamms in der Elektrophoresekammer platzieren
- Elektrophoresekammer mit Elektrodenpuffer füllen
- 10 µL der Proben bzw. 5 µL der Hsp70-Kalibrierlösung in die Slots geben (ggf. 5 µL des Molekulargewichtsmarkers)
- Elektrophoresekammer schließen und Spannung anlegen (Bedingungen s. Tab. A2)
- Gel entnehmen, wenn Farbstoffe an der Anode angelangt sind
- Gel zum Semidry-Blot einsetzen

Tab. A2 – Geräteeinstellung bei der SDS-PAGE

Spannung [V]	Stromstärke [mA]	Leistung [W]	Zeit [min]
200	120	25	35

8.1.4.2 SEMIDRY-BLOT (MODIFIZIERT NACH KHYSE-ANDERSEN, 1984)

*Reagenzien*Transferpuffer (pH 10,4)

0,025 M Tris	1,52 g Tris
20 % Ethanol	0,05 g Natriumazid
	100 mL Ethanol
	mit bidest. Wasser ad 500 mL

Durchführung

- SDS-PAGE wie beschrieben durchführen
- NC-Membran in einer Größe von 7,5 x 8 cm zurechtschneiden
- Kathode des Blotmoduls mit bidest. Wasser anfeuchten
- 4 Blotting-Schwämme (bzw. bei 2 Gelen 3 Schwämme) in Transferpuffer tränken und luftblasenfrei auf die Kathode legen
- Gel aus der Elektrophoresekammer entnehmen
- Gelkassette aufbrechen und Gel auf den Schwämmen platzieren
- NC-Membran, 2 Lagen Haushaltstücher und 4 Schwämme in Transferpuffer tränken und in dieser Reihenfolge luftblasenfrei auf das Gel legen (bei 2 Gelen nur 2 Schwämme verwenden, 2. Gel, 2. NC-Membran, Haushaltstücher und als Abschluss 3 Schwämme wie oben beschrieben auflegen)
- Anode des Blotmoduls mit bidest. Wasser befeuchten und Blotmodul zusammensetzen
- Semidry-Blot durchführen (Bedingungen s. Tab. A3)

Tab. A3 – Geräteeinstellung beim Semidry-Blot

Spannung	Stromstärke	Leistung	Zeit
[V]	[mA]	[W]	[min]
40	180	17	60

8.1.4.3 UNSPEZIFISCHE FÄRBUNG MIT BRILLIANT BLACK (MODIFIZIERT NACH HANCOCK UND TSANG, 1983)

*Reagenzien*Waschlösung

9,76 g NaCl
 2,90 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O
 0,27 g NaH₂PO₄ x H₂O
 0,10 g NaN₃
 0,50 mL Tween20 mit bidest. Wasser ad 1000 mL

Färbelösung

2,0 mL Eisessig
 0,2 mL Brilliant Black
 0,1 mL Tween20 mit PBS ad 200 mL

Natronlauge (0,2 M)

8 g Natriumhydroxid mit bidest. Wasser ad 1000 mL

Durchführung

- Blot 5 Minuten mit 0,2 M Natronlauge inkubieren
- 4 x 10 min mit Waschlösung waschen
- mit Färbelösung inkubieren, bis Banden gut sichtbar sind (10 min bis zu mehreren Stunden)
- 2 x 2 min in bidest. Wasser waschen

8.1.4.4 SPEZIFISCHE IMMUNFÄRBUNG (MODIFIZIERT NACH SCHRÖDER ET AL., 1999)

*Reagenzien*PBS (pH 7,2)

Zusammensetzung s. 8.1.1

Blockierlösung

5 % Magermilchpulver	5 g Magermilchpulver
0,1 % Tween20	100 µL Tween20 ad 100 mL mit PBS

Inkubationspuffer

0,1 % BSA	100 mg BSA
0,05 % Tween20	50 µL Tween20 ad 100 mL mit PBS

Waschlösung

0,05 % Tween20	250 µL Tween20 ad 500 mL mit PBS
----------------	----------------------------------

Anti-Hsp70-IgG-Lösung
(monoklonal, Maus)

1 : 10.000 mit Inkubationspuffer verdünnen

Anti-Maus-IgG-Lösung
(Ziege)

1 : 5.000 mit Inkubationspuffer verdünnen

Streptavidin-HRP-Lösung

1 : 20.000 mit Inkubationspuffer verdünnen

Umpufferlösung (pH 6,0)

0,01 M Tris	121,1 mg Tris in 80 mL bidest. Wasser lösen mit 4 M HCl pH 6,0 einstellen ad 100 mL mit bidest. Wasser
-------------	--

Citratpuffer (pH 5,0)

0,15 M Citrat-Phosphat	0,94 g Citronensäure 1,82 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O in 80 mL bidest. Wasser lösen, pH-Wert einstellen, ad 100 mL mit bidest. Wasser
------------------------	--

Färbelösung

(frisch ansetzen)	12 mg TMB 40 mg DONS 5 mL mit Ethanol (96 %)
-------------------	--

Durchführung

- freie Bindungsstellen durch 2 x 15minütige Inkubation mit je 25 mL Blockierlösung belegen
- 2 x mit bidest. Wasser abspülen
- über Nacht unter ständigem Schütteln mit 25 mL Maus-Anti-Hsp70-Lösung inkubieren
- 3 x 5 min mit je 25 mL Waschlösung waschen
- 3 h unter ständigem Schütteln mit 25 mL Anti-Maus-IgG-Lösung inkubieren
- 3 x 5 min mit je 25 mL Waschlösung waschen
- 20 min mit Streptavidin-HRP-Lösung inkubieren
- 3 x 5 min mit je 25 mL Waschlösung waschen
- 1 min mit 25 mL Umpufferlösung umpuffern
- 5 mL Färbelösung mit 15 mL Citratpuffer und 10 µL Wasserstoffperoxid versetzen und Blot bis zur ausreichenden Färbung behandeln
- mit Wasser spülen und trocknen lassen
- einscannen und mittels ScanPack Vers. 3.0 densitometrisch auswerten

8.1.4.5 BERECHNUNG DES HSP70-GEHALTES

$$c[\text{g Hsp70}/100 \text{ g Protein}] = \frac{c(\text{Std.}) \times AV(\text{Std.}) \times \text{Area}(\text{Probe}) \times VF \times 100}{\text{Area}(\text{Std.}) \times AV(\text{Probe}) \times c(\text{Protein})}$$

Abb. A3 – Berechnung des Hsp70-Gehaltes. $c(\text{Std.})$, Konzentration des Hsp70-Standards in ng/µL; $AV(\text{Std.})$, Auftragsvolumen des Hsp70-Standards in µL; $\text{Area}(\text{Probe})$, ermittelte Area der Hsp70-Bande der Probe in Flächeneinheiten (A.E.); $\text{Area}(\text{Std.})$, ermittelte Area der Hsp70-Bande des Standards in A.E.; $AV(\text{Probe})$, Auftragsvolumen der Probe in µL; $c(\text{Protein})$, Proteingehalt der Probe in mg/L; VF, Verdünnungsfaktor bei der Reduzierung der Probe

8.1.4.6 GRUNDKALIBRIERUNG DER METHODE

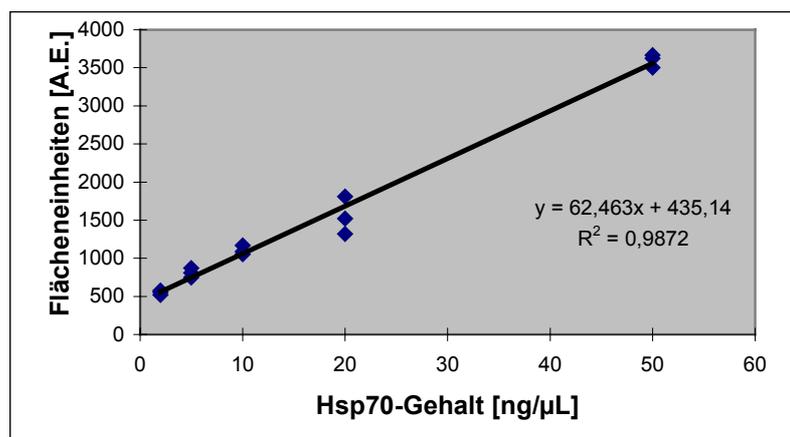


Abb. A4 – Grundkalibrierung der Hsp70-Bestimmung mittels SDS-PAGE/IB

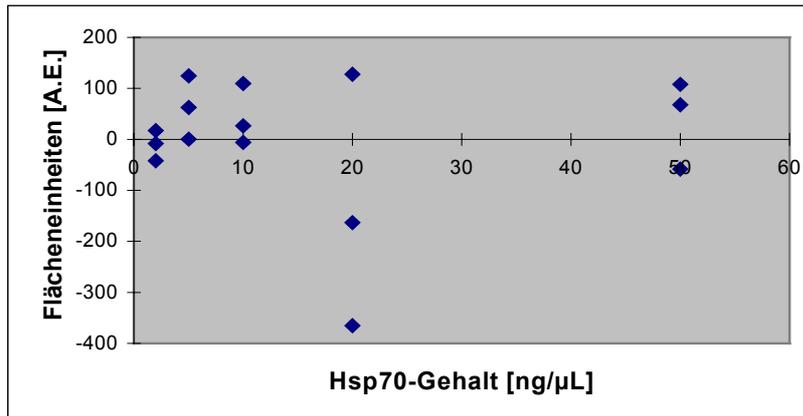


Abb. A5 – Residuenplot zur Gundkalibrierung der Hsp70-Bestimmung mittels SDS-PAGE/IB

8.1.4.7 VARIATIONSKOEFFIZIENT FÜR DIE ELEKTROPHORESE

Tab. A4 – Ermittlung des Variationskoeffizienten $CV_{\text{Elektrophorese}}$

Probe	Area [A.E.]
1	156
2	158
3	183
4	154
5	123
Mittelwert	155
Standardabweichung	21
CV	14 %

8.2 DATEN ZU DEN SEDIMENTPROBEN

Tab. A5 – Charakterisierung der verwendeten Sedimentproben (BISELLI, 2002)

Probe	Schicht [cm]	Position	TC [%]	TOC [%]	N [%]	WG [%]
T41a	0-2	54°00'N 08°05'E	2,46	0,82	0,09	36,62
KS11	0-2	54°04'N 08°05'E	3,44	1,49	0,17	53,75
OS710a	0-2	Kiel	5,39	4,79	0,48	61,2
Arkona-Becken	0-2	55°01'N 14° 04'E	5,41	5,23	0,65	81,4
Skagerrak	0-4	57° 46'N 7° 56'E	3,53	2,22	0,28	68,3
Odermündung	0-2	54° 05'N 14°08' E	0,23	0,21	0,05	21,9
Gotlandtief	0-4	57°18'N 20°03'E	11,06	10,78	1,29	95,8

