



FACULTEIT BIO-INGENIEURSWETENSCHAPPEN

Academiejaar 2007 – 2008

DNA-METHYLATIE, GENEXPRESSIE EN
TRANSGENERATIONELE EFFECTEN NA
BLOOTSTELLING VAN *DAPHNIA MAGNA* AAN
TOXISCHE STRESS

Dieter DE CONINCK

Promotor : Prof. dr. Colin Janssen
Wetenschappelijk begeleider: ir. Michiel Vandegheuchte

Scriptie voorgedragen tot het behalen van de graad van
BIO-INGENIEUR IN DE CEL- EN GENBIOTECHNOLOGIE

Woord vooraf

Meestal worden dankwoorden geschreven nadat voor de rest de laatste letter op papier is gezet (of zo doet men toch uitschijnen), maar laat ik eerlijk zijn: dat is bij mij niet het geval. Na een vrij ontnuchterende tussentijdse presentatie van mijn resultaten, moet ik mijn gedachten even tot rust laten komen bij een “gemakkelijkere” taak. Alhoewel, gemakkelijk... het is moeilijk om niemand te vergeten. Maar toch hoop ik dat ik daar nog vrij goed in geslaagd ben.

Laat ik beginnen met mijn dank te betuigen aan het adres van mijn promotor, Prof. Janssen. Het is een simpel feit dat er zonder zijn vertrouwen in mij nooit sprake zou zijn geweest van deze scriptie. Alhoewel de verwachtingen soms hoog waren, waardoor het vertrouwen in mezelf soms een beetje zoek was (zoals nu), zorgde dat meestal wel voor de juiste positieve stimulans om er toch weer tegenaan te gaan. Ongetwijfeld droegen uw realistische, scherpzinnige en recht-door-zee houding hiertoe bij. Dan weet je pas waar je aan toe bent en wat je kan verwachten.

Een tweede persoon zonder wie van deze scriptie niet veel in huis zou zijn gekomen is ongetwijfeld mijn begeleider en mentor Michiel geweest. Jouw enthousiasme blijft aanstekelijk, zelfs op momenten wanneer het weer eens niet ging zoals het zou moeten gaan. Door jouw uitleg begreep ik het dikwijls veel beter en voelde ik me steeds weer opnieuw gedreven om alles tot een goed einde te brengen. Ik zou hier nog wel even kunnen doorgaan maar ach wat, gewoon ongelooflijk bedankt voor die goede begeleiding die ik van jou heb gekregen!

En laat ik nog even wat langer “dichtbij huis” blijven: iedereen in het laboratorium was zo gewillig naar mijn vragen en problemen te luisteren en oplossingen te bieden. Ik wil hierbij vooral de laboranten extra bedanken. Emmy en Leen, zonder jullie hulp bij de kweek en testen zou dat op bepaalde ogenblikken een onmogelijke taak voor mij zijn geweest. Bedankt! Gisèle, zonder jou zouden mijn “beestjes” nooit zo’n goed eten gehad hebben en ook je praktische tips hebben ze ongetwijfeld van meer lijden bespaard. Ook Guido wil ik bedanken, alhoewel onze samenwerking slechts van korte duur was, heb ik in die paar weken toch enorm veel van je geleerd en veel respect voor je gekregen. Moge je pensioen je (nog steeds) wel bekomen. Ook mijn collega’s thesisstudenten wil ik zeker niet over het hoofd zien. Het feit dat ik bijna nooit alleen in het labo was, maakte het eens zo aangenaam.

Laat ik ook maar eens buiten de muren van het laboratorium gaan om een heleboel mensen te bedanken. De eerste persoon die daarbij in me opkomt is Annelies. Bedankt voor je begeleiding en advies bij de polyacrylamide gels en ook later, bij mijn moleculaire werk in jullie labo. Ook jullie advies, Tina en Bartel, werd erg op prijs gesteld. Alle andere doctoraatsstudenten van het labo Moleculaire Biotechnologie wil ik eveneens bedanken voor het mij wegwijs maken in allerlei praktische zaken. Uiteraard wil ik hier ook prof. Gheysen niet over het hoofd zien, want het is enkel dankzij u mogelijk geweest dat ik kon genieten van de expertise aldaar in het labo.

Van het ene labo rol ik nog maar even binnen in een ander: dat van de vakgroep Ecofysiologie, Biochemie en Toxicologie van de Universiteit Antwerpen, waar ik mijn arrays mocht maken en hybridiseren. Uiteraard, Tine, heel erg bedankt voor jou begeleiding hierbij. En ook hier is een woordje van dank aan prof. De Coen meer dan op zijn plaats. Bedankt dat ik mijn ding mocht doen in uw laboratorium. Het gaf me bovendien een beetje dat gevoel van “terug thuiskomen”.

Het werk dat niet op het labo verricht werd, werd uiteraard thuis en op kot voor rekening genomen. De steun die ik hier heb gekregen van kotgenoten is niet te onderschatten. In het bijzonder wil ik Sofie, Lotte, Tim en Els bedanken, die net als mij naarstig aan hun scriptie werkten en dus maar al te goed wisten wat een miserie dat soms kan zijn. Bedankt voor jullie steun, peptalk en vriendschap. Hopelijk houdt het na dit jaar niet op en zien we elkaar nog vaak terug als goede vrienden. Ook mijn directe buur Tom wil ik bedanken, al was het maar omdat hij mijn sporadisch gevloek verdroeg. Ook jou hoop ik nog in mijn leven als goede vriend te mogen tegenkomen.

Mijn dank gaat uiteraard ook uit naar mijn ouders, broers en familie. Zonder de steun van hen (ja, ook financieel) had ik deze studie nooit kunnen vervolledigen. Dank voor alle goede zorgen.

En *last but not least*, moet ik mijn lieve en geduldige vriendin Ellen bedanken voor haar steun, hulp bij het ingeven van sommige data en misschien nog het meest omdat ze al die jaren van mij is blijven houden, ondanks het feit dat dat niet altijd even gemakkelijk moet zijn geweest (ja, ik ben me er wel degelijk van bewust).

Ik hoop niet te veel mensen vergeten te zijn, maar moest dat toch zo zijn dan weten die personen wel dat deze welgemeende DANKJEWEL voor hen bedoeld is.

Dieter De Coninck, mei 2008, Gent

Inhoudsopgave

1. Inleiding.....	1
2. Literatuurstudie	3
2.1. DNA-methylatie.....	3
2.1.1. Inleiding	3
2.1.2. DNA-methyltransferasen	3
2.1.3. Variatie in DNA-methylatiepatronen	4
2.1.4. Overerving van methylatiepatronen.....	5
2.1.5. DNA-methylatie mechanismen	7
2.1.6. Gevolgen van DNA-methylatie	9
2.1.7. Invloed van milieu op DNA-methylatie.....	11
2.2. (Eco)toxicogenomics	14
2.2.1. Inleiding	14
2.2.2. Veronderstellingen in de toxicogenomics.....	15
2.2.3. Toepassingen van microarrays in de toxicogenomics.....	16
2.2.4. Ecotoxicogenomics.....	17
2.2.5. Genexpressie bij <i>Daphnia magna</i>	18
2.3. Metalen: zink.....	20
2.3.1. Inleiding	20
2.3.2. Speciatie en biobeschikbaarheid.....	20
2.3.3. Accumulatie	21
2.3.4. Subcellulaire verdeling	22
2.3.5. Acclimatisatie en adaptatie.....	24
2.3.6. Effecten van zink bij <i>Daphnia magna</i>	24
2.4. <i>Daphnia magna</i> Straus.....	26
2.4.1. Voorkomen	27
2.4.2. Morfologie, anatomie en fysiologie.....	27
2.4.3. Reproductie	29
2.4.4. <i>Daphnia magna</i> als testorganisme.....	30
3. Materiaal en methoden	32
3.1. DNA-methylatie.....	32
3.1.1. Amplification of intermethylated sites (AIMS).....	32
3.1.2. DNA-extractie	34
3.1.3. Restrictiedigestie met HpaI en MspI.....	34
3.1.4. Adaptorligatie.....	34
3.1.5. Purificatie	35
3.1.6. HOT-PCR	35
3.1.7. Polyacrylamide gelelektroforese (PAGE)	37

3.1.8.	Klonering.....	40
3.1.9.	Miniprep	41
3.1.10.	Gelextractie.....	41
3.1.11.	Genome Walking	41
3.1.12.	Sequencing	42
3.1.13.	Bisulfiet sequencing	42
3.2.	Kweek van <i>Daphnia magna</i> Straus	43
3.2.1.	Standaard kweekprocedure stamkloon	43
3.2.2.	Algenkweek	43
3.2.3.	Aanmaak media.....	43
3.2.4.	Experimentele kweek	45
3.3.	Meting van fysiologische eindpunten	48
3.3.1.	Mortaliteit en reproductie	48
3.3.2.	Lengte.....	49
3.3.3.	Drooggewicht.....	49
3.3.4.	Voedselopnamesnelheid	49
3.3.5.	Respiratie.....	50
3.3.6.	Bepaling inwendige zinkconcentratie (destructie)	51
3.4.	Genexpressie.....	52
3.4.1.	cDNA bibliotheken en extra genen	52
3.4.2.	Micro-array spotting	53
3.4.3.	RNA-extractie	53
3.4.4.	Amino allyl labeling van RNA	56
3.4.5.	Micro-array hybridisatie	59
3.4.6.	Scanning en data-analyse	61
3.4.7.	Variance Stabilization Normalization (VSN)	62
3.4.8.	Linear Models for Microarray Data (LIMMA)	65
3.5.	Statistiek	66
3.6.	Software.....	67
4.	Resultaten	68
4.1.	AIMS	68
4.1.1.	Optimalisatie	68
4.1.2.	Bandextractie en -sequencing.....	75
4.1.3.	Genome walking	76
4.1.4.	Verder onderzoek d.m.v. bisulfietsequencing	79
4.2.	Fysiologische parameters.....	80
4.2.1.	Overleving.....	80
4.2.2.	Reproductie	81
4.2.3.	Lengte.....	84
4.2.4.	Biomassa	85

4.2.5.	Zinkaccumulatie.....	89
4.2.6.	Filtratie.....	89
4.2.7.	Respiratie.....	90
4.3.	Genexpressie.....	93
4.3.1.	Voorafgaande analyse.....	93
4.3.2.	Expressie generatieblanco's.....	94
4.3.3.	Expressie in de zinkaquaria.....	95
4.3.4.	Expressie in de nakomelingenlijn [F1Zn - F2ZnBI - F3ZnBIBI].....	99
4.3.5.	Expressie in de nakomelingenlijn [F2Zn - F3ZnBI].....	102
4.3.6.	Expressie extra toegevoegde genen.....	105
5.	Discussie.....	107
5.1.	DNA-methylatie.....	107
5.2.	Fysiologische parameters.....	110
5.3.	Genexpressie.....	113
6.	Besluit.....	120
7.	Referenties.....	123
Bijlage 1		133
Bijlage 2		135
Bijlage 3		137
Bijlage 4		138
Bijlage 5		140
Bijlage 6		142

1. Inleiding

Meer dan 50 jaar is ondertussen verstreken sinds Watson en Crick hun revolutionaire publicatie over de driedimensionale structuur van het DNA op de wereld loslieten. Het inzicht dat het DNA codeert voor erfelijke eigenschappen is sindsdien algemeen aanvaard. Gaandeweg realiseren we ons echter dat een evolutie waarin genen centraal staan toch enige beperkingen heeft. Zonder epigenetische processen in cellen blijft genetische informatie levenloos, als een ingewikkelde partituur zonder musici of instrumenten om haar tot uitdrukking te brengen.

Het is pas sinds de jaren '90 dat er steeds meer en meer inzicht verkregen wordt in deze epigenetische processen, gaande van DNA-methylatie tot histonmodificaties. Vooral bij vertebraten wordt een steeds vollediger beeld verkregen over hoe deze processen de expressie van het DNA kunnen reguleren, alhoewel dat beeld nog steeds verre van volledig is. Hieruit weten we ook dat deze markeringen, alhoewel ze de DNA-streng zelf niet blijvend veranderen, gedurende meerdere generaties aan de nakomelingen doorgegeven kunnen worden en deze nakomelingen op deze manier nog steeds een deel van de gevolgen kunnen dragen van de leefomgeving van hun (voor)ouders. Want epigenetische processen kunnen het resultaat zijn van de wisselwerking tussen milieu en organisme.

Bij invertebraten is de kennis omtrent deze epigenetische processen echter heel wat minder uitgebreid en blijkt bovendien dat, op basis van de kennis die we toch al hebben, de effecten en de processen van epigenetica zoals ze zich voordoen in vertebraten niet zonder meer naar invertebraten geëxtrapoleerd kunnen worden.

In het onderzoek uitgevoerd voor deze scriptie werd het licht geworpen op één van die epigenetische processen, nl. DNA-methylatie, bij het invertebrate organisme *Daphnia magna*. Daar *D. magna* als modelorganisme wordt gebruikt in ecotoxicologische studies, kan het vormen van een beeld van de rol die DNA-methylatie speelt in dit organisme, belangrijke implicaties hebben op het identificeren van mogelijke werkingsmechanismen van bepaalde toxicanten. Indien blootstelling aan een chemische stof een epigenetisch effect in een organisme kan bewerkstelligen en dit effect overgeërfd wordt door toekomstige, niet-blootgestelde generaties, moet de manier waarop de risico-evaluatie van die stof gebeurt eveneens aan dit gegeven worden aangepast.

In deze studie werden organismen gedurende drie generaties blootgesteld aan een sublethale concentratie zink. Deze blootstelling werd verondersteld mogelijk epigenetische veranderingen te induceren, welke kunnen doorgegeven worden aan volgende generaties, zelfs na het wegvallen van de zinkstress.

Het onderzoek stelde zich in een eerste luik tot doel om een techniek voor detectie van DNA-methylatie bij humane kankercellen (Frigola *et al.*, 2002) aan te passen en te optimaliseren voor detectie van DNA-methylatie in het modelorganisme *D. magna*, om op deze manier voor het eerst een beeld te krijgen van de status van DNA-methylatie in dit organisme.

In een tweede luik werd nagegaan of de impact van transgenerationele epigenetische processen onrechtstreeks kon waargenomen worden op organismaal, fysiologisch niveau en op het niveau van wijzigingen in genexpressie. Een transgenerationeel epigenetisch effect van zinkstress zou zich vertalen in een blijvende wijziging van genexpressie of van organismale eigenschappen, ook bij generaties die niet meer blootgesteld zijn aan zink.

2. Literatuurstudie

2.1. DNA-methylatie

2.1.1. Inleiding

Het karakter van een cel wordt bepaald door zijn samenstellende proteïnen, dewelke het resultaat zijn van specifieke genexpressiepatronen. Cruciale determinanten in deze genexpressiepatronen zijn ongetwijfeld DNA-bindende transcriptiefactoren die genen kunnen activeren of onderdrukken door te binden met specifieke DNA-basen in de promotorregio's. Echter, de vele gekende transcriptiefactoren in de cel alleen bieden geen afdoende verklaring voor het genexpressiespectrum. Immers kan het transcriptionele potentieel van een genoom op een stabiele manier beperkt worden gedurende de ontwikkeling. Een model dat alleen transcriptiefactoren toelaat, zou voorspellen dat het expressiepatroon van een gedifferentieerde kern wijzigt na blootstelling van deze kern aan een nieuw spectrum van factoren. Sommige differentiatiekenmerken zijn echter zo stabiel dat immersie in een vreemd cytoplasma hun "geheugen" niet kan uitwissen (Gurdon, 1999)

Een eerste mogelijke verklaring zou gezocht kunnen worden in het voorkomen van mutaties in de DNA-code, maar in de meeste gevallen echter is de genomische sequentie van gedifferentieerde cellen dezelfde dan deze van de zygote waaruit ze afkomstig waren. Een tweede verklaring kan gevonden in minder onomkeerbare reacties die men onder noemer "epigenetica" plaatst. De huidige definitie die aan deze term gegeven wordt luidt: "De studie van meiotisch en/of mitotisch overerfbare veranderingen in genexpressie die niet veroorzaakt kunnen worden door verandering in de DNA-code zelf" (Russo *et al.*, 1996). Er zijn tot hertoe twee epigenetische mechanismen die dierlijke ontwikkeling beïnvloeden en die voldoen aan de definitie van overerfbaarheid, namelijk DNA-methylatie en de Polycomb-trithorax Group proteïnecomplexen. Histonmodificaties hebben ook eigenschappen van een epigenetisch proces, maar tot hertoe is nog onvoldoende geweten of ze ook overerfbaar zijn. DNA-methylatie is één van de best bestudeerde epigenetische modificaties in unicellulaire en multicellulaire organismen. Het brengt een grote epigenetische verandering van de DNA-structuur teweeg en reguleert cruciale aspecten van diens functie (Reik *et al.*, 2001).

In wat volgt, wordt enkel dieper ingegaan op DNA-methylatie, daar dit het meest relevante is voor deze thesis. Daarbij zullen invertebraten steeds in het achterhoofd gehouden worden.

Voor een meer algemene beschrijving van epigenetica verwijs ik graag naar het eerder geschreven project "Epigenetica - dirigent van het DNA" (De Coninck *et al.*, 2007).

2.1.2. DNA-methyltransferasen

Methylatie gebeurt hoofdzakelijk op cytosine in het symmetrische CpG-dinucleotiden verband. Bij zoogdieren zijn ongeveer 80% van de CpG dinucleotiden en ongeveer 5% van het totaal aantal cytosines gemethyleerd. Het voorkomen van de CpG dinucleotiden is vijf keer minder dan verwacht op

basis van de frequenties van cytosine en guanine. Zowel het bewerkstelligen als het onderhouden van deze methylatie zijn nodig voor een normale ontwikkeling van het organisme (Wilkins, 2005).

DNA-(de)methylatie wordt gekataliseerd door een aantal methyltransferasen die twee verschillende activiteiten vervullen: men onderscheidt methyltransferasen met *de novo* activiteit (DNMT3a en b), die specifiek ongemethyleerde CpG's methyleren en methyltransferasen met *maintenance* activiteit (DNMT1), die hemi-gemethyleerde CpG's methyleren na de replicatie. Het substraat voor deze methyltransferasen is S-adenosyl-L-methionine (SAM).

2.1.3. Variatie in DNA-methylatiepatronen

In eerste instantie zijn methylatieniveau's en patronen dikwijls verschillend in verschillende diersoorten. Het ene uiterste wordt gevormd door het genoom van de nematode *Caenorhabditis elegans* dat geen detecteerbare DNA-methylatie heeft en niet codeert voor een conventioneel methyltransferase. Van een andere ongewervelde, het fruitvliegje *Drosophila melanogaster*, heeft men lange tijd gedacht dat er geen methylatie op het genoom voorkwam. Nu weten we echter dat hun genoom een *DNA-methyltransferase-like* gen en een zeer laag methylatieniveau bevat. Hierbij komt dat de methylatie meestal gevonden wordt op het dinucleotide CpT, eerder dan op CpG, welke normaal de belangrijkste doelsequentie voor methylatie in dieren is. De meeste andere genomen van ongewervelden hebben matig hoge CpG-methylatieniveaus, dikwijls geconcentreerd in grote domeinen die van elkaar gescheiden worden door domeinen met ongemethyleerd DNA (mozaïekmethylatie). Het tegenovergestelde uiterste van *C. elegans* zijn de genomen van de gewervelde dieren, die de hoogste methylatieniveaus in het dierenrijk hebben en waarbij de methylatie verspreid is over bijna het hele genoom (globale methylatie). Deze verschillende methylatiedistributies suggereren dat DNA-methylatie verschillende functies kan hebben (Bird, 2002).

Daarnaast is er ook een variatie van de methylatiepatronen in tijd en ruimte terug te vinden. Methylatiepatronen blijven niet constant gedurende de hele ontwikkeling. Meest algemeen wordt waargenomen dat de hoeveelheid methylatie in de vroegste ontwikkelingsstadia van een dier afnemen, om daarna door werking van *de novo* methylatie terug toe te nemen tot het eerdere niveau. Niet bij alle dieren is deze shift even groot: bij de muis is er bijvoorbeeld een terugval tot 30% van het "normale" niveau, terwijl bij de kikker slechts een veel beperktere terugval te merken is (Stancheva & Meehan, 2000). Uiteraard zijn er ook uitzonderingen op de regel, zoals bijvoorbeeld de zebravis waar helemaal geen terugval waargenomen wordt (Macleod *et al.*, 1999).

Bij vertebraten is daarenboven ook het verschijnsel van de zogenaamde CpG-eilanden waargenomen. Dit zijn ongemethyleerde CG-rijke regio's in het genoom die relatief hoge CpG dichtheden bezitten en voorkomen aan het 5' einde van vele genen. Het overgrote deel van deze CpG-eilanden blijft ongemethyleerd gedurende de hele ontwikkeling. Omdat veel CpG-eilanden gelokaliseerd zijn in genen waarvan de expressie gereguleerd wordt door weefsel-specifieke transcriptiefactoren, kunnen ze toch methylatie-vrij blijven, zelfs wanneer hun geassocieerde gen *gesilenced* is. Een voorbeeld hiervan is het humane alpha-globine gen dat CpG-eilanden bevat die in ongemethyleerd blijven,

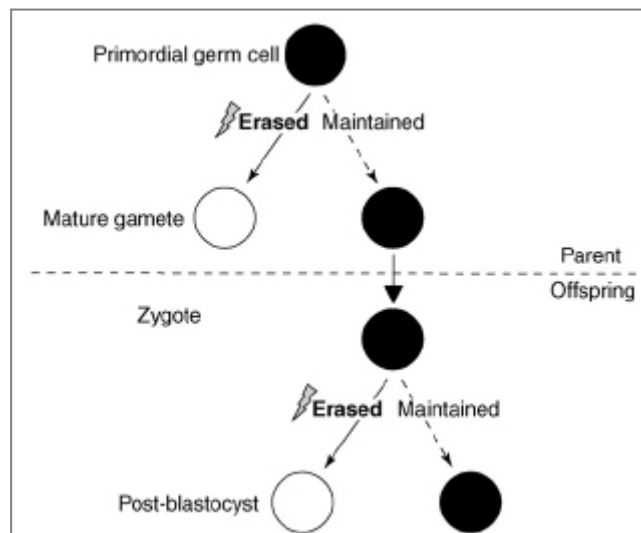
ongeacht zijn expressie (Bird *et al.*, 1987). Een klein, maar significant deel van de CpG-eilanden echter wordt wel gemethyleerd gedurende de ontwikkeling. Wanneer dit gebeurt leidt het tot een stabiele *silencing* van de geassocieerde promotor. Voorbeelden waarbij dit gebeurt, zijn genomische imprinting en X-chromosoom inactivatie. Hierbij dient opgemerkt te worden dat het voorkomen van CpG-eilanden bij invertebraten niet gekend is.

De novo methylatie komt vooral voor in kiemcellen of gedurende de vroege embryonale stadia, wat suggereert dat *de novo* methyltransferasen voornamelijk actief zijn gedurende deze stadia (Jeanisch *et al.*, 1982). Er is echter ook bewijs gevonden dat *de novo* methylatie kan optreden in adulte somatische cellen. Een significant deel van alle (humane) CpG-eilanden zijn vatbaar voor progressieve methylatie in bepaalde weefsels gedurende veroudering (Issa, 2000) of in abnormale cellen, zoals kankercellen (Baylin & Herman, 2000). De accumulatiesnelheid van CpG-methylatie in deze somatische cellen gebeurt wel erg traag.

Hoe komt het dat in de ontwikkeling zowel gemethyleerde als ongemethyleerde patronen voorkomen en hoe worden ze “onderhouden”? Hoe komt het dat CpG-eilanden meestal (maar niet altijd) ongemethyleerd zijn? Wat veroorzaakt de methylatie van de andere CpG dinucleotiden? Op al deze vragen is er vandaag nog geen éénduidig antwoord, maar er zijn wel verschillende hypothesen waarnaar experimenteel onderzoek werd en wordt verricht.

2.1.4. Overerving van methylatiepatronen

Het meest simpele principe dat het behoud van methylatiepatronen over verschillende generaties kan beschrijven, steunt op het zogenaamde semi-conservatieve kopiëren van het methylatiepatroon op de ouderstreng naar de nieuw gevormde DNA-streng in het nageslacht (Riggs, 1975). Het *maintenance* methyltransferase DNMT1 heeft een katalytische voorkeur voor hemigemethyleerde substraten en zal dan ook die CpG dinucleotiden methyleren waar de complementaire CpG dinucleotiden op de ouderstreng al gemethyleerd zijn (figuur 2.1.). Dit mechanisme is een postreplicatieve enzymatische verandering. Het herstel van het methylatiepatroon treedt op na de DNA-replicatie. De idee dat DNA methylatiepatronen gedurende de vroege ontwikkeling gevormd worden door *de novo* methylatie en dan in de somatische cellen gekopieerd worden door *maintenance* methylatie is aantrekkelijk in zijn eenvoud, maar kan de persistentie van methylatiepatronen gedurende de celproliferatie niet volledig verklaren.



Figuur 2.1. Een model dat aangeeft hoe een epigenetisch kenmerk transgeneratieel overgedragen kan worden. De bovenste zwarte cirkel stelt een hypothetische epigenetische markering voor. De bliksemschicht duidt aan dat de meeste epigenetische markeringen gewist zullen worden gedurende de gametogenese, waardoor de mature gameet het kenmerk niet meer heeft (witte cirkel). Soms kunnen deze epigenetische markeringen hieraan echter ontsnappen en zo doorgegeven worden aan het nageslacht (zwarte cirkel derde rij). Wanneer bij de zygote gedurende de tijd van het blastocyststadium weer een gehele genoomherprogramering gebeurt (tweede bliksemschicht), kunnen overgeërfde kenmerken van de ouders naar de zygote weer gewist worden (witte cirkel vierde rij). Markeringen die deze herprogramering wel overleven kunnen dan overgeërfd worden door het nageslacht en eventuele fenotypische kenmerken beïnvloeden. Waarschijnlijk komt het wissen van epigenetische kenmerken meer voor dan het behouden van de kenmerken. (Bron: Rakyen en Beck, 2006)

Bij de eerste experimenten met artificieel gemethyleerd DNA werd waargenomen dat het proces van *maintenance* methylatie maar een beperkte betrouwbaarheid heeft: per celdeling faalde het met een frequentie van ongeveer 5% per CpG dinucleotide (Wigler *et al.*, 1981). Foutenmarges van deze grootte betekenen dat een gedetailleerd methylatiepatroon na verloop van vele celproliferaties redelijk wat van haar "details" kwijt kan zijn. Bovendien faalt het DNA methyltransferase niet alleen in het onderhouden van hemigemethyleerde CpG dinucleotiden, maar wordt ook een significante *de novo* methylatie op ongemethyleerde CpG dinucleotiden waargenomen.

Op het eerste zicht lijken deze bevindingen het concept van *maintenance* methylatie te ondermijnen, maar dit is niet noodzakelijk zo: alhoewel het methylatiepatroon niet altijd even goed bewaard blijft op het niveau van de CpG dinucleotiden, blijft de globale methylatiestatus van het genoom wel behouden (Pfeifer *et al.*, 1990). De gemethyleerde of ongemethyleerde status van CpG-eilanden bijvoorbeeld wordt zeer stabiel doorgegeven naar volgende generaties. DNMT1 is gedeeltelijk verantwoordelijk voor deze stabiliteit, maar daarnaast zou er ook nog een ander, ongekend *maintenance* mechanisme optreden. Deze veronderstelling komt voort uit de bevinding dat de methylatiestatus van CpG-eilanden zelfs in afwezigheid van DNMT1 goed behouden blijft (Rhee *et al.*, 2000).

Een ander aantrekkelijk alternatief om het falen van *maintenance* methylatie en het plotse voorkomen van *de novo* methylatie te verklaren is dat de kenmerken van een DNA domein dat zijn *maintenance* methylatie helpt te bewerkstelligen dezelfde zijn als de kenmerken die *de novo* methylatie induceren.

Alhoewel volgens Rakyan en Beck (2006) nog geen onomstotelijk bewijs is geleverd voor overerving van het epigenoom, duiden ze er wel op dat verschillende onderzoeken in die richting wijzen. Een van die onderzoeken omvatte testen bij *Drosophila* op een endogeen allel. De activiteit van het *heat-shock* proteïne Hsp90 werd verminderd door toevoeging van de Hsp90-inhibitor geldanamycine. Hierdoor kwamen een aantal abnormale overerfbare oogfenotypes tot uiting. De penetrantie van de fenotypen kon in de afwezigheid van de inhibitor, bij positieve selectie, tot 13 generaties bedragen (Chong & Whitelaw, 2004). Anway *et al.* (2005) stelden zwangere ratten bloot aan de hormoonverstorende stof vinclozolin en stelden een verminderde fertiliteit bij de mannetjes vast. Deze verminderde fertiliteit kwam o.a. voort uit defecten en een verminderde mobiliteit van de spermacellen en werd gedurende vier opeenvolgende generaties vastgesteld. De vrouwelijke nakomelingen waren volledig normaal.

De vraag die bij dit alles gesteld kan worden is hoeveel generaties er dienen te passeren voordat men kan spreken van een transgeneratie epigenetisch kenmerk. Skinner (2008) argumenteert dat blootstelling van een zwanger wijfje (F0 generatie) aan eender welke vorm van stress resulteert in een F1 embryo en een F2 kiemlijn die ook direct blootgesteld waren en dat in dat geval dus de F3 generatie de eerste generatie is die niet rechtstreeks aan de stressor blootgesteld was. Blootstelling van een neonataal of adult (F0 generatie) resulteert enkel in een F1 kiemlijn die rechtstreeks blootgesteld was, zodat in dit geval al vanaf F2 gesproken kan worden over transgeneratie overerving.

2.1.5. DNA-methylatie mechanismen

2.1.5.1. Aselecte de novo methylatie

De *de novo* methyltransferasen DNMT3A en DNMT3B komen tot hoge expressieniveaus in vroege embryonale cellen. Het is dan ook in dit stadium van de ontwikkeling dat de meeste *de novo* methylatie plaatsgrijpt. Maar wat bepaalt welke regio's gemethyleerd dienen te worden en welke niet? Een eerste (extreme) mogelijkheid gaat ervan uit dat de initiële *de novo* methylatie aselect gebeurt. Er is immers geen bewijs dat niet alle CpG dinucleotiden potentieel gemethyleerd zouden kunnen worden. Zelfs CpG-eilanden, waarvan de meeste ongemethyleerd blijven gedurende de hele ontwikkeling, kunnen onder bijzondere ontwikkelingsomstandigheden of in abnormale cellen gemethyleerd worden. Toch is het echter duidelijk dat niet alle regio's van het genoom even toegankelijk zijn voor DNA-methyltransferasen. DNMT3B, bijvoorbeeld, zou aangepast kunnen zijn om regio's in inactief chromatine te methyleren (Bird, 2002).

Daarnaast is er ook bewijs voor de noodzakelijkheid van accessorische factoren bij DNA-methylatie: muizen met mutaties in de *Ish2* genen, welke coderen voor de enzymen gerelateerd aan het chromatine remodelling enzyme SNF2, vertoonden significante effecten op de DNA-methylatie. Hieruit zou kunnen besloten worden dat een efficiënte DNA-methylatie gepaard dient te gaan met perturbaties in de chromatinestructuur zodat deze toegankelijk wordt voor methyltransferasen (Bird, 2002).

2.1.5.2. DNA methylatie centra

Een tweede hypothese stelt dat de DNA methylatie machinerie preferentieel aangetrokken zou kunnen worden tot bepaalde DNA sequenties, de DNA methylatie centra. Methylatie van DNA buiten deze centra, zoals bijvoorbeeld voorkomt bij vertebraten, kan veroorzaakt worden door methylatiespreading. Het voorkomen van CpG eilanden bij vertebraten en een mozaïek methylatiepatroon bij invertebraten kan dan verklaard worden door bepaalde methylatiebarrières, alhoewel totnogtoe niet geweten is welke deze barrières zouden kunnen zijn (Turker, 1999).

Een hypothetisch DNA methylatie centrum zou kunnen bestaan uit repetitieve stukken DNA. Het duidelijkste voorbeeld van een DNA methylatie centrum werd gevonden in de schimmel *Neurospora*, waar aangetoond werd dat korte TpA-rijke DNA-segmenten DNA-methylatie stimuleerden (Miao *et al.*, 2000).

2.1.5.3. Ongewone DNA-structuren en RNAi als trigger voor methylatie

In vitro studie van opgezuiverd DNMT1 toonde aan dat het enzym een voorkeur heeft om ongewone DNA-structuren te methyleren (Laayoun & Smith, 1995). Dit leidde tot de idee dat zulke structuren misschien gevormd werden tijdens recombinatie tussen repetitieve stukken DNA of gedurende transpositiegebeurtenissen en dat deze DNA methylatie direct zouden kunnen triggeren (Bestor & Tycko, 1996). Echter, bewijs hiervoor *in vivo* is nog niet gevonden.

In planten zorgt dubbelstrengig RNA voor de gerichte afbraak van transcripten die dezelfde sequentie als dit dubbelstrengige RNA bevatten (posttranscriptionele *silencing*). Er is echter bewijs dat deze dubbelstrengige RNA sequenties ook *de novo* methylatie van homologe genomische DNA-sequenties kunnen veroorzaken (Matzke *et al.*, 2001). Echter deze DNA methylatie is niet essentieel om tot een doeltreffende posttranscriptionele *silencing* te komen.

2.1.5.4. Interactie met histonmodificaties

Sommige studies wijzen erop dat DNA-methylatie slechts een secundaire modificatie is en dat enkel genen die *gesilenced* zijn door andere mechanismen onderworpen kunnen worden aan CpG-methylatie. Deze hypothese wint meer en meer aan belang en gaat ervan uit dat DNA methylatie dient om de inactivatie van genen door andere *silencing* mechanismen te verstevigen. Deze andere *silencing* mechanismen omvatten vooral histonmodificaties. Histonen reguleren de toegankelijkheid van het DNA voor transcriptie, methylatie, recombinatie, replicatie en herstel, wat een essentiële rol speelt in de genregulatie bij eukaryoten. Hierbij worden ze gestuurd door verschillende processen en modificaties. De positionering en de modificatie van de histonen, evenals methylatie van het DNA vormt een epigenetisch geheugen of epigenoom.

Fuks beschreef in 2005 een algemeen aanvaard model: methylatie op K9 van histon H3 door een H3K9-enzyme vormt een bindingsplaats voor een adaptorproteïne dat op zijn beurt DNA-

methyltransferasen aantrekt. Deze DNA-methyltransferasen katalyseren CpG-methylatie in het gebied van het gemethyleerde lysine. Methyl-CpG-bindingsdomeinen binden dan aan het gemethyleerde DNA, waardoor ze HDAC-complexen en bijkomende H3K9-methyltransferasen aantrekken. H3 wordt hierdoor verder gemethyleerd en gedeacetyleerd. Beide processen zorgen voor een versterking van het *silencings* signaal.

Bovenstaande hypothese is erg aantrekkelijk omdat ze impliceert dat DNA-methylatie, histondeacetylatie en histonmethylatie samenwerken in een zelfversterkende epigenetische cyclus die de gecondenseerde status van het chromatine onderhoudt en bestendigt. Zo een cyclus zou belangrijk kunnen zijn in situaties waarin genen permanent *gesilenced* moeten worden, wat bijvoorbeeld het geval is bij parentale *imprinting*, X-chromosoom inactivatie en hypergemethyleerde oncogenen.

Het is duidelijk dat verdere studies nodig zijn om de cascade die leidt tot epigenetische *silencing* op te helderen. Er wordt meer en meer gesuggereerd dat DNA-methylatie ook zou interageren met andere histonmodificaties (H3K27- of H4K20-methylatie) (Fuks, 2005).

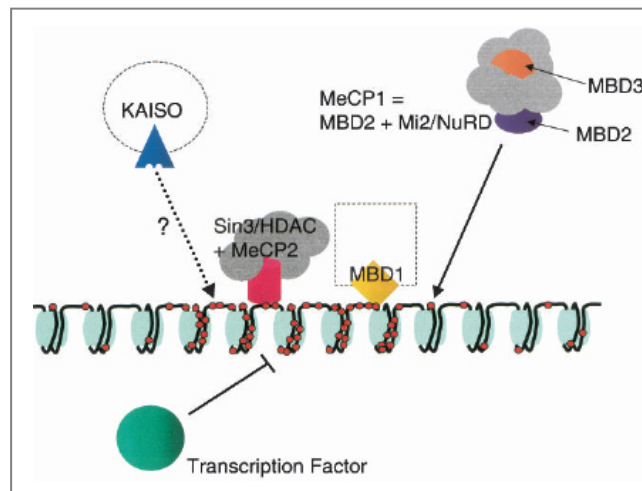
Alhoewel bij sommige invertebraten, zoals bij *Drosophila melanogaster*, wel histonmodificaties beschreven zijn (Spada *et al.*, 2005) is er tot op heden bij invertebraten nog geen interactie beschreven tussen deze modificaties en DNA-methylatie zoals hierboven beschreven door Fuks (2005).

2.1.6. Gevolgen van DNA-methylatie

Bij vertebraten heeft DNA-methylatie steeds *silencing* van genen tot gevolg of stabiliseert het, in de lijn van de hypothese dat methylatie slechts een secundaire modificatie is, gen *silencing*. Transcriptie kan op drie manieren door DNA-methylatie onderdrukt worden (figuur 2.2.), die waarschijnlijk alle drie biologisch relevant zijn (Bird, 2002).

- DNA-methylatie interfereert direct met de binding van proteïnen (bijvoorbeeld transcriptiefactoren) op hun DNA sequentie. Op die manier wordt ook de transcriptie rechtstreeks voorkomen.
- Een tweede, meer voorkomende, manier is tegenovergesteld aan de eerste: het beschrijft proteïnen die tot de gemethyleerde sequenties aangetrokken worden. Een familie van vijf methyl-CpG-bindingsproteïnen die elk een regio bevatten die nauw verwant is met het methyl-CpGbinding domein (MBD) van MeCP2. Van vier van deze proteïnen, namelijk MBD1, MBD2, MBD3 en MeCP2 is aangetoond dat ze betrokken zijn bij repressie van DNA transcriptie. Van een niet-gerelateerd proteïne Kaiso is eveneens aangetoond dat het gemethyleerd DNA bindt en zo in competitie treedt met andere proteïnen, zoals transcriptiefactoren, voor bindingsplaatsen. Van Kaiso en MBD1 is niet geweten of ze voorkomen in invertebraten.

- Het laatste model tenslotte is misschien nog wel het belangrijkste en volgt uit het tweede: het MeCP2 complex bindt histonendeacetylasen die deacetylatis van nabije histonen veroorzaken. Dit leidt tot chromatinecondensatie en onderdrukking van de genexpressie.