TC: Total Carbon; TOC: Total Organic Carbon; N: Stickstoff; WG: Wassergehalt

Tab. A6 – Gehalt an Trockenmasse (und TOC) der zur Inkubation eingesetzten Extrakte und Fraktionen in g/mL (mg/mL) DMSO (BISELLI, 2002; REINEKE, 2002)

Probe	Stufe I	Stufe II	Stufe III	Stufe IV
T41a	5,4 (44,3)	-	-	-
KS11	7,6 (113)	8,8 (131)	35,2 (524) F4: 25,1 (374)	38 (566)
OS710a	4,0 (192)	5,7 (273)	14 (671)	16 (766)
Arkona-Becken	1,6 (83,7)	-	-	-
Skagerrak	3,8 (84,4)	-	-	-
Odermündung	39,5 (83,0)	-	-	-
Gotlandtief	0,84 (90,6)	-	-	-

8.3 ERGEBNISTABELLEN

Tab. A7 – Daten zur Festlegung der Inkubationsbedingungen – Inkubation in Kulturgefäßen
P: Proteingehalt, AP: Abnahme im Proteingehalt, grau unterlegt: Cytotoxizität

		Cadmiumkonzentration [µg/mL]									
		KW	0,1	0,5	5	10	25	50	100	200	
2 h-Inkubation	Hsp70-Gehalt [µg/mg Protein]	x ₁ /x ₂	5,3 6,3	5,6 7,3	5,8 6,9	16,7 19,1	24,8 26,0	37,5 46,0	33,8 27,6	7,8 6,3	4,8 5,5
		x	5,8	6,5	6,4	17,9	25,4	41,8	30,7	7,1	5,2
		s	0,7	1,2	0,8	1,7	0,8	6	4,4	1,1	0,5
	P [mg/L]	x ₁ /x ₂	589 565	563 599	584 602	583 625	608 594	603 546	562 586	568 515	398 321
		AP [%]		2 -4	-1 -4	-1 -8	-5 -3	-5 5	3 -2	2 11	31 44
4 h-Inkubationszeit	Hsp70-Gehalt [µg/mg Protein]	x ₁ /x ₂	5,6 7,6	6,3 6,8	7,9 8,8	15,3 22,8	26,9 33,5	22,4 28,6	17,9 25,4	9,5 5,8	3,6 4,5
		x	6,6	6,6	8,4	19,1	30,2	25,5	21,7	7,4	4,1
		s	1,4	0,4	0,6	5,3	4,7	4,4	5,3	2,6	0,6
	P [mg/L]	x ₁ /x ₂	683 593	584 621	635 587	635 611	633 596	562 523	543 521	546 536	403 362
		AP [%]		8 3	0 8	0 4	1 7	12 18	15 18	14 16	37 43
24 h-Inkubationszeit	Hsp70-Gehalt [µg/mg Protein]	x ₁ /x ₂	5,8 4,7	9,6 11,1	12,3 11,5	27,3 25,3	11,6 11,6	2,2 1,8	2,3 1,9	0 0	0 0
		x	5,3	10,4	11,9	26,3	11,6	2,0	2,1	0,0	0,0
		s	0,8	1,1	0,6	1,4	0,0	0,3	0,3	0,0	0,0
	P [mg/L]	x ₁ /x ₂	635 662	635 612	631 644	625 619	588 512	452 486	268 356	0 0	0 0
		AP [%]		2 6	3 1	4 5	9 21	30 25	59 45	100 100	100 100

Tab. A8 – Daten zur Festlegung der Inkubationsbedingungen – Inkubation in Reaktionsgefäßen
 P: Proteingehalt, AP: Abnahme im Proteingehalt, grau unterlegt: Cytotoxizität

		Cadmiumkonzentration [µg/mL]									
		KW	0,1	0,5	5	10	25	50	100	200	
2 h-Inkubation	Gehalt [µg/mg Pro-]	x ₁ /x ₂	6,6 4,8	5,1 6,5	7,8 8,5	10,6 12,3	12,3 15,7	7,3 16,7	22,1 25,4	17,7 13,6	8,9 6,7
		x	5,7	5,8	8,2	11,5	14,0	12,0	23,8	15,7	7,8
		s	1,3	1,0	0,5	1,2	2,4	6,6	2,3	2,9	1,6
	P [mg/L]	x ₁ /x ₂	623 594	581 601	614 625	587 573	634 581	658 622	632 594	584 563	562 541
		AP [%]		5 1	-1 -3	4 6	-4 5	-8 -2	-4 2	4 7	8 11
4 h-Inkubationszeit	Gehalt [µg/mg Pro-]	X ₁ /X ₂	7,3 6,7	6,6 8,5	9,5 13,5	18,3 24,5	21,5 26,5	23,4 30,4	34,4 32,5	15,6 11,2	9,2 6,7
		x	7,0	7,6	11,5	21,4	23,8	26,9	33,5	13,4	8
		s	0,4	1,3	2,8	4,4	3,3	4,9	1,3	3,1	1,8
	P [mg/L]	x ₁ /x ₂	574 589	611 632	643 611	576 635	589 586	613 599	618 581	531 499	568 489
		AP [%]		-5 -9	-11 -5	1 -9	-1 -1	-5 -3	-6 0	9 14	2 16
24 h-Inkubationszeit	Gehalt [µg/mg Pro-]	X ₁ /X ₂	50,8 70,9	70,3 65,4	62,6 73,8	74,8 85,4	76,2 62,5	97,2 89,7	67,3 42,4	35,5 16,5	11,3 5,4
		x	60,9	67,9	68,2	80,1	69,4	93,5	54,9	26,0	8,4
		s	14,2	3,5	7,9	7,5	9,7	5,3	17,6	13,4	4,2
	P [mg/L]	x ₁ /x ₂	563 642	635 668	602 646	564 623	578 589	591 568	412 463	322 398	256 224
		AP [%]		-5 -11	0 -7	6 -3	4 2	2 6	32 23	47 34	58 63

Tab. A9 – Daten zur Überprüfung der Proteotoxizität von DMSO, P: Proteingehalt, AP: Abnahme im Proteingehalt

		DMSO-Konzentration [Vol.-%]				
		KW	1	2	5	10
Hsp70-Gehalt [µg/mg Protein]	x ₁ /x ₂	10,2 9,0 9,8 11,4	9,9 11,8	10,8 11,2	16,0 14,8	15,3 12,9
	x	10,1	10,9	11,0	15,4	14,1
	s	1,0	1,3	0,3	0,9	1,7
P [mg/L]	x ₁ /x ₂	1060 958 984 987	987 965	996 1002	964 947	956 932
AP [%]			1 4	0 0	3 5	4 7

Tab. A10 – Daten zur Cyto- und Proteotoxizität von Lösungsmitteln, grau unterlegt: Cytotoxizität

Stressor	c [Vol.-%]	Hsp70-Gehalt [µg/mg Protein]			Proteingehalt [mg/L] x ₁ / x ₂	Abnahme Proteingehalt [%]	LDH- Aktivität [U/L] x ₁ / x ₂	Zunahme LDH- Aktivität [%]
		x ₁ / x ₂	x	s				
		Gesamt-LDH 1964 / 2136						
KW		11,0 / 11,4 9,8 / 11,4	10,9	0,8	547 / 531 587 / 593		50 / 24 73 / 40	
Aceton	0,008	15,8 / 14,6	15,2	0,9	486 / 505	14 / 11	71 / 52	3 / 2
	0,04	13,4 / 12,7	13,1	0,5	484 / 484	14 / 14	76 / 38	3 / 2
	0,2	13,3 / 13,6	13,5	0,2	531 / 476	6 / 16	62 / 39	3 / 2
	1,0	12,8 / 13,4	13,1	0,4	502 / 495	11 / 12	86 / 130	4 / 6
n-Hexan	0,008	15,5 / 13,0	14,3	1,8	398 / 468	30 / 17	36 / 35	2 / 2
	0,04	15,3 / 9,7	12,5	14,0	437 / 571	23 / -1	230 / 90	11 / 4
	0,2	14,8 / 12,5	13,7	1,6	145 / 160	74 / 72	758 / 742	37 / 36
	1,0	11,3 / 11,3	11,3	0,0	371 / 460	33 / 19	274 / 189	13 / 9
cyclo-Hexan	0,008	11,3 / 6,6	9,0	3,3	545 / 384	4 / 32	126 / 175	6 / 9
	0,04	8,7 / 7,6	8,0	0,6	330 / 490	42 / 13	449 / 262	22 / 13
	0,2	10,0 / 5,3	7,7	3,3	134 / 129	76 / 77	724 / 625	35 / 31
	1,0	7,5 / 14,3	10,9	4,8	206 / 153	64 / 73	547 / 450	27 / 22
Ethylacetat	0,008	10,0 / 8,4	9,2	1,1	466 / 564	17 / 0	242 / 60	12 / 3
	0,04	14,3 / 10,6	12,5	2,6	555 / 483	4 / 14	65 / 34	3 / 2
	0,2	17,6 / 18,1	17,9	0,4	705 / 489	-25 / 13	25 / 130	1 / 4
	1,0	12,9 / 11,1	12,0	1,3	484 / 501	14 / 11	63 / 51	3 / 3
Dichlormethan	0,008	9,0 / 9,5	9,3	0,4	536 / 526	5 / 7	37 / 20	2 / 1
	0,04	9,8 / 15,3	12,6	3,9	527 / 437	7 / 23	43 / 69	2 / 3
	0,2	23,9 / 22,2	23,1	1,2	135 / 131	76 / 77	917 / 917	45 / 45
	1,0	33,3 / 26,0	29,7	5,2	166 / 107	71 / 81	866 / 765	42 / 37
Methanol	0,008	10,1 / 11,5	10,8	1,0	462 / 525	18 / 7	44 / 46	2 / 2
	0,04	12,3 / 11,0	11,7	0,9	442 / 488	22 / 14	41 / 33	2 / 2
	0,2	15,2 / 9,1	12,2	4,3	465 / 587	18 / -4	27 / 29	1 / 1
	1,0	8,5 / 9,4	9,0	0,6	509 / 499	10 / 12	59 / 78	3 / 4

Tab. A11 – Daten zur Untersuchung der Sedimentrohextrakte, P: Proteingehalt, AP: Abnahme im Proteingehalt, grau unterlegt: Cytotoxizität