Figuur 2.2. Mechanismen van transcriptionele repressie door DNA-methylatie. Op de streng nucleosomaal DNA zijn de gemethyleerde CpG dinucleotiden aangeduid als rode cirkels. De transcriptiefactor onderaan is niet meer in staat met het DNA te binden doordat het zijn interactieplaats door de methylatie niet meer herkent. Boven de streng worden een aantal proteïnecomplexen die door de DNA-methylatie aangetrokken kunnen worden, weergegeven. Deze complexen zijn bijvoorbeeld het MeCP2 complex dat tevens het Sin3A histon deacetylase complex bevat, het MeCP1 complex, samengesteld uit de subeenheden MBD2 en het NuRD corepressor complex en tenslotte het ongekaracteriseerde MBD1 en de KAISO complexen. MeCP2 en MBD1 zijn chromosoom bindende complexen. MeCP1 kan minder hard gebonden zijn en van de KAISO complexen is *in vivo* nog niet aangetoond dat ze met gemethyleerde cytosines binden (bron: Bird, 2002).

De uniforme functies van DNA-methylatie zoals hierboven beschreven zijn vooral afgeleid uit studies met planten en zoogdieren. Bij invertebraten kan DNA-methylatie andere functies hebben en vermoedt men dat DNA-methylatie in ieder taxa een verschillende rol kan vervullen.

Bij *Drosophila melanogaster* bijvoorbeeld vindt men slechts zeer lage niveau's van DNA-methylatie terug in het genoom van embryo's (0,4% van de totale cytosineresidu's) en geen methylatie in het genoom van adulten. Lyko *et al.* (2000) suggereerden dat deze methylatie enkel een rol speelt in de ontwikkeling van het vliegenembryo. De waargenomen DNA-methylatie kan in de embryo's mogelijk een rol spelen in de regulatie van transposons (Field *et al.*, 2004).

In de homopteren *Myzus persicae* en *Planococcus citri* is aangetoond dat gemethyleerde genen wel actief afgeschreven worden (Field, 2000; Bongiorno *et al.*, 1999). Bij *Myzus* speelt DNA-methylatie voornamelijk een rol in de transcriptie van de E4-genen, welke coderen voor esterasen. Hypomethylatie van deze genen heeft een verminderde transcriptie tot gevolg. Mogelijke verklaring voor deze positieve rol van methylatie in transcriptie is dat door methylatie in de coderende regio's de vertaling van incorrecte transcripten vermeden kan worden (Field, 2000). Alleszins heeft DNA-methylatie in *Myzus* een genregulerende rol (Simmen *et al.*, 1999).

In *Planococcus* werd eveneens vastgesteld dat hypomethylatie over het algemeen leidde tot verminderde transcriptie van genen. Daarenboven blijkt DNA-methylatie er een rol te spelen in genomische *imprinting* (Bongiorno *et al.*, 1999).

In de mot *Mamestra brassicae* werden zeer hoge methylatieniveaus teruggevonden (tot 10% van alle cytosines). De rol van methylatie is hier echter nog niet volledig duidelijk. Wel is vastgesteld dat transposons sterk gemethyleerd zijn, wat kan wijzen op een mogelijk verdedigingsmechanisme tegen transpositie. In dit geval zou methylatie dus een rol kunnen spelen in genomische stabiliteit (Field *et al.*, 2004).

In het sociale insect *Apis mellifera* werden eveneens lagere methylatieniveaus teruggevonden dan bij vertebraten het geval is. Bovendien lijkt methylatie ook hier eerder aan activerende rol te spelen daar in dit bijengenoem geen methylatie terug te vinden is op o.a. transposons (Wang *et al.*, 2006). Een derde, en misschien wel de meest interessante ontdekking was het bezit van twee paralogen die instaan voor methylatie *maintenance*. Tot hiertoe is de honingbij daarmee het enige levende wezen waarin meerdere somatische DNMT1 proteïnen teruggevonden werden. Een vierde verschil met vertebraten was te vinden in het feit dat bij *Apis* de methylatie voorkomt in de coderende stukken van de genen en niet in de promotorregio's zoals doorgans bij vertebraten het geval is (Wang *et al.*, 2006).

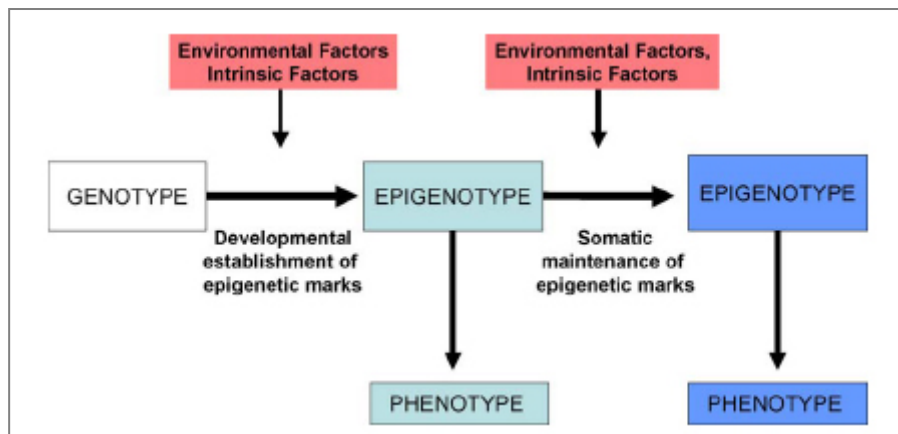
Bij toevallige deaminatie van gemethyleerd cytosine treedt een puntmutatie op, waarbij de base thymine ontstaat. Bij deaminatie van ongemethyleerd cytosine, zal het gevormde uracil herkend en verwijderd worden door *DNA repair* enzymen. Thymine ontstaan uit de deaminatie van m5C wordt echter niet efficiënt verwijderd en kan mutageen zijn. Het veroorzaakt namelijk een G/T *mismatch*. Bij genomen met een hoog gehalte aan m5C kan een groot deel van de CpG dinucleotiden op deze manier verloren gaan.

2.1.7. Invloed van milieu op DNA-methylatie

Alhoewel de relatie tussen het milieu en DNA-methylatie (epigenetica in het algemeen) nog grotendeels onbekend terrein is, zijn er toch verschillende recente studies die duiden op het feit dat milieufactoren en dieet de manier waarop genen gecontroleerd worden door DNA-methylatie en covalente histonmodificaties beïnvloeden. Het epigenotype vormt dan ook één van de dynamische links tussen genotype en fenotype (figuur 2.3.). De primaire epigenetische code wordt gevormd gedurende de foetale ontwikkeling en is afhankelijk van intrinsieke factoren (vb. SAM) en de omgeving in de uterus. Daarna kunnen diverse milieu-invloeden aanleiding geven tot het behouden of veranderen van het epigenotype. Epigenetica kan op die manier er voor zorgen dat identieke genotypes leiden tot verschillende fenotypes (Feil, 2006).

Er is aangetoond dat blootstelling van organismen aan een veranderend milieu verschillende transgenerationale ziektebeelden kan voortbrengen (Anway & Skinner, 2006). Over het algemeen is een blootstelling in het embryonale of vroeg postnatale stadium vereist opdat deze transgenerationale fenotypen tot uiting kunnen komen. De reproduceerbaarheid en frequentie van deze ongewone fenotypen suggereren dat ze waarschijnlijk epigenetisch gereguleerd zijn en niet het resultaat zijn van mutaties op het niveau van het DNA. Het directe verband tussen deze afwijkende, epigenetisch

gereguleerde, fenotypen en de veranderde milieumomstandigheden dient evenwel nog aangetoond te worden (Skinner, 2007).



Figuur 2.3. Schematische voorstelling van hoe milieueffecten en intrinsieke factoren aanleiding geven tot het ontstaan en de evolutie van het epigenotype bij een individu. Het primaire epigenotype (lichtblauw) wordt tijdens de foetale ontwikkeling gevormd en kan door boven-vermelde invloeden behouden blijven of veranderen tot een nieuw epigenotype (donkerblauw). (Bron: Feil, 2006)

Studies naar invloed van milieufactoren op de epigenetische status van een organisme kunnen onderverdeeld worden in drie categorieën: de epigenetische drift die optreedt tijdens het verouderingsproces, de invloed van nutriënten en de invloed van toxische componenten (in de meest ruime zijn). In wat volgt zal enkel op deze twee laatste groepen verder ingegaan worden. Het dient ook opgemerkt te worden dat de meeste studies betrekking hebben op vertebraten en dat het nog maar slechts recentelijk is dat ook invertebraten in het plaatje betrokken worden.

De verschillende fenotypes in de Agouti en Axin-fused muizeninteltijnen worden veroorzaakt door DNA-methylatie op zogenaamde epi-allelen. In viable yellow agouti muizen werd de invloed van het dieet op de status van dit allel nagegaan. Bij muizen die een dieet kregen aangereikt met foliumzuur, vitamine B12, choline en betaine werd een shift in het fenotype aangetoond door toenemende DNA-methylatie op het A^{vy} -locus. Bovendien kon het effect nog waargenomen worden in de volgende generaties welke op een onaangereikt dieet gevoed werden (Waterland *et al.*, 2003).

Naast dit voorbeeld zijn er nog vele gelijkaardige studies uitgevoerd (Feil, 2006). De effecten op DNA-methylatie zijn daarin meestal te wijten aan interactie van bepaalde componenten uit het dieet met de biosynthese van verschillende enzymen die instaan voor DNA-methylatie. Veelal komt een positieve of inhiberende interactie met S-adenosylmethionine, het substraat voor de DNA-methyltransferases, voor (Oommen *et al.*, 2005).

De invloed van toxische componenten op het epigenotype is een tweede grote uitdaging. Gezien het feit dat toxische componenten dikwijls aanleiding geven tot pleiotrope effecten, is het moeilijk om te oordelen of de consequenties voor het organisme veroorzaakt worden door epigenetische wijzigingen of door genetische (mutaties).

Verschillende recente studies met hormoonverstorende stoffen en oestrogeenagonisten gebruikt in de landbouw suggereren lange termijn effecten veroorzaakt door afwijkende epigenetische patronen. Doordat zulk een afwijkend epigenotype en bijhorend afwijkend fenotype dikwijls gedurende meerdere generaties doorgegeven kan worden, stijgt in de (eco)toxicologie de interesse om deze epigenetische veranderingen te gebruiken als biomerkers voor blootstelling aan bepaalde toxische stoffen. Echter in het licht van vorige opmerking kan de vraag gesteld worden of wel tot zinvolle biomerkers kan gekomen worden (Feil, 2006). En, alhoewel er nog veel op te lossen vragen zijn, halen de eerder genoemde studies mogelijke oplossingen aan voor hoe epigenetische modificaties gebruikt kunnen worden als biomarker (Kaiser, 2005; Ruden *et al.*, 2005). In de toxicologie is het eveneens belangrijk om de rol van epigenetica in het veroorzaken van een afwijkend fenotype op het moleculaire niveau te begrijpen om op basis hiervan te kunnen komen tot de ontwikkeling van therapieën.

De twee toxische componenten die in recente studies de meeste aandacht kregen, zijn vinclozolin, een antifungaal middel, en het gerelateerde methoxychlor, een oestrogeen mengsel dat gebruikt wordt als pesticide. Eén van de toonaangevende studies daaromtrent is de eerder aangehaalde studie van Anway *et al.* (2005) waar zwangere ratten blootgesteld werden aan vinclozolin tijdens de periode waarin seksdeterminatie plaatsvond. Alhoewel de vrouwtjes in het nageslacht volkomen normaal waren, bleken de mannelijke nakomelingen een gereduceerd aantal en minder beweeglijke spermacellen te bezitten. Dit resulteerde in een globale verminderde fertiliteit van de mannelijke nakomelingen. Bovendien werd deze verminderde fertiliteit gedurende vier generaties in meer dan 90% van de nakomelingen via de mannelijke lijn doorgegeven. Door het uitvoeren van een DNA methylatie assay konden verschillende genen vastgesteld worden met een alternerend methylatiepatroon dat een hoge correlatie vertoonde met de overerfbare effecten op de reproductie.

Door deze vaststellingen en het gebruik van deze stoffen in de landbouw, werd het effect van deze stoffen op niet doelorganismen vanuit een ecotoxicologisch standpunt in vraag gesteld. Soetaert *et al.* (2006; 2007a) testten het effect van het pesticide propiconazole en het anti-ecdysteroïde fungicide fenarimol bij *Daphnia magna* door gebruik te maken van een microarray ontworpen op basis van *Expressed Sequence Tags* (ESTs) (zie 2.2.5.).

In een multigeneratie test stelden Campiche *et al.* (2007) de springstaart *Folmosia candida* bloot aan vier verschillende insect groeiregulatoren (methoprene, fenoxycarb, teflubenzuron en precocene II). Hierbij hanteerden ze twee verschillende experimentele *set-ups*: in een eerste *set-up* werd de ouderlijke generatie (F0) gedurende 28 dagen blootgesteld. Juvenielen van de F1 generatie werden gedurende nogmaals 28 dagen overgeplaatst op een niet gecontamineerde bodem om een tweede generatie (F2) te maken. In de tweede *set-up* werd de ouderlijke generatie (F0) slechts gedurende 10 dagen blootgesteld, waarna ze op een niet gecontamineerde bodem werden overgeplaatst om de volgende generatie te maken. Het verschil tussen deze twee *set-ups* is dat de juvenielen die de eerste generatie (F1) uitmaken in het eerste geval nog ongeveer gedurende 10 dagen aan de gecontamineerde bodem blootgesteld waren alvorens overgeplaatst te worden op niet gecontamineerde bodem. In het tweede geval zijn de juvenielen die de eerste generatie uitmaken nooit rechtstreeks in contact geweest met de gecontamineerde bodem, daar hun ouders voor de bevalling overgeplaatst werden naar een niet gecontamineerde bodem.

Voor methoprene en teflubenzuron werden zelfs voor de tweede experimentele set-up significante verschillen waargenomen op de grootte van het broedsel. Dit effect werd waargenomen tot in de tweede generatie (F2), wat aantoont dat de impact van deze twee substanties transgeneratieel is. Voor fenoxycarb en precocene II werd geen effect vastgesteld op de tweede generatie in de tweede experimentele set-up. Een andere belangrijke bevinding is dat twee substanties met dezelfde voorspelde actiemodus, bijvoorbeeld de twee juvenielhormoon analogen fenoxycarb en methoprene, niet noodzakelijk een effect hebben op dezelfde eindpunten in *F. candida*. Alhoewel de auteurs geen onderzoek hebben verricht naar de onderliggende mechanismen voor hun waarnemingen, sluiten ze niet uit dat epigenetica een rol kan spelen (Campiche *et al.*, 2007).

Toch is het ondanks deze studies naar blootstelling aan toxicanten en hieraan gelinkte (transgeneratiele) veranderingen in DNA-methylatie status, moeilijk om te besluiten of dit echt een gevolg is van epigenetische veranderingen. Het is bijvoorbeeld nog niet geweten of methylatietoename in promotorregio's en CpG-einladen het verlies aan genexpressie induceert of dat, omgekeerd, DNA-methylatie een gevolg is van afname in genexpressie. Dit vraagstuk van oorzaak en gevolg vormt een van de grote uitdagingen voor verder onderzoek (Feil, 2006).

2.2. (Eco)toxicogenomics

2.2.1. Inleiding

De snelle vooruitgang op het gebied van genetica en *genomics* bezorgt ons meer en meer een aantal hulpmiddelen die ons begrip over hoe chemische producten de gezondheid van ecosystemen kunnen beïnvloeden doen toenemen. Een uitdaging in de 21^e eeuw in de ecotoxicologie is het begrijpen van de toxiciteitsmechanismen in verschillende soorten organismen. *Toxicogenomics* kan gedefinieerd worden als “de studie van genexpressie belangrijk in adaptatiereacties op blootstelling aan toxische stoffen en een weerspiegeling van de toxische processen” (Iannaconne, 2001). Gezien de parallele implicaties voor ecologische risico-evaluatie stellen Snape *et al.* (2004) de term “*ecotoxicogenomics*” voor om de integratie van *genomics* in de ecotoxicologie te beschrijven. *Ecotoxicogenomics* wordt gedefinieerd als “de studie van genexpressie in niet-doelwit organismen die belangrijk zijn voor de respons op milieutoxicanten”. Het potentieel van *ecotoxicogenomics* hulpmiddelen in ecologische risico-evaluatie blijkt groot te zijn. Veel van de gestandaardiseerde methodes die worden gebruikt om het potentieel effect van chemische producten op aquatische organismen te beoordelen, baseren zich op het meten van organismale effecten. Alhoewel een dergelijke benadering nuttig is om chemische producten met een potentieel risico te identificeren, verstrekken zij weinig inzicht in het onderliggende mechanisme van deze toxicologische effecten. Zonder dit begrip zal het moeilijk zijn om enkele zeer belangrijke uitdagingen in de aquatische ecotoxicologie aan te gaan, zoals bv. het voorspellen van toxicologische responsen over de zeer brede diversiteit van de fylogenetische groepen in aquatische ecosystemen, het inschatten van het effect van veranderingen op één ecologisch niveau op andere

niveaus en het voorspellen van de invloed van tijdsafhankelijke blootstelling op toxicologische responsen (Snape *et al.*, 2004). De hulpmiddelen van *ecotoxicogenomics* kunnen ons een beter mechanistisch inzicht in de aquatische ecotoxicologie geven.

2.2.2. Veronderstellingen in de toxicogenomics

Eén van de gebruikte technieken in de *toxicogenomics* is de microarray technologie, welke ook in de experimenten voor deze scriptie gebruikt werd. Een DNA-microarray is een microfluidische chip met daarop een grote hoeveelheid spots. Elke spot bevat een ander gen dat vastgehecht is op de bodem van de chip, de probe. Deze genen kunnen allerhande oorsprongen hebben. In de experimenten voor deze scriptie werd gebruik gemaakt van *expressed sequence tags*, daar het genoom van *Daphnia magna* nog niet gekarakteriseerd is. Voor de analyse worden er ook een controle- en een testsample voorbereid. Het mRNA van de controlesample wordt geëxtraheerd en met reverse-transcriptase omgezet in cDNA, waarna het vervolgens fluorescerend gelabeld wordt (bv. groen). Het testsample ondergaat dezelfde handelingen maar wordt met een andere fluorescerende kleur gelabeld (meestal rood). De twee gelabelde cDNA-producten worden samengevoegd en op de plaat gehybridiseerd. Het cDNA zal hybridiseren aan die probes waarmee het complementair is, ongeacht de kleur. Na een incubatieperiode worden alle ongebonden cDNA-moleculen weggespoeld waarna de chip ingelezen wordt door detectie van de overeenkomstige golflengten van de gebruikte labels. Hierna zijn er drie mogelijkheden: een spot is groen, rood of geel (een combinatie van rood en groen). Als de spot geel is, is het gen in zowel het test- als in het controlesample aanwezig. Als het rood is, is het alleen in het testsample aanwezig en bij groen alleen in het controlesample. Op deze manier kan d.m.v. microarrays differentiële expressie van honderden genen in twee verschillende samples nagegaan worden.

Er zijn een aantal zaken die inherent met het mechanisme en de natuur van de cel verbonden zijn, die de correcte interpretatie van microarray analysedata naar toxiciteit bemoeilijken.

Hoewel men er algemeen vanuit gaat dat genexpressieprofielen weinig verschillen binnen bepaalde klassen van toxicanten (bv. zware metalen, PAHs, ...) is dit niet steeds het geval. Doordat verschillende biochemische pathways in een cel op vele verschillende manieren dynamisch met elkaar kunnen interageren, kunnen aanvankelijk sterk verschillende expressiepatronen aanleiding geven tot vergelijkbare toxicologische effecten. Omgekeerd kunnen initieel weinig verschillende expressiepatronen aanleiding geven tot dramatisch verschillende toxicologische effecten (Waring *et al.*, 2001). Deze interacties tussen pathways kunnen niet of moeilijk uit de resultaten van een microarray-analyse gedestilleerd worden en dus dient deze kennis elders vandaan te komen om tot een goede interpretatie van de microarray analyse te kunnen komen. Echter zijn tot op heden lang niet al deze interacties gekarakteriseerd.

Naast deze convergentie en divergentie van genexpressiepatronen is het ook mogelijk dat genen met schijnbaar tegengestelde functies geïnduceerd worden ondanks dezelfde milieucondities. Burczynski

et al. namen in 2000 bijvoorbeeld waar dat zowel apoptotische als anti-apoptotische genen in humane cellen geïnduceerd konden worden na blootstelling van de cellen aan cisplatine.

Toxiciteit wordt typisch onderverdeeld in chronische en acute responsen. Dit zijn echter slechts uitersten van een continuüm van mogelijke toxicologische gevolgen, welke het resultaat zijn van zowel ruimtelijke als tijdelijke condities die een invloed hebben op het blootstellingsregime. De gegevens die bekomen worden uit een microarray analyse zijn echter enkel een momentopname van genexpressie gedurende een bepaalde tijd, in een bepaald weefsel en gedurende specifieke blootstellingscondities (Neumann & Galvez, 2002).

Een laatste veronderstelling die men maakt is dat d.m.v. clustering van genetische expressiepatronen een voorspelling gemaakt kan worden van de toxiciteitsmechanismen voor verschillende chemicaliën. Echter, Thomas *et al.* (2001) toonden aan dat er slechts een beperkte relatie bestaat tussen genexpressieprofielen en het groeperen van chemicaliën op basis van hun gekende toxicologische effecten. Deze discrepantie kan uiteraard deels verklaard worden op basis van bovenstaande opmerkingen. Neumann & Galvez (2002) zijn wel van mening dat door toenemende robuustheid, zowel van de microarraytechniek zelf als van de analysemethoden, dit probleem opgelost kan worden.

2.2.3. Toepassingen van microarrays in de toxicogenomics

Meest voor de hand liggend kunnen microarray analyses gebruikt worden om de onderliggende moleculaire mechanismen van waargenomen toxicologische responsen te verklaren, zoals ook verder wordt aangegeven. Er zijn echter nog heel wat meer toekomstige mogelijkheden voor het gebruik van microarrays in toxicologisch onderzoek. Zeker wanneer het genoom van *Daphnia magna*, het modelorganisme gebruikt in deze scriptie, volledig gekarakteriseerd zal zijn, zijn de mogelijkheden quasi onbeperkt.

Als eerste alternatieve toepassing kunnen microarrays gebruikt worden in comparatieve genoomhybridisatie. Microarrays worden hier gebruikt om amplificatie en deletie van genen in het genoom te detecteren: de ratio's van de fluorescente *dyes* duiden op amplificatie of deletie van genen. Op deze manier kan nagegaan worden of persistente milieustress amplificatie of deletie van bepaalde genen in het genoom van opeenvolgende generaties bewerkstelligt. Een potentieel probleem voor deze toepassing situeert zich in het aantal cellen waar wijzigingen optraden. Effecten in een minderheid van de cellen kunnen zodanig gedilueerd worden dat ze op het niveau van de array niet meer te detecteren zijn (Gant, 2007).

Microarrays zouden eveneens gebruikt kunnen worden in detectie van epigenetische modificaties zoals DNA-methylatie onder invloed van milieustress. Door het genomische DNA eerst mechanisch of enzymatisch op te breken en vervolgens die fragmenten die een gemethyleerd cytosine bevatten te selecteren d.m.v. precipitatie met een antilichaam tegen 5-methylcytosine, kan nagegaan worden of genomen differentieel gemethyleerde DNA-fragmenten bevatten (Gant, 2007).

Een laatste minder voor de hand liggende toepassing die volgens Gant (2007) zeker aandacht verdient is het gebruik van microarrays om de expressie van miRNA na te gaan, want voor de toxicologie zijn er een aantal interessante aspecten aan deze microRNA's verbonden. Ten eerste

worden ze afgeschreven van polycistronische regio's en blijkt de transcriptiecontrole gelijkaardig te zijn aan deze van "conventionele" genen die coderen voor proteïnen. Dit impliceert dat de expressie van miRNA's net als bij "conventionele" genen beïnvloed kan worden door milieucontaminanten. Ten tweede, heeft iedere miRNA een effect op de translatie van vele andere mRNA's. Een verandering in expressieniveau van miRNA's heeft dus een verandering in de in de cel aanwezige proteïnen tot gevolg. Tenslotte, omdat ze op het transcriptionele niveau onder een gelijkaardige regulatie staan als mRNA's, kunnen ze ook een gelijkaardig expressiepatroon vertonen dat gemakkelijk via microarrays gekarakteriseerd kan worden.

2.2.4. *Ecotoxicogenomics*

In de ecotoxicologie wordt gebruik gemaakt van twee benaderingen om de impact van milieucontaminanten op het ecosysteem te karakteriseren: analyse van blootstelling en toxicologische effecten.

Biomarkers worden vaak gebruikt als een maatstaf voor blootstelling van een organisme aan een toxicant. Het zijn fysiologische merkers die verschillen vertonen naargelang een veranderende blootstelling. *Biomarkers* zijn niet noodzakelijk indicatief voor een algemeen toxicologisch effect van een toxicant, maar wijzen erop dat blootstelling aan een toxicant of een klasse van toxicanten heeft plaatsgevonden. Om het gebruik van een specifieke *biomarker* tot milieubeoordeling uit te breiden, zou een *biomarker* voorspellend moeten zijn voor gevolgen op hogere biologische organisatieniveaus en zou hij het ecologische effect enige tijd vooraf moeten gaan. *Biomarkers* hebben het potentieel om door contaminatie geïnduceerde gevolgen voor organismen te voorspellen en kunnen daarom gebruikt worden om negatieve effecten op ecosystemen te minimaliseren (Neumann & Galvez, 2002). Monitoring van toxicologische effecten houdt het onderzoeken van wijzigingen en storingen van de biologische fitness van een organisme of populatie in. Deze monitoring is gelimiteerd tot de context van het bestudeerde effect: afwezigheid van een effect betekent niet noodzakelijk dat de populatie gezond is (Neumann & Galvez, 2002).

Het grootste nut voor DNA genexpressie arrays in het gebied van de ecotoxicologie zal de overbrugging van de beperkingen van analyse van blootstelling of toxicologische effecten zijn. De genexpressiepatronen bekomen op basis van microarray analyses kunnen een hulpmiddel zijn in het identificeren van het werkingsmechanisme van een contaminant op het organisme en kan helpen in het voorspellen van het algemene toxicologische effect dat een contaminant op de gastheerfysiologie kan hebben. De blootstelling aan een milieuverontreinigende stof kan de expressiepatronen onthullen die een idee kunnen geven van de beschadigde biochemische *pathway*. Op die manier krijgen microarrays nut in het vinden van verfijnde *biomarkers* van blootstelling.

2.2.5. Genexpressie bij *Daphnia magna*

Alhoewel methoden als *subtracted hybridization* en *microarrays* al langer door verschillende onderzoeksgroepen gebruikt werden om de invloed van contaminanten op genexpressie bij vissen te bestuderen (Larkin *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 2003; Koskinen *et al.*, 2004; Van der Ven *et al.*, 2005), is het toch maar gedurende de voorbije paar jaar dat microarray analyses bij *Daphnia magna* werden uitgevoerd. Dit is mede zo doordat, ondanks het feit dat *D. magna* een veelgebruikt modelorganisme is, haar genomische sequentie en genfuncties nog nauwelijks gekend zijn. Hierdoor zijn heel wat van de eerder beschreven toepassingen voor *D. magna* nog moeilijk uitvoerbaar. Daarom is het doel en opzet in alle tot hiertoe reeds uitgevoerde studies hetzelfde: het werkingsmechanisme van waargenomen toxicologische effecten op het niveau van het organisme proberen te verklaren door de studie van genexpressie. Daar het genoom nog niet gekend is, werd in alle studies vertrokken van een *custom made* microarray op basis van ESTs.

De eerste analyse van expressed sequence tags gebeurde pas in 2005 door Watanabe *et al.* In hun studie extraheerden zij RNA van 3 tot 4 weken oude *Daphnia*'s, gekweekt in carbongefilterd kraantjeswater. Na synthese van dubbelstrenging cDNA uit het geëxtraheerde RNA en klonering van deze cDNA fragmenten werden ze gesequeneerd. Overlappende sequenties werden gerangschikt in contigs, welke op hun beurt gebruikt werden om een cDNA bibliotheek te construeren. Na selectie op basis van de kwaliteit hielden ze nog 7210 ESTs over, waarvan 2958 niet redundant waren. Deze werden onderworpen aan een BLASTx analyse. 41% van de niet-redundante genen vertoonden overeenkomsten met genen in de NCBI database. De overige 59% vertoonden totaal geen overeenkomsten. Bij de 41% gekenmerkte genen vonden Watanabe *et al.* dat de helft van deze klonen gerelateerd waren met proteïnesynthese en ATP synthese en transport. Dit suggereert volgens hen dat *Daphnia magna* een actief energie metabolisme heeft.

Op basis van deze cDNA bibliotheek ontwikkelden Watanabe *et al.* in 2007 een oligonucleotide microarray. Hiermee testten zij de genexpressie van *D. magna* blootgesteld aan vier modelchemicaliën van verschillende klassen: CuSO₄, H₂O₂, pentachlorofenol (PCP) en β-naphtoflavone (βNF). Kopersulfaat deed dienst als model voor metalen, H₂O₂ als model voor oxidatieve stress, PCP voor respiratie ontkoppeling en βNF als model voor de inductie van fase I metabolisme genen. Hun resultaten duiden erop dat verschillende chemicaliëntypes en -doses aanleiding geven tot verschillende expressiepatronen. Tevens vonden ze dat genexpressieprofielen na blootstelling aan de chemicaliën karakteristiek waren voor iedere chemische stof en dat genexpressiepatronen veroorzaakt door deze verschillende chemicaliën onderscheidbaar waren van elkaar.

Een andere onderzoeksgroep rond Soetaert *et al.* ontwikkelde een cDNA microarray op basis van Suppression Substrative Hybridisation-PCR. De array bevatte genen gerelateerd met reproductie, energiemetabolisme en vervelling om de werkingsmechanismen van verschillende contaminanten te onderzoeken. Bij blootstelling van *Daphnia*'s aan 1 µg/mL propiconazole gedurende 4 dagen werd een

drievoudige downregulatie van genen coderend voor het dooierproteïne en vitellogenine waargenomen. Dit wees op een verminderde oöcyt maturatie (Soetaert *et al.*, 2006). Eveneens werd downregulatie van een larvaal-specifiek gen en een chaperonine waargenomen. Genen zoals het heat shock 90 proteïne en ATP synthase kenden dan weer een toename in hun expressie. Organismale effecten bevestigden deze waarnemingen: significant verminderde groei van de adulten en toegenomen ontwikkelingseffecten in de nakomelingen. Uit hun resultaten suggereren Soetaert *et al.* (2006) het gebruik van vitellogenine mRNA als een snelle biomerker voor reproductieve effecten in chronische toxiciteitstudies.

Gebruik makend van dezelfde array, werden eveneens genexpressieprofielen bekomen van neonatale *Daphnia*'s die gedurende 48 en 96 uur blootgesteld waren aan drie concentraties van anti-ecdysteroidale fungicide fenarimol (0,5; 0,75; 1 µg/mL) (Soetaert *et al.*, 2007a). In totaal kwamen 59 niet-redundante genen differentieel tot expressie, waarvan meer genen down- dan upgereguleerd waren. De data toonden een globaal effect op vervelling gerelateerde pathways. Bij de hoogste concentratie werd een reeks proteolytische enzymen, zoals verschillende serine proteasen en carboxypeptidasen geïnduceerd, terwijl verschillende genen coderend voor cuticulaproteïnen minder tot expressie kwamen (48 h). Gevolgen voor embryo-ontwikkeling werden zowel op het niveau van genexpressie als op organismaal niveau aangetoond. Het met embryo-ontwikkeling verwante gen vitellogenine kwam na 96 uur blootstelling differentieel tot expressie samen met een significante verhoging van embryoabnormaliteiten in de nakomelingen (Soetaert *et al.*, 2007a).

Het doel van hun laatste studie was (i) om inzicht te krijgen in concentratie- en tijdsafhankelijke cadmium geïnduceerde moleculaire responsen bij *D. magna*, en (ii) om de genexpressieprofielen te vergelijken met gevolgen op organismaal niveau (Soetaert *et al.*, 2007b). Hiertoe werden *Daphnia*'s blootgesteld aan drie cadmiumconcentraties (nominale concentratie van 10, 50 en 100 µg/L) voor twee tijdsintervallen (48 en 96 uur). In het algemeen werden dynamische expressiepatronen bekomen met een duidelijke toename in genexpressie bij hogere concentraties en langere blootstellingduur. Pathways geassocieerd met processen zoals spijsvertering, zuurstoftransport, cuticulametabolisme en embryo-ontwikkeling werden beïnvloed. Tevens beïnvloedde cadmium de expressie van genen coderend voor proteïnen betrokken bij immunologische, stress respons, celadhesie en signaaltransductie pathways (Soetaert *et al.*, 2007b).

In hun onderzoek in 2007 poogden Poynton *et al.* het potentiële nut van genexpressie in de ecotoxicologie aan te tonen door nieuwe *biomarkers* te identificeren en potentiële mechanismen voor toxicologische respons in *D. magna* aan het licht te brengen. Zij identificeerden verschillende genexpressiepatronen bij blootstelling aan sublethale concentraties van koper, cadmium en zink en ontdekten specifieke *biomarkers*, o.a. twee mogelijke metallothioneïnes en ferritine mRNA met een functioneel IRE-domein (*Iron Responsive Element*) (Poynton *et al.*, 2007). De waargenomen genexpressiepatronen ondersteunden gekende toxiciteitmechanismen en brachten nieuwe mechanismen aan het licht, zoals bijvoorbeeld de remmende werking van zink op de chitinase activiteit (Poynton *et al.*, 2007).

2.3. Metalen: zink

2.3.1. Inleiding

Zink behoort tot de klasse der intermediaire metalen (Duffus, 2002). Zink wordt eveneens tot de micronutriënten of essentiële metalen gerekend. Een tekort hieraan leidt tot pathologische schade of bepaalde wijzigingen in het lichaam van organismen. Bij een voldoende hoge metaalconcentratie zullen deze effecten echter weer verdwijnen. Ze zijn dus in bepaalde hoeveelheden nodig voor een goed metabolisme, doordat ze daarin verschillende functies uitoefenen: ze vormen een belangrijk bestanddeel van proteïnen en enzymen die instaan voor een aantal cellulaire functies: groei, assimilatie, dissimilatie en reproductie. Wanneer metalen echter in te hoge concentraties in het milieu voorkomen, kan het effect op het organisme toxisch worden. Voor elk organisme en essentieel metaal kan zo een '*Optimal Concentration range for Essential Elements*' (OCEE) gedefinieerd worden (Oller *et al.*, 2003). Binnen het OCEE kan het organisme voldoen aan al haar metabolische behoeften. OCEE is gekoppeld aan de biobeschikbare concentratie van het metaal in de natuurlijke habitat van de soort. Studies hebben aangetoond dat dit OCEE kan verschuiven naar lagere of hogere concentraties tengevolge van acclimatisatie (Muyssen en Janssen, 2002; Bossuyt en Janssen, 2003). Tevens wordt het bepaald door de homeostatische capaciteit van de soort, welke zorgt voor de actieve regulatie van de interne concentratie van het essentieel metaal zodat de optimale beschikbare concentratie van het essentieel metaal behouden blijft onder de variërende externe omstandigheden. Deze homeostatische regulatie heeft echter zijn beperkingen. Wanneer de externe biobeschikbare concentratie van het essentieel metaal te hoog of te laag wordt, zal de homeostatische capaciteit niet volstaan en zal respectievelijk toxiciteit of deficiëntie optreden. De optredende metaalstress heeft dan allerlei effecten (zie verder).

2.3.2. Speciatie en biobeschikbaarheid

In de ecotoxicologie is het belangrijk de correlatie te kennen tussen metaalconcentraties in het milieu en hun effect op de organismen die in dit milieu resideren. De metingen van metalen in het milieu zijn echter niet altijd even gemakkelijk te interpreteren (Soto *et al.*, 2003). Eén van de moeilijkheden daarin schuilt in het juist inschatten van de biobeschikbaarheid van de metalen. Immers enkel die metalen die beschikbaar zijn voor het organisme kunnen een effect op het organisme uitoefenen. Biobeschikbaarheid wordt bepaald door verschillende factoren: het type metaal, fysico-chemische factoren van het milieu, metaalregulerend vermogen van het organisme.

Speciatie omvat de transformatie en distributie van metalen. De transformatie of biochemische cyclus van metalen houdt bioaccumulatie, bioconcentratie, biobeschikbaarheid en toxiciteit in. De distributie is eerder gekoppeld aan de geochemische cyclus (transport, adsorptie en precipitatie van metalen). Metaalconcentratie in het milieu zal dus niet de enige factor zijn die de metaalbelasting op aquatische organismen bepaalt. Bioaccumulatie in organismen wordt bepaald door verschillende abiotische en biotische factoren (Soto *et al.*, 2003).

Belangrijke abiotische factoren zijn de geleidbaarheid, de hardheid, de zuurtegraad, de redoxpotentiaal, de temperatuur, de alkaliniteit, het zuurstofgehalte, het synergisme of antagonisme tussen metaalkationen, de oplosbaarheid en de aanwezigheid van (an)organische liganden. Eveneens spelen processen zoals precipitatie, sedimentatie, adsorptie en filtratie een belangrijke rol in natuurlijke milieus. Speciatie en biobeschikbaarheid van metalen op basis van deze abiotische factoren kunnen voorspeld worden door het gebruik van modellen, zoals bijvoorbeeld het *Biotic Ligand Model* (BLM). Zulk BLM werd uitvoerig beschreven door Heijerick *et al.* (2005). Zij onderzochten de individuele effecten van de kationen Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ en H^+ op de chronische zinktoxiciteit bij *Daphnia magna* en bepaalden de fractie van de bindingsplaatsen ingenomen door Zn op het organisme bij EC_{50} en NOEC concentraties.

Veel biotische factoren staan in direct verband met de abiotische, toch zijn een aantal biotische parameters zoals groei en reproductie, belangrijk in de bepaling van de metaaltoxiciteit. In bioaccumulatie worden 2 groepen onderscheiden naargelang de bindingsplaats van de metalen. Binding op fysiologisch inerte plaatsen, zoals macromoleculen die mee verantwoordelijk zijn voor de detoxificatie van een overmaat aan metalen in de cel, geeft aanleiding tot accumulatie van metalen in de cel zonder verstoring van haar functies. Binding op fysiologisch actieve plaatsen, zoals bijvoorbeeld metallo-enzymen, kan leiden tot directe of indirecte schade aan het celmetabolisme. De accumulatie van metalen in weefsels is eveneens in hoge mate afhankelijk van verschillende metabolische processen (metalen *in se* kunnen niet gemetaboliseerd worden) die plaatsvinden in specifieke celtypen in doelweefsels/organen. In vele van deze processen komt het eiwit MT (metallothioneïne) en lysosomen tussen in de intracellulaire regulatie van metalen (Soto *et al.*, 2003). Verhoogde synthese van het eiwit MT is geassocieerd met een toegenomen capaciteit om metalen te binden en toegenomen bescherming tegen metaaltoxiciteit (zie 2.3.4.1.).