		KW											
		1			2			3					
Hsp70-Gehalt [µg/mg Protein]	x ₁ /x ₂	11,0	10,9	10,6	11,0	9,9	11,8	12,2	11,9	9,8	10,6	12,5	11,5
	x	11,1	11,0	11,4	11,0	11,0	11,4	11,0	11,0	11,0	11,0	11,0	11,0
	s	0,7	0,9	1,0	0,9	0,9	1,0	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9
P [mg/L]	x ₁ /x ₂	670	569	676	801	552	558	768	638	545	662	550	639
	x	670	569	676	801	552	558	768	638	545	662	550	639
	s	670	569	676	801	552	558	768	638	545	662	550	639
		Verdünnung der Rohextrakte											
		1 ^{a)}	1:2	1:5	1:10	1:25	1:50	1:100	1:200	1:500			
T41a	Hsp70-Gehalt [µg/mg Protein]	x ₁ /x ₂	11,0 9,1 ^{b)}	8,4 9,0 ^{b)}	10,2 11,5 ^{b)}	11,0 10,6 ^{b)}	19,2 14,0 ^{b)}	20,1 19,4 ^{c)}	20,1 17,4 ^{c)}	16,8 16,5 ^{d)}	12,2 10,4 ^{d)}		
		x	10,1	8,7	10,9	10,8	16,6	19,8	18,8	16,7	11,3		
		s	1,3	0,4	0,9	0,3	3,7	0,5	1,9	0,2	1,3		
	P [mg/L]	x ₁ /x ₂	688 708	698 716	713 741	671 722	753 779	607 672	661 673	604 613	528 452		
AP [%]		9 6	8 5	6 2	11 5	0 -3	-1 -12	-10 -12	-4 -6	9 22			
KS11	Hsp70-Gehalt [µg/mg Protein]	x ₁ /x ₂	12,4 9,2 ^{b)}	6,2 9,4 ^{b)}	11,6 11,9 ^{b)}	11,1 11,6 ^{b)}	9,1 10,5 ^{b)}	24,2 21,4 ^{c)}	16,5 18,0 ^{c)}	13,6 15,8 ^{d)}	12,1 11,0 ^{d)}		
		x	11,0	7,8	11,8	11,4	9,8	22,8	17,3	14,7	11,6		
		s	2,1	2,3	0,2	0,4	1,0	2,0	1,1	1,6	0,9		
	P [mg/L]	x ₁ /x ₂	708 800	764 692	708 737	769 764	805 664	542 662	654 654	504 453	512 490		
AP [%]		7 -6	-1 8	6 3	-2 -1	-6 12	10 -10	-9 -9	13 22	12 15			
OS710a	Hsp70-Gehalt [µg/mg Protein]	x ₁ /x ₂	9,2 11,5 ^{c)}	14,8 10,7 ^{c)}	12,8 12,7 ^{c)}	12,3 10,6 ^{c)}	20,1 17,3 ^{c)}	14,5 16,0 ^{c)}	12,8 14,0 ^{c)}	11,2 10,5 ^{c)}	12,3 11,0 ^{c)}		
		x	10,4	12,8	12,8	11,5	18,7	15,3	13,4	10,9	11,7		
		s	1,6	2,9	0,1	1,2	2,0	1,1	0,9	0,5	0,9		
	P [mg/L]	x ₁ /x ₂	651 598	541 536	581 598	556 567	683 646	617 572	613 533	588 617	612 633		
AP [%]		-8 1	10 11	3 0	8 6	-14 -7	-3 5	-2 11	2 -3	-2 -5			

^{a)} TOC-Konzentration des unverdünnten Rohextraktes ergibt sich aus Tab. A6 (Stufe I)

^{b)} Bezug auf KW 1

c) Bezug auf KW 2

d) Bezug auf KW 3

Fortsetzung Tab. A11 – Daten zur Untersuchung der Sedimentrohextrakte, P: Proteingehalt, AP: Abnahme im Proteingehalt, grau unterlegt: Cytotoxizität

		Verdünnung der Rohextrakte									
		1 ^{a)}	1:2	1:5	1:10	1:25	1:50	1:100	1:200	1:500	
Arkona-Becken	Hsp70-Gehalt [µg/mg Protein]	x ₁ /x ₂	10,9 8,1 ^{b)}	12,3 10,0 ^{b)}	7,9 11,2 ^{b)}	9,4 9,6 ^{b)}	10,9 10,6 ^{b)}	9,5 9,5 ^{c)}	9,5 9,6 ^{c)}	-	-
		x	9,5	11,2	9,6	9,5	10,8	9,5	9,6	-	-
		s	2,0	1,6	2,3	0,1	0,2	0,0	0,1	-	-
	P [mg/L]	x ₁ /x ₂	764 736	731 729	778 713	779 711	711 705	607 672	654 654	-	-
		AP [%]	-1 3	3 5	-3 6	-3 6	6 7	-1 12	-9 -9	-	-
Skagerrak	Hsp70-Gehalt [µg/mg Protein]	x ₁ /x ₂	10,8 10,1 ^{b)}	8,5 7,7 ^{b)}	7,5 8,6 ^{b)}	8,3 7,0 ^{b)}	6,7 10,0 ^{b)}	19,0 21,6 ^{c)}	16,5 11,1 ^{c)}	-	-
		x	10,5	8,1	8,1	7,7	8,4	20,3	13,8	-	-
		s	0,5	0,6	0,8	0,9	2,3	1,8	3,8	-	-
	P [mg/L]	x ₁ /x ₂	427 563	642 713	753 711	749 745	764 751	607 672	661 673	-	-
		AP [%]	44 26	15 6	0 6	1 1	-1 1	-1 -12	-10 -12	-	-
Odermündung	Hsp70-Gehalt [µg/mg Protein]	x ₁ /x ₂	8,1 9,2 ^{b)}	8,2 8,1 ^{b)}	12,4 10,1 ^{b)}	13,5 14,4 ^{b)}	15,8 20,5 ^{b)}	10,1 11,5 ^{c)}	12,1 12,0 ^{c)}	-	-
		x	8,7	8,2	11,3	14,0	18,2	10,8	12,1	-	-
		s	0,8	0,1	1,6	0,6	3,3	1,0	0,1	-	-
	P [mg/L]	x ₁ /x ₂	881 805	828 656	583 581	634 582	871 799	581 643	661 654	-	-
		AP [%]	-16 -6	-9 13	20 20	14 20	-15 -6	3 -7	-10 /9	-	-
Gotlandtief	Hsp70-Gehalt [µg/mg Protein]	x ₁ /x ₂	20,5 26,4 ^{b)}	24,2 23,1 ^{b)}	22,9 20,6 ^{b)}	14,4 14,1 ^{b)}	12,1 12,6 ^{b)}	-	-	-	-
		x	23,5	23,7	21,8	14,3	12,4	-	-	-	-
		s	4,2	0,8	1,6	0,2	0,4	-	-	-	-
	P [mg/L]	x ₁ /x ₂	837 721	848 851	802 832	770 841	855 788	-	-	-	-
		AP [%]	-11 5	-12 -13	-6 -10	-2 -11	-13 -4	-	-	-	-

a) TOC-Konzentration des unverdünnten Rohextraktes ergibt sich aus Tab. A6 (Stufe I)

b) Bezug auf KW 1

c) Bezug auf KW 2

d) Bezug auf KW 3

Tab. A12 – Daten zur Untersuchung der Extrakte und Fraktionen aus der BdF von KS11, P: Proteingehalt, AP: Abnahme im Proteingehalt, grau unterlegt: Cytotoxizität

		KW									
		1	2	3	4						
Hsp70-Gehalt [µg/mg Protein]	x ₁ /x ₂	10,9 9,9 12,2 9,8 10,6 10,8	9,2 9,1 9,0 8,2 7,4 9,0	10,6 12,4 11,2 10,4 10,3 9,1	10,6 11,8 11,9 9,7 12,5 11,5						
	x	10,7	8,7	10,7	11,3						
	s	0,9	0,7	1,1	1,0						
P [mg/L]	x ₁ /x ₂	569	544	777	676						
		552	662	839	558						
		638	621	839	545						
		662	576	881	550						
		550	571	781	639						
		636	530	801	507						
Extrakte bzw. Fraktionen											
TOC-Gehalt [mg/mL]		Roh 0,023	VF 1,31	HF 0,026	NF 1,31	F1 5,24	F2 5,24	F3 5,24	F4 0,75	F5 5,24	F6 5,24
Hsp70-Gehalt [µg/mg Protein]	x ₁ /x ₂	24,2 21,4 ^{a)}	13,2 17,9 ^{b)}	60,2 29,7 ^{b)}	11,8 9,8 ^{b)}	10,6 10,2 ^{c)}	9,7 10,3 ^{c)}	10,1 6,5 ^{c)}	16,5 16,0 ^{c)}	10,6 15,2 ^{c)}	16,9 14,4 ^{c)}
	x	22,8	15,6	45,0	10,8	10,4	10,0	8,3	16,3	12,9	15,7
	s	2,0	3,3	21,6	1,4	0,3	0,4	2,5	0,4	3,3	1,8
P [mg/L]	x ₁ /x ₂	542 662	604 617	539 648	578 580	799 946	875 868	874 946	895 812	867 812	814 815
AP [%]		10 -10	-5 -7	7 -12	0 0	2 -15	-7 -6	-7 -15	-9 1	-6 1	1 1
Extrakte bzw. Fraktionen											
TOC-Gehalt [mg/mL]		F4.1 5,66	F4.2 5,66	F4.3 5,66	F4.4 5,66	F4.5 5,66	F4.6 5,66	F4.7 5,66	F4.8 5,66	F4.9 5,66	F4.10 5,66
Hsp70-Gehalt [µg/mg Protein]	x ₁ /x ₂	12,6 9,0 ^{d)}	15,2 21,6 ^{d)}	31,2 27,8 ^{d)}	22,7 19,6 ^{d)}	35,4 28,6 ^{d)}	25,1 19,6 ^{d)}	13,4 15,2 ^{d)}	17,5 21,3 ^{d)}	18,6 21,7 ^{d)}	38,7 26,3 ^{d)}
	x	10,8	18,4	29,4	21,2	32,0	22,4	14,3	19,4	20,2	32,5
	s	2,5	4,5	2,6	2,2	4,8	3,9	1,3	2,7	2,2	8,8
P [mg/L]	x ₁ /x ₂	588 519	515 494	620 572	485 505	495 599	449 539	629 605	550 521	529 572	506 582
AP [%]		-1 10	11 15	-7 1	16 13	15 -3	22 7	-9 -5	5 10	9 1	13 0

^{a)} Bezug auf KW 1

^{b)} Bezug auf KW 2

^{c)} Bezug auf KW 3

^{d)} Bezug auf KW 4

Tab. A13 – Daten zur Untersuchung der Extrakte und Fraktionen aus der BdF von OS710a, P: Proteingehalt, AP: Abnahme im Proteingehalt, grau unterlegt: Cytotoxizität

		KW									
		1	2	3	4						
Hsp70-Gehalt [µg/mg Protein]	x ₁ /x ₂	10,9 9,9 12,2 9,8 10,6 10,8	9,2 9,1 9,0 8,2 7,4 9,0	10,6 12,4 11,2 10,4 10,3 9,1	10,6 11,8 11,9 9,7 12,5 11,5						
	x	10,7	8,7	10,7	11,3						
	s	0,9	0,7	1,1	1,0						
P [mg/L]	x ₁ /x ₂	569	544	777	676						
		552	662	839	558						
		638	621	839	545						
		662	576	881	550						
		550	571	781	639						
		636	530	801	507						
Extrakte bzw. Fraktionen											
TOC-Gehalt [mg/mL]		Roh 0,077	VF 2,73	HF 0,11	NF 2,73	F1 6,97	F2 6,97	F3 6,97	F4 6,97	F5 6,97	F6 6,97
Hsp70-Gehalt [µg/mg Protein]	x ₁ /x ₂	20,1 17,3	16,9 19,9	23,3 18,8	13,5 11,5	9,4 15,1	8,9 10,3	8,1 12,3	16,0 18,8	13,4 9,2	16,2 19,9
	x	18,7	18,4	21,1	12,5	12,3	9,6	10,2	17,4	11,3	18,1
	s	2,0	2,1	3,2	1,4	4,0	1,0	3,0	2,0	3,0	2,6
P [mg/L]	x ₁ /x ₂	683	680	587	489	772	722	822	789	822	855
		646	594	636	603	689	805	689	771	855	789
AP [%]		-14	-18	-2	15	6	12	0	4	0	-4
		-7	-3	-10	-4	16	2	16	6	-4	4
Extrakte bzw. Fraktionen											
TOC-Gehalt [mg/mL]		F4.1 7,66	F4.2 7,66	F4.3 7,66	F4.4 7,66	F4.5 7,66	F4.6 7,66	F4.7 7,66	F4.8 7,66	F4.9 7,66	F4.10 7,66
Hsp70-Gehalt [µg/mg Protein]	x ₁ /x ₂	11,6 21,0	7,4 13,8	17,1 25,2	20,7 13,6	15,0 13,7	14,2 9,7	11,3 13,0	10,8 12,6	12,5 14,3	13,3 8,1
	x	16,3	10,6	21,2	17,2	14,4	12,0	12,2	11,7	13,4	10,7
	s	6,6	4,5	5,7	5,0	0,9	3,2	1,2	1,3	1,3	3,7
P [mg/L]	x ₁ /x ₂	421	601	475	568	453	447	530	497	511	473
		480	616	489	456	480	510	462	453	487	472
AP [%]		27	-4	18	2	22	19	9	14	12	18
		17	-6	16	21	17	12	20	22	16	19

a) Bezug auf KW 1

b) Bezug auf KW 2

c) Bezug auf KW 3

d) Bezug auf KW 4

Tab. A14 – Daten zur Untersuchung der Einzelsubstanzen, P: Proteingehalt, AP: Abnahme im Proteingehalt, grau unterlegt: Cytotoxizität

		KW							
		1	2	3	4	5			
Hsp70-Gehalt [µg/mg Protein]	x ₁ /x ₂	11,3 12,2 10,4 10,9	10,2 9,0 11,9 10,3	9,2 9,1 9,0 8,2 7,4 9,0	10,9 9,9 12,2 9,8 10,6 10,8	9,6 8,9 11,6 12,3 10,6			
	x	11,2	10,4	8,7	10,7	10,6			
	s	0,8	1,2	0,7	0,9	1,6			
P [mg/L]	x ₁ /x ₂	949	672	544	569				
		949	752	662	552				
		864	690	621	638	700			
		1021	768	576	662	730			
				571	550	636	839		
				530					
		Konzentration [µg/mL]							
		0,1	0,2	0,5	1	2	5	10	
9,10-Dihydroxyanthracen	Hsp70-Gehalt [µg/mg Protein]	x ₁ /x ₂	-	-	-	11,3 10,9 ^{b)}	10,4 11,0 ^{b)}	10,9 10,4 ^{b)}	9,3 11,4 ^{a)}
		x	-	-	-	11,1	10,7	10,7	10,4
		s	-	-	-	0,3	0,4	0,4	1,5
	P [mg/L]	x ₁ /x ₂	-	-	-	891 897	927 606	633 673	808 853
		AP [%]	-	-	-	6 5	-28 16	12 7	15 10
9,10-Anthrachinon	Hsp70-Gehalt [µg/mg Protein]	x ₁ /x ₂	-	-	-	10,2 9,9 ^{b)}	10,9 12,4 ^{b)}	12,7 9,4 ^{b)}	13,2 11,3 ^{a)}
		x	-	-	-	10,1	11,7	11,1	12,3
		s	-	-	-	0,2	1,1	2,3	1,3
	P [mg/L]	x ₁ /x ₂	-	-	-	747 596	666 630	630 630	921 965
		AP [%]	-	-	-	-4 17	8 13	13 13	3 -2
Anthron	Hsp70-Gehalt [µg/mg Protein]	x ₁ /x ₂	-	-	-	10,6 10,5 ^{b)}	8,6 10,1 ^{b)}	17,4 13,5 ^{b)}	16,8 14,0 ^{a)}
		x	-	-	-	10,6	9,4	15,5	15,4
		s	-	-	-	0,1	1,1	2,8	2,0
	P [mg/L]	x ₁ /x ₂	-	-	-	742 789	722 652	652 708	918 958
		AP [%]	-	-	-	-3 -10	0 10	10 2	3 -1

Fortsetzung Tab. A14 – Daten zur Untersuchung der Einzelsubstanzen, P: Proteingehalt, AP: Abnahme im Proteingehalt, grau unterlegt: Cytotoxizität

		Konzentration [µg/mL]							
		0,1	0,2	0,5	1	2	5	10	
Xanthon	Hsp70-Gehalt [µg/mg Protein]	x ₁ /x ₂	-	-	-	13,2 11,3 ^{a)}	10,4 11,0 ^{b)}	10,9 10,4 ^{b)}	14,9 12,4 ^{a)}
		x	-	-	-	12,3	10,7	10,7	13,7
		s	-	-	-	1,3	0,4	0,4	1,8
	P [mg/L]	x ₁ /x ₂	-	-	-	921 965	927 606	633 673	823 901
	AP [%]		-	-	-	3 -2	-28 16	12 7	13 5
Benzanthron	Hsp70-Gehalt [µg/mg Protein]	x ₁ /x ₂	-	-	-	10,2 9,9 ^{b)}	10,7 9,8 ^{b)}	15,7 14,9 ^{b)}	8,5 8,4 ^{a)}
		x	-	-	-	10,1	10,3	15,3	8,5
		s	-	-	-	0,2	0,6	0,6	0,1
	P [mg/L]	x ₁ /x ₂	-	-	-	747 596	834 819	606 630	707 712
	AP [%]		-	-	-	-4 17	-16 -14	16 13	25 25
Phenanthren	Hsp70-Gehalt [µg/mg Protein]	x ₁ /x ₂	-	-	-	10,9 12,4 ^{b)}	11,1 14,3 ^{b)}	12,8 13,9 ^{b)}	17,0 17,5 ^{a)}
		x	-	-	-	11,7	12,7	13,4	17,3
		s	-	-	-	1,1	2,3	0,8	0,4
	P [mg/L]	x ₁ /x ₂	-	-	-	666 630	684 744	807 699	1013 942
	AP [%]		-	-	-	8 13	5 -3	-12 3	-7 0
9,10-Dihydrophenanthren	Hsp70-Gehalt [µg/mg Protein]	x ₁ /x ₂	-	-	-	10,7 9,8 ^{b)}	10,9 10,4 ^{b)}	10,6 10,5 ^{b)}	11,9 12,9 ^{a)}
		x	-	-	-	10,3	10,7	10,6	12,4
		s	-	-	-	0,6	0,4	0,1	0,7
	P [mg/L]	x ₁ /x ₂	-	-	-	633 673	717 606	912 971	823 901
	AP [%]		-	-	-	12 7	0 16	4 -3	13 5

Fortsetzung Tab. A14 – Daten zur Untersuchung der Einzelsubstanzen, P: Proteingehalt, AP: Abnahme im Proteingehalt, grau unterlegt: Cytotoxizität

		Konzentration [µg/mL]							
		0,1	0,2	0,5	1	2	5	10	
9,10-Phenanthrenchinon	Hsp70-Gehalt [µg/mg Protein]	x ₁ /x ₂	-	-	-	10,4 11,0 ^{b)}	11,9 11,2 ^{b)}	14,9 16,3 ^{b)}	18,6 21,8 ^{a)}
		x	-	-	-	10,7	11,6	15,6	20,2
		s	-	-	-	0,4	0,5	1,0	2,3
	P [mg/L]	x ₁ /x ₂	-	-	-	808 853	701 712	585 651	1037 1027
	AP [%]		-	-	-	15 10	3 1	19 10	-10 -9
Carbazol	Hsp70-Gehalt [µg/mg Protein]	x ₁ /x ₂	-	-	-	10,9 10,4 ^{b)}	11,2 11,8 ^{b)}	12,8 12,7 ^{b)}	14,9 17,4 ^{a)}
		x	-	-	-	10,7	11,5	12,8	16,2
		s	-	-	-	0,4	0,4	0,1	1,8
	P [mg/L]	x ₁ /x ₂	-	-	-	633 673	633 610	669 690	957 1029
	AP [%]		-	-	-	12 7	12 15	7 4	-1 -9
3-Methylchinolin	Hsp70-Gehalt [µg/mg Protein]	x ₁ /x ₂	-	-	-	10,4 11,0 ^{b)}	13,6 16,9 ^{b)}	23,7 24,3 ^{b)}	19,5 18,1 ^{a)}
		x	-	-	-	10,7	15,3	24,0	18,8
		s	-	-	-	0,4	2,3	0,4	1,0
	P [mg/L]	x ₁ /x ₂	-	-	-	927 606	1055 633	717 606	912 971
	AP [%]		-	-	-	-28 16	-46 12	0 16	4 -3
Pyren	Hsp70-Gehalt [µg/mg Protein]	x ₁ /x ₂	9,9 6,0 ^{d)}	10,5 11,6 ^{d)}	10,0 14,9 ^{d)}	12,9 12,7 ^{d)}	16,2 14,9 ^{c)}	-	6,9 8,5 ^{c)}
		x	8,0	11,1	12,5	12,8	15,6	-	7,7
		s	2,8	0,8	3,5	0,1	0,9	-	1,1
	P [mg/L]	x ₁ /x ₂	626 607	616 585	607 619	565 578	650 599	-	543 568
	AP [%]		-4 -1	-2 3	-1 -3	6 4	-13 -4	-	5 1

Fortsetzung Tab. A14 – Daten zur Untersuchung der Einzelsubstanzen, P: Proteingehalt, AP: Abnahme im Proteingehalt, grau unterlegt: Cytotoxizität