2.3.3. Accumulatie

De accumulatie van metalen door invertebraten kan onderverdeeld worden in drie fasen: de metaalopname, transport en distributie in het lichaam en excretie. De balans tussen deze drie fasen bepaalt de accumulatie strategie van invertebraten. Naast metalen die in het lichaam van invertebraten opgenomen worden om daar een metabolische rol te vervullen of geaccumuleerd te worden, kunnen metalen ook passief geadsorbeerd worden aan de buitenkant van het lichaam. Dit is in het bijzonder waar voor invertebraten met een exoskelet, zoals de *Crustaceae*. Accumulatiestrategieën verschillen intraspecifiek voor verschillende metalen en interspecifiek voor hetzelfde metaal, zelfs tussen nauw verwante taxa (Rainbow & Dallinger, 1993). Deze strategieën kunnen gaan van sterke netto accumulatie tot sterke regulatie van de metaalbelasting in het lichaam. Netto accumulatoren zullen bijna geen metalen uitscheiden, terwijl bij een regulator tot op een bepaald niveau een relatief constante metaalbelasting van het lichaam is, zelfs bij blootstelling aan hoge concentraties metalen. Deze verschillen zijn voor een groot deel (epi)genetisch bepaald.

Opname en transport in het lichaam gebeurt voornamelijk via twee routes. Een eerste route verloopt via passief transport en vereist geen energie. Door middel van gefaciliteerde diffusie zal het metaal in de cel gebracht worden waar het bindt aan een grote variëteit van liganden. Op die manier wordt gezorgd voor het behoud van de intern gerichte diffusiegradiënt en wordt verspreiding van metalen in de cel voorkomen. Dit type van diffusie vereist dat de metalen in de vorm van hun vrije ion in het milieu voorkomen. Onder ongewone omstandigheden komt directe passage doorheen de lipidemembraan eveneens voor. De metalen worden dan gebonden in lipofiele organometallische mengsels afkomstig van bijvoorbeeld microbiële activiteit (Rainbow & Dallinger, 1993). Soto *et al.* (2003) maken eveneens gewag van directe diffusie van het metaal doorheen de celmembraan in de vorm van vrij ion of in een anorganisch complex.

Een tweede opnameroute behelst actief transport doorheen ionenpompen. Hier worden vrije metaalionen per ongeluk mee opgenomen door de beperkte selectiviteit van de ionenpompen. Best gekend voorbeeld is hier cadmium dat door zijn zeer gelijkende diameter (109 pm) mee met calcium ($d = 114$ pm) opgenomen wordt. Deze opnameroute staat potentieel wel onder fysiologische controle van het organisme: cadmiumopname bijvoorbeeld kan beperkt worden door calciumopname te beperken. Echter volledige stopzetting van calciumopname is onmogelijk daar dit essentieel is voor invertebraten.

Lasenby & Van Duyn (2004) toonden in hun studie aan dat zink en cadmium bij de kreeftachtige *Mysis relicta* voor een belangrijk deel worden verwijderd met de vervellingen en dat het aantal vervellingen toeneemt bij verhoogde blootstelling. Vele *Crustacea* ondergaan zo een periodieke detoxificatie tijdens het vervellen, wat verschillende keren gedurende de levenscyclus voorkomt (Ravera, 2001). Naast dit mechanisme kunnen metalen, o.a. ook bij *Daphnia magna*, geëxcreteerd worden op cellulair niveau door lysosomen, vesikels, peroxisomen en vacuolen of door biomineralisatieprocessen.

2.3.4. Subcellulaire verdeling

In zijn studie van 2003 schuift Stanley naar voren dat er drie detoxificatiemechanismen voor metaalionen onderscheiden kunnen worden in invertebraten. Ten eerste zijn er specifieke, oplosbare liganden die complexen met de ionen zullen vormen. Compartimentalisatie in vesiculaire of lysosomale organellen kan als een tweede mechanisme beschouwd worden. Tenslotte is er de vorming van een onoplosbare neerslag waarin de metaalionen gebonden kunnen zijn. Deze mechanismen vertonen efficiëntieverschillen, zowel tussen verschillende organismen als tussen verschillende celtypes.

2.3.4.1. Complexvorming met liganden

De meeste liganden die voorkomen zijn proteïnen of peptiden. Zij kunnen ingedeeld worden in drie klassen:

- Metallothioneïnes (MTs)
- Antioxidant enzymen, zoals glutathion
- Phytochelatine is net zoals MT dit een metaalbindend polypeptide dat oorspronkelijk enkel in planten en fungi gekend was. In 2002 toonden Vatamaniuk *et al.* echter aan dat het ook een essentiële rol speelt in de metaaldetoxificatie bij invertebraten.

Metallothioneïne (MT) is een proteïne/polypeptide, voor een groot deel bestaande uit het aminozuur cysteïne. Iedere cysteïnegroep is betrokken in de chelatie van metalen door afsplitsing van het waterstofatoom in de thiolgroep. De synthese van MT wordt geïnduceerd door de aanwezigheid van metalen (Amiard *et al.*, 2006). Bij verschillende invertebraten is aangetoond dat er een zekere tijdsperiode zit tussen het tijdstip van blootstelling en de productie van MT. In eerste instantie zullen andere macromoleculen instaan voor de detoxificatie in de cel. In de cel hebben MTs een duale functie: enerzijds vormen ze een niet-toxisch zink- en koperreservoir en verzekeren zo de beschikbaarheid van die metalen voor de synthese van metalloenzymen. Anderzijds staan MTs in voor een reductie van de niet-specifieke binding van niet-essentiële metalen in de cel en beschermen ze tegen celtoxiciteit (Amiard *et al.*, 2006). Weefsels die betrokken zijn in de opname van metalen hebben een hogere capaciteit voor de synthese van MTs. In *Crustacea* zijn dit o.a. de hepatopancreas en de filterorganen, zoals de kieuwen en de setae.

De rol van MT in de tolerantieontwikkeling (adaptatie en acclimatisatie) aan metaalstress is cruciaal en levert een grote bijdrage in de werking van aquatische ecosystemen, in termen van biomassa, ecosysteemstructuur en functie.

Antioxidant enzymen bieden bescherming tegen oxidatieve stress. Wanneer een cel in homeostase met haar omgeving is, zal ook haar redoxbalans in evenwicht zijn. Door aanwezigheid van externe stressfactoren kan dit evenwicht echter verstoord worden, met zogenaamde oxidatieve stress tot gevolg. Eén van die externe stressfactoren kan de aanwezigheid van toxische concentraties metalen zijn. Biobeschikbaarheid, accumulatie en toxiciteit bepalen sterk de activiteit van vrije metaalionen of onstabiele metaalcomplexen. In eerste instantie zullen MTs slechts in beperkte mate instaan voor chelatie van deze metaalionen. Antioxidant enzymen zullen dan het meeste werk voor hun rekening nemen. Glutathion (γ-glutamylcysteinylglycine of GSH) is een belangrijk antioxidant enzyme in vele eukaryoten. Het komt in veel hogere concentraties dan MT voor. Naast GSH komen nog tal van andere antioxidant enzymen voor, zoals catalase, glutathion reductase, glutathion-S-transferase, *thiobarbituric acid reactive substances*, superoxide dismutase, glutathion-peroxidase en lipide peroxidase (Barata *et al.*, 2005).

2.3.5. Acclimatisatie en adaptatie

Elke verandering in de leefomgeving van een organisme kan tot stress leiden. Stress moet echter steeds gedefinieerd worden op het niveau van de niche van een bepaalde soort (Korsloot *et al.*, 2004). Een zeer stresserende omgeving voor het ene organisme kan net een optimale omgeving voor een ander betekenen.

Organismen onderhevig aan metaalstress kunnen een verhoogde resistentie aan deze toxicanten ontwikkelen. Doorgaans zijn er twee mechanismen die de organismen hiertoe in staat stellen (Madlung, 2004). Een eerste proces wordt fysiologische acclimatisatie genoemd: een organisme verkrijgt een zekere graad van tolerantie na blootstelling aan subletale hoeveelheden van een toxische stof. De blootstellingstijd en de stadia van de levenscyclus zijn hierbij van groot belang. De verkregen tolerantie zal niet doorgegeven worden aan de nakomelingen. Acclimatisatie is een energetisch veeleisend proces, waardoor mogelijk de fitness gereduceerd wordt.

Het tweede proces behelst genetische adaptatie: natuurlijke selectie in een genetisch diverse populatie zal over een langere periode leiden tot toename van het gemiddelde tolerantieniveau in de populatie. De eigenschappen van de tolerantie worden hier uiteraard wel doorgegeven aan de nakomelingen en in tegenstelling tot acclimatisatie zijn er bij adaptatie veelal geen extra energetische kosten verbonden. Waar oorspronkelijk acclimatisatie optrad, kunnen na een bepaalde periode onder dezelfde stresscondities wijzigingen in het genoom optreden en kunnen de verworven fysiologische aanpassingen leiden tot de geadapteerde organismen door natuurlijke selectie.

Over het algemeen geeft genetische adaptatie geen aanvaardbare verklaring voor het op korte tijd optreden van tolerantie. In het kader van de epigenetica dient hierbij echter een kanttekening gemaakt worden: epigenetische processen kunnen de expressie van het patroon gedurende één generatie aanpassen. Bovendien kunnen deze epigenetische imprints mogelijk doorgegeven worden aan volgende generaties. Epigenetica zou dus een snelle adaptatie, zonder natuurlijke selectie mogelijk kunnen maken.

2.3.6. Effecten van zink bij *Daphnia magna*

2.3.6.1. Oxidatieve stress

Zoals eerder vermeld kunnen heel wat metalen zorgen voor oxidatieve stress, waartegen de cel zich beschermt door aanmaak van antioxidantenzymen. Zink vervult een dubbele rol bij het optreden van oxidatieve stress. Over het algemeen biedt de aanwezigheid van zink bescherming tegen oxidatieve stress, doordat het enerzijds een essentieel deel uitmaakt van Cu/Zn-SOD en anderzijds de MT-concentratie in de cel op peil houdt. Zoals eerder aangehaald, zijn zowel SOD als MT belangrijke beschermingsmiddelen tegen oxidatieve stress. Daarnaast gaat zink oxidatie van sulfhydrylgroepen op bepaalde enzymen tegen en vermindert het vorming van reactieve hydroxylradicalen door het tegenwerken van de redoxactieve eigenschappen van andere metalen, zoals ijzer en koper (Tapiero & Tew, 2003).

Bij planten werd daarentegen ook een aantal gevallen beschreven waarin waarin zink net aanleiding gaf tot oxidatieve stress. Onder andere bij *Phaseolus vulgaris* induceerde zinkblootstelling de anti-oxidatieve verdedigingsmechanismen (Cuypers *et al.*, 2001). Ook bij andere organismen werd de rol van zink in het veroorzaken van oxidatieve stress beschreven. Yanagisawa *et al.* (2004) beschreven een toename in de gemiddelde arteriële bloeddruk bij ratten gevoederd met een Zn-rijk dieet. Na toediening van de exogene superoxide “wegvanger” Tempol zagen zij terug een daling in de bloeddruk tot op een vergelijkbaar niveau met deze waargenomen in ratten gevoederd met een normaal dieet. De activiteit van het endogene SOD in de thoracale aorta bleek sterk gereduceerd. De verhoogde oxidatieve stress ten gevolge van het Zn-rijke dieet interfereerde waarschijnlijk met de werking van de vasodilator NO waardoor het normale bloeddrukniveau niet meer gehandhaafd kon worden (Yanagisawa *et al.*, 2004). Chen & Liao (2003) beschrijven neurologische schade ten gevolge van toenemende oxidatieve stress bij verhoogde Zn-blootstelling (zie 2.3.6.3.).

De gevolgen van oxidatieve stress voor het organisme zijn velerlei. Onder invloed van een zuurstofradicaal kan in de membranen een lipideradicaal gevormd worden, welke op zijn beurt verdere afbraak van de membraan initieert. De cel reageert hierop door de onverzadigde vetzuren in de membraan te vervangen door de meer rigide verzadigde vetzuren, welke niet vatbaar zijn voor lipideperoxidatie. Hierdoor vermindert de beweeglijkheid van de membraan echter en kunnen lekken ontstaan (Tapiero & Tew, 2003). Ook kan er schade aan proteïnen en zelfs DNA optreden, door verandering van aminozuren en basen of door fragmentatie. Van DNA-schade wordt gesuggereerd dat het in verband gebracht kan worden met carcinogenese (De Coen & Janssen, 1999).

2.3.6.2. Effect op de calciumbalans

Marshall (2002) besluit uit het feit dat calciumopname competitief geïnhibeerd wordt door zink en omgekeerd dat zink via dezelfde weg als calcium in de cel wordt opgenomen. Het toxicologische effect dat zink uitoefent zou dus voortkomen uit competitieve inhibitie van het calciumkanaal gelegen op de epitheliale membraan (Hogstrand *et al.*, 2002; Marshall, 2002). Het transport van zink ter hoogte van de basolaterale membraan blijkt niet via het Ca^{2+} -ATPase of door een Na^{+} -afhankelijk mechanisme te gaan. Waarschijnlijk gebeurt dit door een specifieke zinktransporter (Marshall, 2002).

Het grootste deel van het opgenomen calcium wordt gebonden in het exoskelet onder de vorm van carbonaten en fosfaten. Bij vervelling wordt eerst een deel van deze calcium terug uit het exoskelet opgenomen om later in de nieuwe carapax te investeren. Bij zooplankton is deze opslagcapaciteit echter beperkt tot ongeveer 15% van het totale calciumgehalte (Wheatly, 1999). Dit houdt in dat bij iedere vervelling steeds een grote hoeveelheid calcium uit de omgeving zal moeten opgenomen worden. Calciumdeficiëntie zal geen invloed hebben op de vervellingsfrequentie, maar er zal minder groei optreden tussen de vervellingen en er al een zachtere carapax gevormd worden, wat het organisme meer kwetsbaar maakt en een invloed kan hebben op zijn verspreiding (Hessen & Rukke, 2002b). Hessen en Rukke (2002) suggereren eveneens dat *Daphnia* bij calciumdeficiëntie de aanwezige calcium prioritair zal aanwenden om de intracellulaire calciumhomeostase in stand te houden.

Calcium vervult eveneens, net zoals bij vertebraten, een belangrijke functie in de signaaltransductie (Tack & Smith, 2004). In de volgende paragraaf wordt hier dieper op ingegaan.

2.3.6.3. Neurologische schade

Calcium is één van de molecules in de cel die tussenkomt in de signaaloverdracht tussen verschillende synapsen. Daar zink in competitie treedt met calcium, zou zinkstress kunnen leiden tot neurologische schade daar onvoldoende calcium aanwezig is om de pulsoverdracht te bewerkstelligen. Tot hertoe wordt de rol van zink in het veroorzaken van neurologische schade echter niet meteen gelinkt aan de calciumhomeostase (Chen & Liao, 2003). Zink komt voor in de synaptische vesikels van het centraal zenuwstelsel waar het een essentiële rol als modulator van de neurotransmissie vervult door het inwerken op de functies van verschillende receptoren. Wanneer een echter een overmaat aan zink voorkomt kan dit leiden tot schade aan de synapsen en eventueel tot celdood. Onderliggende mechanismen die beschreven zijn, zijn zowel de influx van zink in de neuronen als het voorkomen van oxidatieve stress (Chen & Liao, 2003).

Voorafgaand aan neurologische schade wordt typisch een daling in het glutathiongehalte (GSH) vastgesteld. Chen & Liao (2003) beschrijven in hun onderzoek op ratten hoe zink het GSH cheleert en uitput waardoor peroxides en zuurstofradicalen niet meer geneutraliseerd worden. De oxidatieve stress in de cel stijgt en leidt uiteindelijk tot celdood. GSH zou daarenboven ook belangrijk zijn als neurotransmitter en neuromodulator in de hersenen. Uitputting van GSH door zink zou zo ook een directe invloed hebben op hersenschade (Oja *et al.*, 2000). Echter wordt hier tevens melding gemaakt van de duale rol van zink dat in de hersenen ook zou kunnen optreden als bescherming tegen oxidatieve stress.

2.4. *Daphnia magna* Straus

Daphnia magna Straus wordt al gedurende vele jaren gebruikt als standaard aquatisch testorganisme. Uitgezonderd voor vis en algen is *Daphnia magna* het meest gebruikte organisme in aquatische studies voor chronische en acute testen (OECD). Zeker wanneer multigeneratie testen opgezet worden is *D. magna* zeer gegeerd omwille van zijn korte generatietijd. De dag van vandaag zijn testen met *D. magna* zelfs de enige zoetwater invertebraten studies die formeel bekrachtigd worden door grote internationale instellingen zoals EEC, OECD en ISO.

2.4.1. Voorkomen

Daphnia magna behoort tot de orde van de Cladocera (figuur 2.4.), kleine kreeftachtige organismen die sterk eurytoop zijn en daardoor zelfs voorkomen in matig tot sterk vervuilde zoetwater-ecosystemen. Hun geografische verspreidingsgebied beslaat het gehele Palearctisch gebied en een deel van het Nearctisch en het Ethiopisch gebied. Ze komen niet voor in sterk stromende beken en rivieren, in bronnen en in binnenwateren met te hoge zoutconcentratie. Ze overleven wel in kleinere wateren, in het litoraal van meren en in vijvers, poelen en sloten (Hebert, 1978), waar een relatief lage vispredatie is (Koivisto, 1995).

Het geslacht *Daphnia* vormt een onontbeerlijke schakel in de zoetwatervoedselketen omdat ze een belangrijk deel uitmaken van het zoöplankton. Aan- of afwezigheid van *Daphnia* in de natuur kan aanzienlijke gevolgen hebben voor de ecologische kwaliteit van een aquatisch systeem (Hebert, 1978). *Daphnia* is één van de belangrijkste consumenten van primaire producenten. Anderzijds echter is ze zelf een belangrijke bron van voedsel voor invertebrate en vertebrate predatoren.

De structuur van een zoöplanktongemeenschap in een habitat wordt veelal bepaald door de interactie tussen twee tegengestelde selectieve krachten. Enerzijds moet het zoöplankton zo klein mogelijk zijn om aan vispredatie te kunnen ontsnappen. Anderzijds is het zo dat in visvrije vijvers de grotere *Daphnia* het beter zullen doen dan hun kleinere tegenhangers, doordat grotere soorten een ruimer voedselaanbod zullen kunnen opnemen (*Size efficiency hypothesis*) (Koivisto, 1995).



Kingdom	<i>Animalia</i>
Phylum	<i>Arthropoda</i>
Subphylum	<i>Crustacea</i>
Class	<i>Branchiopoda</i>
Order	<i>Cladocera</i>
Family	<i>Daphniidae</i>
Genus	<i>Daphnia</i>
Subgenus	<i>CtenoDaphnia</i>
Species	<i>magna</i>

Figuur 2.4. *Daphnia magna* en classificatie

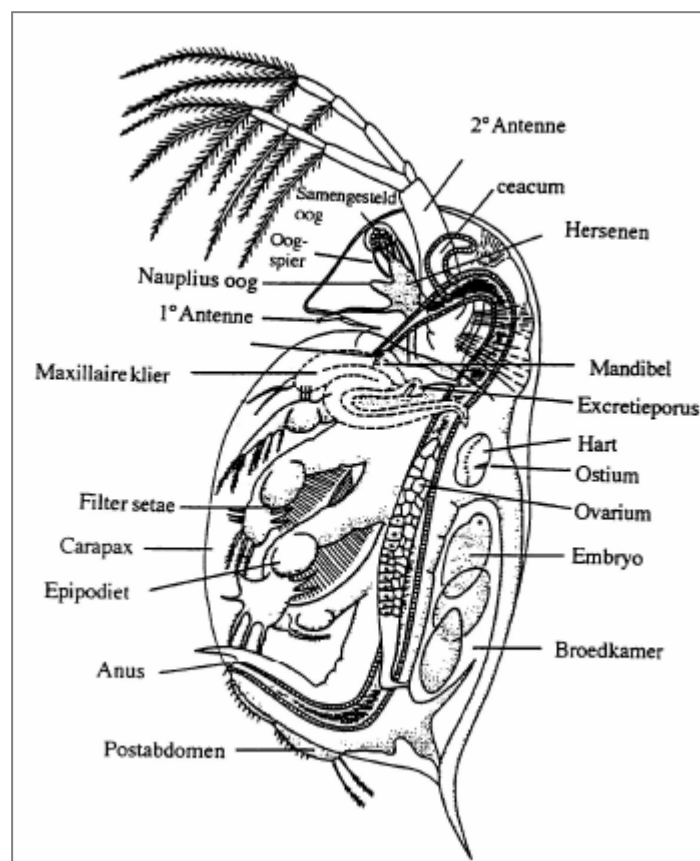
2.4.2. Morfologie, anatomie en fysiologie

Alle Crustacea hebben een exoskelet. Bij *D. magna* bestaat deze uit een tweedelige carapax die rond de thorax en het abdomen zit en is opgebouwd uit verschillende lagen weefsel. Calciumverbindingen en chitine in deze weefsels verlenen de carapax zijn sterkte (O'Brien *et al.*, 1991). De carapax is onelastisch, waardoor groei enkel mogelijk is door regelmatige vernieuwing van de carapax. Deze vervelling of ecdysis gaat eveneens gepaard met het vernieuwen van de cuticula, welke ook de voor-

en einddarm uitmaakt. Bij elke vervelling wordt er opnieuw kalk ingebouwd in de cuticula onder de vorm van calciumcarbonaat en calciumfosfaat.

Bij vele invertebraten zullen metalen gedeeltelijk door het exoskelet migreren of zich vastzetten vooraleer ze zich in het organisme verspreiden. Metalen kunnen via verschillende opnameroutes in de carapax terechtkomen en daarbij binden aan proteïnen. De carapax kan zo een vrij grote hoeveelheid metaal accumuleren. Naast de carapax blijkt ook de hepatopancreas of verteringsklier (figuur 2.5.) een belangrijke opslagplaats voor metalen te zijn. Weefsels in de buurt van het darmstelsel blijken meer metalen op te slaan dan andere weefsels.

Watervlooien zijn *filter feeders*, die door snelle bewegingen van de vijf thoracale poten een waterstroom creëren doorheen de carapax (figuur 2.5.). Hieruit wordt het nodige voedsel en zuurstof gefilterd door de lange haren en setae op de thoracale poten, alvorens deze de mond bereiken. *D. magna* kan beschouwd worden als een aselechte filter feeder (Lavens & Sorgeloos, 1996). Ze prefereren fytoplankton, maar zullen alle gesuspenderde deeltjes opnemen die gefilterd kunnen worden ($> 0,45 \mu\text{m}$). Bij voedselschaarste gaan ze over tot het opnemen van deeltjes uit het sediment (Gillis *et al.*, 2005). In de mond wordt het voedsel vermengd met orale secreties en gaat het verder naar de darm, van waaruit het opgenomen wordt in het lichaam. De stoffen die niet opgenomen worden, zullen na enige tijd via de darm terug uitgescheiden worden. Metalen die niet worden opgenomen, kunnen tot meer dan 6 uur in het darmstelsel blijven (Gillis *et al.*, 2005). Metalen worden niet enkel rechtstreeks via het water opgenomen, maar ook gedeeltelijk via het voedsel.



Figuur 2.5. Morfologie van *Daphnia magna* (vrouwelijk) (naar Barnes, 1980).

De fysiologie van *D. magna* maakt het mogelijk om in minder gunstige omstandigheden te overleven. In een zuurstofarme omgeving kan *D. magna* zelf hemoglobine aanmaken. Echt ongunstige perioden kunnen ze overleven door resistente ruststadia, de ephippia (Mitchell *et al.*, 2004). Door passieve dispersie kunnen de rusteieren terecht komen in gunstigere omstandigheden waarin ze tot ontwikkeling zullen komen. In deze gebieden kunnen zich dan grote populaties ontwikkelen. Dit werkt bovendien een snelle kolonisatie van nieuwe habitats in de hand (Jenkins & Buikema, 1998).

2.4.3. Reproductie

Bij de meeste *Daphnia* spp. verloopt de reproductie via cyclische parthenogenese. Hierin wisselen fasen van parthenogenetische reproductie zich af met fasen van seksuele reproductie. Dit eerste type reproductie zal zich vooral voordoen onder gunstige levensomstandigheden, terwijl het laatste type zich enkel voordoet in ongunstige omstandigheden. De afwisseling van de parthenogenetische en de seksuele fase verloopt echter niet in strikte zin: de duur van de parthenogenetische fase is zowel afhankelijk van genetische factoren als van veranderingen in de omgevingscondities (Hughes, 1983). Cyclische parthenogenese combineert de voordelen van parthenogenetische reproductie (een snelle vermenigvuldiging van het genoom) met de voordelen van seksuele reproductie (recombinatie van genetisch materiaal). Bovendien wordt, zoals eerder vermeld, door de productie van resistente rusteieren, de ephippia, de mogelijkheid gecreëerd om via diapauze periodes van te ongunstige omgevingscondities te overbruggen.

2.4.3.1. Parthenogenetische reproductie

Tijdens deze fase bestaat de populatie van *Daphnia* uitsluitend uit wijfjes, welke door middel van parthenogenese genetisch identieke wijfjes voortbrengen. Onbevuchte diploïde eitjes worden afgezet in de broedkamer, waaruit zich genetisch identieke individuen ontwikkelen. De celdelingen verlopen volledig mitotisch met de vorming van klonen tot gevolg (Zaffagnini, 1987).

De parthenogenetische eieren worden gevormd in het ovarium (figuur 2.5.), waarna ze naar de broedkamer verplaatst worden. Bij een temperatuur van 20°C neemt de ontwikkeling van ei tot embryo zo'n twee tot drie dagen in beslag. Kort voor de vervelling komen de juvenieltjes vrij als miniatuurversie van de adulten. Ze zijn geslachtsrijp na vier tot vijf preadulte vervellingstadia. Dit duurt ongeveer zeven dagen bij een omgevingstemperatuur van 20°C (Zaffagnini, 1987).

Het aantal en de grootte van de geproduceerde eitjes hangt samen met de grootte van het moederdier, het voedselaanbod en de eventuele aanwezigheid van predatorspecifieke kaïromonen (Lampert, 1993).

2.4.3.2. Sexuele reproductie

De sexuele reproductie start vooral onder invloed van ongunstige omstandigheden. Impulsen die door *Daphnia* als negatief ervaren worden en kunnen wijzen op naderende ongunstige omstandigheden werden beschreven door Kleiven *et al.* (1992):

- Hoge populatiedensiteit
- Voedseltekort
- Slechte voedselkwaliteit
- Aanwezigheid van predatorspecifieke stoffen (kaïromonen)
- Uitdroging van de habitat
- Afnemende fotoperiode (indicatie van het aanbreken van de winter)

Tijdens de sexuele fase verschijnen er eveneens mannetjes in de populatie, dewelke ook ontstaan via parthenogenese en bijgevolg genetisch identiek zijn aan de wijfjes (Zaffagnini, 1987). De geslachtsbepaling is dus niet genetisch bepaald, maar wel omgevingsgebonden. Tijdens de fase van seksuele reproductie leggen de vrouwtjes haploïde eieren af die door de mannetjes bevrucht dienen te worden om verdere ontwikkeling mogelijk te maken. Er worden twee haploïde eieren per legsel geproduceerd. Na bevruchting ontwikkelen de eieren zich tot rusteieren, welke verpakt zitten in een kapsel dat uit verschillende lagen membranen is opgebouwd. Dit kapsel komt tot stand door een transformatie van de broedkamerwand (Zaffagnini, 1987). Het resultaat wordt het ephippium genoemd en bevat hooguit twee bevruchte rusteieren. Als het moederdier vervelt, komen de ephippia vrij. Dankzij het kapsel dat de bevruchte eieren bevat, zijn deze beschermd tegen ongunstige omgevingsinvloeden zoals vorst, uitdroging en verteringsenzymen. Als de ongunstige periode voorbij is ontluiken uit de ephippia parthenogenetisch reproducerende wijfjes.

2.4.4. *Daphnia magna* als testorganisme

De keuze van *Daphnia magna* als een standaard testorganisme werd sterk beïnvloed door de volgende factoren (Mark en Solbé, 1998; *Daphnia Genomics Consortium*, 2008):

- Gedurende bijna drie eeuwen wordt het genus *Daphnia* al bestudeerd in de taxonomie, fysiologie en limnologie.
- Ze komen voor in bijna alle zoetwaterecosystemen. Bovendien speelt *Daphnia* als zoöplankton een sleutelrol in deze ecosystemen. Ze vormen de schakel tussen producenten en hogere consumenten: ze voeden zich met fytoplankton en vormen zelf een belangrijke voedselbron voor predatoren, zoals vissen.
- De levenscyclus is ideaal voor experimenten op stress- en genetische respons. De reproductietijd is korter dan bij de meeste andere eukaryotische modelorganismen. Ze zijn

eenvoudig te kweken in kleine volumes medium en bereiken het adult stadium in 5-10 dagen, waardoor onderzoek naar adaptatie en acclimatisatie binnen een korte tijdsperiode mogelijk is

- Door de asexuele parthenogenetische voortplanting is het mogelijk om constante klonale lijnen te produceren en genetische variatie uit te sluiten. Dit biedt de mogelijkheid responsen van verschillende klonale lijnen op te volgen en zo nauwkeuriger de toxische werking van een stof te achterhalen.
- Populaties zijn duidelijk begrensd en bestaan uit een groot aantal individuen. Bovendien komen deze species wereldwijd voor, wat hun ecologische relevantie doet toenemen.
- De moleculaire fylogenie van het genus *Daphnia* maakt vergelijking mogelijk met andere genomen. De grote database van de fruitvlieg *Drosophila melanogaster* vereenvoudigt daarbij het genoomonderzoek.
- Zoöplankton is in het bijzonder gevoelig voor stress vanuit het milieu. *Daphnia magna* is bijvoorbeeld heel gevoelig voor cadmium.
- Het transparant zijn van de organismen gedurende de hele levenscyclus maakt het mogelijk om genexpressie in bepaalde specifieke weefsels te bestuderen.
- De rusteieren, geproduceerd tijdens de seksuele voortplanting, kunnen voor lange perioden bewaard blijven.

Andere algemenere redenen waarom met modelorganismen gewerkt wordt, kunnen eveneens aangehaald worden. Ondanks slechts verre verwantschap lijken de biochemische processen in verschillende organismen dikwijls zeer sterk op elkaar. Het voedsel dat ze bijvoorbeeld consumeren wordt grosso modo omgezet naar dezelfde chemische moleculen, nodig voor groei en reproductie. De biochemische processen op cellulaire en moleculaire schaal zijn zo vergelijkbaar, doordat veel genen in de genomen overeenkomst vertonen met elkaar. Processen onderzocht in lichaamscellen van fruitvliegen, e.a. kunnen ook teruggevonden worden bij de mens en andere organismen. Dit onderzoek levert dus een bijdrage aan de toxicologische kennis bij mens en dier. Guilhermino *et al.* (2000) stellen dat acute toxiciteitstesten met *Daphnia magna* een alternatief voor zoogdieren kunnen vormen in de prescreening naar chemische toxiciteit.

Al deze voordelen komen in het wetenschappelijk onderzoek echter te vervallen indien geen standaardisatie doorgevoerd wordt. Naast verschillen in gevoeligheid tussen verschillende individuen zijn er ook verschillen in gevoeligheid al naargelang de gebruikte kloon of populatie. Daarnaast hebben ook omgevingscondities zoals de voeding van de ouder een invloed op de gevoeligheid van het nageslacht (Naylor *et al.*, 1992). Doorgedreven standaardisatie is dus noodzakelijk om onderling verschillende resultaten te kunnen vergelijken en nuttige besluiten te kunnen trekken (Bradley *et al.*, 1993).

3. Materiaal en methoden

3.1. DNA-methylatie

Amplification of intermethylated sites (AIMS) is een moleculaire techniek die toelaat methylatiepatronen van DNA in kaart te brengen en werd voor het eerst beschreven in 2002 door Frigola *et al.* Zij beschreven de techniek voor detectie van methylatie in humane kankerweefsels. Sindsdien werd hij al in een aantal andere toepassingen gebruikt, echter een beschrijving voor toepassing met *Daphnia magna* ontbreekt nog. Daarom werd in de eerste plaats gestreefd naar een optimalisatie van het protocol voor *Daphnia* uitgaande van de originele beschrijving. Teneinde de kans op methylatiedetectie te verhogen, werden in het experiment verschillende restrictie-enzymen toegepast, evenals verschillende primers bij de PCR-amplificatie. Een mogelijks gemethyleerd restrictiefragment werd vervolgens uit de gelblot geëxtraheerd, gekloneerd, gesequeneerd en via blasting vergeleken met bestaande genen en genfragmenten. Meer informatie over de sequentie waarvan het fragment afkomstig is, werd opgespoord door Genome Walking, daar het volledige genoom van *Daphnia magna* nog onbekend is. Wederom werd, na sequentie, d.m.v. blasting getracht de functie en eigenschappen van de gevonden sequentie te achterhalen. Tenslotte vond een laatste stap plaats om de methylatiestatus van het volledige fragment te bepalen. Dit werd gedaan met behulp van een bisulfietsequencing.

3.1.1. Amplification of intermethylated sites (AIMS)

Door vergelijking van de methylatiepatronen kunnen veranderingen in de methylatiestaat van het DNA aan het licht gebracht worden bij organismen in verschillende situaties. De methoden wordt toegepast op geëxtraheerd DNA, dat achtereenvolgens twee restrictiedigesties, adaptorligatie en PCR-amplificatie ondergaat.

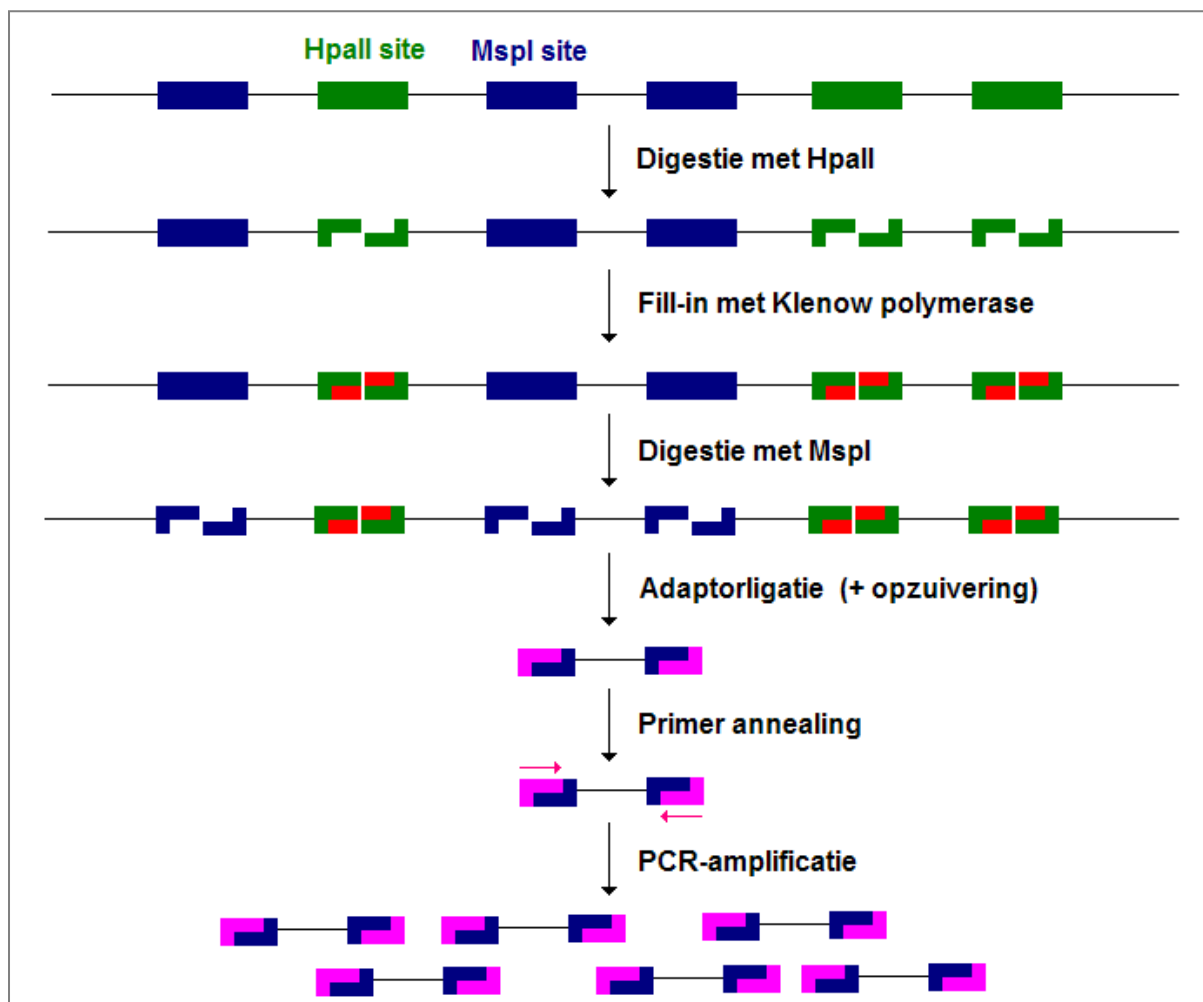
De werking van de techniek gaat of staat met de keuze van 2 restrictie-enzymen, die dezelfde herkenningssite hebben, maar waarvan het ene methylatiegevoelig is en *blunt ends* knipt, terwijl het andere methylatieongevoelig is en *sticky ends* knipt. In onze experimenten werd gebruik gemaakt van de tetracutters HpaII en MspI, die beide de sequentie 5'-CCGG-3' herkennen en *sticky ends* knippen. HpaII is methylatiegevoelig, terwijl MspI methylatieongevoelig is.

Eerst wordt een digestie uitgevoerd met HpaII en wordt het DNA dus enkel op de herkenningsplaatsen waar de C op CpG niet gemethyleerd is, *sticky* geknipt ($5'-C^{\vee}CGG-3'$ / $3'-GGC_{\wedge}C-5'$). Deze

sticky overhang wordt *blunt* gemaakt door invulling met het Klenow-polymerase. Vervolgens wordt er op hetzelfde DNA een digestie uitgevoerd met MspI. De ongemethyleerde sequenties die reeds werden geknipt door HpaII blijven onaangeroerd, maar alle andere herkenningsplaatsen waar de C op de CpG gemethyleerd is, worden *sticky* geknipt (figuur 3.1.).

Hierop volgt een ligatiereactie met adaptors die de *sticky end* overhang, achtergelaten door MspI, aanvullen en een specifieke sequentie bevatten waarop de primer voor de PCR-reactie kan binden. Door ligatie met deze specifieke adaptors zullen tijdens de PCR-reactie enkel DNA fragmenten gelegen tussen 2 gemethyleerde restrictiesites geamplificeerd worden (figuur 3.1.). De primer bevatte één of twee selectieve nucleotiden om het aantal verkregen bandjes op de gel te beperken. Door deze fragmenten op gel te scheiden wordt een bandenpatroon verkregen, dat vervolgens tussen stalen onderling vergeleken kan worden.

Het voordeel van de AIMS techniek schuilt vooral in de technische eenvoud en het feit dat er weinig startmateriaal nodig is. Mogelijke nadelen doen zich voor wanneer het fragment gelegen tussen twee gemethyleerde restrictiesites te groot is om door de PCR-reactie geamplificeerd te worden (amplificatie is enkel effectief wanneer 2 primersites niet meer dan 1400 à 1500 baseparen van elkaar verwijderd zijn) of wanneer digestie met HpaII onvolledig is, waardoor het MspI ook ongemethyleerde sites knipt.