		Konzentration [µg/mL]							
		0,1	0,2	0,5	1	2	5	10	
Fluoranthen	Hsp70-Gehalt [µg/mg Protein]	x ₁ /x ₂	11,7 9,7 ^{d)}	12,5 11,7 ^{d)}	15,0 12,3 ^{d)}	28,3 26,0 ^{d)}	17,0 17,8 ^{c)}	-	16,3 9,7 ^{c)}
		x	10,7	12,1	13,7	27,2	17,4	-	13,0
		s	1,4	0,6	1,9	1,6	0,6	-	4,7
	P [mg/L]	x ₁ /x ₂	626 607	616 585	607 619	565 578	650 599	-	543 568
		AP [%]	-4 -1	-2 2	-1 -3	6 4	-13 -4	-	5 1
Dieldrin	Hsp70-Gehalt [µg/mg Protein]	x ₁ /x ₂	10,8 11,2 ^{e)}	12,3 10,4 ^{e)}	11,4 11,6 ^{e)}	16,5 15,3 ^{e)}	22,2 16,6 ^{e)}	-	9,3 11,4 ^{a)}
		x	11,0	11,4	11,5	15,9	19,4	-	10,4
		s	0,3	1,3	0,1	0,8	4,0	-	1,5
	P [mg/L]	x ₁ /x ₂	581 709	640 734	653 629	649 744	653 688	-	808 853
		AP [%]	20 2	12 -1	10 13	11 -2	10 5	-	15 10
Paraquat	Hsp70-Gehalt [µg/mg Protein]	x ₁ /x ₂	18,6 22,0 ^{e)}	10,2 9,5 ^{e)}	9,6 10,6 ^{e)}	9,8 10,1 ^{e)}	12,2 10,7 ^{e)}	-	10,5 10,4 ^{a)}
		x	20,1	9,9	10,1	10	11,5	-	10,5
		s	2,1	0,5	0,7	0,2	1,1	-	0,1
	P [mg/L]	x ₁ /x ₂	800 727	835 797	804 797	705 783	818 729	-	957 1029
		AP [%]	-10 0	-15 -10	-11 -10	3 -8	12 0	-	-1 -9
5-Brominol	Hsp70-Gehalt [µg/mg Protein]	x ₁ /x ₂	9,1 8,3 ^{d)}	9,3 9,1 ^{d)}	10,6 8,9 ^{d)}	14,5 14,5 ^{d)}	14,6 21,0 ^{d)}	-	13,0 12,4 ^{d)}
		x	8,7	9,2	9,8	14,5	17,8	-	12,7
		s	0,6	0,1	1,2	0,0	4,5	-	0,4
	P [mg/L]	x ₁ /x ₂	533 554	569 559	562 649	574 549	595 593	-	587 603
		AP [%]	11 8	5 7	7 -8	5 9	-4 -3	-	-2 -5

Fortsetzung Tab. A14 – Daten zur Untersuchung der Einzelsubstanzen, P: Proteingehalt, AP: Abnahme im Proteingehalt, grau unterlegt: Cytotoxizität

		Konzentration [µg/mL]							
		0,1	0,2	0,5	1	2	5	10	
4-Bromphenol	Hsp70-Gehalt [µg/mg Protein]	x ₁ /x ₂	-	-	-	11,7 9,7 ^d	11,5 10,4 ^c	-	10,7 15,9 ^c
		x	-	-	-	10,7	11,0	-	13,3
		s	-	-	-	1,4	0,8	-	3,7
	P [mg/L]	x ₁ /x ₂	-	-	-	626 607	605 701	-	597 610
	AP [%]		-	-	-	-4 -1	-5 -22	-	-4 -6
Tris(2-chlorethyl)phosphat	Hsp70-Gehalt [µg/mg Protein]	x ₁ /x ₂	8,9 12,3 ^d	12,7 15,5 ^d	15,2 13,5 ^d	21,7 14,7 ^d	40,4 32,7 ^c	-	25,5 65,4 ^c
		x	10,6	14,1	14,4	18,2	36,6	-	45,5
		s	2,4	2,0	1,2	5,0	5,4	-	28,2
	P [mg/L]	x ₁ /x ₂	558 547	563 593	593 667	540 623	681 613	-	637 707
	AP [%]		7 9	6 1	1 -11	10 -4	-19 -7	-	-10 -23
Chlorpyrifos	Hsp70-Gehalt [µg/mg Protein]	x ₁ /x ₂	-	-	-	-	8,9 9,4 ^c	-	11,7 11,7 ^c
		x	-	-	-	-	9,2	-	11,7
		s	-	-	-	-	0,4	-	0,0
	P [mg/L]	x ₁ /x ₂	-	-	-	-	649 615	-	513 505
	AP [%]		-	-	-	-	-13 -7	-	10 12
Ethylparathion	Hsp70-Gehalt [µg/mg Protein]	x ₁ /x ₂	-	-	11,7 9,7 ^d	10,5 11,6 ^d	8,7 10,9 ^c	-	13,7 8,3 ^c
		x	-	-	10,7	11,1	9,8	-	11,0
		s	-	-	1,4	0,8	1,6	-	3,8
	P [mg/L]	x ₁ /x ₂	-	-	626 607	616 585	630 618	-	603 617
	AP [%]		-	-	-4 -1	-2 3	-10 -8	-	-5 -7

Fortsetzung Tab. A14 – Daten zur Untersuchung der Einzelsubstanzen, P: Proteingehalt, AP: Abnahme im Proteingehalt, grau unterlegt: Cytotoxizität

		Konzentration [µg/mL]							
		0,1	0,2	0,5	1	2	5	10	
N,N'-Dientyl-N,N'- diphenylharnstoff	Hsp70-Gehalt [µg/mg Protein]	x ₁ /x ₂	-	-	-	10,9 10,4 ^{b)}	8,6 10,1 ^{b)}	10,2 9,9 ^{b)}	11,3 10,9 ^{a)}
		x	-	-	-	10,7	9,4	10,1	11,1
		s	-	-	-	0,4	1,1	0,2	0,3
	P [mg/L]	x ₁ /x ₂	-	-	-	717 606	722 652	747 596	891 897
	AP [%]		-	-	-	0 16	0 10	-4 17	6 5
Galaxolid	Hsp70-Gehalt [µg/mg Protein]	x ₁ /x ₂	-	-	-	10,9 12,4 ^{b)}	12,7 9,4 ^{b)}	9,4 14,0 ^{b)}	9,5 13,4 ^{a)}
		x	-	-	-	11,7	11,1	11,7	11,5
		s	-	-	-	1,1	2,3	3,2	2,8
	P [mg/L]	x ₁ /x ₂	-	-	-	666 630	630 630	628 627	718 692
		AP [%]		-	-	-	8 13	13 13	13 13
2-Methylthiothiazol	Hsp70-Gehalt [µg/mg Protein]	x ₁ /x ₂	15,1 13,1 ^{d)}	16,3 22,9 ^{d)}	18,6 23,5 ^{d)}	22,9 25,2 ^{d)}	149 230 ^{c)}	-	16,9 25,7 ^{c)}
		x	14,1	19,6	21,1	24,1	190	-	21,3
		s	1,4	4,7	3,5	1,6	58	-	6,2
	P [mg/L]	x ₁ /x ₂	564 561	649 562	578 603	549 559	630 652	-	593 634
		AP [%]	6 7	8 7	3 0	9 7	-10 -14	-	-3 -10

a) Bezug auf KW 1

b) Bezug auf KW 2

c) Bezug auf KW 3

d) Bezug auf KW 4

e) Bezug auf KW 5

8.4 CHEMIKALIENLISTE, GERÄTE, VERBRAUCHSMITTEL, ZUBEHÖR

8.4.1 CHEMIKALIENLISTE

Chemikalie	Hersteller	Toxizität, R- und S-Sätze
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	Fluka	
Anti-Hsp70-IgG (monoklonal, Maus)	Sigma	
Anti-Maus-IgG, biotinyliert (Ziege)	Dako	
Brilliant Black	Pelikan	
Bromphenolblau	Merck	
Citronensäure-Monohydrat	Merck	
Coomassie Brilliant Blue G-250	Serva	
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma	Xi, R36/37/38, S26-36-23
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck	
Dioclylnatriumsulfosuccinat (DONS)	Fluka	Xn, R22, S22-24/25
Essigsäure, 99 %	Merck	C, R10-35, S2-23.2-26
Elektrodenpuffer, NuPage [®] , MES SDS Running Buffer	Invitrogen	
Ethanol, 96 %	Merck	F, R11, S7-16
Fötale Kälberserum (FKS)	Sigma	
Glycerin, 87 %	Fluka	
Hsp70 (aus Rinderhirn)	Sigma	
Kaliumchlorid	Merck	
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck	
LDH-Testkit (In vitro toxicology assay kit lactate dehydrogenase based)	Sigma	Xn, R20/21/22-36/37/38-41-42/43, S26-36-23
L-Lactatdehydrogenase (L-LDH), 2500 U/0,6 mL	Sigma	
Magermilchpulver	Saliter	
Molekulargewichtsmarker (14-94 kDa)	Pharmacia	
Natriumazid	Merck	T ⁺ , R28-32, S28.1
Natriumchlorid	Merck	
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck	
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva	Xn, R20/22-36/38, S26-28
Natriumhydrogencarbonat	Merck	
Natriumhydroxid	Merck	C, R35, S26-37/39-45
o-Phosphorsäure, 88 %	Merck	C, R34, S26-36/37/39-45
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma	T, R23/24/25-34-32, S45-36/37/39-22
Pyronin Y	Fluka	
Rinderserumalbumin (BSA), pH 7, reinst	Sigma	
Salzsäure, 37 %	Merck	C, R34-37, S26-36/37/39-45
Schwefelsäure, 98 %	Merck	C, R35, S2-26-30
β-Mercaptoethanol	Serva	T, R22-24-36/37/38, S26-36/37-45
Streptavidin-HRP-Konjugat	Medac	
Tris-hydroxymethylaminomethan (Tris)	Merck	Xi, R36/38
Trypsin-Ethylendiamintetraacetat- Lösung	Sigma	
Tween20	Serva	

Wasserstoffperoxid, 30 %

Merck

C, R34, S28-36/39

8.4.2 GERÄTE

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Zentrifuge	3 K 12	Sigma
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Ultraschallhomogenisator	Sonopuls HD2200	Bandelin
Tiefkühlschrank, -80 °C		Kryotec
Mikrotiterplattenreader	Dynex MRX	Dynex
Auswertesoftware	Dynex Revelation G 3.04	Dynex
	Scan Pack 3.0	Biometra
Wasserbad	W 6	Störk Tronic
Elektrophoresekammer	Xcell <i>SureLock</i> ™ Mini-Cell	Invitrogen
Schüttler	WT 17	Biometra
Blotmodul		Invitrogen
Power Supply für Elektrophorese	PowerEase™ 500	Novex
pH-Meter	CG 840	Schott
pH-Elektrode	N 6130	Schott

8.4.3 VERBRAUCHSMITTEL UND ZUBEHÖR

	Bezeichnung	Hersteller
Reaktionsgefäße	Safe-Lock, 1,5 mL	Eppendorf
Mikrotiterplatten	MicroWell™, 96 Kavitäten	Nunc
Gele	NuPage® Novex 10 % Bis-Tris Gel, 1 mm, 15 well	Invitrogen
Nitrocellulosemembran	Protran® BA 83, 0,2 µm	Schleicher & Schuell
Blotting-Schwämme	Sponge Pads for Blotting	Invitrogen

9 LITERATURVERZEICHNIS

- AÏT-AÏSSA S, PORCHER J-M, ARRIGO A-P, LAMBRÉ C (2000) Activation of the *hsp70* promoter by environmental inorganic and organic chemicals: relationships with cytotoxicity and lipophilicity. *Toxicology* **145**, 147-157
- AMATO JR, MOUNT DI, DURHAN EJ, LUKASEWYCZ MT, ANKLEY GT, ROBERT ED (1992) An example of the identification of diazinon as a primary toxicant in an effluent. *Environ Toxicol Chem* **11**, 209-216
- ANKLEY GT, SCHUBAUER-BERIGAN MK, HOKE RA (1992) Use of toxicity identification evaluation techniques to identify dredged material disposal options: a proposed approach. *Environ Manag* **16**, 1-6
- BACHOWSKI S, XU Y, STEVENSON DE, WALBORG EF JR., KLAUNIG JE (1998) Role of oxidative stress in the selective toxicity of dieldrin in the mouse liver. *Toxicol Appl Pharmacol* **150**, 301-309
- BAGCHI D, BHATTACHARYA G, STOHS SJ (1996a) *In vitro* and *in vivo* induction of heat shock (stress) protein (Hsp) gene expression by selected pesticides. *Toxicology* **112**, 57-68
- BAGCHI D, BAGCHI M, HASSOUN EA, STOHS SJ (1996b) *In vitro* and *in vivo* generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. *Toxicology* **104**, 129-140
- BAKSI SM, FRAZIER JM (1990) Review: Isolated fish hepatocytes – model systems for toxicology research. *Aquat Toxicol* **16**, 229-256
- BARIŠIĆ K, PETRIK J, RUMORA L, ČEPELAK I, ŽANIĆ GRUBIŠIĆ T (2002) Expression of Hsp70 in kidney cells exposed to ochratoxin A. *Arch Toxicol* **76**, 218-226
- BIERKENS J, MAES J, VANDER PLAETSE F (1998) Dose-dependent induction of heat shock protein 70 synthesis in *Raphidocelis subcapitata* following exposure to different classes of environmental pollutants. *Environ Poll* **101**, 91-97
- BISELLI S (2002) persönl. Mitteilung
- BJÖRKLUND HV, JOHANSSON TR, RINNE A (1997) Rhabdovirus-induced apoptosis in a fish cell line is inhibited by a human endogenous acid cysteine proteinase inhibitor. *J Virol* **71**, 5658-5662

- BLOM A, HARDER W, MATIN A (1992) Unique and overlapping pollutant stress proteins of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **58**, 331-338
- BRACK W, ALTENBURGER R, ENSENBACH U, MÖDER M, SEGNER H, SCHÜÜRMAN G (1999) Bioassay-directed identification of organic toxicants in river sediment in the industrial region of Bitterfeld (Germany) – A contribution to hazard assessment. *Arch Environ Contam Toxicol* **37**, 164-174
- BRADFORD MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254
- BRAUNBECK T, HOLLERT H, DÜRR M, ERDINGER LF (1997a) Biotest in der Ökotoxikologie am Beispiel der Fischzelltests. *PAÖ* **22**, 345-358
- BRAUNBECK T, ARNOLD H, OULMI Y, ZAHN T, STORCH V (1997b) Neue Ansätze zur Bewertung der Ökotoxizität von Xenobiotika. Teil 1: *In vitro* Tests an Fischzellkulturen. *BIOforum* **1-2**, 12-16
- CALABRESE V, TESTA G, RAVAGNA A, BATES TE, STELLA AMG (2000) Hsp70 induction in the brain following ethanol administration in the rat: Regulation by glutathione redox state. *Chem Biophys Res Commun* **269**, 397-400
- CETKAUSKAITÈ A, BERŽINSKIENÈ J, SODERGREN A (2002) Free unsaturated fatty acids: Detection in environmental samples, combined toxicity with organochlorines in bioluminescence. Posterpräsentation bei der SETAC Europe, 12th annual meeting, Vienna, Austria, 12.-16. Mai
- CHEMICAL ABSTRACT SERVICE (2002) www.cas.org, Stand September 2002
- CHIANG H-L, TERLECKY SR, PLANT CP, DICE JF (1989) A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intercellular proteins. *Science* **246**, 382-391
- CRAIG EA, GROSS CA (1991) Is hsp 70 the cellular thermometer? *Trends Biochem Sci* **16**, 135-140
- DANISCHEWSKI D (2002) persönl. Mitteilung
- DAS M, GARG K, SINGH GB, KHANNA SK (1994) Attenuation of benzanthrone toxicity by ascorbic acid in guinea pigs. *Toxicol Sci* **22**, 447-456

- DECKER T, LOHMANN-MATTHES ML (1988) A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J Immunol Meth* **15**, 61-69
- DESCAMPIAUX B, COTELLE N, CATTEAU JP, PEUCELLE C, LEROUX JM, ERB F (1999) Cytotoxicity of lindane and paraquat to human hepatoma cell lines. *Bull Environ Contam Toxicol* **62**, 16-24
- DE WACHTER B, SCHOLLIERS A, BLUST R (1998) Semiquantitative immunoblot detection of 70 kDa stress proteins in the Carp *Cyprinus carpio*. *Bull Environ Contam Toxicol* **60**, 37-44
- DJOMO JE, GARRIGUES P, NARBONNE JF (1996) Uptake and depuration of polycyclic aromatic hydrocarbons from sediments by the zebrafish (*Brachydanio Rerio*). *Environ Toxicol Chem* **15**, 1177-1181
- DUAN Y, GUTTMANN SI, ORIS JT, HUANG X, BURTON GA (2000) Genotype and toxicity relationships among *Hyaella azteca* II acute exposure to fluoranthene-contaminated sediment. *Environ Toxicol Chem* **19**, 1422-1426
- DUTSON SM, BOOTH GM, SCHAALJE GB, CASTLE RN, SEEGMILLER RE (1997) Comparative developmental dermal toxicity and mutagenicity of carbazole and Benzo(a)carbazole. *Environ Toxicol Chem* **16**, 2113-2117
- DWIVEDI N, DAS M, KHANNA SK (2001) Role of biological antioxidants in benzanthrone toxicity. *Arch Toxicol* **75**, 221-226
- DYER SD, DICKSON KL, ZIMMERMANN EG (1993) A laboratory evaluation of the use of stress proteins in fish to detect changes in water quality. In: Landis WG, Hughes JS, Lewis MA (Eds). Environmental toxicology and risk assessment. American Society for Testing and Materials (ASTM STP 1179), Philadelphia, USA, 247-261
- ECKWERT H, ALBERTI G, KÖHLER H-R (1997) The induction of stress proteins (hsp) in *Oniscus asellus* (Isopoda) as a molecular marker of multiple heavy metal exposure: I. Principles and toxicological assessment. *Ecotoxicology* **6**, 249-262
- EDINGTON BV, WHELAN SA, HIGHTOWER LE (1989) Inhibition of heat shock (stress) protein induction by deuterium oxide and glycerol: additional support for the abnormal protein hypothesis of induction. *J Cell Physiol* **139**, 219-227

- EDWARDS MJ, DYKES PJ, DONOVAN MRO, MERRETT VR, MORGAN HE, MARKS R (1990) Induction of heat shock proteins as a measure of chemical cytotoxicity. *Toxic in vitro* **4**, 270-276
- EGUSA K, HUANG CC, HADDAD J (1995) Heat shock proteins in acute otitis media. *Laryngoscope* **105**, 708-713
- ELLIS RJ (1990) The molecular chaperon concept. *Semin Cell Biol* **1**, 1-7
- FERNÁNDEZ P, GRIFOLL M, SOLANAS AM, BAYONA JM, ALBAIGES J (1992) Bioassay-directed chemical analysis of genotoxic components in coastal sediments. *Environ Sci Technol* **26**, 817-829
- FIELMAN KT, WOODIN SA, LINCOLN DE (2001) Polychaete indicator species as a source of natural halogenated organic compounds in marine sediments. *Environ Toxicol Chem* **4**, 738-747
- FIJAN N, SULIMANOVIC D, BEARZOTTI M, MUZINIC D, ZWILLENBERG LO, CHILMONCZYK S, VAUTHEROT JF, DE KINKELIN P (1983) Some Properties of the Epithelioma Papulosum Cyprini (EPC) Cell Line from Carp *Cyprinus Carpio* L. *Ann Virol* **134E**, 207-220
- FLAHERTY KM DELACA-FLAHERTY C, MCKAY DB (1990) Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70 K heat-shock cognate protein. *Nature* **346**, 623-628
- GALLATI H, PRACHT L (1985) Peroxidase aus Meerrettich: Klinische Studien und Optimierung der Peroxidase-Aktivitätsbestimmung mit den Substraten H₂O₂ und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin. *J Clinical Chem* **14**, 82-89
- GAGNÉ F, BLAISE C (1995) Evaluation of the genotoxicity of environmental contaminants in sediments to rainbow trout hepatocytes. *Environ Toxicol Water Qual* **10**, 217-229
- GAGNÉ F, BLAISE C (2000) Evaluation of environmental estrogens with a fish cell line. *Bull Environ Contam Toxicol* **65**, 494-500
- GETHING M-J, SAMBROOK J (1992) Protein folding in the cell. *Nature* **355**, 33-42
- GOSSLAU A, RUOFF P, MOHSENZADEH S, HOBBOHM U, RENSING L (2001) Heat shock and oxidative stress-induced exposure of hydrophobic protein domains as common signal in the induction of hsp68. *J Biol Chem* **276**, 1814-1821

- GOTTWALD W (2000) Statistik für Anwender, Verlag Wiley-VCH, Weinheim, Berlin, New York, 1. Auflage
- GRIFOLL M, SOLANAS AM, BAYONA JM (1990) Characterisation of genotoxic components in sediments by mass spectrometric techniques combined with Salmonella(microsome test). *Arch Environ Contam Toxicol* **19**, 175-184
- GUTTMANN A (1996) Capillary sodium dodecyl-sulfate gel electrophoresis of proteins. *Electrophoresis* **17**, 1333-1341
- HANCOCK K, TSANG VCW (1983) India Ink staining of proteins on nitrocellulose paper. *Anal Biochem* **133**, 157-162
- HARTL FU (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381**, 571-579
- HARTL FU, MARTIN J, NEUPERT W (1992) Protein folding in the cell: The role of molecular chaperones Hsp70 and Hsp60. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **21**, 293-322
- HASHIMOTO H, TAKEUCHI K, MATSUO Y, YOKOYAMA Y, TOYOHARA H, SAKAGUCHI M (1999) Suppression of Apoptosis of Fish Cells by Acclimation to Hypertonicity. *Fish Sci* **65**, 145-149
- HARKEY GA, LANDRUM PF, KLAINE SJ (1994) Comparison of whole-sediment, elutriate and pore-water exposures for use in assessing sediment-associated organic contaminants in bioassays. *Environ Toxicol Chem* **13**, 1315-1329
- HASSANEIN HMA, BANHAWY MA, SOLIMAN FM, ABDEL-REHIM SA, MÜLLER WEG, SCHRÖDER HC (1999) Induction of Hsp70 by the herbicide oxyfluorfen (Goal) in the Egyptian Nile Fish, *Oreochromis niloticus*. *Arch Environ Contam Toxicol* **37**, 78-84
- HEINZEL N (2002), persönl. Mitteilung
- HENSCHLER D (1989) Risiko, Grenzwerte und politische Prioritäten. In: Handelskammer Hamburg – Hauptabteilung Industrie (Hrsg.): Auf dem Wege zur Nullemission? 34-56, Handelskammer Hamburg: Dokumente
- HIGHTOWER LE (1991) Heat shock, stress proteins, chaperons, and proteotoxicity (Meeting review). *Cell* **66**, 1-22