Figuur 3.1. Schematische weergave van de AIMS techniek. Het geëxtraheerde DNA wordt geknipt met HpaII, waarna de achtergelaten sticky ends opgevuld worden door het Klenow polymerase. Vervolgens wordt het DNA geknipt met MspI. Aan deze sticky ends worden adaptors geligiert die dienst doen als annealingssite voor de primers in de daaropvolgende PCR-amplificatie.

3.1.2. DNA-extractie

DNA-extractie gebeurde met behulp van de MasterPure DNA purification kit (Epicentre). Voor meer details dan onderstaand beschreven, wordt dan ook verwezen naar het protocol ingesloten bij de kit.

De stalen werden gedurende de verschillende stappen zoveel mogelijk op ijs bewaard.

De *Daphnia magna* organismen waaruit het DNA geëxtraheerd werd, zijn afkomstig van een blootstellingsexperiment aan het Laboratorium voor Milieutoxicologie en Aquatische Ecologie dat liep in mei en juni 2007. Er werden zowel adulte (21 dagen of ouder) als juveniele (4 dagen oud) organismen gebruikt die hetzij in standaard M4 medium, hetzij in M4-medium met 180 µg/L cadmium gekweekt waren gedurende twee of drie generaties.

3.1.3. Restrictiedigestie met HpaI en MspI

Eerst werd er een restrictiedigestie uitgevoerd met het methylatie-gevoelige restrictie-enzyme HpaI. Hiertoe werd 1 µg genomische DNA (x µL) gemixt met 1,5 µL 10x Nebuffer1 (New England Biolabs), 1 µL HpaI (10U/µL) (New England Biolabs), en (12,5 – x) µL bigedesioniseerd water. Deze mix werd na downspinnen gedurende 16h geïncubeerd bij 37°C. Hierna werd aan de digestiemix 1 µL Klenow (2 U/µL, Biolabs) en 1,5 µL 500 µM dNTPs toegevoegd om de *sticky ends* die HpaI achterlaat aan te vullen. Deze mix werd wederom gedurende 15 minuten geïncubeerd bij 37°C, waarna de reactie gestopt werd door de mix gedurende 10 minuten bij 75°C te plaatsen.

Vervolgens werd 0,5 µL MspI (20 U/µL, New England Biolabs), 0,75 µL 10x Nebuffer2 (New England Biolabs) en 6,25 µL bigedesioniseerd water aan de mix toegevoegd, zodat een finaal volume van 25 µL per staal bekomen werd. Na incubatie bij 37°C gedurende 6h, werd de reactie beëindigd door de mix gedurende 20 minuten bij 65°C te plaatsen.

3.1.4. Adaptorligatie

Voordat adaptorligatie kon plaatsvinden, dienden de adaptors voorbereid te worden door ligatie van twee oligonucleotiden aan elkaar. De twee oligonucleotiden, ADPT B-GC (5'-CGTCAGAGCTTTGCGAAT-3', 18 bp, 100 µM, Eurogentec) en ADPT-B (5'-ATTCGCAAAGCTCTGA-3', 16 bp, 100 µM, Eurogentec), werden in een 1/1-verhouding samengevoegd. Dit mengsel werd geïncubeerd gedurende 2 minuten bij 65°C en daarna gedurende 30 tot 60 minuten bij kamertemperatuur. Door deze behandeling liederden de twee oligonucleotiden aan elkaar.

Vervolgens werden de door MspI gecreëerde *sticky ends* met de aangemaakte adaptor geligeerd. De samenstelling van de ligatiemix (tot. vol. = 80 µL) voor 1 staal was als volgt:

- 20 µL adaptor (100 µM, Eurogentec)
- 2 µL T4 DNA ligase (New England Biolabs)
- 8 µL 10x T4 ligase buffer (New England Biolabs)
- 25 µL DNA-mix

- 25 µL bigedesioniseerd water

Het reactiemengsel werd gedurende 16h geïncubeerd bij 16°C, waarna de reactie stopgezet werd door incubatie bij 65°C gedurende 10 minuten.

3.1.5. Purificatie

Het ligatieproduct bekomen uit bovenstaande adaptorligatie werd voor bepaalde stalen opgezuiverd door middel van de QIAquick PCR purification kit (Qiagen). Voor uitvoering van de purificatie wordt verwezen naar het protocol beschikbaar bij de kit.

3.1.6. HOT-PCR

Door middel van een HOT-PCR of radioactieve PCR-reactie werden de inter-methylated sites geamplificeerd. Hierbij werden voor de PCR-reactie de primers radioactief gelabeld met ^{33}P . In ons experiment werd slechts gebruik gemaakt van 1 primer die zowel als *forward*- en reverse-primer dienst deed. Verschillende primers werden gedurende het experiment getest (zie 4.1.1.).

Na de PCR-reactie werden de amplificatieproducten gescheiden door middel van polyacrylamide gelelektroforese (PAGE) en werden de fragmenten gedetecteerd via autoradiografie of *fosfo-imaging*.

3.1.6.1. Primer- en ladderlabeling

De radioactieve labeling gebeurde met het ^{33}P isotoop (β -straler met $T_{1/2} = 25,4$ dagen) onder de vorm van $\gamma^{33}\text{P}$ -ATP.

De primer werd radioactief gelabeld via een zogenaamde “*forward*”-reactie met behulp van het T4 polynucleotidekinase (PNK) (Fermentas), afkomstig uit de bacteriofaag T4 (figuur 3.2.). Het PNK is een polynucleotide 5' hydroxylkinase dat de tranfer katalyseert van de gamma-fosfaat van $\gamma^{33}\text{P}$ -ATP naar het 5'OH uiteinde van de primer.

De reactiemix (tot. vol. = 0,5 µL) nodig voor de hoeveelheid primer voor 1 staal was als volgt samengesteld:

- 0,1 µL primer (10 µM, Fermentas)
- 0,1 µL $\gamma^{33}\text{P}$ -ATP (10 mCi/ml, GE Healthcare)
- 0,01 µL T4 polynucleotidekinase (10U/µl, Fermentas)
- 0,05 µL reactiebuffer A (10x, Fermentas)
- 0,24 µL bigedesioniseerd water

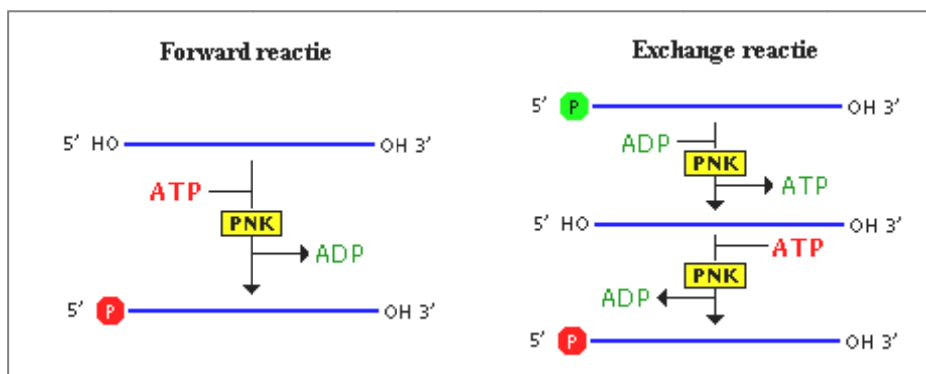
Deze reactiemix werd gedurende 45 minuten bij 37°C geïncubeerd, waarna het PNK geïnactiveerd werd door incubatie bij 80°C gedurende 10 minuten.

Ook de 25bp ladder (Invitrogen) werd radioactief gelabeld. Deze labeling gebeurde nu echter via een “exchange”-reactie waarbij de aanwezige 5' fosfaat wordt vervangen door de gamma-fosfaat van $\gamma^{33}\text{P}$ -ATP (figuur 3.2.). In tegenstelling tot de “forward”-reactie vond deze reactie plaats in een andere buffer die ADP bevatte.

De reactiemix (tot. vol. = 1,5 μL) nodig voor de hoeveelheid ladder voor 1 laantje was als volgt samengesteld:

- 0,6 μL 25bp ladder (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, Invitrogen)
- 0,36 μL $\gamma^{33}\text{P}$ -ATP (10 mCi/ml, Amersham Biosciences)
- 0,075 μL T4 polynucleotidekinase (10U/ μL , Fermentas)
- 0,15 μL reactiebuffer B (10x, Fermentas)
- 0,315 μL polyethyleenglycol PEG6000 (24% (w/v), Fermentas)

Deze reactiemix werd eveneens gedurende 45 minuten bij 37°C geïncubeerd, waarna het PNK geïnactiveerd werd door incubatie bij 80°C gedurende 10 minuten.



Figuur 3.2. Forward en exchange reactie van het Polynucleotide Kinase (PNK), naar <http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hbooks/genetics/biotech/enzymes/pnk.html>

3.1.6.2. PCR-amplificatie

De reactiemix (tot. vol. = 15 μL) nodig voor 1 staal had volgende samenstelling:

- 5 μL DNA (ongeveer 5 ng/ μL)
- 0,2 μL Taq-polymerase (5U/ μL , Fermentas)
- 0,5 μL dNTP's (10 mM, Promega)
- 1,5 μL PCR buffer zonder MgCl_2 (25mM, Fermentas)
- 0,5 μL MgCl_2 (50 mM, Fermentas)
- 0,5 μL radioactief gelabelde primer (10 μM , Fermentas)
- 6,8 μL bigedestioneerd water

Het volgende PCR-programma werd doorlopen:

- 5 min bij 94°C
- 30 cycli: 1 min bij 94°C
1 min bij 50°C
1 min bij 72°C
- 8 min bij 72°C
- hold bij 4°C

Na de reactie werd aan ieder staal 15 µL formamide ladingsbuffer toegevoegd om de reactie te stoppen, waarna de PCR buisjes afgedekt werden met aluminium tape en gedurende de nacht bij -20°C bewaard werden.

De samenstelling van de formamide ladingsbuffer was:

- 10 mM EDTA op pH 8 (bereid met EDTA (Acros Organics), bigedesioniseerd water en NaOH om de pH op 8 te stellen)
- 98% formamide (Vel)
- 0,06% bromofenolblauw (Vel)
- 0,06% xyleencyanol (Merck)

Vóór het laden op de gel werden de stalen en de ladder gedurende 5 minuten gedenatureerd bij 95°C.

3.1.7. Polyacrylamide gelelektroforese (PAGE)

3.1.7.1. Bereiden van de geloplossing

De geloplossing had volgende samenstelling:

- 450 g ureum (Acros Organics)
- 125 mL acrylamide:bisacrylamide 19:1 (Rotiphorese Gel 40 (19:1), Carl Roth GmbH)
- 1 tot 2 lepels Amberlite (Resin, Bio-Rad)

Aan deze componentenmix werd bigedesioniseerd water toegevoegd tot een volume van 800 mL. Vervolgens werd het mengsel in een warmwaterbad bij 60-70°C geplaatst en regelmatig goed geschud tot alle ureum opgelost was. Amberlite is een ionen-complexator die ionen uit de oplossing wegvangt en zo het oplossen van het ureum helpt te bevorderen.

De oplossing werd vervolgens gefiltreerd om het Amberlite te verwijderen. Hierna werd 100 mL 10x TBE en 4 mL 0,5 M EDTA (pH 8) toegevoegd. Het geheel werd tenslotte met bigedesioniseerd water aangevuld tot een volume van 1 liter.

Samenstelling 10x TBE:

- 108 g Tris-Base (MW 121, Acros Organics)
- 55 g boorzuur (Sigma-Aldrich)
- 5,8 g EDTA (Sigma-Aldrich) of 40 mL 0,5 M EDTA (pH 8)
- aanvullen tot een volume van 1 liter met bigedestilleerd water

De geloplossing werd bewaard bij 4°C.

3.1.7.2. Gieten van de gel

De elektroforetische scheiding van de fragmenten volgens grootte vindt plaats in een gelcassette, de Sequi-Gen GT Sequencing Cell van de firma Bio-Rad. Spacers, glas- en bufferplaat werden eerst grondig gereinigd met ethanol (Merck), waarna de bufferplaat gecoat werd RAINIX (Pennzoil Benelux) en de glasplaat met aceton (Merck). Deze stap is belangrijk om later de gel gemakkelijk en zonder beschadiging tussen de twee platen uit te verwijderen. RAINIX gedraagt zich hydrofoob, terwijl aceton zich meer hydrofiel gedraagt.

Glas- en bufferplaat werden vervolgens op elkaar gelegd met de spacers tussen beiden ingeklemd. Het geheel werd aan elkaar vastgemaakt door het aanbrengen van 2 klemmen. De cassette werd onderaan afgedicht met een hulpstuk en 2 spanschroeven. De gelcassette werd vervolgens horizontaal neergelegd.

Met behulp van een spuit en een darmpje werd het gelmengsel achteraan in de cassette langzaam ingespoten. Hierbij werd speciale aandacht besteed aan het vermijden van luchtbelletjes in de spuit en het darmpje. Het ingespoten gelmengsel had volgende samenstelling:

- 100 tot 110 mL geloplossing (zie 3.1.7.1.)
- 100 L N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED, Amersham Biosciences)
- 500 L 10% ammoniumpersulfaat (APS, Amersham Biosciences)

De geloplossing werd ingespoten totdat ze de bovenkant van de glasplaat passeerde.

Vervolgens werd een kam omgekeerd tussen glas- en bufferplaat geplaatst om in de gel een opening uit te sparen om later het laden van de gel mogelijk te maken. Ook hier werd weer aandacht besteed aan het vermijden van luchtbelletjes bij de plaatsing.

Na het plaatsen van de kam werden bovenaan de platen en de kam tegen elkaar gedrukt met behulp van een aantal klemmen die op de platen gezet werden en werd het teveel aan gelmengsel verwijderd. De gel polymeriseerde gedurende minstens een half uur.

Indien de gel overnacht polymeriseerde, werd nat papier aan het begin van glas- en bufferplaat aangebracht en werd de bovenste opening van de cassette afgedicht met plasticfolie om uitdroging van de gel tegen te gaan.

3.1.7.3. *Laden en lopen van de gel*

Na de polymerisatie van de gel werd 2 liter 1x TBE-buffer bereid. Hieraan werd 8 mL 0,5 M EDTA (pH 8, Sigma-Aldrich) toegevoegd. Ongeveer 400 mL van deze oplossing werd in een container gegoten, waarin vervolgens de gelcassette verticaal geplaatst werd. De overige 1600 mL werd gedurende 5 minuten in een microgolfoven verwarmd (900 W). Deze warme buffer werd bovenaan in de buffertank gegoten, waarna de omgekeerde kam voorzichtig werd verwijderd. Restjes polyacrylamide werden verwijderd en met behulp van een spuit met bufferoplossing werd ureum verwijderd dat zich in de door de omgekeerde kam achtergelaten uitsparing tussen glas- en bufferplaat bevond.

De gel werd vervolgens gedurende minstens 30 minuten voorverwarmd bij 100 W, geleverd door een Bio-Rad PowerPac 3000 (Bio-Rad), tot een temperatuur van ongeveer 50°C.

Na deze “pre-run” werd opnieuw ureum verwijderd met behulp van een spuit met bufferoplossing en werd een kam met de tandjes in de richting van de gel in de uitsparing bovenaan de gel geplaatst.

De stalen en ladder werden na 5 minuten denaturatie bij 95°C tussen de tandjes van de kam geladen. Gedurende het laden werden de stalen op ijs bewaard om renaturatie te voorkomen.

De hoeveelheid geladen staal hing af van het aantal openingen in de kam. Meestal werd een kam met 72 openingen gebruikt waarin 3,5 µL staal geladen werd. Bij kleinere stalensets werd bij voorkeur gebruik gemaakt van een kam met 48 openingen waarin 5 µL staal geladen werd. Bij grotere stalensets kon eventueel gebruik gemaakt worden van een kam met 96 openingen waarin 2,5 µL staal geladen werd.

Na het laden werd de Bio-Rad PowerPac 3000 (Bio-Rad) ingesteld op 110 W en werd de gel voor ongeveer 5 uur gelopen. Hierbij werd aandacht besteed aan de spanning die over de gel kwam te staan. Bij een spanning hoger dan 2000 V werd de gel als waardeloos afgedaan.

3.1.7.4. *Na de elektroforese*

Na het lopen van de gel werd de buffertank geleegd, werd de gelcassette neergelegd en werden de twee platen voorzichtig van elkaar losgemaakt door de bufferplaat opwaarts te duwen. Bij een goede coating bleef de gel op de glasplaat achter.

Op de gel werd een Whattman papier gelegd waardoor de gel door het voorzichtig wegtrekken van het papier verwijderd kon worden (de gel bleef op het papier achter). Het papier met de gel werd vervolgens afgedekt met plasticfolie en gedurende 2h bij 80°C gedroogd in een vacuümdroger (model 583, Bio-Rad) aangesloten op een vaccuümpomp (HydroTech vaccuümpomp (Bio-Rad)).

Na het drogen werd de plasticfolie verwijderd en werd de radioactiviteit gemeten met behulp van een Geiger-Müllerteller (Mini900 Ratemeter, SercoLab). Indien de radioactiviteit meer dan 5 counts per seconde bedroeg, werden de fragmenten gedetecteerd via autoradiografie door de gelblot in een donkere kamer in een lichtdichte cassette te plaatsen met een gevoelige film (Scientific Imaging Film X-OMATTM LS, Kodak). Deze film werd na 2 tot 3 dagen (afhankelijk van de radioactiviteit) ontwikkeld met een Medical Film Processor (model FPM-100A, FUJI). Indien de radioactiviteit echter minder dan

5 counts per seconde bedroeg, werd geopteerd om de film in een donkere kamer in een lichtdichte cassette met een *fosfo-imaging* plaat (BAS cassette 2 3543, FujiFilm) te leggen. Na 1 of 2 dagen (afhankelijk van de radioactiviteit) werd de plaat ingescand met een scanner (FLA-5100 imaging system, Fujifilm), waarna een digitaal beeld van de gel verkregen werd met MultiGauge Image Analysis software (Fujifilm). In de meeste gevallen werden echter beide methoden toegepast, daar de *fosfo-imaging* plaat gevoeliger is dan de klassieke film, maar de klassieke film minder achtergrondruis geeft.

3.1.8. Klonering

Om voldoende grote aantallen te verkrijgen om sequenceren toe te laten, werd het fragment vermenigvuldigd d.m.v. klonering. Hiertoe werd het fragment eerst geligeerd in een pGEM-T vector (Promega) door 3 μL PCR-product zo snel mogelijk na de geleextractie samen te voegen met 1 μL pGEM-T vector, 1 μL ligase (Promega) en 5 μL ligase buffer (Promega). Deze mix werd gedurende de nacht geïncubeerd bij 4°C.

Vervolgens werd de vector d.m.v. heat-shock transformatie in competente *E. coli* cellen gebracht. Hiertoe werd 5 μL van het ligatiemengsel toegevoegd aan 50 μL competente cellen. Deze mix werd gedurende 10 minuten op ijs geïncubeerd om hem vervolgens gedurende 90 seconden in een warmwaterbad bij 42°C te zetten. Daarna werd de mix weer zo snel mogelijk op ijs gebracht. Vervolgens werd aan de mix 900 μL SOC-medium toegevoegd. Dit werd tenslotte gedurende 60 minuten bij 37°C op een schudder geplaatst.

Hierna werd de vloeibare cultuur uitgeplaat op LB⁺-medium met carbenicilline (100 $\mu\text{g/mL}$). Het LB-medium werd bereid door 12,5 g LB Broth High Salt (Duchefa Biochemie) en 7,5 g agar (Acros Organics) op te lossen in 0,5 L bigedesioniseerd water. Op het medium werd eerst 20 μL X-gal (50 mg/mL opgelost in dimethylformamide, Fermentas) aangebracht om later d.m.v. blauw/wit screening het selecteren van de juiste kolonies toe te laten. De uitgeplaatte cultuur werd gedurende de nacht bij 37°C geplaatst.

In een laatste stap werd een kolonie-PCR uitgevoerd. Witte kolonies (die het fragment ingebouwd hadden) werden geselecteerd, gemarkeerd en opgepikt door met een steriel tipje zachtjes langs de kolonie te wrijven en het vervolgens in 10 μL bigedesioniseerd water te brengen. Per staal werd de volgende PCR-mix hieraan toegevoegd: 3 μL 10x PCR-buffer (met KCl, Fermentas), 1 μL dNTPs (5 mM, Promega), 1 μL SP6-primer (10 μM , Invitrogen), 1 μL T7-primer (10 μM , Invitrogen), 1 μL MgCl_2 (25mM, Fermentas), 0,1 μL Taq-polymerase (5 U/ μL , native, zonder BSA, Fermentas) en 12,9 μL bigedesioniseerd water. Het volgende PCR-programma werd doorlopen:

- 1 min 94°C
- 35 cycli: 20 sec 94°C
30 sec 52°C
2 min 72°C
- hold bij 16°C

Na de PCR-reactie werden de stalen geladen op een 1,5% agarose-gel (1,5 g agarose (Invitrogen Life Technologies) in 100 mL 0,5x TAE-buffer). De gel werd gedurende ongeveer 20 minuten gelopen in 0,5x TAE-buffer bij 100 V. Het resultaat werd na kleuring met EtBr bekeken onder UV licht m.b.v. Bio-Rad Universal Hood II (Bio-Rad).

Samenstelling 10x TAE-buffer:

- 48,5 g tris(hydroxymethyl)aminomethaan, DNase, Rnase, protease free (Tris, Acros Organics)
- 2,9 g ethyleendiaminetetra-azijnzuur (EDTA), dinatriumzoutdihydraat (Acros Organics)
- aanvullen met azijnzuur 99-100% (Vel) tot pH 8,3
- aanvullen met bigedesioniseerd water tot 1 L

Kolonies die het fragment bleken te bevatten werden volledig opgepikt met een steriele tip, dewelke vervolgens in een falconbuis met 2 mL LB⁺-medium met carbenicilline (100 µg/mL) gedurende de nacht en bij 37°C op een schudder geplaatst werd.

3.1.9. Miniprep

Het plasmide met het gewenste fragment werd uit de kloon verwijderd door middel van de NucleoBond AX kit (Macherey-Nagel) en het bijhorende “Plasmid DNA Purification” - protocol.

3.1.10. Gelextractie

Fragmenten uit de gelblot bekomen na uitvoering van de AIMS procedure (zie 3.1.1.) werden uitgesneden en gedurende een nacht in 100 µL bigedesioniseerd water en bij 4°C bewaard om het DNA terug in oplossing te brengen. Daar deze DNA-fragmenten de adaptors geligeerd tijdens AIMS (zie 3.1.1.) nog bevatten, kon het door middel van dezelfde PCR-reactie gebruikt gedurende AIMS geamplificeerd worden (zie 3.1.6.2.).

Gelextractie van bandjes uit een agarosegel werd uitgevoerd gebruik makend van de QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) en het bijhorende protocol (gebruik makend van een centrifuge).

3.1.11. Genome Walking

De aanpalende sequenties aan het geëxtraheerde bandfragment werden bepaald d.m.v. genome walking, daar het genoom van *Daphnia magna* nog niet volledig gekend is. De genome walking werd uitgevoerd met de BD GenomeWalkerTM Universal Kit van BD Biosciences Clontech en het bijhorende

protocol. Een kleine aanpassing aan de PCR-programma's t.o.v. deze in het protocol werd doorgevoerd. De doorlopen programma's waren de volgende:

- PCR1: 25 x (35 s 94°C, 35 s 54°C, 1min40s 72°C) + hold bij 16°C
- PCR2: 35 x (35 s 94°C, 35 s 54°C, 1min40s 72°C) + hold bij 16°C

3.1.12. Sequencing

Sequencing gebeurde door het VIB (Antwerpen) voor de fragmenten die na de AIMS procedure uit de gelblot geëxtraheerd werden en door de firma Agowa (Berlijn) voor de fragmenten die na Genome Walking gedetecteerd werden.

3.1.13. Bisulfiet sequencing

Om zo zuiver mogelijk DNA te bekomen, werden het geëxtraheerde DNA uit de organismen in een extra stap behandeld met RNase (RiboShredder Rnase Blend, Epicentre) volgens het bijgevoegde protocol van de leverancier.

Vervolgens werd het genomisch DNA mechanisch in stukken gebroken d.m.v. een 30G naald (Microlance3 naald 30G ½", BD Medical Systems). Hiertoe werd 2,5 µL lysisbuffer gemixd met 2 µg DNA en aangelengd met bigedesioniseerd water tot een eindvolume van 25 µL. Deze mix werd gedurende 30 minuten geïncubeerd bij 37°C om vervolgens 5 maal voorzichtig door een 30G naald gepasseerd te worden. Na deze passage volgde een tweede incubatieperiode van 30 minuten bij 37°C. De lysisbuffer bestond uit 4 µL 500 µg/µL tRNA (25 mg, Fluka), 14 µL 20 mg/mL proteïnase K (50 µg/µL, EpiCentre), 50 µL SDS 20% (Sigma) en 32 µL bigedesioniseerd water.

Voor de bisulfietbehandeling werd verder gewerkt met 18 µL van het opgebroken DNA, waaraan eerst 2 µL 3M NaOH toegevoegd werd om vervolgens gedurende 15 minuten bij 37°C geïncubeerd te worden. Ondertussen werd de bisulfietoplossing (MBS) en een quinole-oplossing bereid. Voor de MBS-oplossing werd 7,6 g Natrium Metabisulfiet (Carlo Erba, RPE) afgewogen en opgelost in 17 mL bigedesioniseerd water. Vervolgens werd hieraan 416 µL 10M NaOH toegevoegd. De quinole-oplossing werd bereid door 0,55 g quinole (Aldrich) opgelost in 50 mL bigedesioniseerd water. Deze oplossing werd vervolgens 10x verdund. Na de incubatie werd 208 µL MBS en 12 µL quinole (verdunding 1/10) toegevoegd. Het geheel werd afgeschremd van de lucht door 100 µL minerale olie (Sigma) toe te voegen zodat MBS niet afgebroken zou worden aan de lucht. Deze mix werd gedurende de nacht bij 55°C geïncubeerd.

Na opzuivering van het DNA met "GFX PCR DNA and gel band purification kit" (GE Healthcare) en oplossen van het DNA in 50 µL bigedesioniseerd water, werd aan het staal 5 µL 3M NaOH toegevoegd om tot desulfinitie te komen. Neutralisatie werd bekomen door de helft van het volume staal (27,5 µL) NH₄Oac toe te voegen. Precipitatie tenslotte werd gestart door 350 µL absolute ethanol

(VWR, *molecular graded*) toe te voegen en het staal gedurende de nacht bij -20°C te incuberen. Hierna volgde gedurende 15 minuten centrifugatie bij 4°C op maximum toerenaantal. Ethanol werd verwijderd en het staal werd gedroogd aan de lucht op kamertemperatuur en vervolgens gehersuspendeerd te worden in 50 µL bigedesioniseerd water.

Vervolgens werd een PCR-reactie uitgevoerd met behulp van degeneratieve primers (zie 4.1.4.). Hiertoe werd aan 4 µL staal de volgende reagentia toegevoegd: 5 µL 10x PCR buffer (met KCl, Fermentas), 3 µL MgCl₂ (25mM, Fermentas), 2 µL dNTPs (5mM, Promega), 0,2 µL Taq polymerase (5 U/µL, native, zonder BSA, Fermentas), 2,5 µL primers (Eurogentec Genomic Oligo) en 33,3 µL bigedesioniseerd water. Om de optimale annealingstemperatuur te bepalen werd een gradiënt PCR opgezet gaande van 45,9°C tot 60,1°C. De PCR condities waren de volgende:

- 5 min 95°C
- 40 cycli: 30 s 95°C (denaturatie)
1 min annealing (gradiënt)
45 s 72°C (elongatie)
- 7 min 72°C

3.2. Kweek van *Daphnia magna* Straus

3.2.1. Standaard kweekprocedure stamkloon

De gekweekte *Daphnia magna* zijn oorspronkelijk afkomstig van een zoetwaterput in Kallo (1984). Een beperkt aantal organismen werden gekloond en op basis van parthenogenetische voortplantingsresultaten werd 1 *strain* weerhouden, nl. kloon K6. De kweek gebeurde volgens de standaardprocedures van het Laboratorium voor Milieutoxicologie en Aquatische Ecologie.

3.2.2. Algenkweek

De algenkweek van *Pseudokirchneriella subcapitata* en *Chlamydomonas reinhardtii* gebeurde volgens de standaard methode in het Laboratorium voor Milieutoxicologie en Aquatische Ecologie.

3.2.3. Aanmaak media

3.2.3.1. Blancomedium

Als kweekmedium voor de experimentele cultuur werd geopteerd voor een gemodificeerd M4-medium, dat in tegenstelling tot het originele M4-medium (Elendt & Bias, 1990) geen EDTA of Fe bevat. M4

medium wordt beschouwd als een goed kweekmedium voor *Daphnia magna*. Naast EDTA bevat het eveneens macronutriënten, vitamines en sporenelementen. De aanwezigheid van deze laatste maakt dat de organismen een goede reproductie en weinig mortaliteit kennen.

In plaats van EDTA, werd natuurlijk DOC (*Dissolved Organic Carbon*), via omgekeerde osmose bekomen uit natuurlijk water afkomstig uit Bihain (België), toegevoegd. EDTA interageert met de macronutriënten en sporenelementen die eveneens in het medium aanwezig zijn. Zo complexeert het onder andere calcium. Zink wordt eveneens sterk door EDTA gecomplexed. Hierdoor zouden in het medium te hoge en minder ecologisch relevante zinkconcentraties nodig zijn om een toxisch effect te bewerkstelligen. Natuurlijk DOC bezit ook zinkchelerende eigenschappen, maar deze zijn geringer.

De uiteindelijke samenstelling van het medium wordt weergegeven in tabel 3.1.

Tabel 3.1. Samenstelling gemodificeerd M4 medium.

Component	Concentratie (mg/L)
natuurlijk DOC	4
H ₃ BO ₃	2,8595
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,3605
LiCl	0,3060
RbCl	0,0710
SrCl ₂ .6H ₂ O	0,1520
NaBr	0,0160
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,0630
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,0165
ZnCl ₂	0,0260
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0100
KI	0,0033
Na ₂ SeO ₃	0,0022
NH ₄ VO ₃	0,0006
CaCl ₂ .2H ₂ O	293,8
MgSO ₄ .7H ₂ O	123,3
KCl	5,8
NaHCO ₃	64,8
Na ₂ SiO ₃ .5H ₂ O	7,464
NaNO ₃	0,274
KH ₂ PO ₄	0,143
K ₂ HPO ₄	0,184
Thiamine	0,075
B12 Cyanocobalamine	0,001
Biotine	0,00075

Gedurende het experiment diende regelmatig nieuw medium aangemaakt te worden. Hiervan werd telkens de nominale zinkconcentratie opnieuw bepaald met behulp van atomaire absorptie spectrometrie. De nominale zinkconcentratie in de verschillende tonnen medium bedroeg $18,9 \pm 5,5$ $\mu\text{g Zn/L}$.

3.2.3.2. Zinkmedium

Aan het zinkmedium werd, naast alle componenten die ook in het blanco medium aanwezig waren, extra ZnCl_2 toegevoegd tot een nominale concentratie van 400 $\mu\text{g/L}$. Net zoals bij het blancomedium diende ook hier gedurende het experiment regelmatig nieuw medium aangemaakt te worden. De nominale zinkconcentratie in de verschillende tonnen medium bedroeg in dit geval $388,6 \pm 40,1$ $\mu\text{g Zn/L}$.

3.2.3.3. Referentiemedium

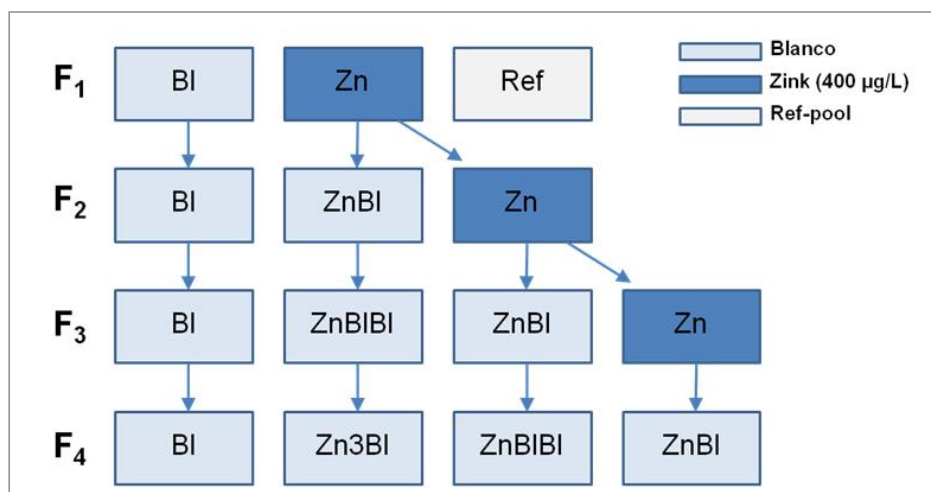
Als referentiemedium werd carbongefilterd leidingwater dat over een biofilter gepasseerd was, gebruikt. De nominale zinkconcentratie in het referentiemedium bedroeg $4,3 \pm 1,5$ $\mu\text{g Zn/L}$.

3.2.4. Experimentele kweek

3.2.4.1. Algemeen

In de experimentele kweek werd *Daphnia magna* gedurende vier opeenvolgende generaties in gecontroleerde labo-omstandigheden gekweekt. Hierbij werden de organismen aan verschillende omstandigheden ("behandelingen") blootgesteld, nl. aan blanco- of zinkmedium (zie 3.2.3.1. en 3.2.3.2.). Figuur 3.3. geeft weer hoe de verschillende behandelingen elkaar opvolgden gedurende de vier generaties.

Bij het opzetten van de eerste generatie organismen werden 0 tot 24 uur oude juveniele organismen afkomstig uit de standaard laboratoriumkweekcultuur gebruikt. De kweek gebeurde in plastic aquaria waarin ongeveer 10 mL medium per juveniel organisme (jonger dan 7 dagen) voorzien werd en 20 mL medium per adult organisme (ouder dan 7 dagen). Het kweken gebeurde in een gethermostatiseerde ruimte bij $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Een lichtintensiteit van 1000 Lux op het wateroppervlak van de aquaria werd verkregen d.m.v. TL-licht. De fotoperiode bedroeg 16h licht en 8h donker, geregeld door een tijds klok. Via een plastic darm aangesloten op een glazen pasteurpipet werd lucht in de aquaria geleid. Met behulp van een kraantje werd de luchtsnelheid geregeld tot ongeveer 10 luchtbellen per seconde (± 3 mL O_2/min). De gemiddelde zuurstofconcentratie in de aquaria bedroeg $8,44 \pm 0,96$ mg O_2/mL .



Figuur 3.3. Schematische weergave van de kweekopzet. Vooraan iedere rij staat de generatie weergegeven. Lichte blauwe kleur staat voor blanco medium in de aquaria, donkerblauwe voor zinkmedium en grijze kleur voor referentiemedium. In de blokken staat het verloop van de blootstellingscondities over de verschillende generaties weergegeven. In combinatie met de generaties vormen zij een unieke benaming voor ieder aquarium of “behandeling”. Deze benaming zal verder in deze scriptie gebruikt worden.

3.2.4.2. Opvolging reproductie

Per behandeling werden 10 ronde PVC frames, omgeven met zeefdoek met maaswijdte van 200 µm, in de aquaria geplaatst (figuur 3.4.). In ieder buisje werd 1 adult organisme geplaatst. In de buisjes golden dezelfde condities als in het aquarium.



Figuur 3.4. Buisjes gebruikt in de aquaria voor opvolging van de reproductie.

Drie keer per week, tijdens de verversing, werden de organismen gecontroleerd op mortaliteit en werden eventuele juvenielen geteld. Op basis van deze gegevens werden de netto reproductiesnelheid (R_0) en de intrinsieke groeisnelheid (r_m) berekend aan de hand van de formules van Lotka (1913):

$$R_0 = \sum_{x=0}^{21} l_x m_x$$

$$\sum_{x=0}^{21} l_x m_x e^{(-r_m \cdot x)} = 1$$

waarbij:

- l_x fractie van de organismen die overleven tot leeftijd x
- m_x aantal juvenielen geproduceerd per wijfje op leeftijd x
- x leeftijd in dagen

3.2.4.3. Verversing

Driemaal per week werd het medium verversed. De voornaamste reden hiervoor is het verwijderen van uitwerpselen, dode organismen en overtollige algen uit het kweekmedium omdat deze de optimale condities van het medium teniet kunnen doen.

Verversing gebeurde steeds door het opzuigen van de organismen met een plastieken pasteurpipetje en het overbrengen van de organismen in het nieuwe medium. Deze manier van werken bezorgt de organismen het minste stress en laat eveneens toe om het aantal organismen te tellen. Tijdens de verversingen werden eveneens de aquaria en de buisjes waarin de reproductie werd opgevolgd grondig uitgeschrobd en vijf maal nagespoeld met gedestilleerd water.

3.2.4.4. pH-meting en bepaling zink-, calcium- en magnesiumconcentratie

Teneinde een optimale leefomgeving voor de organismen te creëren dient de pH van het medium gelegen te zijn tussen 7 en 8. Veranderingen in deze pH kunnen veroorzaakt worden door metabolieten uitgescheiden door de organismen. Daarom werd het medium 3 keer per week vervangen. De pH is eveneens belangrijk voor de chemische evenwichten in het medium. De binding van metalen en sporenelementen met het DOC verandert in functie van de pH. Hoe zuurder, hoe meer vrije ionen in het medium zullen voorkomen en hoe meer er dus biobeschikbaar worden voor de organismen. Een toenemende hoeveelheid H^+ -ionen kunnen in competitie treden met de metaalionen voor de bindingsplaatsen op het DOC (Verloo *et al.*, 1999) waardoor deze laatste vrij in oplossing komen. Om een inschatting van dit alles te kunnen maken en controle te kunnen behouden, werd eenmaal per week de pH van de media na verversing van het medium gemeten. Eveneens werd er steeds een pH-meting gedaan vlak voor het verversen van de media. De gemiddelde pH in de aquaria bedroeg $7,34 \pm 0,17$ over alle generaties heen.

Als tweede controlefactor werd eveneens de werkelijk aanwezig vrije zinkconcentratie van het medium bepaald via atomaire absorptie spectrofotometrie. Hiertoe werd vlak voor het verversen (en eenmaal in de week na het verversen) een staal van de media genomen. Dit gebeurde met behulp van een 10

mL-spuutje, waarna het opgezogen medium gefilterd werd door een filter met poriëndiameter van 0,45 µm en aangezuurd werd tot een 1% HNO₃-matrix.

Een analoge werkwijze werd toegepast om de calcium- en magnesiumconcentratie in de media te bepalen. Deze concentraties laten toe om de hardheid van het medium te bepalen via de formules beschreven in “*Standard methods for the examination of water and wastewater*” (Clesceri *et al.*, 1998).

$$\text{Waterhardheid (mg equivalent CaCO}_3\text{/L)} = 2,497 \cdot [\text{Ca, mg/L}] + 4,118 \cdot [\text{Mg, mg/L}]$$

De waterhardheid van het medium bedroeg gemiddeld 46,74 mg equivalent CaCO₃/L.

3.2.4.5. Afzeving

Teneinde een scheiding te bekomen tussen adulten en juvenielen werden de organismen, maximaal 24 uur voor het opstarten van een nieuwe generatie, afgezeefd. Hierbij werd gebruik gemaakt van 2 zeven boven elkaar: een bovenste zeef met maaswijdte van 1400 µm en een onderste zeef met maaswijdte van 200 µm. Juveniele organismen bleven op de onderste zeef achter, terwijl adulte organismen reeds achterbleven ter hoogte van de bovenste zeef.

3.2.4.6. Voeding

De organismen werden iedere dag gevoerd met een algenmix bestaande uit *Pseudokirchneriella subcapitata* (voorheen *Selenastrum capricornutum*) en *Chlamydomonas reinhardtii* in een 3:1 verhouding. Telkens werd ervoor gezorgd dat de organismen na de voederbeurt steeds dezelfde drooggewichtconcentratie algen ter beschikking hadden. Hiertoe werd steeds voor iedere voederbeurt de nog aanwezige celconcentratie aan algenmix gemeten met behulp van de Coulter Counter (Z1 Coulter Particle Counter, Beckman Coulter) om te kunnen berekenen hoeveel extra algenmix de organismen nog dienden te krijgen, teneinde het drooggewicht aan algenmix na iedere voederbeurt constant te kunnen houden. Per juveniel organisme werd 197,13 µg DW toegediend, voor adulten bedroeg dit 1,5 keer zoveel, nl. 295,70 µg DW per adult organisme.

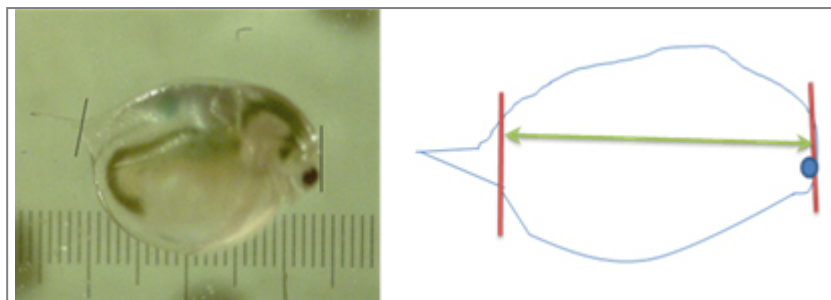
3.3. Meting van fysiologische eindpunten

3.3.1. Mortaliteit en reproductie

Driemaal per week, tijdens de verversing van het medium, werden de adulten en de juvenielen van elkaar gescheiden. Het aantal overlevende adulten en eventueel aanwezige juvenielen werd geteld.

3.3.2. Lengte

Drie maal per generatie (doorgaans op dag 6, 13 en “einde test”) werden per behandeling de lengte van tien organismen opgemeten met behulp van een binoculair en een millimeterlatje. De lengte werd bepaald als de rechte lijn tussen de basis van de *spine* en de top van het kopdeel (figuur 3.5.).



Figuur 3.5. Lengtebepaling van *Daphnia magna*.

3.3.3. Drooggewicht

Voor bepaling van het drooggewicht werden drie replica's van 10 juvenielen of twee replica's van 3 en een replica van 4 adulten uit de aquaria verzameld en gedurende 5 uur in referentiemedium geplaatst. Ze werden voorzien van eenzelfde voedselconcentratie als in de aquaria. Deze behandeling liet darmspoeling van de organismen toe (Gillis *et al.*, 2005). Hierna werden ze gedurende 20 minuten in een EDTA-oplossing (Na-EDTA, $5 \cdot 10^{-3}$ M, Fluka) geplaatst, waardoor het geadsorbeerde metaal verwijderd werd zodat alleen inwendige concentraties gemeten werden. Vervolgens werden ze in kleine aluminium kuipjes gedroogd in een oven bij 40°C gedurende minstens 2 dagen. Tenslotte werden ze gewogen met de Sartorius-balans (Sartorius-Werke GMBH, Göttingen).

3.3.4. Voedselopnamesnelheid

Per generatie werd drie keer (doorgaans op dag 6, 13 en “einde test”) de voedselopnamesnelheid gemeten. Hiervoor werden per behandeling 20 organismen genomen en in 5 replica's van 4 organismen in aparte 50 mL polyethyleen-testpotjes met 45 mL medium geplaatst. De wier- en zinkconcentratie waren identiek aan die in de aquaria. Telkens werd er ook, per behandeling, gezorgd voor een controlepotje waarin geen organismen werden uitgezet om de groei en uitzakking van de wieren gedurende het experiment in rekening te brengen (correctiefactor A).

Bij het begin van het experiment werd de wierconcentratie gemeten met behulp van de Coulter Counter (Z1 Coulter Particle Counter, Beckman Coulter). Na acht uur blootstelling in het licht werd de wierconcentratie opnieuw gemeten. Hieruit werd de filtratiesnelheid *F* (het volume medium dat gefiltreerd wordt door één organisme per tijdseenheid) en de ingestiesnelheid (het aantal cellen

geconsumeerd door één organisme in een specifiek tijdsinterval) berekend volgens de formules van Gauld (1951):

$$F = \frac{V}{n} \frac{(\ln C_0 - \ln C_t)}{t} - A$$

$$A = \frac{\ln C_0 - \ln C'_t}{t}$$

$$I = F \sqrt{C_0 \cdot C_t}$$

waarbij:

- C_0 en C_t initiële en finale voedselconcentratie (# cellen/ml)
- t de tijdsduur van het experiment
- n het aantal organisme per testpotje
- V het testvolume waarin de organismen zich bevinden
- A correctiefactor voor veranderingen in de voedselconcentratie in de controle
- C'_t finale voedselconcentratie in de controle

De filtratie- en ingestiesnelheden werden vervolgens omgerekend naar ml/mg drooggewicht/h, respectievelijk cellen/mg drooggewicht/h. Omdat lengtemetingen (I) nauwkeuriger bepaald konden worden dan drooggewichten (DW) werd het DW gebruikt voor bovenstaande normalisatie berekend op basis van de lengte. Hiertoe werd de correlatie tussen I^3 en DW bepaald. Na afloop van het experiment konden de organismen terug in hun respectievelijke aquaria worden geplaatst.

3.3.5. Respiratie

Om zuurstofverbruik te kunnen bepalen werden een aantal organismen uit hun aquarium genomen en overgebracht in glazen spuitn van 10 mL, in hetzelfde medium en bij dezelfde voedselconcentratie als in het aquarium waaruit ze afkomstig waren. Voor juvenielen (6 dagen oud) werden drie organismen in 5 replica's genomen, voor adulten waren dit 2 organismen in 5 replica's. Deze aantallen werden zodanig gekozen dat het totale oppervlak van de organismen steeds ongeveer gelijk was. Daartoe werd uitgegaan van enerzijds een lineaire toename in gewicht van dag 0 (15 µg) tot dag 14 (400 µg) en anderzijds volgende formule: oppervlak = (massa)^{2/3}.

Gedurende een periode van 2 uur werd op 5 tijdstippen (met ertussen telkens een interval van 30 min) een gekende hoeveelheid medium uit het spuitje geïnjecteerd in een zuurstofelektrode (Oxygen meter Model 781, Strathkelvin Instruments, Schotland). Uit deze metingen werd de zuurstofconsumptiesnelheid (mg O₂/organisme.h) van de organismen berekend als de richtingscoëfficiënt van de hoeveelheid zuurstof (mg) in de spuit in functie van de tijd. Deze waarden werden daarna omgerekend naar µL O₂/mg organisme/h. Na afloop van de metingen werden de organismen in hun respectievelijke aquaria teruggeplaatst.

3.3.6. Bepaling inwendige zinkconcentratie (destructie)

3.3.6.1. Uitvoering destructie

Aan de afgewogen organismen (zie 3.3.3.) in afgewogen AAS-buisjes werd 400 µL 14N HNO₃ (Fluka, >69,0%, Zn ≤ 0,0000001%) toegevoegd. Dit werd uit een metaal-vrij bekertje, dat gespoeld werd met bigedesioniseerd water, gepipetteerd. Er werd voor gezorgd dat alle organismen volledig onder het zuur zaten. Vervolgens werden de buisjes afgesloten en per behandelingsreeks in een rekje en in een plastieken beveiligingsbox geplaatst. Vervolgens werden de stalen in een microgolfoven geplaatst en werd het volgende programma doorlopen: 90, 160 en 350 W gedurende telkens 4 minuten. Elke cyclus werd na 2 minuten kortstondig stopgezet om de veiligheidsbox om te draaien zodat alle stalen gelijkmatig opwarmden. Indien er voortdurend dekseltjes opensprongen, werd het programma eveneens stop gezet. Nadat het programma doorlopen was, werd gecontroleerd of de destructie goed verlopen was door visueel te controleren op zichtbare elementen in het buisje. Indien de destructie onvoldoende was, werd een aantal minuten extra bij 350 W verwarmd, telkens in stappen van 2 minuten. Na destructie werden de buisjes aan de lucht afgekoeld, waarna ze opnieuw gewogen werden. Aan de hand van dit gewicht werd het exacte volume HNO₃ dat nog in het buisje aanwezig was, berekend:

$$m(\text{HNO}_3) = m(\text{gewogen}) - m(\text{leeg buisje}) - m(\text{organismen})$$
$$V(\text{HNO}_3) = m(\text{HNO}_3) / \text{dichtheid}(\text{HNO}_3)$$

Hierop volgend werd het zuur verdund met bi-gedesioniseerd water tot een oplossing van 10% HNO₃ bekomen werd. Tenslotte werd de zinkconcentratie in de stalen bepaald via atomaire absorptie spectrometrie (SpectrAA-100, Varian).

3.3.6.2. Kwaliteitscontrole

Om de kwaliteit van de destructie na te gaan, werden bij iedere destructiereeks eveneens 3 referentiestalen meegenomen. De referentiestalen omvatten mosselweefsel (Commission of the European Communities, Community Bureau of Reference, Reference material No 278R) met een gekende zinkconcentratie (83,1 ± 1,7 mg Zn/kg). Deze referentiestalen doorliepen dezelfde procedure als de te meten stalen. Het rendement van de destructies bedroeg gemiddeld 92,47 ± 2,78%.

Om met eventuele crosscontaminatie tussen de verschillende buisjes via zuurdampen rekening te kunnen houden, werden bij iedere reeks 3 procedure-blanco's meegenomen. Deze doorliepen eveneens de volledige procedure, maar bevatten geen organismen.

3.4. Genexpressie

Om genexpressie na te gaan werd gebruik gemaakt van cDNA/cDNA microarrays. Vermits het genoom van *Daphnia magna* nog niet gekend is, werden cDNA-bibliotheken aangelegd op basis van EST's welke bekomen werden door Suppression Subtractive Hybridisation.

Bij ieder hybridisatie-experiment werd mRNA afkomstig van de organismen uit de verschillende aquaria differentieel gehybridiseerd t.o.v. mRNA afkomstig van organismen afkomstig uit een referentiepool (gekweekt volgens de standaardprocedures die van toepassing zijn in het Labo voor Milieutoxicologie). Vermits deze referentiepool steeds dezelfde was in alle hybridisaties konden de arrays later onderling in alle mogelijke combinaties vergeleken worden, om zo een beeld te vormen van de differentiële genexpressie tussen organismen afkomstig uit twee verschillende aquaria.

3.4.1. cDNA bibliotheken en extra genen

Drie verschillende cDNA bibliotheken met betrekking tot reproductie, vervelling en energiemetabolisme werden aangemaakt volgens de methode beschreven bij Soetaert *et al.* (2006 en 2007a). Om tot mRNA te komen dat specifiek gerelateerd was met deze drie bibliotheken werd gebruik gemaakt van Suppression Subtractive Hybridisation (SSH). SSH is bijzonder geschikt om een set van genen die differentieel tot expressie komen in verschillende organismen te identificeren, zelfs indien geen genomische informatie gekend is. mRNA afkomstig van twee groepen organismen die onder verschillende omstandigheden gekweekt zijn (tester en driver groep), wordt geïsoleerd en omgezet naar ds cDNA. Complementaire strengen uit tester en driver groep worden na hybridisatie verwijderd, zodat men op het einde enkel cDNA uniek voor de tester groep overhoudt. Door de omstandigheden van de kweek van beide groepen zodanig te kiezen wordt enkel mRNA gerelateerd met een bepaalde parameter overgehouden. In het geval van de drie eerder beschreven bibliotheken werd dit onder de volgende omstandigheden bekomen:

- Reproductieve cDNA bibliotheek: pooled mRNA van eidragende adulten (tester) en juvenielen (driver)
- Vervelling cDNA bibliotheek: pooled mRNA van controle organismen (driver) en organismen blootgesteld aan het vervellinghormoon 20-hydroxyecdysone (tester)
- Energie cDNA bibliotheek: pooled mRNA van goed gevoede (tester) en uitgehongerde organismen (driver)

Naast de drie cDNA bibliotheken werd ook cDNA van vier ESTs van genen waarvan uit de literatuur geweten is dat ze zinkgevoelig zijn, op de array gespot. Het betrof ESTs met homologie aan het gen voor ferritine, twee mogelijke metallothioneïnen A (DV437799) en B (DV437826) en retinol dehydratase (DV437801). Hiertoe werd vertrokken van de EST sequenties zoals ze door Poynton *et al.* in 2007 beschreven werden (zie NCBI accession numbers tussen haakjes). Op deze sequenties

werden primers ontworpen zodat, na omzetting van het geëxtraheerde mRNA in cDNA, de overeenkomstige sequenties konden geamplificeerd worden. Na scheiding op gel en gelelectie, werden deze cDNA's toegevoegd aan de drie bibliotheken.

3.4.2. *Micro-array spotting*

Als voorbereiding op het spotten werden de cDNA-inserts van de klonen geamplificeerd, gebruik makend van adaptor-specifieke primers (nested primers, Clontech), opgezuiverd d.m.v. Montage PCR Plaat (Millipore) en geladen in 384-well platen (Genetix) in 50% dimethylsulfoxide bij ± 75 ng/ μ L. Een Qarray MiniRobot (Genetix) werd gebruikt om de cDNA bibliotheek in triplo op aminosilane-gecoate glasplaatjes (Generoma Microarray Slides; Asper Biotech) te spotten. Bovendien werd een reeks kunstmatige controlegenen (Lucidea Universal Scorecard, Amersham BioSciences), in 20 replicaten over de array gespot. Deze controlegenen omvatten calibratie controles, ratio controles en negatieve controles. Doordat controlespikes met gekende concentratie in het te hybridiseren mRNA-mengsel toegevoegd werden, verstrekken deze controlegenen informatie over cDNA labeling efficiëntie, sensitiviteit en intra-array variabiliteit van verschillende replicaten. Negatieve controle-cDNA's leverden informatie over niet-specifieke hybridisatie en de blokkings efficiëntie gedurende de prehybridisatie stap. Na rehydratisatie in waterdamp en het drogen op een hete plaat, werden de glasplaatjes *cross-linked* door UV-bestraling bij 300 mJ (UVStrataLinker 2400, Stratagene).

3.4.3. *RNA-extractie*

3.4.3.1. *Voorbereiding van de organismen*

Organismen uit de aquaria verzameld werden over een zeef afgespoeld met gedestilleerd water om vervolgens overgebracht te worden in een cryobuisje met 200 μ L RNALater (Qiagen). Hierna werden ze zeer snel bevroren door ze in vloeibare stikstof onder te dompelen. De op deze manier behandelde organismen konden bij -80°C bewaard worden tot het moment van RNA-extractie.

3.4.3.2. *Homogenisatie*

De weefselstalen werden met een plastieken Eppendorf pestel gehomogeniseerd in 1 mL TRIzol Reagent (Invitrogen Life Technologies) per 50-100 mg weefsel. Voor *Daphnia magna* gaf dit:

- Dag 6: 20 daphnia's per staal of ongeveer 17 mg weefsel en dus ongeveer 300 μ L TRIzol Reagent per staal
- Dag 13-21: 10 daphnia's per staal of ongeveer 30 mg weefsel per staal en dus ongeveer 500 μ L TRIzol Reagent per staal

Volgend op de homogenisatie werd het onoplosbare weefselmateriaal verwijderd uit het homogenaat door centrifugatie gedurende 10 minuten, bij 2 tot 8°C en 11000 rpm (Mikro200R, Hettich). De resulterende pellet bevat extracellulaire membranen, polysacchariden en DNA met hoog molecuulair gewicht, terwijl het supernatans RNA bevat. Het supernatans werd overgebracht in een nieuw 1,5 mL RNase-vrij Biopur Eppendorf buisje.

3.4.3.3. Fase scheiding

De gehomogeniseerde stalen werden gedurende 5 minuten geïncubeerd bij kamertemperatuur om de complete dissociatie van de nucleoproteïne complexen toe te laten. Per 1 mL TRIzol Reagent werd 0,2 mL *molecular graded* chloroform (VWR) toegevoegd aan de stalen. De buisjes werden hierna gedurende 15 seconden krachtig met de hand geschud en gedurende 3 minuten bij kamertemperatuur geïncubeerd. Vervolgens werden de stalen gecentrifugeerd gedurende 15 minuten, bij 2 tot 8°C en maximum 12000x g. De stalen werden op die manier gescheiden in een bovenste, kleurloze waterige fase, een middelste interfase en een onderste rood-roze fenol/chloroform fase. RNA bevond zich uitsluitend in de bovenste, waterige fase. Het volume van deze waterige fase bedroeg ongeveer 60% van het volume TRIzol Reagent gebruikt voor de initiële homogenisatie.

3.4.3.4. RNA precipitatie

De waterige fase werd overgebracht in een nieuw 1,5 mL RNase-vrij Biopur Eppendorf buisje. RNA precipitatie vanuit de waterige fase vond plaats door de fase te mengen met 0,5 mL isopropanol (Sigma) per 1 mL TRIzol Reagent gebruikt voor de initiële homogenisatie. Vervolgens werden de stalen gedurende minstens 1 uur geïncubeerd bij -20°C. Hierna werden ze gedurende 10 minuten gecentrifugeerd bij 2 tot 8°C en maximum 12000x g. Het RNA precipitaat vormde een gelachtige pellet op de bodem van het buisje.

3.4.3.5. RNA wassen en oplossen

Het supernatans werd verwijderd en de pellet werd gewassen met minstens 1 mL 75% *molecular graded* ethanol (verdund in DEPC behandeld MilliQ-water) (VWR) per 1 abso mL TRIzol Reagent gebruikt voor de initiële homogenisatie. De stalen werden voorzichtig gemengd en gecentrifugeerd voor 5 minuten, bij 2 tot 8°C en maximum 7500x g. De resulterende pellet werd opgelost in 30 µL DEPC behandeld MilliQ water.

3.4.3.6. DNase behandeling

Voor de DNase behandeling werd aan 30 μL RNA-staal achtereenvolgens 3,56 μL 10x DNase buffer (Fermentas), 1 μL RiboLock RNase inhibitor (10 U/ μL , Fermentas) en 1 μL DNase (1U/ μL , Fermentas) toegevoegd. Vervolgens werden de stalen gedurende 30 minuten geïncubeerd bij 37°C, waarna DEPC-water toegevoegd werd tot een eindvolume van 200 μL . Hierop volgend werd tweemaal geëxtraheerd met 200 μL fenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1, pH 5,2, VWR International) en éénmaal met 200 μL chloroform (Sigma, *Molecular Biology Tested*). Bij iedere extractiestap werd er gedurende 5 minuten bij 4°C en 14000 rpm gecentrifugeerd, waarna de bovenste fase overgebracht werd in een nieuw RNase-vrij Biopur Eppendorf buisje. Tenslotte werd 0,1 vol. (20 μL) 3 M NaAc (Merck) (verdund in DEPC behandeld bigedesioniseerd water) en 2 vol. (400 μL) 100% EtOH (VWR, *molecular graded*) toegevoegd en werden de stalen gedurende een nacht geïncubeerd bij -20°C.

Na de incubatie werden de stalen gedurende 15 minuten gecentrifugeerd bij 4°C en 14000 rpm. Het supernatans werd verwijderd en de resulterende pellet werd gewassen met 200 μL 70% EtOH (VWR, *molecular graded*) (verdund in DEPC behandeld bigedesioniseerd water). Vervolgens werden de stalen opnieuw gecentrifugeerd gedurende 5 minuten, bij 4°C en 14000 rpm en werd het supernatans verwaarloosd. Een volgende korte centrifugatie verzamelde alle residuele vloeistof op de bodem van het buisje. Deze residuele vloeistof werd wederom verwijderd. De pellet werd tenslotte opgelost in een volume van 32 μL DEPC behandeld MilliQ water. De RNA stalen werden bewaard bij -80°C.

3.4.3.7. Concentratiebepaling en kwaliteitscontrole

De concentratie van de RNA-stalen werd bepaald door Optische Densiteitsmeting (OD-meting) bij 260 nm met behulp van de NanoDrop spectrofotometer (Thermo Scientific). Om later op basis van het RNA een micro-array hybridisatie te kunnen uitvoeren, dient de hoeveelheid minstens 7-10 μg in maximum 16,5 μL DEPC behandeld bigedesioniseerd water te bedragen.

De RNA zuiverheid werd nagegaan door OD-meting bij 260, 280 en 230 nm (NanoDrop, Thermo Scientific). De ratio 260/280 is een maat voor proteïnecontaminatie. Een waarde groter dan 1,7 duidt op een zuiver staal. De ratio 260/230 is een maat voor de contaminatie vanwege solventen en producten gebruikt tijdens de RNA precipitatie. Opnieuw duidt een waarde groter dan 1,7 op een zuiver staal.

Tenslotte werd ook de RNA integriteit nagegaan door middel van een denaturerende agarose gel elektroforese. Hiervoor werden gelbakje, buffertank en kam eerst gereinigd met ethanol (VWR, *molecular graded*), daarna grondig gespoeld met DEPC behandeld bigedesioniseerd water en ethanol om tenslotte aan de lucht te drogen. Voor 60 mL 1% agarose geloplossing werd 42,6 mL DEPC behandeld bigedesioniseerd water toegevoegd aan 0,6 g agarose (Invitrogen Life Technologies). Deze geloplossing werd in de microgolfoven gesmolten. Na afkoeling tot ongeveer 60°C werd 6 mL

10x MOPS en 11,4 mL 37% formaldehydeoplossing (VWR) toegevoegd. Hierna werd de gel onmiddellijk gegoten. Een 1x MOPS loopbuffer (ongeveer 300 mL) werd bereid door 10x MOPS te verdunnen met DEPC behandeld bigedesioniseerd water. 10x MOPS (pH 7) werd bereid door 83,8 g MOPS (200 mM, Sigma, min. 99,5%), 8,2 g NaAc (50 mM, Merck) en 3,7 g EDTA (10 mM, Sigma-Aldrich) aan te lengen tot 1 liter met DEPC behandeld bigedesioniseerd water.

Uit de RNA stalen werden volumes bereid die 0,5 tot 1 µg RNA bevatten. Hieraan werd eenzelfde volume *loading dye* (Sigma) toegevoegd. Na vortexen en incubatie bij 65°C gedurende 5 minuten werden de stalen op de bodem van het Eppendorf buisje verzameld door een korte centrifugatie. Hierna werden de stalen op de gel geladen. Gedurende de hele tijd werden de stalen op ijs bewaard. De elektroforese vond plaats gedurende 45 minuten tot 1 uur bij 60 tot 80 V.

3.4.4. Amino allyl labeling van RNA

3.4.4.1. Labeling

Allereerst werd 100 mM aminoallyl dUTP (Sigma) bereid, door 1 mg op te lossen in 19,1 mL 0,1 M KPO₄ buffer, pH 7,5. De 1 M KPO₄ buffer werd bereid door 19,0 mL 1 M K₂HPO₄ en 1,0 mL 1 M KH₂PO₄ samen te voegen en op pH te brengen met HCl. Op de aminoallyl gelabelde dUTP zal later de fluorescente kleurstof kunnen binden.

Ten tweede werd ook 20 µL 50x Labeling Mix aangemaakt. Deze mix bevat aminoallyl-dUTP in een 2:3 ratio tot ongelabeld dTTP en werd bereid door 5 µL 100 mM dATP, dCTP, dGTP, 3 µL 100 mM dTTP en 2 µL 100 mM aa-dUTP samen te voegen. De finale concentratie van de nucleotiden bedroeg op die manier: 25 mM dATP, 25 mM dCTP, 25 mM dGTP, 15 mM dTTP en 10 mM aa-dUTP. Ongebruikte oplossing werd bewaard bij -20°C.

Vervolgens werd de volgende mix aangemaakt op een totaal volume van 18,5 µL: 5 µg RNA (1-16,5 µL afhankelijk van de concentratie), 2 µL Random Hexamer Primers (3 mg/ml, LifeTech) om de latere werking van het Reverse Transcriptase toe te laten, 2 µL mRNA spike mix (Lucidea Controls, Lucide Universal ScoreCard, Amersham BioSciences) en 13,5-0 µL DEPC behandeld MilliQ water (afhankelijk van de hoeveelheid toegevoegd RNA). De spike mix zal op de array uiteindelijk hybridiseren met een aantal controlegenen die erop geplaatst werden. Dit maakt mogelijk om achteraf de kwaliteit van de hybridisatie te checken. De mix werd vervolgens gedurende 10 minuten geïncubeerd bij 70°C. Hierna volgde *snap freezing* door de mix gedurende 1 minuut op ijs te brengen. Na microcentrifugatie gedurende 1 minuut werd verder gewerkt op kamertemperatuur. Aan de mix werd vervolgens het volgende toegediend: 6,0 µL 5x Superscript II Buffer (Invitrogen), 3,0 µL 0,1 M DTT (Invitrogen), 0,6 µL aminoallyl-dNTP mix en 2,0 µL SuperScript II Reverse Transcriptase (200 U/µL, Invitrogen). Deze finale mix werd gedurende de nacht geïncubeerd bij 42°C, waardoor het RNA in cDNA omgezet werd door werking van het Reverse Transcriptase.

Om het RNA te hydrolyseren werd na de incubatie 10 µL 1 M NaOH en 10 µL 0,5 M EDTA toegevoegd. Dit werd gedurende 15 minuten geïncubeerd bij 65°C, waarna 10 µL 1 M HCl werd toegevoegd om de hydrolyse te neutraliseren.

3.4.4.2. *Clean-up*

Voorafgaand aan de conjugatie met NHS-ester Cy dyes is verwijdering van niet geïncorporeerde aminoallyl-dUTPs en vrije amines uit het aa-cDNA aangewezen. Dit om koppeling van de dyes aan vrije aminegroepen in de oplossing te voorkomen. Deze clean-up werd uitgevoerd op basis van een aangepast Qiagen PCR spin column protocol (PCR Cleanup kit, Qiagen). De aanpassing omvatte o.a. andere was- en elutiebuffers dan deze die bij de kit geleverd werden, omdat deze laatste Tris bevatten.

Aan de mix voor de cDNA reactie werd 300 μL (5x het reactievolume) PB buffer (uit de kit) toegevoegd. Na mixen door enkele keren op- en neer te pipetteren, werd dit overgebracht op een QIAquick kolom. Deze kolom werd op een collectiebuisje geplaatst en zo gedurende 1 minuut in een microcentrifuge (Eppendorf) gecentrifugeerd bij 14000 rpm en 4°C. Het cDNA dat zo achter bleef op de QIAquick kolom werd vervolgens gewassen door 750 μL fosfaat wasbuffer op de kolom te brengen en deze wederom gedurende 1 minuut te centrifugeren in een microcentrifuge bij 14000 rpm en 4°C. De samenstelling van de fosfaat wasbuffer was:

- 0,25 mL 1 M KPO_4 , pH 8,5
- 7,63 mL MilliQ water
- 42,12 mL 95% ethanol

Na het leegmaken van het collectiebuisje werd de vorige stap nog eens herhaald. Hierna werd de QIAquick kolom overgebracht op een nieuw 1,5 mL Eppendorf buisje. Om elutie van het aa-cDNA te bekomen werd tweemaal 30 μL 4 mM KPO_4 , pH 8,5 op de kolom gepipetteerd en gedurende 1 minuut in een microcentrifuge bij 14000 rpm en 4°C gecentrifugeerd. Het totale volume van het staal bedroeg nu ongeveer 60 μL . Het staal werd gedroogd door vacuümcentrifugatie in de Speed vac. Hierdoor concentreerde het aa-cDNA zich in een pellet op de bodem van het Eppendorf buisje.

3.4.4.3. *Covalente koppeling van het aminolallyl gelabelde cDNA met het Cy Dye ester*

Bij de labeling met Cy3 en Cy5 fluorescente kleurstoffen werd erop toegezien dat de stalen zo weinig mogelijk in contact kwamen met direct licht om *fotobleaching* van het fluorescente signaal te voorkomen.

Allereerst werden de Cy Dye esters klaargemaakt voor labeling. Dit gebeurde door *ready-to-use* Cy3/Cy5 esters (12/12 tubes, 40000 pmol, Amersham BioSciences) op te lossen in 4,5 μL 100% DMSO. Het aminoallyl gelabelde cDNA werd opgelost in 4,5 μL 0,1 M carbonaat buffer, pH 9,0. 1 M Na_2CO_3 buffer, pH 9 werd aangemaakt door 10,8 g Na_2CO_3 (Merck) op te lossen in 80 mL MilliQ water, dit op pH te brengen met 12 N HCl en vervolgens aan te lengen tot 100 mL met MilliQ water. Tenslotte werden cDNA stalen en Cy Dye esters gecombineerd en gedurende anderhalf uur in het donker bij kamertemperatuur geïncubeerd. Het cDNA afkomstig van de referentiepool werd doorgaans

met Cy3 gelabeld, terwijl Cy5 gebruikt werd om het cDNA afkomstig van de verschillende behandelingen te labelen.

3.4.4.4. *Clean-up II: verwijderen van ongekoppelde Cy dye*

Een tweede clean-up stap was nodig om de overtollige, ongekoppelde Cy Dye esters uit het reactiemengsel te verwijderen. Dit werd gedaan met behulp van de QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). Voor meer informatie omtrent het protocol dan hieronder beschreven wordt dan ook naar het protocol bijgesloten in de kit verwezen.

Aan het reactievolume werd om te beginnen 35 μ L 100 mM NaOAc, pH 5,2 (bekomen door verdunning van de Sigma-oplossing voor sequenceren) toegevoegd. Hierna werd 250 μ L PB buffer (uit de kit) toegevoegd. Het geheel werd overgebracht op een QIAquick kolom. Om het Cy gelabelde cDNA op de kolom te binden, werd de kolom overgebracht op een collectiebuisje en werd het geheel gedurende 1 minuut in een microcentrifuge gecentrifugeerd bij 14000 rpm en 4°C. De doorgelopen vloeistof werd verwijderd waarna de kolom op hetzelfde collectiebuisje teruggeplaatst werd en het geheel voor een bijkomende minuut gecentrifugeerd werd in een microcentrifuge bij 14000 rpm en 4°C. Hierna werd de QIAquick kolom overgebracht op een nieuw 1,5 mL Eppendorf buisje en werd 30 μ L EB buffer (uit de kit) in het midden van de kolom toegevoegd. Na incubatie bij kamertemperatuur gedurende 1 minuut werd het cDNA geëluëerd door in een microcentrifuge gedurende 1 minuut bij 14000 rpm en 4°C te centrifugeren. Vervolgens werden de stappen vanaf het toevoegen van de EB buffer voor een tweede maal herhaald. Het totale eindvolume van het staal bedroeg ongeveer 60 μ L.

3.4.4.5. *Analyse van de koppelingsreactie*

Voorafgaand aan de micro-array hybridisatie werd de efficiëntie van voorgaande reacties gemeten m.b.v. de NanoDrop (Thermo Scientific). Indien de reacties niet goed verlopen waren, was het nutteloos om met deze probes een hybridisatie uit te voeren daar dit waarschijnlijk toch geen bruikbare data zou opleveren.

Voor ieder staal/probe werd de absorbantie bij 260 nm, bij 550 nm voor Cy3 gelabelde stalen en bij 650 nm voor Cy5 gelabelde stalen gemeten door 1 μ L staal op de sensoren van de NanoDrop aan te brengen. Hiervoor werd gebruik gemaakt van het “Microarray” programma van de NanoDrop 3.0 software. De extinctiecoëfficiënt werd ingesteld op 37 (dit is voor *single stranded* cDNA). Naast de absorbanties werden eveneens de concentratie cDNA (ng/ μ L) en ‘pmol incorporated dye/ μ L’ genoteerd. Op basis van deze gegevens werden volgende kwaliteitsparameters berekend:

Totale cDNA synthese = concentratie cDNA x 59 μ L (= overblijvend volume van het staal)

Totale Dye incorporatie (pmol/staal) = pmol Dye incorporated/ μ L x 59 μ L

FOI (frequency of incorporation) Cy3 = 58,5 x A550/A260

FOI Cy5 = 35,1 x A550/A260

Een FOI gelegen tussen 20 en 50 is optimaal om hybridisaties uit te voeren.

Omwille van de reproduceerbaarheid en omwille van het feit dat we geen verdraaide resultaten willen door het feit dat de fluorescentie uitgezonden door een bepaalde dye groter is dan deze uitgezonden door de andere doordat deze eerste in hogere concentraties aanwezig is dan de laatste, diende de pmol Dye incorporatie per staal gelijk te zijn. Omdat 150 pmol Dye incorporatie per staal goede resultaten geeft bij de hybridisatie werd ervoor gezorgd dat ieder staal hieraan gelijk gesteld werd. Dit werd bekomen door het volume staal aan te passen.

volume staal nodig voor hybridisatie (μ L) = totale dye incorporatie (pmol/ μ L * 59 μ L) / 150 pmol

Hierna werden de stalen door vacuüm centrifugatie gedurende ongeveer 1 uur gedroogd in de Speed vac. De Speed vac werd met handdoeken bedekt om het binnenin donker te maken.

3.4.5. Micro-array hybridisatie

Een volgende stap omvatte de hybridisatie van de fluorescent gelabelde cDNA probes op de cDNA micro-array. De methode die hiervoor toegepast werd is gebaseerd op de Corning hybridisatie protocols (Corning Inc.).

3.4.5.1. Prehybridisatie

Alvorens de stalen op de array te hybridiseren werd een pre-hybridisatie uitgevoerd. Dit had als doel om enerzijds de plaatsen waar geen genen gespot werden te blokkeren om latere specifieke hybridisatie te minimaliseren. Anderzijds zorgde de pre-hybridisatie ook voor een optimalisatie van de oppervlaktespanning van de array zodat de latere hybridisatie met een grotere efficiëntie kon verlopen.

De arrays werden gedurende 30-60 minuten bij 42°C geïncubeerd in een *Coplin jar*. De toegevoegde oplossing bevatte 50% formamide, 5x SSC, 0,1% SDS en 0,1% BSA (20 mg/ml, Fermentas). Deze concentraties waren steeds op eindvolumebasis. SSC werd toegevoegd om de oppervlaktespanning van de array te optimaliseren en BSA om de lege spots te blokkeren. Na de incubatie werden de arrays gewassen door ze tweemaal gedurende één minuut in een met MilliQ gevulde *Coplin jar* te

dompelen. Vervolgens werd dit ook gedurende één minuut gedaan in een Coplin jar gevuld met isopropanol. Na deze laatste was werden de arrays onmiddellijk gedroogd met samengeperst N₂-gas. Indien de array niet proper gedroogd was (strepen en vlekken zijn zichtbaar), werd de array nogmaals gedurende één minuut met MilliQ water en isopropanol gewassen en opnieuw gedroogd.

De samenstelling van 20x SSC (pH 7,0) was:

- 88,23 g trisodiumcitraat (Merck)
- 175,32 g NaCl (Vel)
- 1 L bigedesioniseerd water

3.4.5.2. Hybridisatie

Voor de werkelijke hybridisatie werd telkens 2,5mL verse hybridisatieoplossing aangemaakt. Deze bevatte:

- 1250 µL formamide (= 50% op eindvolume)
- 625 µL 20x SSC
- 25 µL 10% SDS
- 12,5 µL 20mg/ml BSA (= 0,1 mg/ml op eindvolume)
- 25 µL 10 mg/mL Salmon Sperm (Amersham) om het achtergrondsignaal te minimaliseren
- 563 µL steriel MilliQ water

Vervolgens werd het gelabelde vacuüm gedroogde cDNA opgelost in 23 µL van deze hybridisatie oplossing, waarna de respectievelijke Cy3 en Cy5 gelabelde probes van cDNA van een staal en van een referentiestaal samengevoegd werden in 1 Eppendorf buisje. Deze probe oplossing werd gedurende 5 minuten geïncubeerd bij 95°C. Centrifugatie gedurende 2 minuten bij 12000 rpm en kamertemperatuur (Eppendorf) zorgde voor afkoeling tot kamertemperatuur en verzameling van condensatie op de bodem van het buisje. Op 2 dekglasjes (Menzel Glaser, Duitsland), gelegen op een stofvrij doekje, werd telkens 23 µL van de probe oplossing gebracht. Hierop werd de array, met de spots naar beneden aangebracht. Eventuele luchtballen werden verwijderd door lichte druk op de coverslides uit te oefenen en ze eronderuit te persen. De arrays werden vervolgens in de hybridisatiekamer (Genetix) geplaatst. Na toevoeging van 4-5 mL steriel MilliQ water in het waterreservoir van de kamer, werd deze gesloten en gedurende de nacht bij 42°C geïncubeerd.

3.4.5.3. Post-hybridisatie was

Volgende wasbuffers werden eerst aangemaakt:

- Wasbuffer 1: 2x SSC, 0,1% SDS (telkens op eindvolume en bij 42°C)
- Wasbuffer 2: 0,1x SSC, 0,1% SDS (telkens op eindvolume)

- Wasbuffer 3: 0,1x SSC (op eindvolume)
- Wasbuffer 4: 0,01x SSC (op eindvolume)

Nadat de arrays uit de hybridisatiekamer genomen werden, werden ze in Coplin jars of in grotere plasticen bakjes onderworpen aan de wasstappen weergegeven in tabel 3.2.

Tabel 3.2. Overzicht van de verschillende wasstappen uitgevoerd tijdens de post-hybridisatie was van de microarrays.

Wasbuffer (temp °C)	Wastijd	# keer wassen
Wasbuffer 1 (4°C)	1 minuut	1
Wasbuffer 1 (4°C)	5 minuten	1
Wasbuffer 2 (RT)	10 minuten	2
Wasbuffer 3 (RT)	15 seconden	1
Wasbuffer 3 (RT)	2 minuten	2
Wasbuffer 3 (RT)	1 minuut	1
Wasbuffer 4 (RT)	15 seconden	1
MilliQ water	1 minuut	1
isopropanol	1 minuut	1

Gedurende de eerste wasstap werd de array met een pincet op een neer bewogen in de wasbuffer totdat de coverslips vanzelf loskwamen. Na de isopropanol wasstap werden de arrays onmiddellijk gedroogd met N₂-gas onder druk. Indien de array niet proper gedroogd was (strepen en vlekken zijn zichtbaar), werd de array nogmaals gedurende één minuut met MilliQ water en isopropanol gewassen en opnieuw gedroogd.