- HIGHTOWER LE (1993) A brief perspective on the heat-shock response and stress proteins. *Mar Environ Res* **35**, 79-83
- HIGHTOWER LE, RENFRO JL (1988) Recent applications of fish cell culture to biomedical research. *J Experim Zool* **248**, 290-302
- HIGHTOWER LE, WHITE FP (1981) Cellular response to stress: comparison of a family of 71-73 kilodalton proteins rapidly synthesized in rat tissue slices and canavanine-treated cells in culture. *J Cell Physiol* **108**, 261-275
- HO KTY, QUINN JG (1993) Bioassay-directed fractionation of organic contaminants in an estuarine sediment using the new mutagenic bioassay, MutatoxTM. *Environ Toxicol Chem* **12**, 823-830
- HOPKINS WA, SNODGRASS JW, ROE JH, JACKSON BP, GARIBOLDI JC, CONGDON JD (2000) Detrimental effects associated with trace element uptake in lake chub-suckers (*Erimyzon sucetta*) exposed to polluted sediments. *Arch Environ Contam Toxicol* **39**, 193-199
- HOSOKAWA N, HIRAYOSHI K, NAKAI A, HOSOKAWA Y, MARUI N, YOSHIDA M, SAKAI T, NISHINO H, AOIKE A, KAWAI K, NAGATA K (1990) Flavonoids inhibit the expression of heat shock proteins. *Cell Struct Funct* **15**, 393-401
- JOHNSON DA, GAUTSCH JW, SPORTSMAN JR, ELDER JH (1984) Improved technique utilization nonfat dry milk for analysis of proteins and nucleic acid transferred to nitrocellulose. *Genetic analysis and technology* **1**, 3
- JOHNSON BT, LONG ER (1998) Rapid toxicity assessment of sediments from estuarine ecosystems: a new tandem *in vitro* testing approach. *Environ Toxicol Chem* **17**, 1099-1106
- JUNGMANN J, REINS H-A, SCHOBERT C, JENTSCH S (1993) Resistance to cadmium mediated by ubiquitin-dependent proteolysis. *Nature* **361**, 369-371
- KAMMANN U (2002) persönl. Mitteilung
- KAMMANN U, BUNKE M, STEINHART H (2000) Anwendung von Fischzellkulturen in der Meeresforschung. *Inf Fischwirtsch Fischereiforsch* **47**, 48-51
- KAMMANN U, BUNKE M, STEINHART H, THEOBALD N (2001) A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay. *Mut Res* **498**, 67-77

- KAR CHOWDHURI D, SAXENA DK, VISWANATHAN PN (1999) Effect of hexachlorocyclohexane (HCH), its isomers, and metabolites on hsp70 expression in transgenic *Drosophila melanogaster*. *Pestic Biochem Physiol* **63**, 15-25
- KHYSE-ANDERSEN J (1984) Electroblotting of multiple gels: A simple horizontal apparatus without buffer tank for electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Meth* **10**, 203-209
- KILEMADE M, MOTHERSILL C (2000) An *in vitro* assessment of the toxicity of 2,4-dichloroaniline using rainbow trout epidermal cell cultures. *Environ Toxicol Chem* **19**, 2093-2099
- KILEMADE M, MOTHERSILL C (2001) Heat shock protein 70 levels in rainbow trout primary epidermal cultures in response to 2,4-dichloroaniline exposure: A novel *in vitro* aquatic toxicity marker. *Environ Toxicol* **16**, 253-259
- KITAZAWA M, ANANTHARAM V, KANTHASAMY AG (2001) Dieldrin-induced oxidative stress and neurochemical changes contribute to apoptotic cell death in dopaminergic cells. *Free Radical Biol Med* **31**, 1473-1485
- KÖHLER H-R, RAHMAN B, GRÄFF S, BERKUS M, TRIEBSKORN R (1996) Expression of the stress-70 protein family (hsp70) due to heavy metal contamination in the slug, *Deroceras reticulatum*: an approach to monitor sublethal stress conditions. *Chemosphere* **33**, 1327-1340
- KÖHLER H-R, ECKWERT H, TRIEBSKORN R, BENGTSSON G (1999) Interaction between tolerance and 70 kDa stress protein (hsp70) induction in collembolan populations exposed to long-term metal pollution. *Appl Soil Ecol* **11**, 43-52
- KOSIAN PA, MAKYNEN EA, MONSON PD, MOUNT DR, SPACIE A, MEKENYAN OG, ANKLEY GT (1998) Application of toxicity-based fractionation techniques and structure-activity relationship models for the identification of phototoxic polycyclic aromatic hydrocarbons in sediment pore water. *Environ Toxicol Chem* **17**, 1021-1033
- LANGE M, GEBAUER W, MARKL J, NAGEL R (1995) Comparison of testing acute toxicity on embryo of zebrafish, *brachydanio rerio* and RTG-2 cytotoxicity as possible alternatives to the acute fish test. *Chemosphere* **30**, 2087-2102

- LANGER T, NEUPERT W (1991) Heat shock proteins hsp60 and hsp70: Their roles in folding, assembly and membrane translocation of proteins. In: Kaufmann SHE (Ed.). Heat shock proteins and immune response. Springer, Berlin, New York. *Curr Top Microbiol Immunol* **167**, 3-30
- LEGRAND C, BOUR JM, JACOB C, CAPIAUMONT J, MARTIAL A, MARC A, WUDTKE M, KRETZMER G, DEMANGEL C, DUVAL D, HACHE J (1992) Lactate dehydrogenase (LDH) activity of the number of dead cells in the medium of cultured eukaryotic cells as a marker. *J Biotech* **25**, 231-243
- LINDQUIST S, CRAIG EA (1988) The heat shock proteins. *Annu Rev Genet* **22**, 631-677
- LOTUFO GR, FLEEGER JW (1996) Toxicity of sediment-associated pyrene and phenanthrene to *Limnodrilus hoffmeisteri* (Oligochaeta: Tubificidae). *Environ Toxicol Chem* **15**, 1508-1516
- MARIÑO F, WINTERS C, MORGAN AJ (1999) Heat shock protein (hsp60, hsp70, hsp90) expression in earthworms exposed to metal stressors in the field and laboratory. *Pedobiologia* **43**, 615-624
- MARTELL FL, MOTEKAITIS RT, SMITH RM (1988) Structure-stability relationships of metal complexes and metal speciation in environmental aqueous solutions. *Environ Toxicol Chem* **7**, 417-434
- MARTINEZ J, PEREZ-SERRANO J, BERNADINA WE, RODRIGUEZ-CAABEIRO F (2000) Detection of heat shock protein-70 from *Trichinella spiralis* larvae using a modification of the routine western blotting procedure. *J Parasitol* **86**, 637-639
- MARVIN CH, TESSARO M, MCCARRY BE, BRYANT DW (1994) A bioassay-directed investigation of Sydney Harbour sediment. *Sci Total Environ* **156**, 119-131
- MARVIN CH, MCCARRY BE, LUNDRIGAN JA, ROBERTS K, BRYANT DW (1999) Bioassay-directed fractionation of PAH of molecular mass 302 in coal tar-contaminated sediment. *Sci Total Environ* **231**, 135-144
- MCCARTHY JF, SHUGART LR (1990) Biological markers of environmental contamination. In: McCarthy JF, Shugart LR (eds.): Biomarkers of environmental contamination, Lewis Publishers, 429-439

- McCONKEY, DUXBURY CL, DIXON DG, GREENBERG BM (1997) Toxicity of a PAH-photooxidation product to the bacteria photobacterium phosphoreum and the duckweed *Lemna gibba*: Effects of phenanthrene und its primary photoproduct phenanthrenquinone. *Environ Toxicol Chem* **16**, 892-899
- MEYER U, SCHWEIM P, FRACELLA F, RENSING L (1995) Close correlation between heat shock response and cytotoxicity in *Neurospora crassa* treated with aliphatic ; alcohols and phenols. *Appl Environ Microbiol* **61**, 979-984
- MORIARTY F (1993) Ecotoxicology. The study of pollutants in ecosystems. Academic Press, London, 289ff
- MORIMOTO RI, SARGE KD, ABRAYAYA K (1992) Transcriptional regulation of heat shock genes. *J Biol Chem* **31**, 21987-21995
- MUN H-S, NOROSE K, AOSAI F, CHEN M, YANO A (2000) A role of carboxy-terminal region of *Toxoplasma gondii*-heat shock protein 70 in enhancement of *T. gondii* infection in mice. *J Parasitol* **38**, 107-110
- MURDOCK A (1991) CRC Handbook of Technics for Aquatic Sediment Sampling, CRC Press, Boca Raton.
- NAKAGAWA I, SUZUKI M, IMURA N, NAGANUMA A (1998) Involvement in oxidative stress in paraquat-induced Metallothionein synthesis under glutathione depletion. *Free Radical Biol Med* **24**, 1390-1395
- NEUHAUS-STEINMETZ U, RENSING L (1997) Heat shock protein induction by certain chemical stressors is correlated with their cytotoxicity, lipophilicity and protein-denaturing capacity. *Toxicology* **123**, 185-195
- NISHIOKA MG, HOWARD CC, CONTOS DA, BALL LM, LEWTAS J (1988) Detection of hydroxylated nitro aromatic and hydroxylated nitro polycyclic aromatic compounds in an ambient air particulate extract using bioassay-directed fractionation. *Environ Sci Technol* **22**, 908-915
- NOVER LE (1991) The Heat Shock Response. CRC Press, Boca Raton, Florida
- OLIVIER K, LIU J, KARANTH S, ZHANG H, ROANE DS, POPE CN (2001) Glucose feeding exacerbates parathion-induced neurotoxicity. *J Toxicol Environ Health* **63**, 253-272