3.4.6. Scanning en data-analyse

De micro-arrays werden met behulp van de Genepix Personal 4100A Scanner (Axon Instruments, USA) ingescand bij een golflengte van 532 en 635 nm. Voor iedere array werd de *photomultiplier tube voltage* (PMT) aangepast om een ratio Cy5/Cy3 dicht bij 1 en geen oversaturatie in de artificiële controlespots te verkrijgen. Analyse (spotidentificatie en kwantificatie van de totale fluorescentie intensiteit) van de verkregen beelden werd uitgevoerd aan de hand van de Genepix Pro software (Axon Instruments). Hierop volgend werden de data verder statistisch geëvalueerd door de BioArray Software Environment Database (BASE 1.2.12, <http://www.islab.ua.ac.be/base/>). BASE is een MIAME platform gebaseerde micro-array analysemethode ontwikkeld door het Intelligent Systems Laboratory van de Universiteit Antwerpen. De spotintensiteit (d.i. het gemiddelde van de intensiteit van iedere pixel gelegen binnen de spot) werd berekend op basis van *local background subtraction*. Spots met lage intensiteit (gemiddelde voorgrond intensiteit is kleiner dan de gemiddelde achtergrond intensiteit plus tweemaal de standaardafwijking) en gesatureerde signalen werden voor de verdere analyse

verwaarloosd. De verhouding Cy5/Cy3 werd voor iedere spot berekend, getransformeerd in een logaritmische $\log_2$ waarde en genormaliseerd gebruik makend van *between array Variance Stabilization Normalization* (VSN, zie 3.4.7.) (Huber *et al.*, 2002). Deze genormaliseerde waarden werden gebruikt in een LIMMA-analyse om op basis van een aangepaste t-statistiek te komen tot significantieniveau's voor differentieel tot expressie komende genen (Smyth, 2004).

3.4.7. Variance Stabilization Normalization (VSN)

In micro-array experimenten zijn er vele bronnen van systematische variatie die een effect kunnen hebben op de uiteindelijke gemeten genexpressie. Normalisatie is de term die gebruikt wordt om het proces te beschrijven dat deze variatie poogt weg te werken. In vele gevallen zal dit normalisatieproces er voor zorgen dat de gemiddelden van de verschillende meetpunten op éénzelfde niveau gebracht worden, zodat de gemeten variantie enkel nog afhangt van werkelijke experimentele variatie.

In vele normalisatiemethoden worden de spotintensiteiten logaritmisch getransformeerd. Dit heeft voor gevolg dat zowel up- als downgereguleerde genen op eenzelfde manier benaderd kunnen worden en dat de variatie minder afhankelijk wordt van de absolute magnitude van de intensiteiten. Durbin *et al.* (2002) stelden echter een aantal beperkingen van deze benadering vast en suggereerden eerder het gebruik van variantie stabiliserende transformatie.

Tengevolge van het experimentele ontwerp van de microarray experimenten, was het noodzakelijk om achteraf verschillende microarrays van verschillende behandelingen onderling te kunnen vergelijken. Hiertoe diende een *between array* normalisatie toegepast te worden. Hierbij wordt uitgegaan van een aantal veronderstellingen:

- Er is enkel variatie tengevolge van experimentele artefacten en niet tengevolge van een verschillende biologie
- Het merendeel van de data zal niet differentieel tot expressie komen (slechts ongeveer 1% van de genen wel)
- Data moeten gecentreerd worden, wat betekent dat het gemiddelden van de logratio's gelijk aan nul dienen te zijn
- Data moeten geschaald worden, of m.a.w. de standaardafwijking dient gelijk aan één te zijn.
- Data moeten normaal verdeeld zijn, zodat alle verdelingen onderling identiek zijn

Door toepassing van *Variance Stabilization Normalization* (VSN) en *h*-transformatie kan aan deze voorwaarden voldaan worden en kunnen verschillende arrays onderling met elkaar vergeleken worden (Huber *et al.*, 2002). In wat volgt wordt het model voor deze transformatie en normalisatie beschreven.

Een microarray dataset kan voorgesteld worden als een matrix met reële getallen. De rijen k corresponderen met de verschillende probes op de arrays en de kolom i staat voor de verschillende stalen/replica's. Het aantal probes n kan variëren van enkele honderdtallen tot enkele duizendtallen. Het aantal kolommen d is gelijk aan twee voor een tweekleuren array (zoals meestal het geval is). De waarden y_{ki} geven dan de intensiteitsdata van de probes op de verschillende arrays weer. Echter door verschillende variaties in experimentele factoren (zoals hoger vermeld) kunnen deze intensiteitsdata niet *an sich* vergeleken worden. Er wordt verondersteld dat de verschillende kolommen (stalen) op eenzelfde schaal gebracht kunnen worden door affine-lineaire transformatie, welke geparametriseerd wordt door de $2d-2$ parameters $o_2, \dots, o_d$ en $s_2, \dots, s_d > 0$:

$$y_{ki} \mapsto \tilde{y}_{ki} = o_i + s_i y_{ki} \quad (1)$$

waarin $i = 1, \dots, d$ en $o_1 = 0$, $s_1 = 1$. Na deze transformatie kunnen verschillen in differentiële expressie gemeten en gekwantificeerd worden.

Voor een niet-differentieel tot expressie komend gen, liggen de waarden $\tilde{y}_{ki}$ voor $i = 1, \dots, d$ verstrooid rond de echte waarde, afhankelijk van de verdeling van de meetfout van de probe k . $\tilde{y}_{ki}$ kan dus gezien worden als de realisaties van de random variabele Y_k met gemiddelde $E(Y_k) = u_k$ en variantie $\text{Var}(Y_k) = v_k$. Verondersteld wordt dat v_k enkel afhankelijk is van k via een kwadratische functie van het gemiddelde u_k met de volgende vorm:

$$v_k = v(u_k) = (c_1 u_k + c_2)^2 + c_3 \text{ met } c_3 > 0 \quad (2)$$

De redenen voor deze veronderstelling worden uitvoerig beargumenteerd in Rocke en Durbin (2001) en Huber *et al.* (2002).

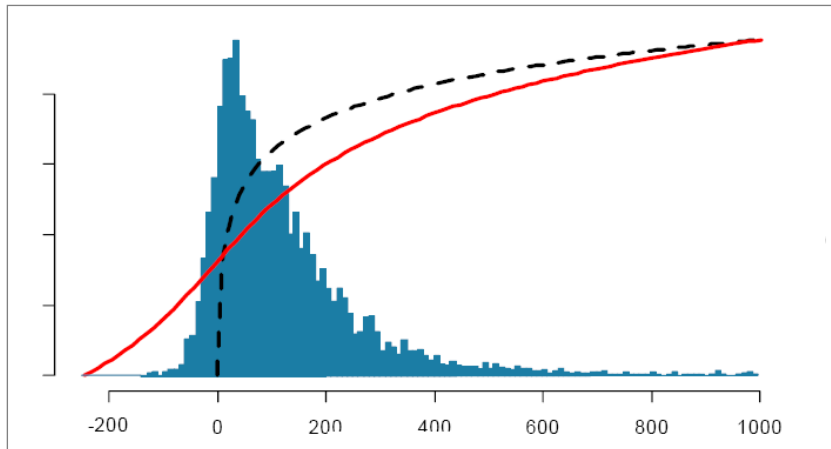
Vervolgens kan de methode voor variantie stabilisatie (Durbin *et al.*, 2002) gebruikt worden om een transformatie h af te leiden zodat de variantie $\text{Var}(h(Y_k))$ bij benadering onafhankelijk is van het gemiddelde $E(h(Y_k))$:

$$h(y) = \int^y \frac{1}{\sqrt{v(u)}} du \quad (3)$$

De gegeven expressie voor h resulteert uit een lineaire benadering van $h(Y_k)$ rond $h(u_k)$. Combinatie van de vorige twee uitdrukkingen leidt dan tot:

$$h(y) = \gamma \text{arsinh}(a + by) \quad (4)$$

waar “arsinh” verwijst naar de inverse hyperbolische sinus. De parameters van h kunnen gekarakteriseerd worden via $\gamma = c_1^{-1}$, $a = c_2 / \sqrt{c_3}$ en $b = c_1 / \sqrt{c_3}$. Een voorstelling van de “arsinh” functie is weergegeven als de volle lijn in figuur 3.6.



Figuur 3.6. Grafiek van de variantie stabiliserende transformatie (4) (volle lijn) en de logaritmische functie (onderbroken lijn). Het histogram geeft de intensiteitsdistributie van 1 kleurenkanaal op een cDNA microarray met 8400 probes weer. De parameters van de transformatie (4) werden geschat door vergelijking met de intensiteiten van het andere kleurenkanaal. (Bron: Huber *et al.*, 2002)

De relatie tussen de “arsinh” functie en de logaritmische functie worden gegeven door:

$$\begin{aligned} \operatorname{arsinh}(x) &= \log(x + \sqrt{x^2 + 1}) \\ \lim_{x \rightarrow \infty} (\operatorname{arsinh}(x) - \log(x) - \log(2)) &= 0 \quad (5) \end{aligned}$$

Dus, voor grote intensiteiten wordt de transformatie (4) gelijk aan de gebruikelijke logaritmische transformatie. Maar, in tegenstelling tot het logaritme, heeft deze transformatie geen singulariteit bij het punt 0 en blijft ze glad en gelijk aan de echte waarden in de range van kleine en negatieve intensiteiten (figuur 3.6.) Deze transformatie (4) wordt ook wel de *generalized log scale* (glog) genoemd.

Indien nu deze variantie stabiliserende transformatie toegepast wordt op de genormaliseerde data $\tilde{y}_{ki}$, wordt de volgende transformatie bekomen:

$$y_{ki} \mapsto h(\tilde{y}_{ki}) = \operatorname{arsinh}(a + b(o_i + s_i y_{ki})) \quad (6)$$

De parameter γ werd hierbij genegeerd omdat dit slechts een schalingsfactor was. Indien gesteld wordt dat $a_i = a + b \cdot o_i$, $b_i = b \cdot s_i$ en $h_i(y_{ki}) = \operatorname{arsinh}(a_i + b_i y_{ki})$, dan kunnen de normalisatietransformatie (1) en de variantie-versus-gemiddelde afhankelijkheid (2) van de y_{ki} , beide samengevat worden in het volgende statistische model:

$$h_i(Y_{ki}) = \mu_k + \varepsilon_{ki}, k \in K \quad (7)$$

Waar K de set niet-differentieel tot expressie komende genen voorstelt, $\mu_k = E(h(Y_{ki}))$ het gemiddelde is en de variantie van de foutterm constant is:

$$E(\varepsilon_{ki}) = 0, \text{Var}(\varepsilon_{ki}) = \sigma^2 \quad (8)$$

De conditie $E(\varepsilon_{ki}) = 0$ reflecteert het doel van de normalisatie en de variantie σ^2 van de foutterm het doel is van de variantie stabilisatie.

De $2d$ parameters a_i en b_i worden geschat aan de hand van een robuuste variant van de maximum likelihood schatter. Voor meer informatie hierom wordt verwezen naar Huber *et al.* (2002).

3.4.8. Linear Models for Microarray Data (LIMMA)

De genormaliseerde waarden werden gebruikt in een LIMMA-analyse om op basis van een aangepaste statistische analyse te komen tot significantieniveau's voor differentieel tot expressie komende genen. Hierbij wordt uitgegaan van het contrast (het verschil in fluorescentie-intensiteit) tussen twee overeenkomstige probes op de microarray.

De basisstatistiek die voor significantie-analyse gebruikt wordt, is de *moderated* t-statistiek, die voor elke probe en elk contrast berekend wordt (Smyth, 2004; Smyth, 2005). Deze statistiek heeft dezelfde interpretatie als een gewone t-statistiek uitgezonderd het feit dat de standaardfouten uitgemiddeld zijn over de verschillende genen, d.w.z. dat ze convergeren naar een gemeenschappelijke waarde op basis van een eenvoudig Bayesiaans model. De *moderated* t-statistiek leidt op eenzelfde manier als de gewone t-statistiek tot p-waarden, behalve dat het aantal vrijheidsgraden hoger is, wijzend op de grotere betrouwbaarheid verbonden aan de geconvergeerde standaardfouten.

LIMMA leidt bovendien tot een aantal andere beschrijvende statistieken (Smyth, 2004). De M-waarde is de waarde van het contrast tussen overeenkomstige probes. Gewoonlijk stelt dit een log2 verandering tussen twee of meer experimentele voorwaarden voor, hoewel het soms een log2-expressie niveau voorstelt. De A-waarde stelt het gemiddelde log2-expressie niveau van een gen aan in alle arrays en kanalen (Cy3 en Cy5) in het experiment.

De p-waarden die voortkomen uit de *moderated* t-statistiek worden gecorrigeerd voor meervoudig testen. De populairste vorm van aanpassing is "fdr", wat de methode van Benjamini en Hochberg (1995) is om de *false discovery rate* te controleren. De betekenis van "fdr" gecorrigeerde p-waarden is de volgende. Indien alle genen met een p-waarde onder een bepaalde grens (bv. 0,05) geselecteerd worden als zijnde differentieel tot expressie komende genen, dan is de verwachte proportie van *false discoveries* in de geselecteerde groep minder dan de grenswaarde (in dit geval 5%).

De B-statistiek (lods) is de logaritmische waarschijnlijkheid dat een gen differentieel tot expressie komt. Veronderstel bij wijze van voorbeeld dat $B = 1,5$, dan is de waarschijnlijkheid voor differentiële expressie $e^{1.5} = 4.48$, ongeveer 4,5 t.o.v. 1. De kans dat het gen differentieel tot expressie komt is dan

$4.48/(1+4.48)=0.82$, m.a.w. de kans is ongeveer 82% dat het gen differentieel tot expressie zou komen. Een B-statistiek gelijk aan nul komt overeen met een 50-50 kans dat het gen differentieel tot expressie komt. De B-statistiek wordt automatisch aangepast voor meervoudig testen door te veronderstellen dat 1% van alle genen (of een andere waarde gedefinieerd door de gebruiker) differentieel tot expressie zullen komen. De p-waarden en B-statistiek zullen genen normaal in dezelfde volgorde rangschikken.

Zoals met alle model-gebaseerde methoden, hangen de p-waarden af van veronderstellingen van o.a. normaliteit die nooit helemaal waar zijn voor microarray data. Er is echter aangetoond dat p-waarden toch een bruikbare rangschikking opleveren indien er grote afwijkingen van de veronderstellingen zijn (Smyth *et al.*, 2003). Benjamini en Hochberg's *fdr*-methode veronderstelt onafhankelijkheid tussen de genen, maar ook hier werd geargumenteed door Reiner *et al.* (2003) dat de methode ook werkt wanneer er verschillende vormen van afhankelijkheid tussen genen zijn. De B-statistiek hangt af van dezelfde veronderstellingen als deze voor de p-waarden, maar veronderstelt bovendien *a priori* kennis van de proportie differentieel tot expressie komende genen. Om deze reden worden de p-waarden verkozen boven de B-statistiek (Smyth, 2005).

De *moderated* F-statistiek is een laatste nuttige statistiek. Het combineert de t-statistieken van alle contrasten in een alles omvattende significantietest voor dat gen. De F-statistiek test of één of meerdere van de contrasten voor dat gen verschillend is van nul, m.a.w. of het gen differentieel tot expressie komt op eender welk contrast.

3.5. Statistiek

De effecten van de verschillende behandelingen op de verschillende parameters werden vergeleken aan de hand van een T-test (indien niet meer dan twee behandelingen vergeleken dienden te worden) of One-Way Variantie Analyse (ANOVA) indien meer dan twee behandelingen vergeleken werden. Om uit te maken tussen welke groepen significante verschillen optraden werd vervolgens gebruik gemaakt van de Post-Hoc test Tukey HSD. Beide voorwaarden voor ANOVA, normaliteit en homoscedasticiteit, werden getest door Shapiro-Wilk W test, respectievelijk Levenetest. Waar nodig werd een log-transformatie van de data uitgevoerd om aan deze voorwaarden te voldoen. De Shapiro-Wilk W test werd verkozen boven de Kolmogorov-Smirnov test voor normaliteit omdat deze test betrouwbaarder is voor een klein tot medium aantal replica's ($N < 50$) (Shapiro & Wilk, 1965). Indien niet aan de voorwaarden voor parametrische toetsen voldaan werd of indien het aantal replica's per groep minder dan 5 bedroeg, werd getest met de niet-parametrische Kruskal-Wallis test. Indien hierbij een significant verschil gevonden werd, werden de groepen twee aan twee onderling vergeleken met de niet-parametrische Mann Withney U test.

Indien voor bepaalde gegevens andere statistische testen gebruikt werden, worden deze in de tekst tussen haakjes vermeld.

3.6. Software

- **BASE - BioArray Software Environment 1.2.17.**
Voor normalisatie en LIMMA-analyse van de microarray data.
- **BioEdit 7.0.9.0.**
Voor het aligneren en bewerken van verkregen gensequenties.
- **Blast2Go 2.2.0.**
Voor de annotatie en ontologie van de differentieel tot expressie komende genen op de microarray.
- **FujiFilm Image Reader FLA-5000 v. 1.0.**
Voor het scannen van de *fosfo-imaging* plaat.
- **FujiFilm MultiGauge 381472**
Voor het bewerken en verduidelijken van de beelden verkregen na scannen van de *fosfo-imaging* plaat
- **GenePix Pro 4.1.**
Voor bewerking, spot identificatie en spotanalyse van de microarray beelden.
- **MeV - Multi Experiment Viewer 4.1.**
Voor de statistische analyse en clustering van de differentieel tot expressie komende genen op de microarray.
- **Windermere Humic Aqueous Model (WHAM) 6.0.8.**
Voor berekening van vrije concentratie zinkionen in media.
- **QuantityOne v. 4.5.2. (Bio-Rad)**
Voor het scannen en analyseren van agarosegels.
- **Statistica 6.0.**
Voor de statistische verwerking van de gegevens, anders dan deze afkomstig van de microarray experimenten.

4. Resultaten

4.1. AIMS

Daar de AIMS-techniek (Frigola *et al.*, 2002) nog niet beschreven was voor *Daphnia magna* en in de literatuur nog geen indicaties terug te vinden waren van het methylatieniveau in *D. magna*, diende de techniek eerst voor *Daphnia* geoptimaliseerd en gevalideerd te worden.

4.1.1. Optimalisatie

Alhoewel men in het oorspronkelijke protocol werkte met 6-knipper restrictie-enzymen, werd er bewust voor gekozen om te werken met 4-knippers. Er zouden immers voor deze 4-knippers meer restrictieplaatsen in het genoom moeten zijn (theoretisch is er voor 4-knippers 1 restrictiesite per 256 bp, voor 6-knippers bedraagt dit 1/4096). Dit verhoogt niet alleen de kans op detectie van methylatie, maar eveneens worden zo kortere fragmenten bekomen die gedurende PCR-amplificatie met een hoger rendement en minder fouten geamplificeerd worden. Het AIMS-protocol vereist dat beide gebruikte restrictie-enzymen eenzelfde restrictieplaats herkennen en dat één van beide enzymen methylatie-gevoelig is. De keuze voor de restrictie-enzymen kwam zo op HpaII (methylatie-gevoelig, knipt enkel wanneer de restrictieplaats niet gemethyleerd is) en MspI (methylatie-ongevoelig). Nadeel van deze keuze was dat beide enzymen na knippen dezelfde *sticky ends* achterlaten. Dit zou in latere stappen van het protocol tot gevolg hebben dat de adaptor aan alle restrictiesites (zowel diegene geknipt door HpaII als diegene geknipt door MspI) zou ligeren. Vermits het protocol echter enkel amplificatie van *intermethylated* sites beoogt, was dit niet wenselijk. Dit probleem werd omzeild door na digestie met HpaII een Klenow-polymerase stap in te voeren. Dit had tot gevolg dat de *sticky ends* achtergelaten door HpaII aangevuld werden tot *blunt ends*. De werking van het Klenow-polymerase kon eenvoudig nagegaan worden door DNA enkel met HpaII te knippen, de *sticky ends* aan te vullen met Klenow-polymerase, adaptors te ligeren, de fragmenten te amplificeren met adaptorspecifieke primers en de stalen op agarosegel te scheiden. Indien het Klenow optimaal werkt, zijn er geen *sticky ends* voor adaptorligatie beschikbaar, is er bijgevolg ook geen PCR-amplificatie en zijn op de gel geen bandjes zichtbaar.

De gebruikte adaptors waren ADPT B-GC en ADPT B (of Blue). De gebruikte adaptorspecifieke primer was Apis-Blue (figuur 4.1). Om een mooier bandenpatroon te krijgen (minder smeer) werden Apis-Blue primers met extra selectieve nucleotiden gebruikt.



Figuur 4.1. Voorstelling van de gebruikte adaptors en primers in het AIMS protocol.

Om de kwaliteit van de adaptorligatie te controleren, werd een pre-amplificatie uitgevoerd m.b.v. de adaptorspecifieke Apis-Blue primer, al dan niet met extra selectieve nucleotiden. Deze stalen werden later gescheiden op een agarosegel.

Wanneer deze pre-amplificatie het gewenste resultaat opleverde, werden sommige stalen opgezuiverd door middel van de Illustra GFX PCR Purification kit (GE Healthcare). Doel was na te gaan of deze extra purificatie (GFX) van de PCR-producten in het latere proces een kwaliteitswinst zouden opleveren, zoals minder achtergrondsmateriaal, minder aspecifieke PCR-producten, ... Tenslotte werden primers en ladders gelabeld volgens de methodiek beschreven in materiaal en methoden (zie 3.1.6.1.) en werd een HOT-PCR uitgevoerd waarna de stalen op een polyacrylamide gel geladen werden. Aanvankelijk werden heel wat positieve en negatieve controles meegenomen om de kwaliteit van de verschillende stappen in het protocol te kunnen controleren:

- PCR-blanco met H₂O ipv. DNA
- stalen waar geen adaptorligatie uitgevoerd werd, maar wel purificatie (GFX)
- stalen zonder adaptorligatie en purificatie (GFX)
- stalen enkel geknipt met HpaII en zonder purificatie (GFX)
- Humane cellen (HeLa), zonder ligatie, maar met purificatie (GFX)
- Humane cellen (HeLa), zonder ligatie en purificatie (GFX)
- Humane cellen (HeLa) enkel geknipt met HpaII, maar met purificatie (GFX)
- Humane cellen (HeLa) enkel geknipt met HpaII en zonder purificatie (GFX)

Humane HeLa cellen werden meegenomen als een soort positieve controle, omdat verwacht werd dat humane cellen meer methylatie zouden hebben dan het DNA afkomstig van *Daphnia*. In de literatuur wordt immers beschreven dat methylatieniveau's in vertebraten gemiddeld hoger liggen dan deze in invertebraten (Bird, 2002). Zekerheid daaromtrent was er echter niet.

Initieel werd het hele protocol doorlopen met stalen van vier dagen oude *Daphnia*'s en vier Apis-Blue primers met twee selectieve nucleotiden, nl. -AA, -AT, -TC en -TT. Er werden geen verschillende primercombinaties getest: ieder staal werd geamplificeerd met twee identieke primers. Deze keuze werd enkel om praktische redenen gemaakt, nadat duidelijk was dat deze manier van werken genoeg banden op de gel opleverde. Een overzicht van alle stalen en hun bijhorende behandelingen die gedurende deze eerste initiële pogingen gebruikt werden, is te vinden in tabel 4.1.

De resultaten van de pre-amplificaties van deze eerste stalen waren zoals verwacht. HOT-PCR en scheiding op polyacrylamide gel leverde niet het gewenste resultaat op (resultaat niet weergegeven): veel laantjes vertoonden geen resultaat, de ladder was slecht zichtbaar, er was veel achtergrondsignaal waardoor veel bandjes nauwelijks onderscheidbaar waren. Bandjes in controlestalen die enkel geknipt werden met HpaI wezen op een onvoldoende werking van het Klenow-polymerase.

Tabel 4.1. Overzicht van de stalen en hun bijhorende behandelingen die gedurende de eerste pogingen in de optimalisatie van het AIMS protocol gebruikt werden.

Staalnr.	Omschrijving	Behandeling
L	25 bp ladder	-
<i>Met selectieve nucleotiden</i>		
-	PCR blanco	H ₂ O i.p.v. DNA
2	<i>D. magna</i> , juveniel, 4 dagen, F2 BI	volledig protocol doorlopen
3	<i>D. magna</i> , juveniel, 4 dagen, F2 BI	volledig protocol doorlopen
4	<i>D. magna</i> , juveniel, 4 dagen, F2 BI	zonder PCR purificatie (GFX)
5	<i>D. magna</i> , juveniel, 4 dagen, F2 BI	zonder PCR purificatie (GFX)
10	<i>D. magna</i> , juveniel, 4 dagen, F2 BI	enkel MspI, met GFX
11	<i>D. magna</i> , juveniel, 4 dagen, F2 BI	enkel MspI, met GFX
12	<i>D. magna</i> , juveniel, 4 dagen, F2 BI	enkel MspI, zonder GFX
13	<i>D. magna</i> , juveniel, 4 dagen, F2 BI	enkel MspI, zonder GFX
18	Humane cellen (HeLa)	met GFX
19	Humane cellen (HeLa)	met GFX
20	Humane cellen (HeLa)	zonder GFX
21	Humane cellen (HeLa)	zonder GFX
<i>Controlestalen</i>		
26	<i>D. magna</i> , juveniel, 4 dagen, F2 BI	zonder ligatie
27	<i>D. magna</i> , juveniel, 4 dagen, F2 BI	zonder ligatie, zonder GFX
28	<i>D. magna</i> , juveniel, 4 dagen, F2 BI	geen MspI, zonder GFX
31	Humane cellen (HeLa)	zonder ligatie, met GFX
32	Humane cellen (HeLa)	zonder ligatie, zonder GFX
33	Humane cellen (HeLa)	zonder MspI, met GFX
34	Humane cellen (HeLa)	zonder MspI, zonder GFX
<i>Zonder selectieve nucleotiden</i>		
-	PCR blanco	H ₂ O i.p.v. DNA
2	<i>D. magna</i> , juveniel, 4 dagen, F2 BI	volledig protocol
4	<i>D. magna</i> , juveniel, 4 dagen, F2 BI	zonder PCR purification
<i>Controlestalen</i>		
26	<i>D. magna</i> , juveniel, 4 dagen, F2 BI	zonder ligatie
27	<i>D. magna</i> , juveniel, 4 dagen, F2 BI	zonder ligatie en zonder GFX
28	<i>D. magna</i> , juveniel, 4 dagen, F2 BI	geen MspI, zonder GFX

Doordat veel stalen die na de pre-amplificatie wel resultaat gaven, nu geen zichtbaar resultaat opleverden, werd verondersteld dat er iets gedurende de HOT-PCR moest misgelopen zijn. Daarom

werd beslist deze opnieuw uit te voeren. Omdat de stalen geamplificeerd gebruik makende van de Apis-Blue-AA primer het minste resultaat opleverden, werden deze in de tweede HOT-PCR vervangen door stalen die geamplificeerd werden met de Apis-Blue primer zonder extra selectieve nucleotiden. Hiervoor werd verwacht dat dit meer bandjes zou opleveren.

Het resultaat (niet weergegeven) op deze gel was beter dan het vorige, echter werden er nog steeds minder bandjes waargenomen dan verwacht op basis van de pre-amplificaties, was er nog steeds veel achtergrondsignaal, waren er weinig duidelijke bandjes en bleek de labelling van de ladder wederom niet goed gelukt.

Er waren, zoals verwacht, meer bandjes te zien bij de *Daphnia*-stalen die enkel geknipt werden met het methylatie-ongevoelige MspI (stalen 12 en 13). Bij de stalen geamplificeerd met de Apis-Blue-TC primers waren de bandjes duidelijker onderscheidbaar dan bij de stalen geamplificeerd met de Apis-Blue primer zonder selectieve nucleotiden, welke een smeer op de gel gaven. Tevens zijn er bij de niet-geligeerde controlestalen 26 en 27 die geamplificeerd werden met de Apis-Blue-TC primer een aantal bandjes zichtbaar, wat wijst op aspecifieke amplificatie.

Bij de humane HeLa-stalen (stalen 18, 20 en 21) waren enkele bandjes te zien die niet op de humane controles te zien waren.

Zoals verwacht uit de vorige gel, waren ook hier in zowel de *Daphnia*- (26-28) als de humane controlestalen (31-34) bandjes waar te nemen, welke zowel wezen op aspecifieke amplificatie (stalen 26, 27, 31 en 32) als op onvolledige opvulling door het Klenow-polymerase (stalen 28, 33 en 34).

Op basis van de stalen geamplificeerd met Apis-Blue-TC primer kon wel besloten worden dat de HOT-PCR gelukt was. Uit de stalen enkel geknipt met MspI was eveneens af te leiden dat de restrictieligatie geslaagd was. Deze beide waarnemingen hielden in dat de techniek over het algemeen vrij goed gelukt was.

Om de robuustheid van de techniek nog te verhogen en ter controle of er wel degelijk methylatie gedetecteerd werd, werd de aanpak gewijzigd:

- De gels werden gedurende langere tijd gelopen om een betere scheiding van de bandjes bovenaan de gel te verkrijgen.
- Omdat uit voorgaande gels zeer verscheidene resultaten verkregen werden bij stalen geamplificeerd met verschillende Apis-Blue primers met verschillende selectieve nucleotiden, werd eveneens besloten om meer primers met twee of drie selectieve nucleotiden uit te testen.
- Een aantal stalen werd voor het laden op de gel verdund, om na te gaan of dit een verminderd achtergrondsignaal tot gevolg had.
- In plaats van volledig negatieve controles zonder ligatie, werden stalen enkel behandeld met ofwel MspI ofwel HpaII om op die manier een differentieel bandenpatroon te verkrijgen dat detectie van methylatie moest vergemakkelijken. De methylatiebandjes waren dan diegene die enkel voorkwamen in het staal geknipt met MspI en niet in het staal geknipt met HpaII.

Aspecifieke amplificatie zou in elk van de twee stalen moeten voorkomen, zodat dit probleem op deze manier omzeild werd. Bovendien liet deze manier van werken toe om ook fragmenten die slechts aan één uiteinde gemethyleerd zijn te detecteren en niet enkel fragmenten die aan weerskanten gemethyleerd zijn (*intermethylated*). Ook dit vergrootte de kans op detectie van methylatie.

Op basis hiervan werden stalen 55-57 behandeld volgens het AIMS protocol, maar enkel geknipt met HpaII of MspI (tabel 4.2.). Pre-amplificatie van deze stalen met primers Apis-Blue-AT, -TT en -TC gaf goede resultaten (niet weergegeven) en een HOT-PCR met de primers Apis-Blue-TC, -AC, -AG, -GA, -CTG en -TGG en -CTG werd telkens op de stalen 2, 3, 4, 5, 12, 55, 58, 59, 57 en 56 uitgevoerd. Voor laden op de gel werden sommige stalen vijf maal verdund, nl. de stalen -AC 4, -AC 12, -AG 4, -AG 55, -GA 4, -GA 58, -TC 4, -TC 58, -CTG en -TCG 58. Ontwikkeling van de film (resultaten niet weergegeven) leverde geen methylatiebanden op, maar toonde wel aan dat de techniek reproduceerbaar was, daar voor de stalen geamplificeerd met de Apis-Blue-TC primer eenzelfde bandenpatroon verkregen werd als op de vorige gel. Verdunnen bleek een slechte zaak, naast minder achtergrond waren ook de bandjes veel minder zichtbaar. Tevens werd op basis van deze film beslist om de GFX-purificatie stap in het protocol te behouden daar dit over het algemeen aanleiding gaf tot duidelijkere, meer intense bandjes. Stalen geamplificeerd met Apis-Blue primers voorzien van drie selectieve nucleotiden bleken veel minder bandjes te geven dan primers met twee selectieve nucleotiden. Om de kans op DNA-methylatie detectie te verhogen werd geopteerd om enkel nog primers met twee selectieve nucleotiden te gebruiken.

Tabel 4.2. Overzicht van de stalen en hun bijhorende behandelingen gebruikt tijdens de tweede fase van de optimalisatie van het AIMS protocol.

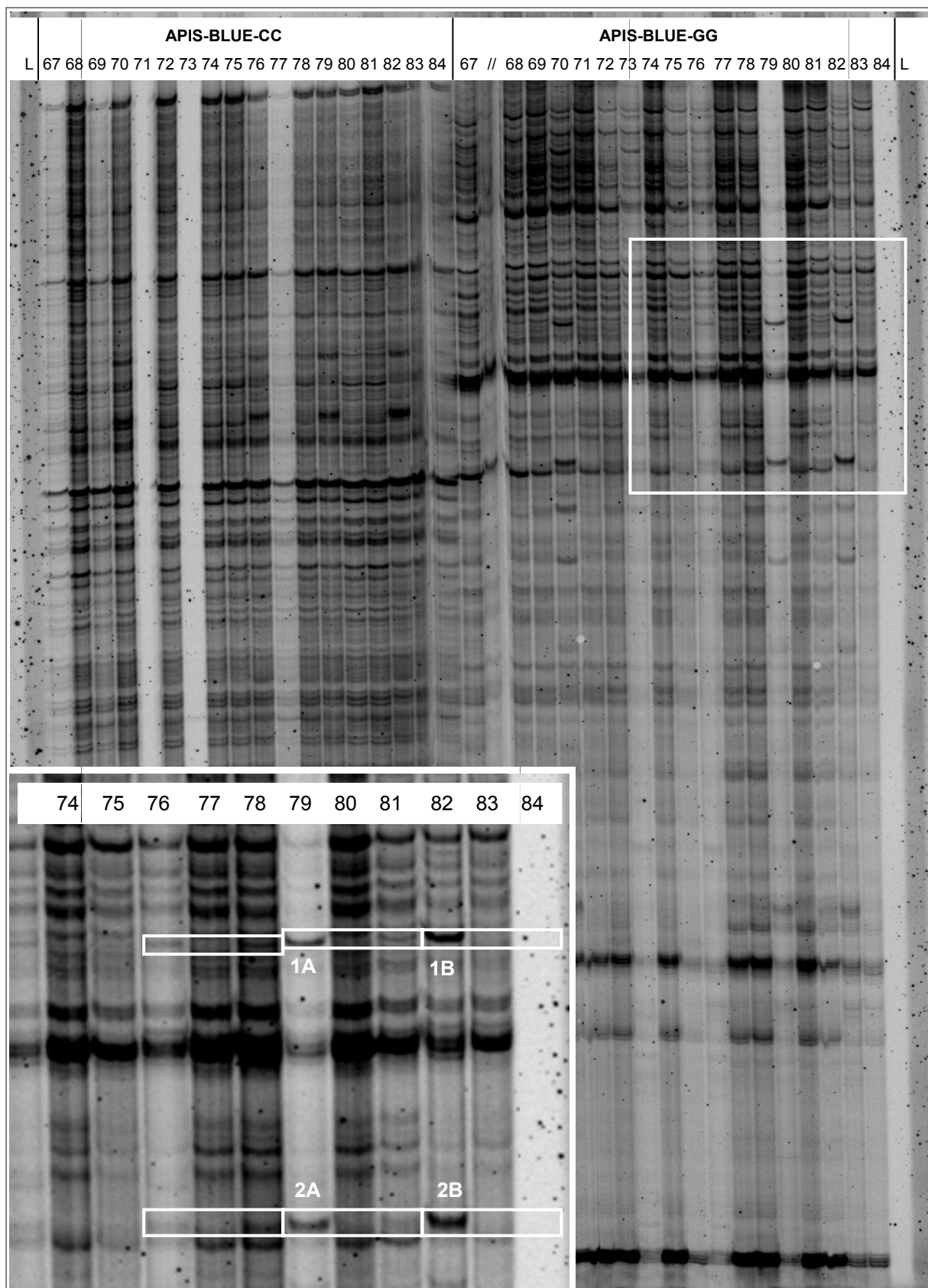
Staalnr.	Omschrijving	Behandeling
55	<i>D. magna</i> , juveniel, 4 dagen, F2 BI	enkel HpaII, zonder GFX
56	<i>D. magna</i> , adult, 27 dagen, F1 BI	enkel HpaII, zonder GFX
57	<i>D. magna</i> , adult, 27 dagen, F1 BI	enkel MspI, zonder GFX
58	<i>D. magna</i> , adult, 27 dagen, F1 BI	volledig protocol, zonder GFX
59	<i>D. magna</i> , adult, 27 dagen, F1 BI	volledig protocol, met GFX
60	<i>D. magna</i> , adult, 21 dagen, F1 Cd	volledig protocol, met GFX
61	<i>D. magna</i> , adult, 21 dagen, F1 Cd	volledig protocol, met GFX
62	<i>D. magna</i> , adult, 21 dagen, F1 Cd	enkel MspI, met GFX
63	<i>D. magna</i> , adult, 21 dagen, F1 Cd	enkel HpaII, met GFX
64	<i>D. magna</i> , adult, 21 dagen, F1 Cd	enkel MspI, zonder GFX
65	<i>D. magna</i> , adult, 27 dagen, F1 BI	enkel MspI, met GFX
66	<i>D. magna</i> , adult, 27 dagen, F1 BI	enkel HpaII, met GFX

Uit voorgaande waarnemingen werd besloten om meer primers met slechts twee selectieve nucleotiden te testen. Eveneens werden nog andere stalen bereid van adulte (21 en 27 dagen), aan cadmium blootgestelde en controle *Daphnia*'s (stalen 60-66, zie tabel 4.2).

Alle mogelijke Apis-Blue primers met twee selectieve nucleotiden werden getest. Naast primers Apis-Blue-AA, -AT, -TC, -TT, -AC, -AG en -GA die reeds getest waren, werden eveneens de primers Apis-Blue-TA, -TG, -GG, -GT, -GC, -CC, -CT, -CG en -CA getest voor de stalen 3, 4, 65, 66, 60, 61, 62 en 63. De meeste primers gaven geen methylatiebandjes (resultaten niet weergegeven). Voor de primers Apis-Blue-CC, -CG en -GG werden mogelijke methylatiebandjes gedetecteerd (resultaten niet weergegeven). Bevestiging van deze methylatie werd gezocht door voor deze drie primers een nieuwe HOT-PCR op te zetten met meer stalen (stalen 67-84, zie tabel 4.3.). Voor de primer Apis-Blue-GG werd de methylatie bevestigd (resultaten niet weergegeven). Voor de primers Apis-Blue-CC en -GG werd tenslotte, in aanloop voor de validatie, een nieuwe gel gelopen om goede scheiding van de bandjes te bekomen zodat latere uitsnijding vergemakkelijkt werd (zie figuur 4.2.).

Tabel 4.3. Overzicht van de stalen en hun bijhorende behandelingen gebruikt tijdens de finale optimalisatie van het AIMS protocol.

Staalnr.	Omschrijving	Behandeling
67	<i>D. magna</i> , 4 dagen, F2 BI	volledig protocol
68	<i>D. magna</i> , 4 dagen, F2 BI	enkel HpaII, met GFX
69	<i>D. magna</i> , 4 dagen, F2 BI	enkel MspI, met GFX
70	<i>D. magna</i> , 4 dagen, F3 BI	volledig protocol
71	<i>D. magna</i> , 4 dagen, F3 BI	enkel HpaII, met GFX
72	<i>D. magna</i> , 4 dagen, F3 BI	enkel MspI, met GFX
73	<i>D. magna</i> , 4 dagen, F3 BI	volledig protocol
74	<i>D. magna</i> , 4 dagen, F3 BI	enkel HpaII, met GFX
75	<i>D. magna</i> , 4 dagen, F3 BI	enkel MspI, met GFX
76	<i>D. magna</i> , 4 dagen, F1 Cd	volledig protocol
77	<i>D. magna</i> , 4 dagen, F1 Cd	enkel HpaII, met GFX
78	<i>D. magna</i> , 4 dagen, F1 Cd	enkel MspI, met GFX
79	<i>D. magna</i> , 4 dagen, F1 Cd	volledig protocol
80	<i>D. magna</i> , 4 dagen, F1 Cd	enkel HpaII, met GFX
81	<i>D. magna</i> , 4 dagen, F1 Cd	enkel MspI, met GFX
82	<i>D. magna</i> , 4 dagen, F1 Cd	volledig protocol
83	<i>D. magna</i> , 4 dagen, F1 Cd	enkel HpaII, met GFX
84	<i>D. magna</i> , 4 dagen, F1 Cd	enkel MspI, met GFX

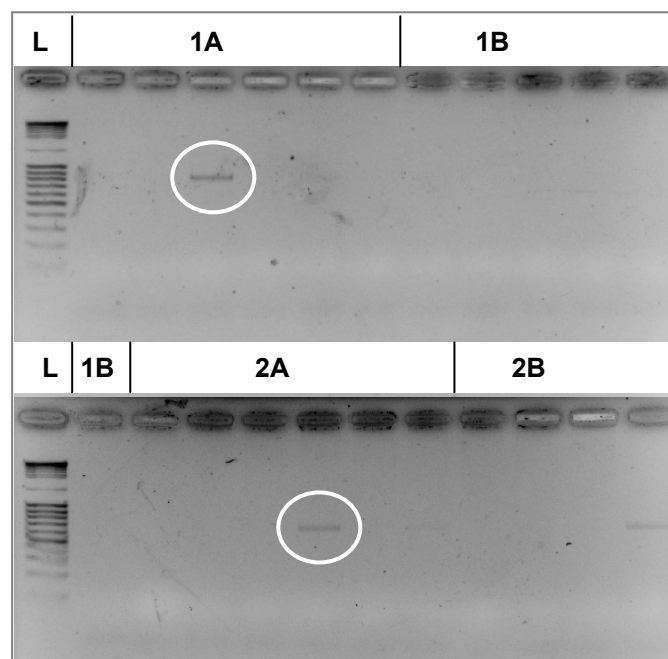


Figuur 4.2. AFIP-gel bekomen na optimalisatie van het AIMS protocol. De *insert* linksonder is een uitvergroting van het met wit omkaderde deel van de gel. In de *insert* is de mogelijke methylatiedetectie omkaderd. De (arbitrair) benoemde banden werden uitgesneden en gesequeneerd.

4.1.2. Bandextractie en -sequencing

Slechts twee van de gemethyleerde bandjes (zie figuur 4.2.) werden in duplo uit de gel gesneden, in 100 μL bigedestioneerd gebracht en gedurende de nacht bij 4°C geïncubeerd om te resuspenderen. Dit beperkt aantal bandjes werd bewust gekozen omdat deze kwalitatief de beste waren (meest intens, minste achtergrondsignalen). De bandjes werden arbitrair 1A, 1B, 2A en 2B genoemd (zie figuur 4.2.). Na resuspensie werden de bandjes aanvankelijk in drie verschillende concentraties geamplificeerd in een PCR met de adaptorspecifieke Apis-Blue primer. De drie concentraties waren respectievelijk 1 μL , 5 μL en 10 μL van het geresuspendeerde staal in een zelfde volume PCR-reactiemengsel. Na scheiding op agarosegel bleek de amplificatie het beste te werken voor de laagste concentratie (resultaten niet weergegeven). Mogelijk omdat bij deze concentratie mogelijk inhiberende factoren uit de gelblot of ladingsbuffer zo'n lage concentratie bereikt hadden dat hun inhiberend effect op de PCR-reactie te verwaarlozen was. Deze concentratie was echter nog niet optimaal (te veel achtergrondsignaal) en dus werd verfijnd op zoek gegaan naar een betere concentratie in een range rond deze eerste.

Hiertoe werd het oorspronkelijke geresuspendeerde staal 10x en 100x verdund. Van de 10x verdunning werd wederom 1 μL en 5 μL in een zelfde volume PCR-reactiemengsel gebracht. Van de 100x verdunning werd 1 μL in het reactiemengsel gebracht. Hiernaast werden dezelfde concentraties van de vorige keer opnieuw meegenomen in een nieuwe PCR-reactie (zie figuur 4.3.).



Figuur 4.3. Resultaat van de amplificatie van de gemethyleerde fragmenten bekomen uit de gel van het AIMS-protocol. De gebruikte ladder (L) was een MassRuler DNA Ladder Mix (Fermentas). Voor ieder fragment (1A, 1B, 2A en 2B) werden volgende verdunningen in volgorde geladen (zie tekst voor meer uitleg): 100x 1 μL ; 10x 1 μL ; 10x 5 μL ; 1 μL ; 5 μL en 10 μL . De aangeduide banden werden geëxtraheerd.

De bandjes aangeduid in figuur 4.3. (voor 1A en 2A) werden uit de gel geëxtraheerd volgens de methode beschreven in materiaal en methoden (zie 3.1.10.) en gesequeneerd. De bekomen sequenties worden weergegeven in bijlage 1.

Analyse van deze sequenties met NCBI BLAST en BLASTx leverde geen aanvaardbare resultaten op ($E\text{-value} > 10^{-3}$). Er werden slechts significante alignments (40-55% *positives*) bekomen voor maximaal 50 nucleotiden van de sequenties of 30 vertaalde aminozuren.

4.1.3. Genome walking

Verder onderzoek van methylatie kan gebeuren door middel van bisulfietsequencing (zie verder). Bisulfietsequencing steunt op het feit dat in DNA, behandeld met bisulfiet, cytosine residu's converteren naar uracil, behalve als de cytosine residu's gemethyleerd zijn. Om mogelijke inhibitie van dit proces te voorkomen, werd geopteerd om de gesequeneerde fragmenten op te pikken uit het genomische DNA. Op die manier werd terug vertrokken van zuiver DNA. De via AIMS gedetecteerde methylatie bevindt zich normaal aan de uiteinden van de gesequeneerde fragmenten. Daarom konden voor het oppikken van deze fragmenten die deze gemethyleerde sites bevatten, geen primers op de gesequeneerde fragmenten zelf ontworpen worden, maar dienden ze op aangrenzende stukken DNA ontworpen te worden. Om deze aangrenzende stukken DNA te bepalen werd gebruik gemaakt van *Genome Walking* (zie 3.1.11.). Het principe van *Genome Walking* wordt kort geschetst in figuur 4.4.

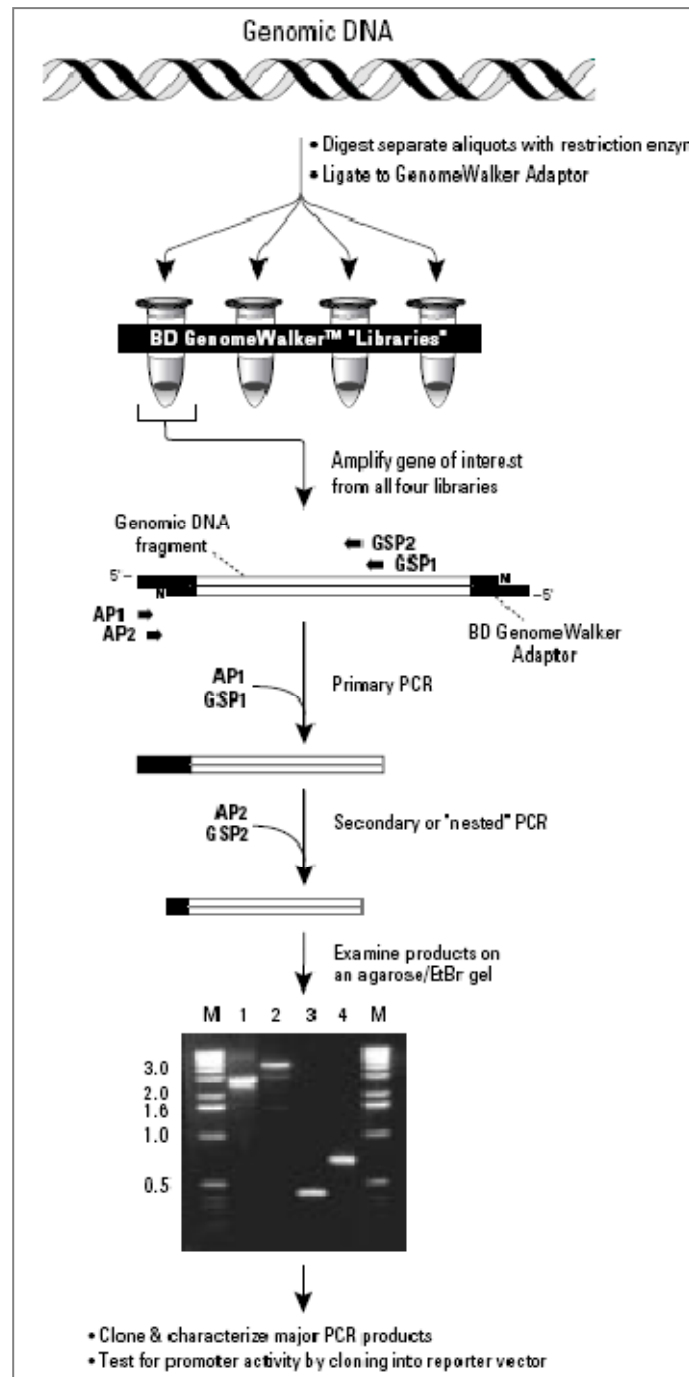
Aanvankelijk werden per sequentie vier genspecifieke primers ontwikkeld: twee *nested* primers voor amplificatie van *upstream* gelegen stukken genomisch DNA en twee *nested* primers voor amplificatie van *downstream* gelegen stukken genomisch DNA. De primers en hun bindingsplaats op de sequenties worden voorgesteld in tabel 4.4. Op basis van deze primers werden na het doorlopen van het protocol sequenties gevonden voor 1A_{down} en 2A_{up} (figuur 4.5.A.). Klonering van fragmenten die uit de bibliotheken voortkwamen na amplificatie met de *nested* primers voor 1A_{up} en 2A_{down} gaf, zelfs na diverse pogingen en aanpassingen, geen resultaat.

Uiteindelijk werd geopteerd om het hele *Genome Walking*-protocol opnieuw te doorlopen op basis van nieuw ontwikkelde genspecifieke primers (2A_{down}1bis, 2A_{down}2bis en 1A_{up}bis; tabel 4.4.), welke in verschillende onderlinge combinaties gebruikt werden. Dit leverde wel resultaat op (figuur 4.5.B/C.).

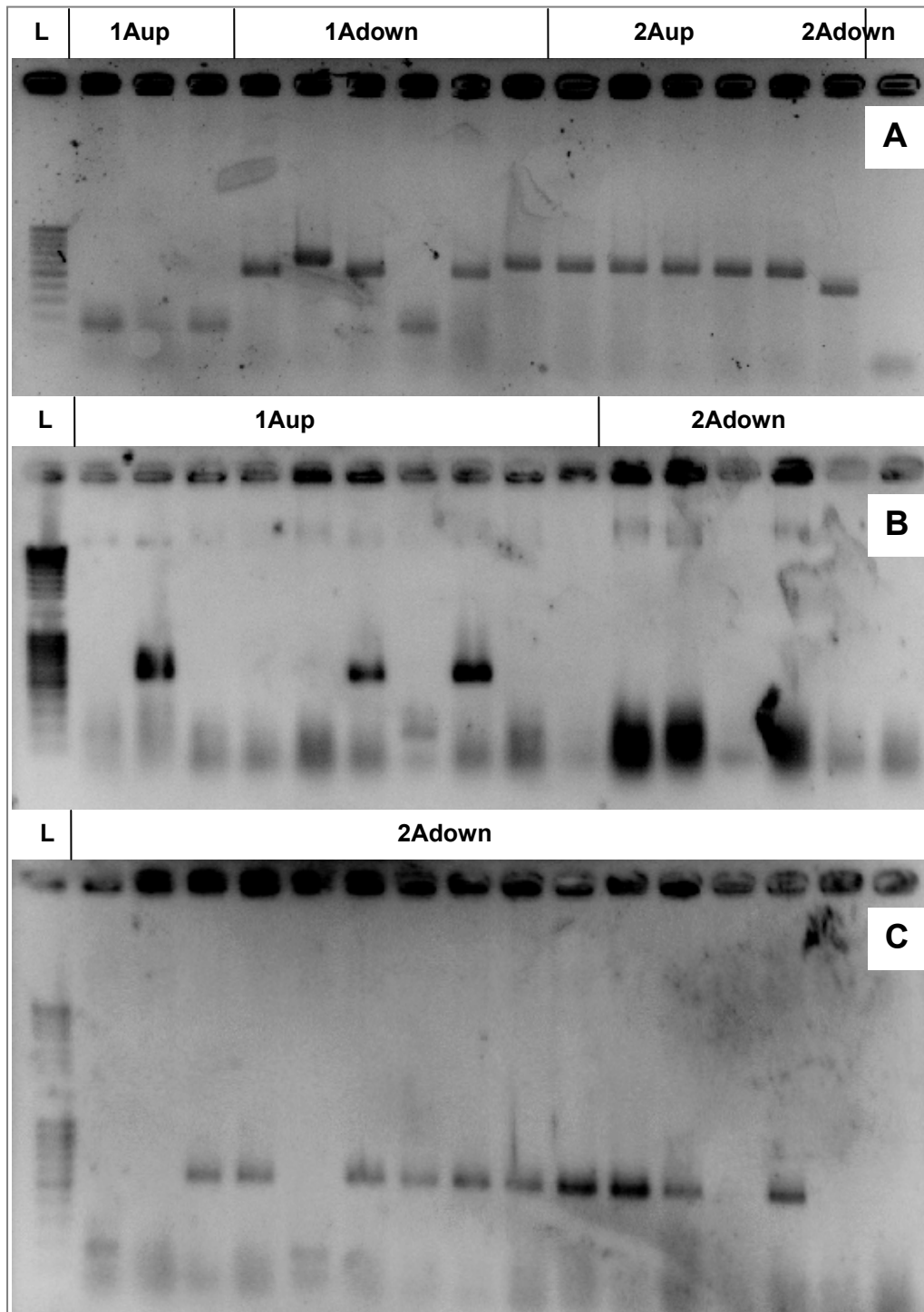
Op basis van de gevonden sequenties werden de sequenties van de aangrenzende stukken DNA bepaald (zie bijlage 2). Voor de sequentie 2A konden geen aangrenzende DNA bepaald worden: de DNA-fragmenten opgepikt uit de genome walking vertoonden geen 100% overlap met de eerder gevonden 2A-sequentie. Waarschijnlijk werd gedurende het *genome walking* protocol een verwant gen opgepikt waar ook de genspecifieke primers op bonden maar dat toch enige variaties in de gensequentie vertoonde t.o.v. de eerder bepaalde 2A-sequentie. Voor het verdere verloop werd dus enkel met de sequentie 1A gewerkt. Op de aangrenzende stukken DNA van deze sequentie werden

primers ontwikkeld welke gebruikt konden worden om d.m.v. PCR de juiste fragmenten uit het genomisch DNA te amplificeren.

Analyse van de 1A sequentie met aangrenzende stukken DNA met NCBI BLAST en BLASTx leverde geen aanvaardbare resultaten op ($E\text{-value} > 10^{-3}$).



Figuur 4.4. Schematisch overzicht van het principe van *genome walking*.



Figuur 4.5. Klonering van de fragmenten bekomen uit het *Genome Walking* protocol. **A:** succesvolle kolonie-PCR voor de fragmenten met sequenties *downstream* van 1A (1Adown) en *upstream* van 2A (2Aup). Ieder laantje is afkomstig van een andere kolonie. De gebruikte ladder (L) was GeneRuler Low range (Fermentas); **B en C:** succesvolle kolonie-PCR voor de fragmenten met sequenties *upstream* van 1A (1Aup) en *downstream* van 2A (2Adown). Ieder laantje is afkomstig van een andere kolonie. De gebruikte ladder (L) was MassRuler DNA Ladder Mix (Fermentas).

Tabel 4.4. Overzicht van de gebruikte genspecifieke primers in het *genome walking* protocol. De kolom positie duidt op de positie van de primer in de sequenties 1A, respectievelijk 2A, achteraan bijgevoegd in bijlage 1.

naam	sequentie	lengte (bp)	T _m (°C)	%GC	positie
1Aup1	5' TAGGAACACAAAACAGTGGATTGGAC 3'	26	56,4	42,3	186-211
1Aup2	5' GGCATAAAACTCGCAAACAATGTGG 3'	25	56,0	44,0	141-165
1Aupbis	5' TTGCCGCGAAACCACGCCGACATCG 3'	25	64,0	64,2	93-117
1Adown1	5' CCGCCCAAACCGCGCAGAGCTAC 3'	24	64,2	66,7	582-605
1Adown2	5' GTGGTCGATCTGGTAGTCCTTAACG 3'	25	59,3	52,0	616-640
2Aup1	5' ACTTGCAGGCATAGCGTTCTAGGTC 3'	25	59,3	52,0	152-176
2Aup2	5' GACACCCCCCGCCTTCGATAACCC 3'	24	64,2	66,7	108-131
2Adown1	5' GCGGTGTATGTAAGATCTTTTCTGTG 3'	26	56,4	42,3	487-512
2Adown2	5' GAAACCACAACAGGGGTCTTATGGG 3'	25	59,3	52,0	531-555
2Adown1bis	5' ACAGGGGTCTTATGGGTCCATCGAAG 3'	26	61,1	53,8	540-565
2Adown2bis	5' CCTCGAGGCGTTGGTGTCAAGAGTC 3'	25	62,2	60,0	579-603

4.1.4. Verder onderzoek d.m.v. bisulfietsequencing

Na het op punt stellen van de AIMS techniek werd gepoogd om door middel van de bisulfietsequencing techniek dezelfde methylatiesites te detecteren. Deze werd uitgevoerd zoals beschreven in materiaal en methoden (zie 3.1.13.). Zoals eerder vermeld volgt het uit de AIMS techniek dat de DNA-methylatie zich bevindt in de herkenningsequentie van de toegepaste restrictie-enzymen. Vermits het zo verkregen fragment 1A 763 bp lang was, en een PCR-reactie slechts optimaal werkt voor sequenties kleiner dan 400 bp werd geopteerd om beide herkenningsequenties (en dus methylatiesites) afzonderlijk te amplificeren.

Oorspronkelijk was het de bedoeling om ervoor te zorgen dat er geen CpG dinucleotiden in de primers voor amplificatie voorkomen, daar men nooit zeker kan zijn van de methylatiestatus van deze cytosines. Was het cytosine niet gemethyleerd zou het door de bisulfietbehandeling omgezet zijn tot uracil en zou de primer zijn specificiteit verliezen. Daar het echter onmogelijk was om zulke primers voor het gesequeneerde fragment 1A te ontwikkelen en daar bovendien ook niet met zekerheid geweten is dat cytosinemethylatie in het *Daphnia* genoom enkel in CpG-dinucleotide verband voorkomt, werd geopteerd om te werken met degeneratieve primers. Dit hield in dat voor de *forward* primers alle cytosines degeneratief omgezet moesten worden naar C of T (m.a.w. Y) en dat voor de *reverse* primer alle guanines degeneratief omgezet dienden te worden naar G of A (m.a.w. R). De gebruikte primers worden weergegeven in tabel 4.5.

Tabel 4.5. Overzicht van de gebruikte primers in de PCR amplificatie na bisulfietbehandeling. De kolom positie duidt op de positie van de primer in de sequentie 1A met up- en downstream sequenties, achteraan bijgevoegd in bijlage 2. De vermelde sites zijn eveneens in bijlage 2 terug te vinden.

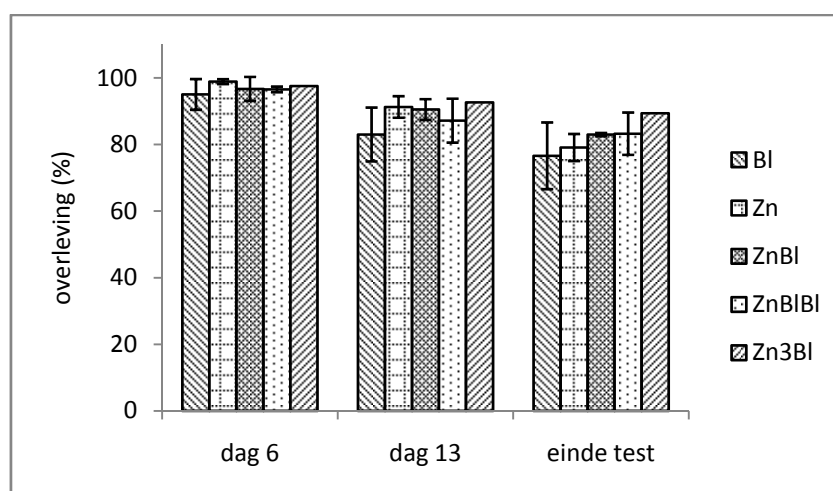
naam	sequentie	lengte (bp)	T _m (°C)	%GC	positie
1A_site1_fw	5' AGTTGATGTAAYYYYGTGYT 3'	20	59,5	50,0	504-523
1A_site1_rev	5' CCCAARRACTRRAARTCARA 3'	20	60,2	55,0	634-653
1A_site2_fw	5' TYAATATGGGAYTYGAYTT 3'	20	59,7	50,0	1323-1342
1A_site2_rev	5' RRTTTACCCRTACARCCTTTC 3'	21	69,9	52,4	1454-1474

Om de optimale annealingstemperatuur van de primers voor de PCR-reactie te bepalen werd een gradiënt-PCR opgezet zoals beschreven in materiaal en methoden (zie 3.1.13.). Scheiding op gel van de PCR-geamplificeerde fragmenten leverde na twee pogingen echter geen resultaat op. Wegens tijdgebrek en de niet noodzakelijkheid van deze techniek in de optimalisatie van het AIMS protocol (zie discussie) werd geopteerd verdere pogingen en optimalisatie te staken.

4.2. Fysiologische parameters

4.2.1. Overleving

In figuur 4.6. wordt de procentuele overleving in de aquaria weergegeven.



Figuur 4.6. Procentuele overleving van *Daphnia magna* in de aquaria. Resultaten voor dezelfde behandelingen werden over de verschillende generaties samengenomen.

Vermits van iedere behandeling in iedere afzonderlijke generatie ten alle tijde slechts één aquarium was, kon geen statistiek toegepast worden. Vermits echter uit de data (niet weergegeven) weinig verschillen naar voren kwamen, werden de data van de verschillende generaties per behandelingen samengevoegd, zodat statistisch vergelijk wel mogelijk was, uitgezonderd voor de behandeling “Zn3BI” daar deze enkel in de vierde generatie voorkwam. Er werden geen significante verschillen

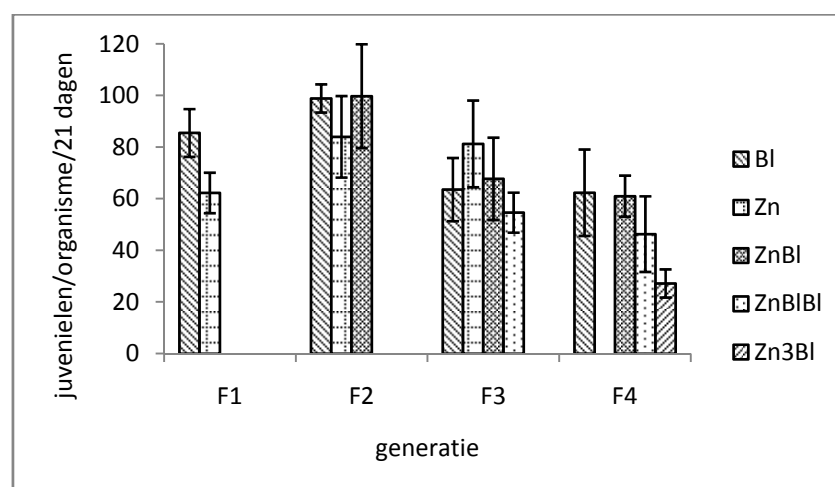
tussen de verschillende behandelingen waargenomen. De gemiddelde procentuele overleving in het zink-medium over alle generaties heen bedroeg $79,09 \pm 4,06$ %, voor de overleving in de blanco-media was dit $83,06 \pm 5,22$ %.

4.2.2. Reproductie

Zowel in de aquaria als in de buisjes voor de opvolging van de reproductie werd de reproductie opgevolgd. Aangezien dit in de buisjes per individueel organisme kon gebeuren zijn deze resultaten nauwkeuriger. In wat volgt zullen dan ook voornamelijk deze resultaten besproken worden.

In de buisjes werd van die individuen die overleefden tot dag 21 het totaal aantal nakomelingen bepaald. Deze resultaten zijn weergegeven in figuur 4.7. In de eerste generatie (F1) werd een significant verschil ($p < 0,05$) tussen de reproductie in het blanco- en in het zinkmedium waargenomen. De reproductie in het zinkmedium bedroeg gemiddeld 23 juvenielen/adult/21 dagen, d.i. 27,2% minder dan in het blancomedium. In de volgende generatie (F2) verkleint het effect naar 15,0% minder juvenielen per adult per 21 dagen in de zink (maar wel nog significant, $p < 0,05$) om in de derde generatie (F3) tenslotte te verdwijnen. Hier is het effect zelfs omgekeerd: de reproductie in het zinkmedium doet het met 27,8% meer juvenielen per adult per 21 dagen zelfs significant ($p > 0,05$) beter dan in het blancomedium.

Binnen de generaties deden de andere aquaria het over het algemeen niet significant beter of slechter dan de blanco. Enkel de vierde generatie (F4) vormde hierop een uitzondering: hier waren enkel BI en ZnBI niet significant verschillend ten opzichte van elkaar. Voor de opvallend mindere prestatie van Zn3BI in de vierde generatie is geen verklaring vermits de experimentele condities voor alle aquaria zo constant mogelijk werden gehouden. Bovendien kwam deze behandeling slechts eenmaal voor gedurende de hele kweek, zodat vergelijking onmogelijk was en het besluit of dit eenmalig voorkwam of een verlaat effect was, niet getrokken kon worden.



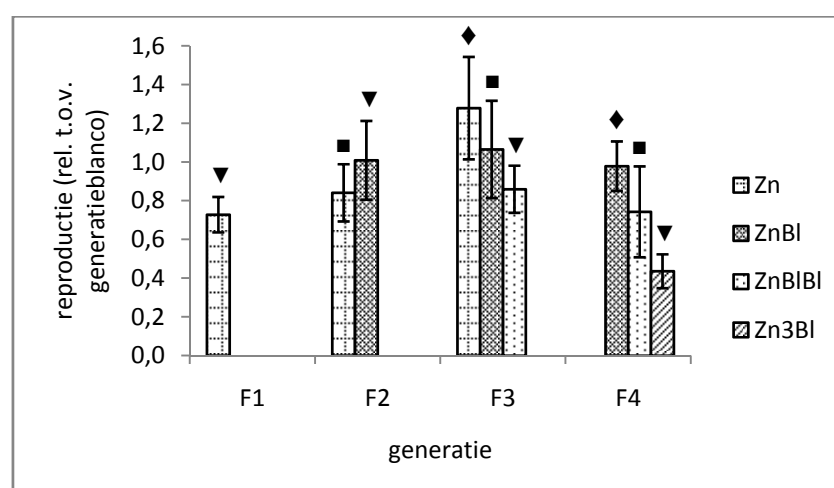
Figuur 4.7. Gemiddeld totaal aantal nakomelingen per organisme voor de verschillende generaties en behandelingen, berekend voor de organismen die tot het einde van de opvolging van de reproductie in de buisjes overleefden.

Om over verschillende generaties heen te kunnen vergelijken, werden de verschillende waarden relatief uitgedrukt t.o.v. de blanco (figuur 4.8.). Daar reproductie in blanco media tussen sommige generaties significante verschillen opleverde, wordt op deze manier gecorrigeerd voor de blanco en geven de resultaten enkel nog het effect van de behandeling op de reproductie weer, en niet het effect van mogelijke andere factoren gekoppeld aan de generatie.

Wanneer de overeenkomstige behandelingen over de verschillende generaties heen bekeken worden, was onmiddellijk te zien dat deze nergens significant verschilden, behalve bij de zink-behandeling in de derde generatie (F3) die een significant ($p < 0,05$) hogere reproductie kende t.o.v. de eerste (F1) en tweede generatie (F2) (respectievelijk 55% en 44% hoger). Dit is niet onlogisch, daar de reproductie in het blanco-aquarium in de derde generatie een significant ($p < 0,05$) lagere reproductie heeft t.o.v. deze in de eerste en tweede generatie.

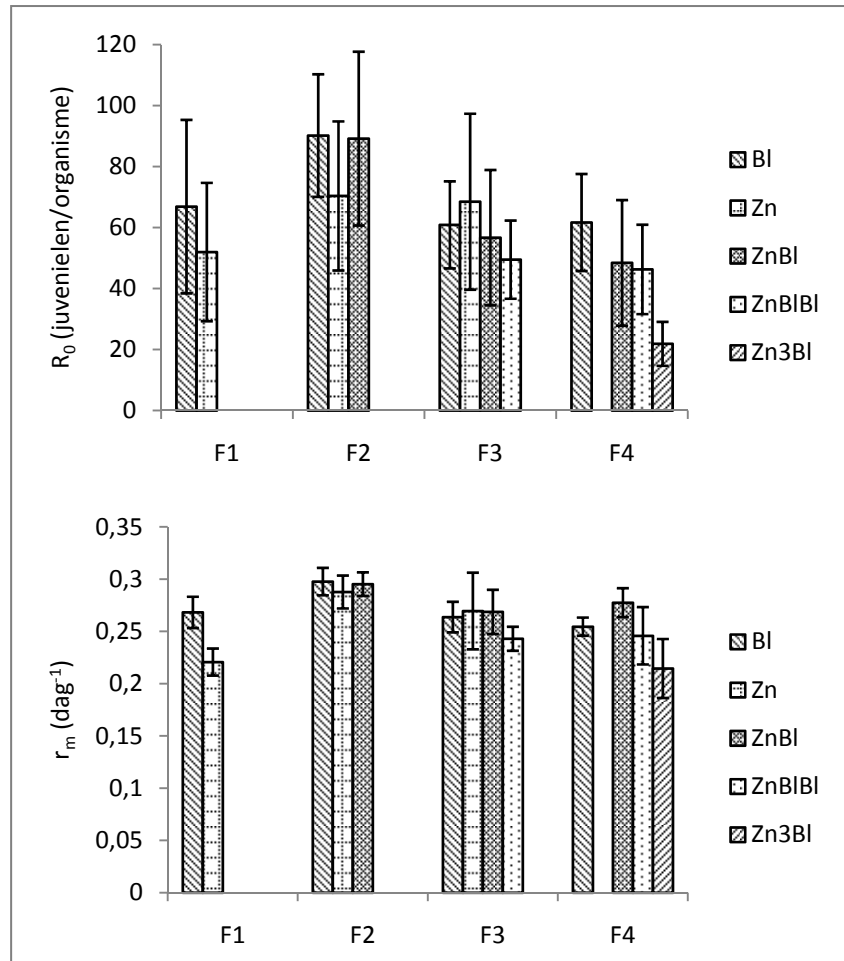
Wanneer verschillende nakomelingenlijnen doorheen de verschillende generaties (resp. [F1 Zn - F2 ZnBI - F3 ZnBIBI - F4 Zn3BI], [F2 Zn - F3 ZnBI - F4 ZnBIBI] en [F3 Zn - F4 ZnBI]) vergeleken werden, werden hier over het algemeen geen significante ($p > 0,05$) verschillen gevonden, behalve in de laatste lijn [F3 Zn - F4 ZnBI] waar het Zn-aquarium een significant ($p < 0,05$) hogere reproductie (23,5%) kende dan in het ZnBI-aquarium. In de lijn [F1 Zn - F2 ZnBI - F3 ZnBIBI - F4 Zn3BI] testte het Zn-aquarium een significant ($p < 0,05$) lagere reproductie dan in de ZnBI- (27% lager) en ZnBIBI-aquaria (12% lager). Het Zn3BI-aquarium testte significant ($p < 0,05$) lagere reproductie t.o.v. alle andere aquaria in de lijn, zonder dat hiervoor een afdoende verklaring te vinden was.

Alhoewel in de eerste en tweede generatie een significant verschil gedetecteerd werd tussen de blanco- en zinkbehandelingen, blijkt dit significant verschil ($p < 0,05$) zich niet in de nakomelingenlijnen verder te zetten. Na het terug plaatsen van de organismen in een blanco medium (resp. F1 ZnBI en F2 ZnBI) na één of twee generaties zinkblootstelling stijgt hun reproductie terug significant ($p < 0,05$) t.o.v. de zinkaquaria tot op een vergelijkbaar niveau van de overeenkomstige generatieblanco. Een mogelijk epigenetische of transgenerationale impact op de reproductie is dus niet detecteerbaar.



Figuur 4.8. Totaal aantal nakomelingen per organisme voor de verschillende generaties en behandelingen, berekend voor de organismen die tot het einde van de chronische test overleefden en relatief uitgedrukt t.o.v. het overeenkomende blanco-gemiddelde. De nakomelingenlijn [F1 Zn - F2 ZnBI - F3 ZnBIBI - F4 Zn3BI] werd aangeduid met '▼', de lijn [F2 Zn - F3 ZnBI - F4 ZnBIBI] met '■' en de lijn [F3 Zn - F4 ZnBI] met '◆'.

Voorts werd eveneens de netto reproductiesnelheid (R_0) en de intrinsieke groeisnelheid (r_m) berekend op basis van de formules van Lotka, zoals beschreven in paragraaf 3.2.4.2. De resultaten hiervan zijn uitgezet in figuur 4.9.



Figuur 4.9. Netto reproductiesnelheid (R_0) en intrinsieke groeisnelheid (r_m) van *Daphnia magna* in functie van de generatie en de behandeling.

Voor de netto reproductiesnelheid werd een analoog beeld waargenomen als voor het totaal aantal nakomelingen (figuur 4.7.). De netto reproductiesnelheid is een parameter die het effect op mortaliteit en reproductie integreert om zo een beeld te verkrijgen van de weerslag van het effect op de populatiedynamica, terwijl het totaal aantal nakomelingen een beeld schetst van het effect op enkel reproductie. Vermits het beeld analoog was, kon besloten worden dat de mortaliteit in alle generaties en behandelingen een vergelijkbare rol speelt. Dit is ook wat besloten kon worden uit paragraaf 4.2.1. In ongelimiteerde situaties zal een populatie aan een maximale snelheid groeien, de intrinsieke groeisnelheid r_m . Enkel de karakteristieken van het organisme zelf bepalen dan hoeveel nakomelingen geproduceerd kunnen worden. Uit de figuur bleek dat er weinig verschillen zijn in intrinsieke groeisnelheid tussen de verschillende generaties en behandelingen. Wat het meeste opviel is dat het verschil tussen de intrinsieke groeisnelheid in de vierde generatie (F4) tussen Zn3BI en de andere

behandelingen vrij beperkt was. Een echte verklaring voor de grote val in reproductie in deze behandeling kon dus blijkbaar niet gevonden worden in de karakteristieken van het organisme zelf, aangezien deze vrij vergelijkbaar zijn met de karakteristieken van de organismen in de andere aquaria.

In de aquaria lag de reproductie in de eerste generaties opvallend lager (resultaten in bijlage 3). In de latere generaties kwamen ze in de buurt van deze waargenomen in de buisjes voor de opvolging van de reproductie. Voor Zn3BI in de vierde generatie was het omgekeerd: in de aquaria lag de reproductie hoger dan in de buisjes (respectievelijk 43,1 en 27,2 juvenielen per adult per 21 dagen). In de aquaria komt de reproductie van Zn3BI hierdoor dicht in de buurt te liggen van de reproductie in de andere aquaria van die generatie. Een mogelijke verklaring voor deze discordantie kon echter niet gevonden worden, daar de proefopzet van de buisjes gedurende de hele kweekprocedure dezelfde was.

Een mogelijke verklaring voor de lagere reproductie in de aquaria gedurende de eerste generaties kon waarschijnlijk gevonden worden in een verschil in densiteit. Waar de densiteit in de aquaria 1 organisme per 10 of 20 mL medium bedroeg (afhankelijk van de leeftijd), was deze in de testbuisjes veel lager (afhankelijk van de hoeveelheid medium in het aquarium). Daar in de latere generaties vertrokken werd van minder organismen dan in de eerste generaties, bevatten de aquaria minder medium, waardoor de verschillen in densiteit afgevlakt werden en tezamen daarmee de verschillen in reproductie tussen beide. Deze vaststelling lag in de lijn van die van Le Blanc *et al.* (1983) die aantoonde dat bij een toenemend volume van 35 tot 200 mL medium per organisme een lineaire stijging van het aantal juvenielen per organisme in functie van het volume voorkwam. Of de stijging van het aantal juvenielen per organisme in het uitgevoerde experiment ook lineair was met toename in het volume, was echter niet te bepalen, daar nooit het exacte volume medium in de buisjes genoteerd werd.

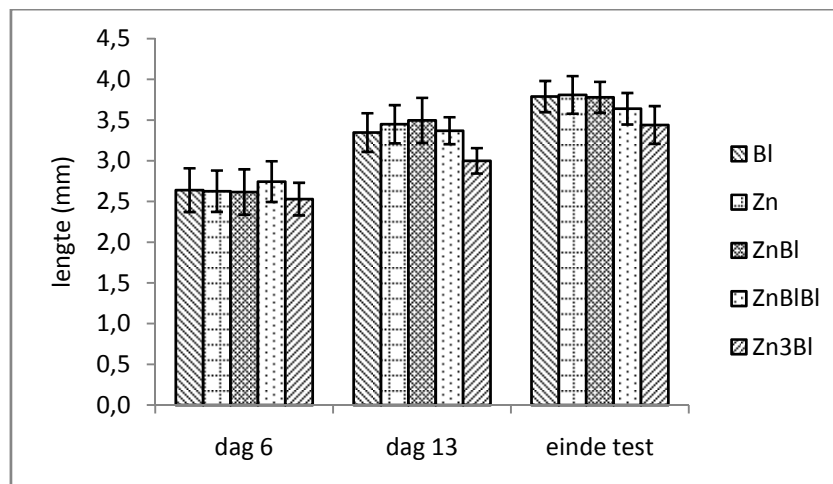
Het gebruik van de buisjes had echter een voordeel t.o.v. meer algemeen gebruik van aparte potjes in de chronische testen. Waar in de aparte potjes de voedselconcentratie nooit helemaal dezelfde is als in de aquaria, was dit bij de gebruikte testopzet wel het geval. De toegediende algen konden vrijelijk in en uit de buisjes migreren via gaas met een diameter van 200 μm waardoor de concentratie in de buisjes dezelfde was dan deze in de aquaria (resultaten niet weergegeven).