- OVELGÖNNE JH, SOUREN JEM, WIEGANT FAC, VAN WIJK R (1995) Relationship between cadmium-induced expression of heatshock genes, inhibition of protein synthesis and cell death. *Toxicology* **99**, 19-30
- PAWERT M, TRIEBSKORN R, GRÄFF, S, BERKUS M, SCHULZ J, KÖHLER H-R (1996) Cellular alterations in collembolan midgut cells as a marker of heavy metal exposure: ultrastructure and intracellular metal distribution. *Sci Tot Environ* **181**, 187-200
- PAYNE JF, MATHIEU A, MELVIN W, FANCEY LL (1996) Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. *Mar Pollut Bull* **32**, 225-231
- PAYNE JF, KICEMINK J, FANCEY LM, WILLIAMS U, FLETCHER GL, RAHIMTULA A, FOWLER B (1988) What is a safe level of polycyclic aromatic hydrocarbons for fish : Subchronic toxicity study on winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *Can J Fish Aquat Sci* **45**, 1983-1993
- PEDERSEN SN, LUNDEBYE AK (1996) Metallothionein and stress protein levels in shore crabs (*Carcinus maenas*) along a trace metal gradient in the Fal Estuary. *Mar Environ Res* **42**, 241-246
- PHILIPS TA, WU J, SUMMERFELT RC, ATCHISON GJ (2002) Acute toxicity and cholinesterase inhibition in larval and early juvenile walley exposed to chlorpyrifos. *Environ Toxicol Chem* **21**, 1469-1474
- PONS M, GAGNE D, NICOLAS JC, MEHTALI M (1990) A new cellular model of response to estrogens: a bioluminescent test to characterize (anti)estrogens molecules. *BioTechniques* **9**, 450-459
- RÄBIGER N (2002) Abwassernachrichten Januar 2002, www.wasserwissen.de/abwassernews/2002/januar2002.html
- RAHMEN-ABWASSER-VERWALTUNGSVORSCHRIFT (1996) Rahmen-Abwasser-Verwaltungsvorschrift über Mindestanforderungen an das Einleiten von Abwasser in Gewässer. Fassung vom 31. Juli 1996 (GMBI. 1996 S. 729)
- RAJDEV S, SHARP FR (2000) Stress proteins as molecular markers of neurotoxicity. *Toxicol Pathol* **28**, 105-112

- REINEKE N (2002) Biotest-geleitete Analytik von ökotoxikologisch relevanten Substanzen in Sedimentextrakten von Nord- und Ostsee, Dissertation an der Universität Hamburg, Fachbereich Chemie
- RITOSSA F (1962) A new puffing pattern induced by heat shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* **18**, 571
- RUTHERFORD SL, ZUKER CS (1994) Protein folding and the regulation of signaling pathways. *Cell* **79**, 1129-1132
- RYAN JA (1997) Fish stress proteins as *in vitro* biomarkers. Dissertation, University of Connecticut
- RYAN JA, HIGHTOWER LE (1994) Evaluation of heavy-metal ion toxicity in fish cells using combined stress protein and cytotoxicity assay. *Environ Toxicol Chem* **13**, 1231-1240
- SALIZZATO M, RIGONI M, PAVONI B, VOLPI GHIRARDINI A, GHETTI PF (1997) Separation and quantification of organic micropollutants (PAH, PCB) in sediments. Toxicity of extracts towards *Vibrio fischeri*. *Toxicol Environ Chem* **60**, 183-200
- SALMINEN WF, VOELLMY R, ROBERTS SM (1996) Induction of hsp 70 in HepG2 cells in response to hepatotoxicants. *Toxicol Appl Pharmacol* **141**, 11-123
- SAMOIOFF MR, BELL J, BIRKHOLZ DA, WEBSTER GRB, ARNOTT EG, PULAK R, MADRID A (1983) Combined bioassay-chemical fractionation scheme for the determination and ranking of toxic chemicals in sediments. *Environ Sci Technol* **17**, 329-334
- SANDERS BM (1993) Stress proteins in aquatic organisms: an environmental perspective. *Crit Rev Toxicol* **23**, 49-75
- SANDERS BM, MARTIN LS (1994) Copper inhibits the induction of stress protein synthesis by elevated temperatures in embryos of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Comp Biochem Physiol* **109C**, 295-307
- SANDERS BM, MARTIN LS, NAKAGAWA PA, HUNTER DA, MILLER S, ULLRICH SJ (1994) Specific cross-reactivity of antibodies raised against two major stress proteins, stress 70 and chaperonin 60, in diverse species. *Environ Toxicol Chem* **13**, 1241-1249

- SANDERS BM, STEINERT S (1996) Evaluation of a suite of biomarkers of toxicity and exposure in deployed mussels exposed to contaminants *in situ*. *Mar Environ Res* **42**, 280-289
- SCHRÖDER HC, BATEL R, LAUENROTH S, HASSANEIN HMA, LACORN M, SIMAT T, STEINHART H, MÜLLER WEG (1999) Induction of DNA damage and expression of heat shock protein HSP70 by polychlorinated biphenyls in the marine sponge *Suberites domuncula* Oliv. *J Exp Mar Biol Ecol* **233**, 285-300
- SCHULZ M, LEWALD B, KOHLPOTH M, RUSCHE B, LORENZ KHJ, UNRUH E, HANSEN PD, MILTENBURGER HG (1995) Fischzelllinien in der toxikologischen Bewertung von Abwasserproben, *ALTEX* **12**, 188-195
- SEGNER H, LENZ D (1993) Cytotoxicity assays with the rainbow trout R1 cell line. *Toxic in vitro* **7**, 537-540
- SIERTS-HERRMANN A (2002) Nachweis von oxidativem Stress in der permanenten Zelllinie *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) im Zuge der Biotest-dirigierten Fraktionierung mariner Sedimentextrakte, Dissertation an der Universität Hamburg, Fachbereich Chemie
- SMITH MT, EVANS CG, THOR H, ORRENIUS S (1985) Quinone-induced oxidative injury to cells and tissues. In: Sies H (Ed.). *Oxidative Stress*. Academic Press, London, 91-113
- SNYDER MJ, GIRVETZ E, MULDER EP (2001) Induction of marine mullusc stress proteins by chemical or physical stress. *Arch Environ Contam Toxicol* **41**, 22-29
- STOTT DI (1989) Immunoblotting and dot blotting. *J Immunol Meth* **119**, 153-187
- STRINGHAM EG, CANDIDO EPM (1994) Transgenic hsp16-lacZ strains of the soil nematode *caenorhabditis elegans* as biological monitors of environmental stress. *Environ Toxicol Chem* **13**, 1211-1220
- TRIEBSKORN R, KÖHLER H-R (1996) The impact of heavy metals on the grey garden slug *Deroceras reticulatum* (Müller): metal storage, cellular effects and semi-quantitative evaluation of metal toxicity. *Environ Pollut* **93**, 327-343
- TSUKAMOTO M, TAMPO Y, SAWADA M, YOUAHA M (2001) Paraquat-induced oxidative stress and dysfunction of the glutathione redox-cycle in pulmonary microvascular endothelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol* **178**, 82-92

- TISSIÈRE DE, MITCHELL HK, TRACY VM (1974) Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*. *J Mol Biol* **84**, 389-398
- VAHL HH (2002) persönl. Mitteilung
- VAHL HH, KARBE L, WESTENDORF J (1997) Genotoxicity assessment of suspended particulate matter in the Elbe river: comparison of *Salmonella* microsome test, arabinose resistance test, and *umu*-test. *Mutation Res* **394**, 81-93
- VALLEE BL, ULMER DD (1972) Biochemical effects of mercury, cadmium, and lead. *Annu Rev Biochem* **41**, 91-128
- VARÓ I, SERRANO R, PITARCH E, AMAT F, LÓPEZ FJ, NAVARRO JC (2002) Bioaccumulation of chlorpyrifos through an experimental food chain: study of protein hsp70 as biomarker of sublethal stress in fish. *Arch Environ Contam Toxicol* **42**, 229-235
- VIETHS S, SCHÖNING B, BROCKMANN A, AULEPP H (1992) Untersuchungen zur Allergie gegen Lebensmittel pflanzlicher Herkunft: Herstellung und Charakterisierung von Obst- und Gemüseextrakten für serologische Untersuchungen. *Dt Lebensm Rundsch* **88**, 239-243 und 273-279
- VIJAYAN MM, PEREIRA C, KRZYNSKI G, IWAMA GK (1998) Sublethal concentrations of contaminant induce the expression of hepatic heat shock protein 70 in two salmonids. *Aquat Toxicol* **40**, 101-108
- WASHBURN BS, MORELAND JJ, SLAUGHTER AM, WERNER I, HINTON DE, SANDERS BM (2002) Effects of handling on heat shock protein expression in rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*). *Environ Toxicol Chem* **21**, 557-560
- WERNER I, KLINE KF, HOLLIBAUGH JT (1998) Stress protein expression in *Ampelisca abdita* (Amphipoda) exposed to sediments from San Francisco Bay. *Mar Environ Res* **45**, 417-430
- WERNER I, NAGEL R (1997) Stress proteins and hsp70 in three species of amphipods exposed to cadmium, diazinon, dieldrin and fluoranthene. *Environ Toxicol Chem* **16**, 2393-2403
- WESTERMEIER R (1990) Elektrophorese-Praktikum. VCH-Verlag, Weinheim

WILLIAMS JH, FARAG AM, STANSBURY MA, YOUNG PA, BERGMAN HL, PETERSEN NS (1996) Accumulation of Hsp70 in juvenile and adult rainbow trout gill exposed to metal-contaminated water and/or diet. *Environ Toxicol Chem* **15**, 1324-1328

WOSNIOK W (2002) persönl. Mitteilung

ZUH X, ZHAO X, BURKHOLDER WF, GRAGEROV A, OGATA CM, GOTTESMAN ME, HENDRICKSON WA (1996) Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science* **272**, 1606-1614

Lebenslauf

Persönliche Daten

Angelika Kinder geb. Lahrssen
geboren am 11.06.1973 in Heide

Schulbildung

Aug. 1979 - Juli 1983	Grundschule Wesselburen
Aug. 1983 - Mai 1992	Nordsee-Gymnasium Büsum

Studium

Apr. 1993 – Feb. 1997	Studium der Lebensmittelchemie, Universität Hamburg
Feb. – Nov. 1997	Diplomarbeit: „Isolierung und Quantifizierung von Metallothioneinen aus Klieschen (<i>Limanda limanda</i> L.)“
Nov. 1997 – März 1998	Erstes Staatsexamen, Diplom in Lebensmittelchemie
Mai 1999 – Juni 1999	Zweites Staatsexamen

Praktika

Aug. 1996 – Sep. 1996	Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp, Brasil
Mai 1998 – Okt. 1998	Handels- und Umweltschutzlabor Dr. Kaiser & Dr. Woldmann, Hamburg
Nov. 1998 – Apr. 1999	Hygiene-Institut, Hamburg

Berufstätigkeit

Nov. 1999 – Dez. 2002	Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Promotion am Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Universität Hamburg
seit Jan. 2003	Lebensmittelchemikerin, Handelslabor Dr. Wiertz-Eggert-Dr. Jörissen GmbH, Hamburg