Voor de Zn-aquaria over alle generaties lag de reproductie in de aquaria gemiddeld 28,1% lager dan in de testbuisjes.

4.2.3. Lengte

Van tien verschillende organismen per generatie en per behandeling werd op verschillende ouderdommen de lengte bepaald van de kop tot aan de basis van de stekel (zie paragraaf 3.3.2.). De resultaten worden weergegeven in figuur 4.10. Vermits geen significante verschillen gevonden werden tussen dezelfde behandelingen over de verschillende generaties heen (ANOVA, Fisher LSD post-hoc test, $p > 0,05$), werden deze data per behandeling gepoold. Uit de figuur kwam duidelijk naar voren

dat er tussen organismen van dezelfde ouderdom en blootgesteld aan verschillende behandelingen geen significant verschil ($p > 0,05$) was (uitgezonderd Zn3BI op dag 13). Waar de groei van dag 6 naar dag 13 nog gemiddeld met 0,70 mm toenam, nam hij vanaf dag 13 naar het einde van de test slechts nog voor ongeveer de helft toe, nl. 0,36 mm. Alhoewel de organismen uit het Zn3BI aquarium (dat enkel voorkwam in de vierde generatie) op dag 13 significant ($p < 0,05$) kleiner zijn, nl. 12,2% t.o.v. het gemiddelde van alle andere behandelingen, was er op het einde van de test geen sprake meer van een significant verschil tussen deze organismen en deze blootgesteld aan andere behandelingen.

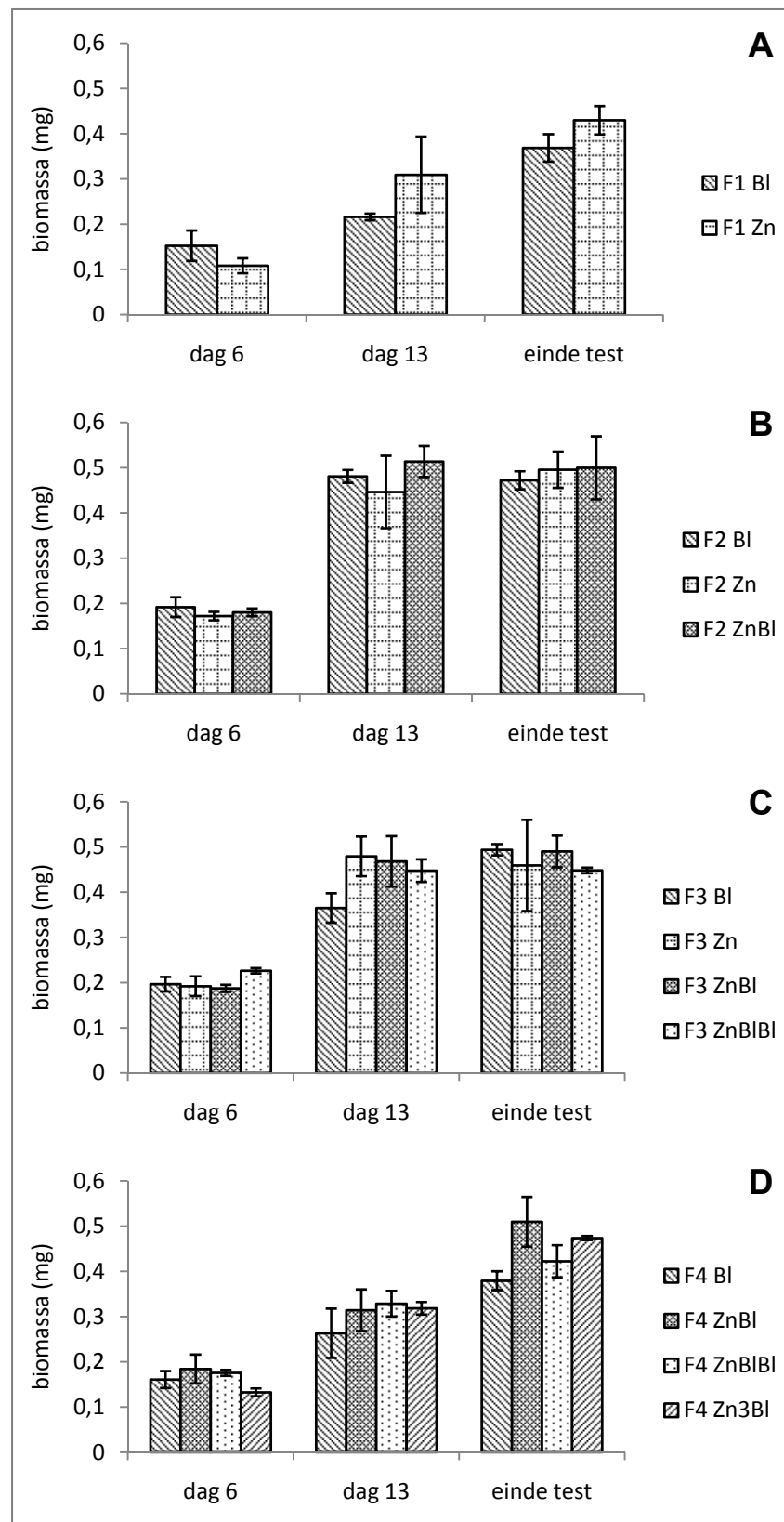


Figuur 4.10. Gemiddelde lengte (mm) van *Daphnia magna* in functie van de ouderdom van de organismen, uitgemiddeld voor dezelfde behandeling over de verschillende generaties heen.

4.2.4. Biomassa

Een aantal organismen werd samen gedroogd en het gemiddelde drooggewicht per organisme werd berekend. Per generatie zijn deze resultaten weergegeven in figuur 4.11.

Deze figuur laat vergelijkingen tussen verschillende behandelingen in eenzelfde generatie gemakkelijk toe. Globaal genomen is in de laatste drie generaties geen significant verschil ($p > 0,05$) tussen de verschillende behandelingen voor organismen met dezelfde ouderdom. In de eerste generatie (F1) echter zijn beide behandelingen op geen enkele ouderdom gelijk (significant, $p < 0,05$). Op dag 6 waren de organismen uit het BI-aquarium nog gemiddeld 29,1% groter dan deze uit de Zn-aquaria. Op dag 13 en op het einde van de test (bij het verschijnen van een 5^e broedsel) was dit echter omgekeerd: de organismen uit het zink-aquarium waren respectievelijk 43,3% en 16,6% groter dan deze uit het blanco-aquarium.



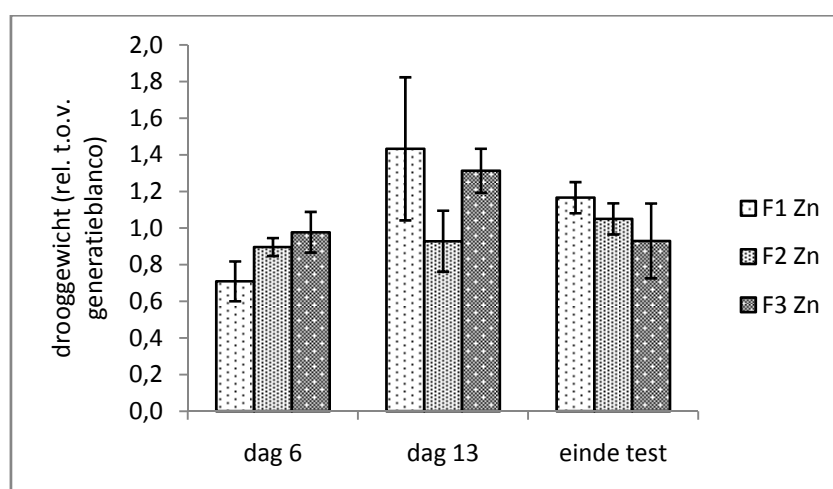
Figuur 4.11. Biomassa van *Daphnia magna* in mg/organisme in functie van de ouderdom voor verschillende behandelingen. Iedere grafiek geeft één generatie weer. **A:** generatie 1 (F1); **B:** generatie 2 (F2); **C:** generatie 3 (F3); **D:** generatie 4 (F4).

In deze eerste generatie was er ook een meer graduele toename van de biomassa te merken naargelang de organismen ouder werden dan in vergelijking met de twee daaropvolgende generaties (F2 en F3). In de andere generaties werd er nog weinig toename in biomassa geregistreerd na dag 13. Een mogelijke verklaring zou acclimatisatie van de organismen in de eerste generatie aan hun nieuwe media kunnen zijn, immers de kweek werd opgezet met organismen afkomstig uit de stamkloon en die in een ander medium gekweekt werden.

Daar er in de metingen op dag 13 in de BI-aquaria over de verschillende generaties heen een significant verschil geobserveerd werd (Kruskal-Wallis Test; $p < 0,05$; significant verschil tussen alle groepen), werd net als eerder gewerkt met de relatieve waarden van de verschillende behandelingen t.o.v. hun overeenkomstige blanco om het effect over verschillende generaties heen te vergelijken. De vergelijking van de Zn-aquaria over de verschillende generaties is weergegeven in figuur 4.12.

Op dag 6 hadden de organismen van de eerste generatie een significant ($p > 0,05$) kleinere biomassa dan deze in de tweede en derde generatie (respectievelijk 18,7% lager en 26,8% lager). Tussen de tweede en derde generatie was er op dag 6 geen verschil. Deze kleinere biomassa in de eerste generatie (F1) was waarschijnlijk het gevolg van gewenning van de organismen aan het nieuwe medium. Op dag 13 waren het de organismen uit de tweede generatie (F2) die t.o.v. de blanco uit de overeenkomstige generatie, een lagere biomassa hadden dan deze uit de eerste en derde generatie (respectievelijk 50,45% lager en 38,49% lager), terwijl op het einde van de test geen significante verschillen ($p > 0,05$) tussen generaties meer werden waargenomen.

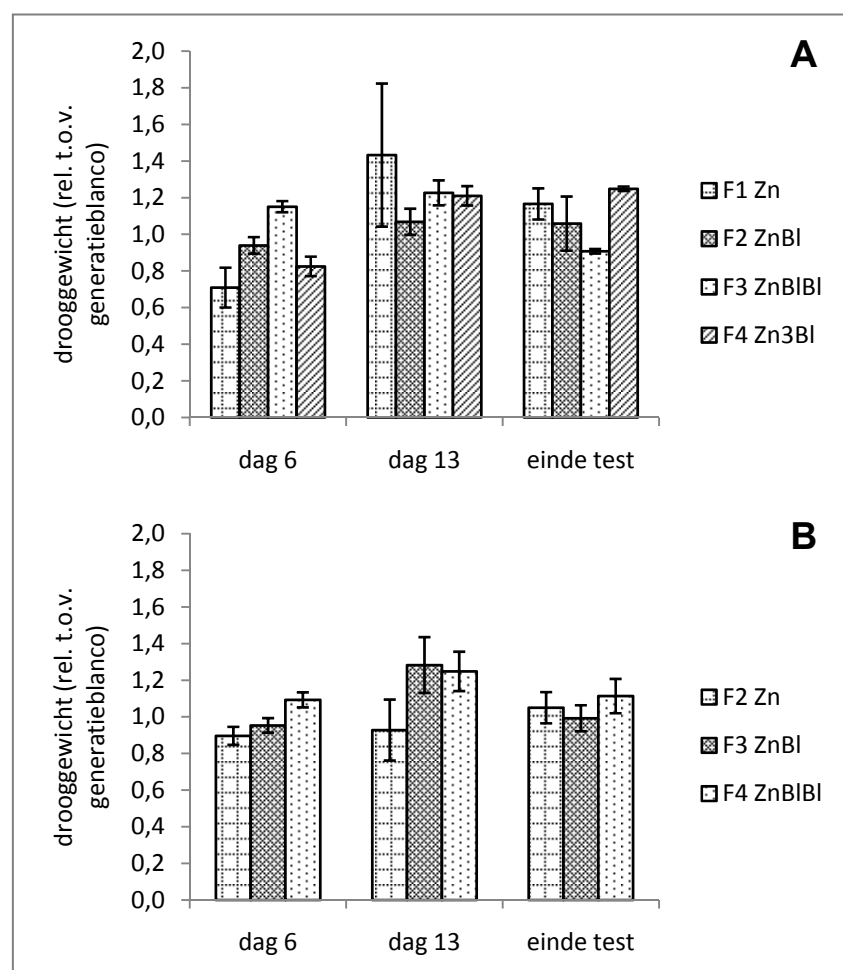
Voor de derde generatie (F3) werd bovendien na de dag 13 een significante terugval van 38,32% in de biomassa waargenomen. Hierbij dient wel in het achterhoofd gehouden te worden dat deze organismen geen werkelijke fysiologische terugval kenden (figuur 4.11.C), daar figuur 4.12. relatief t.o.v. de blanco-waarden werd uitgezet. Waarschijnlijk was deze waarneming te wijten aan het feit dat op dag 13 de organismen van het blanco aquarium een significant kleinere biomassa hadden dan de organismen uit de andere aquaria op die dag (figuur 4.11.C).



Figuur 4.12. Vergelijking van de biomassa van *Daphnia magna* relatief uitgedrukt t.o.v. BI in dezelfde generatie in functie van de ouderdom voor een verschillend aantal generaties Zn-blootstelling.

In figuur 4.13. worden verschillende nakomelingenlijnen doorheen de verschillende generaties (resp. [F1 Zn - F2 ZnBI - F3 ZnBIBI - F4 Zn3BI] en [F2 Zn - F3 ZnBI - F4 ZnBIBI]) vergeleken. Voor de lijn [F3 Zn - F4 ZnBI] werden analoge resultaten verkregen en worden de resultaten om die reden niet weergegeven.

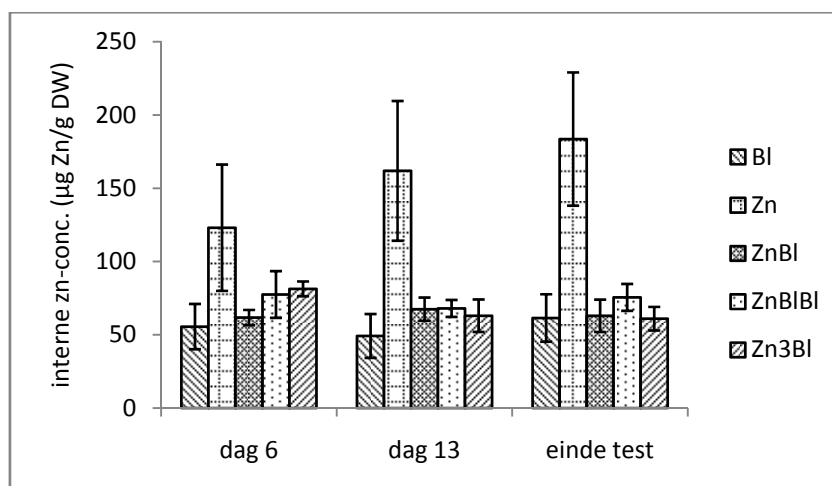
Globaal genomen werden in de twee lijnen weergegeven in figuur 4.13. geen significante ($p > 0,05$) verschillen tussen de verschillende behandelingen waargenomen. In de lijn [F1 Zn - F2 ZnBI - F3 ZnBIBI - F4 Zn3BI] bedroeg de biomassa van de organismen in het zink aquarium significant ($p < 0,05$) minder dan de biomassa in de andere aquaria op dag 6. Opnieuw zou een reden kunnen zijn dat de organismen waarschijnlijk enige tijd nodig hadden om zichzelf aan te passen aan hun nieuwe medium. Op dag 13 en het einde van de test, evenals in de latere generaties, was dit verschil er niet meer.



Figuur 4.13. Vergelijking van de biomassa van *Daphnia magna* in mg/organisme in functie van de ouderdom voor verschillende nakomelingenlijnen. **A:** lijn [F1 Zn - F2 ZnBI - F3 ZnBIBI - F4 Zn3BI]; **B:** lijn [F2 Zn - F3 ZnBI - F4 ZnBIBI].

4.2.5. Zinkaccumulatie

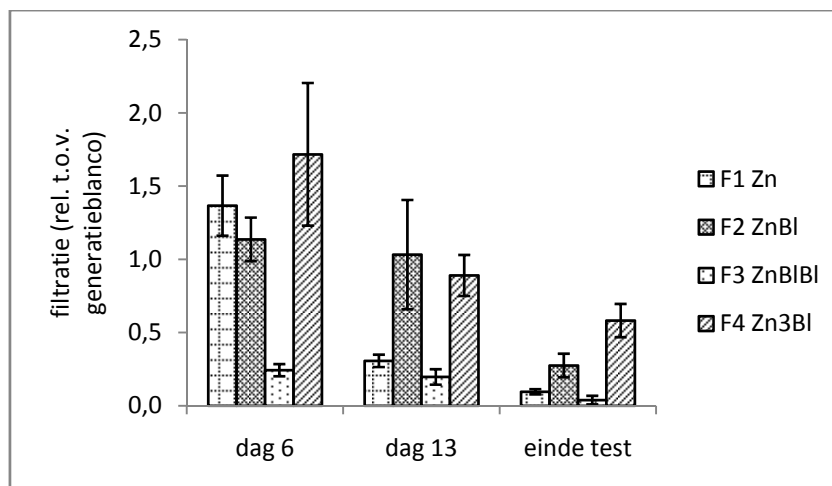
Omdat tussen alle dezelfde behandelingen in de verschillende generaties geen significante verschillen gedetecteerd werden (Kruskal-Wallis test; $p > 0,05$; resultaten niet weergegeven) werden de data voor de verschillende behandelingen in de verschillende generaties gepoold. De resultaten zijn weergegeven in figuur 4.14. Voor de organismen in de zink aquaria werd geen significant verschil gevonden tussen de verschillende ouderdommen. Dit wil zeggen dat de organismen, na blootstelling aan zink, reeds onmiddellijk een zekere hoeveelheid zink in hun lichaam accumuleren (gemiddeld 156 $\mu\text{g Zn/g DW}$) en deze hoeveelheid gedurende de hele generatie constant houden. Indien deze organismen na zink blootstelling in een blanco medium overgebracht werden, daalde de interne concentratie vrijwel onmiddellijk (voor dag 6) naar een vergelijkbaar niveau als de zinkaccumulatie in controle-organismen (blanco aquaria, gemiddeld 55 $\mu\text{g Zn/g DW}$).



Figuur 4.14. Interne zinkaccumulatie in *Daphnia magna* in functie van de ouderdom van het organisme en de behandeling.

4.2.6. Filtratie

De filtratiesnelheid werd gemeten zoals beschreven in paragraaf 3.3.4. De resultaten uit deze metingen waren echter zo variabel (zie figuur 4.15., andere resultaten niet weergegeven) dat hieruit onmogelijk enige besluiten getrokken konden worden. De grote variatie was waarschijnlijk afkomstig uit het feit dat voor de test er geen bijvoeding plaatsvond. Filtratiesnelheid is echter evenredig met de initiële voedselconcentratie (Evers & Kooijman, 1989). Er zal hier dan ook niet dieper op deze resultaten ingegaan worden, noch zullen deze resultaten verder in deze thesis aangehaald of gebruikt worden.



Figuur 4.15. Netto filtratiesnelheid voor de nakomelingenlijn [F1 Zn - F2 ZnBI - F3ZnBI - F4 Zn3BI] in functie van de ouderdom van het organisme en relatief uitgedrukt t.o.v. het gemiddelde van de overeenkomstige blanco.

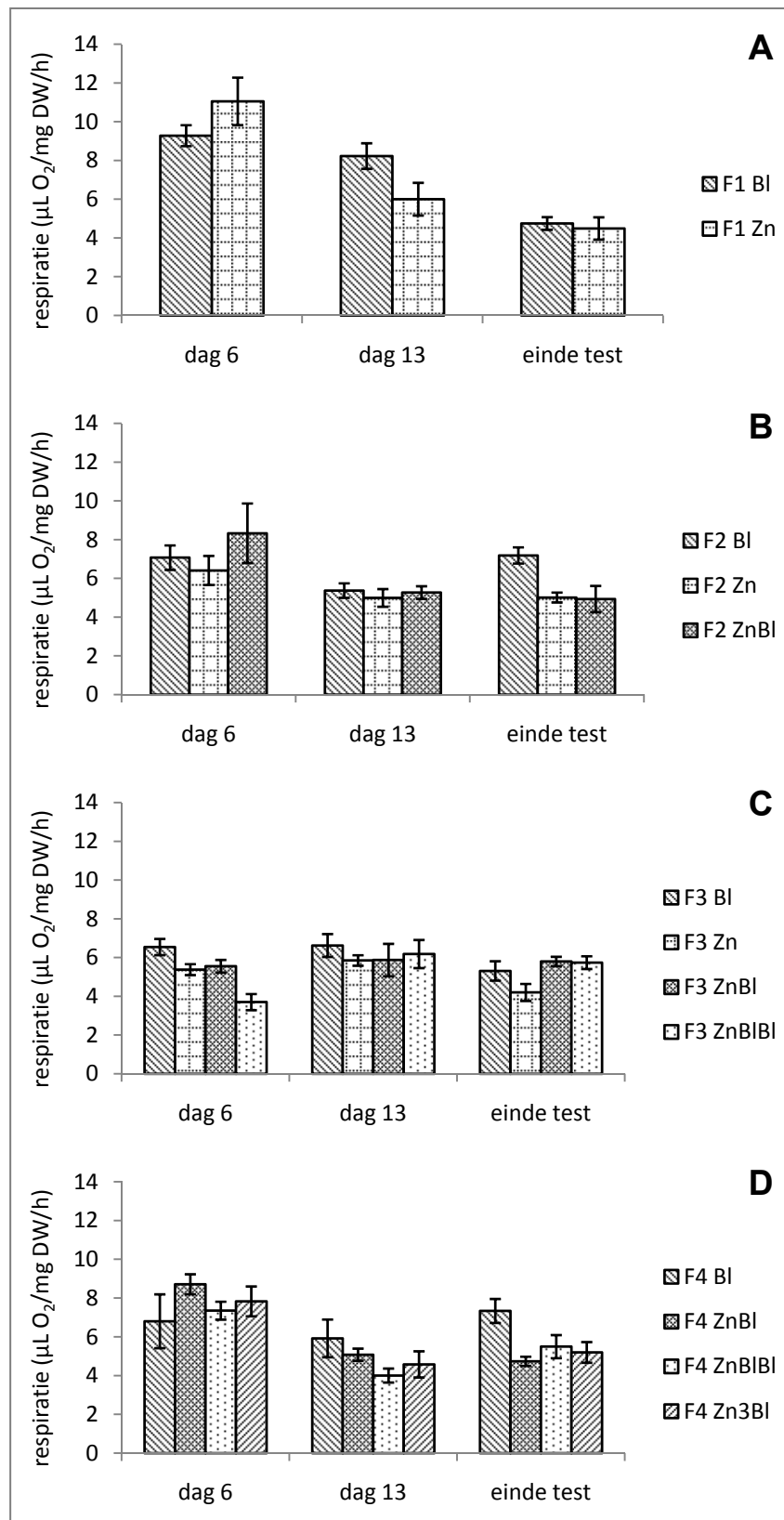
4.2.7. Respiratie

Van een aantal organismen werd gedurende bepaalde tijdstippen in de generatie de respiratie of zuurstofconsumptiesnelheid opgemeten. De resultaten per generatie zijn weergegeven in figuur 4.16. Deze figuur laat vergelijkingen tussen verschillende behandelingen in eenzelfde generatie gemakkelijk toe. Globaal genomen zijn er weinig significante verschillen tussen de verschillende behandelingen in de verschillende generaties. In de eerste generatie (F1) ligt de respiratiesnelheid op dag 6 significant ($p < 0,05$) hoger dan in de andere generaties: gemiddeld $9,28 \mu\text{L O}_2/\text{mg DW/h}$ t.o.v. gemiddeld $6,81 \mu\text{L O}_2/\text{mg DW/h}$ in de laatste drie generaties. Waarschijnlijk had dit te maken met de aanpassing van de organismen aan het nieuwe kweekmedium, dat voor dit experiment verschillend was van het kweekmedium gebruikt voor de stockcultuur. Deze aanpassing zette zich blijkbaar ook nog door op dag 13, daar op deze dag in de eerste generatie de respiratiesnelheden nog steeds hoger liggen (27,4%) dan het gemiddelde in de andere aquaria. Echter op het einde van de generatie (einde test) komt de respiratiesnelheid in de eerste generatie op een vergelijkbaar niveau met deze uit de andere generaties (gemiddeld $6,14 \mu\text{L O}_2/\text{mg DW/h}$).

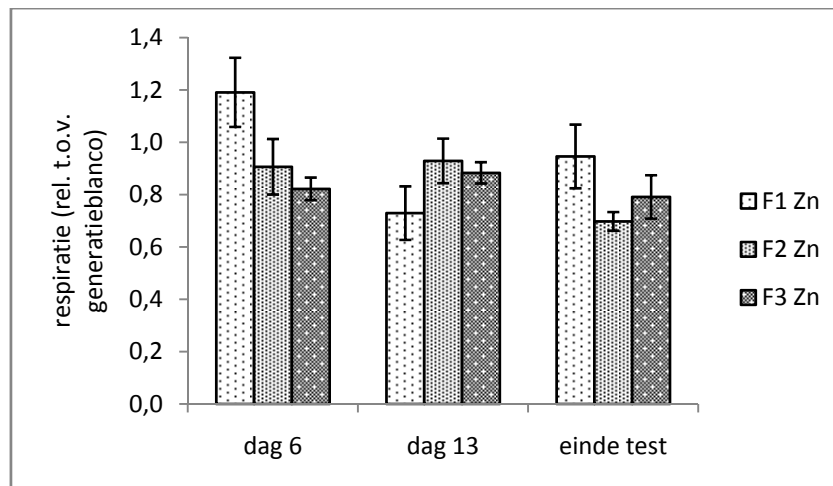
Daar voor dezelfde behandelingen in verschillende generaties soms significante verschillen gevonden werden, werd in wat volgt alles relatief uitgedrukt t.o.v. de overeenkomstige blanco, zodat een beeld verkregen wordt van het werkelijke effect van zink op de respiratie en er gemakkelijk tussen verschillende generaties vergeleken kan worden.

In figuur 4.17. worden de verschillende zink behandelingen onderling vergeleken. Gemiddeld genomen waren er ook hier weinig verschillen waar te nemen. De eerste generatie dient bij deze vaststelling wel min of meer verwaarloosd te worden, daar we hier het sterke effect van de aanpassing aan het nieuwe medium zien.

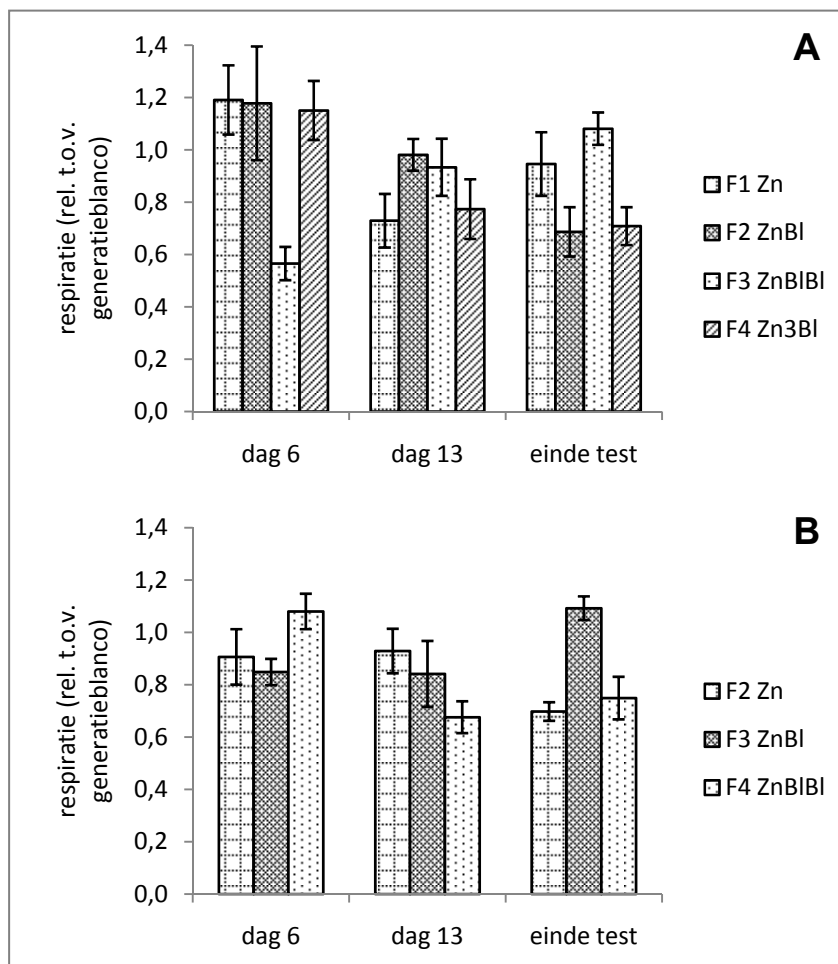
Figuur 4.18. tenslotte geeft de resultaten voor een aantal nakomelingenlijnen weer. Dezelfde vaststellingen als in figuur 4.17. zijn hier van toepassing.



Figuur 4.16. Respiratiesnelheid van *Daphnia magna* per mg drooggewicht in functie van de ouderdom voor verschillende behandelingen. Iedere grafiek geeft één generatie weer. **A:** generatie 1 (F1); **B:** generatie 2 (F2); **C:** generatie 3 (F3); **D:** generatie 4 (F4).



Figuur 4.17. Vergelijking van de respiratiesnelheid van *Daphnia magna* in $\mu\text{L O}_2/\text{mg DW/h}$ in functie van de ouderdom voor een verschillend aantal generaties Zn-blootstelling. De respiratiesnelheden werden steeds relatief t.o.v. de overeenkomstige generatieblanco uitgedrukt.



Figuur 4.18. Vergelijking van de respiratiesnelheid van *Daphnia magna* in $\mu\text{L O}_2/\text{mg DW/h}$ in functie van de ouderdom voor verschillende nakomelingenlijnen (relatief weergegeven t.o.v. de overeenkomstige generatie blanco). **A:** lijn [F1 Zn - F2 ZnBI - F3 ZnBIBI - F4 Zn3BI]; **B:** lijn [F2 Zn - F3 ZnBI - F4 ZnBIBI].

4.3. Genexpressie

De genexpressie van de eerste drie generaties werd bestudeerd aan de hand van microarrays. Zoals vermeld in materiaal en methoden liet het gebruikte design toe om de microarrays door middel van LIMMA-analyse in alle mogelijke combinaties onderling te vergelijken. *Expressed Sequence Tags* met een 2-logaritmische *Fold Change* (FC) van 0,75 (expressie verandert met een factor 1,6) werden beschouwd als differentieel tot expressie komende fragmenten.

4.3.1. Voorafgaande analyse

In een eerste analyse van de arrays werden alle behandelingen vergeleken met hun respectievelijke generatieblanco. Door de hieruit differentieel tot expressie komende fragmenten onderling tussen verschillende behandelingen te vergelijken werd een beeld bekomen van de expressievariatie. Dit werd gedaan voor vergelijking van de expressie in de zinkaquaria over de generaties heen en voor de vergelijking van de expressie in de nakomelingenlijnen [F1Zn - F2ZnBI - F3ZnBIBI] en [F2Zn - F3ZnBI]. De algemene karakteristieken van deze vergelijkingen worden weergegeven in tabel 4.6.

Tabel 4.6. Overzicht van het aantal differentieel tot expressie komende fragmenten na eerste analyse van de expressie in de zinkaquaria, de nakomelingenlijn [F1Zn-F2ZnBI-F3ZnBIBI] en de nakomelingenlijn [F2Zn-F3ZnBI].

	zinkaquaria			NK-lijn [F1Zn-F2ZnBI-F3ZnBIBI]			NK-lijn [F2Zn-F3ZnBI]	
	F1Zn	F2Zn	F3Zn	F1Zn	F2ZnBI	F3ZnBIBI	F2Zn	F3ZnBI
Subset energieregelateerde fragmenten								
totaal # fragmenten	93	97	24	93	89	64	97	61
# upgereguleerd	56	29	13	56	28	36	29	37
% van subset	60,22	29,90	54,17	60,22	31,46	56,25	29,90	60,66
% van eindtotaal	21,37	8,73	13,40	21,37	10,26	15,32	8,73	24,18
# downgereguleerd	37	68	11	37	61	28	68	24
% van subset	39,78	70,10	45,83	39,78	68,54	43,75	70,10	39,34
% van eindtotaal	14,12	20,48	11,34	14,12	22,34	11,91	20,48	15,69
Subset vervellingsgerelateerde fragmenten								
totaal # fragmenten	113	145	46	113	131	74	145	63
# upgereguleerd	92	62	25	92	42	55	62	54
% van subset	81,42	42,76	54,35	81,42	32,06	74,32	42,76	85,71
% van eindtotaal	35,11	18,67	25,77	35,11	15,38	23,40	18,67	35,29
# downgereguleerd	21	83	21	21	89	19	83	9
% van subset	18,58	57,24	45,65	18,58	67,94	25,68	57,24	14,29
% van eindtotaal	8,02	25,00	21,65	8,02	32,60	8,09	25,00	5,88
Subset reproductiegerelateerde fragmenten								
totaal # fragmenten	56	90	27	56	53	97	90	29
# upgereguleerd	26	78	24	26	36	24	78	25
% van subset	46,43	86,67	88,89	46,43	67,92	24,74	86,67	86,21

% van eindtotaal	9,92	23,49	24,74	9,92	13,19	10,21	23,49	16,34
# downgereguleerd	30	12	3	30	17	73	12	4
% van subset	53,57	13,33	11,11	53,57	32,08	75,26	13,33	13,79
% van eindtotaal	11,45	3,61	3,09	11,45	6,23	31,06	3,61	2,61
Eindtotaal								
totaal # fragmenten	262	332	97	262	273	235	332	153
# upgereguleerd	174	169	62	174	106	115	169	116
% van eindtotaal	66,41	50,90	63,92	66,41	38,83	48,94	50,90	75,82
# downgereguleerd	88	163	35	88	167	120	163	37
% van eindtotaal	33,59	49,10	36,08	33,59	61,17	51,06	49,10	24,18

Deze eerste analyse toonde een zeer willekeurige expressie. Vele fragmenten die in de eerste generatie (F1) upgereguleerd werden, werden in de tweede generatie (F2) downgereguleerd om in de derde generatie (F3) weer upgereguleerd te worden of omgekeerd. Dit kwam eveneens voor bij vergelijking van aquaria die dezelfde behandeling ondergingen, wat het vermoeden deed rijzen van een *confounding* factor in de expressie.

4.3.2. Expressie generatieblanco's

In een poging die *confounding* factor te identificeren, werden de verschillende generatieblanco's onderling met elkaar vergeleken. Het aantal differentieel tot expressie komende fragmenten wordt weergegeven in tabel 4.7.

Tabel 4.7. Overzicht van het aantal differentieel tot expressie komende fragmenten na vergelijking van de verschillende generatieblanco's onderling. '*' duidt erop dat deze array als blanco in de analyse gebruikt werd.

	F1BI* vs F2BI	F2BI* vs F3BI	F1BI* vs F3BI
Subset energiegerelateerde fragmenten			
totaal # fragmenten	46	74	34
# upgereguleerd	43	24	8
% van subset	93,48	32,43	23,53
% van eindtotaal	25,90	10,81	5,63
# downgereguleerd	3	50	26
% van subset	6,52	67,57	76,47
% van eindtotaal	1,81	22,52	18,31
Subset vervellingsgerelateerde fragmenten			
totaal # fragmenten	92	114	64
# upgereguleerd	78	37	21
% van subset	84,78	32,46	32,81
% van eindtotaal	46,99	16,67	14,79
# downgereguleerd	14	77	43
% van subset	15,22	67,54	67,19

% van eindtotaal	8,43	34,68	30,28
Subset reproductiegerelateerde fragmenten			
totaal # fragmenten	28	34	44
# upgereguleerd	12	22	19
% van subset	42,86	64,71	43,18
% van eindtotaal	7,23	9,91	13,38
# downgereguleerd	16	12	25
% van subset	57,14	35,29	56,82
% van eindtotaal	9,64	5,41	17,61
Eindtotaal			
totaal # fragmenten	166	222	142
# upgereguleerd	133	83	48
% van eindtotaal	80,12	37,39	33,80
# downgereguleerd	33	139	94
% van eindtotaal	19,88	62,61	66,20

Zoals uit de bovenstaande tabel af te leiden valt, kwamen tussen de verschillende generatieblanco's veel fragmenten differentieel tot expressie.

In een poging om voor deze variabiliteit tengevolge van de generatie te corrigeren werd een 2-factor ANOVA-analyse uitgevoerd, waarbij in één factor de generatie beschouwd werd en in een andere factor de behandeling. Deze laatste factor bestond uit twee groepen: enerzijds de generatieblanco's en anderzijds alle andere behandelingen. De fragmenten die significant testten ($p < 0,05$) op de interactie tussen beide factoren werden beschouwd als fragmenten waarvoor de variatie tussen de verschillende generatieblanco's een oorzaak kan zijn van differentiële expressie. Deze fragmenten werden uit de lijst met differentieel tot expressie komende fragmenten, bekomen uit de voorgaande analyse geschrapt, in een poging enkel die fragmenten die differentieel tot expressie kwamen tengevolge van de zinkstress te kunnen analyseren.

4.3.3. Expressie in de zinkaquaria

De fragmenten die differentieel tot expressie kwamen, na correctie voor de variabiliteit tengevolge van de generatie, worden, samen met hun voorspelde functie, weergegeven in tabel 4.8. Fragmenten waarvan de klasse niet via BLAST, BLASTx of PredictProtein (<http://www.predictprotein.org>) kon achterhaald worden, werden niet in deze tabel opgenomen, maar worden wel met hun bijhorende *accession numbers* vermeld in bijlage 4. Tevens dient opgemerkt te worden dat niet alle EST's op de array gespot, niet-redundant waren. Tengevolge hiervan kwamen meer fragmenten dan in de tabel weergegeven differentieel tot expressie. Echter na hiërarchische clustering van fragmenten die na annotatie tot eenzelfde proteïneklasse bleken te behoren, bleek voor verscheidene EST's de expressie zeer vergelijkbaar te zijn en werd aangenomen dat deze EST's afkomstig waren van eenzelfde gen. Van deze EST's werd, na volledige analyse van alle microarrays, één representatief fragment dat in zoveel mogelijk analyses voorkwam, opgenomen in onderstaande tabellen. Zo werd

tot een enigszins representatief beeld van de differentiële genexpressie in alle generaties en behandelingen bekomen.

Vervolgens werden genen op basis van hun voorspelde proteïneklasse, ingedeeld volgens hun biologische functie door gebruik te maken van genontologie (<http://amigo.geneontology.org>).

Tabel 4.8. Overzicht en voorspelde functie van de differentiële tot expressie komende genen in de zinkaquaria. Expressie werd steeds gemeten t.o.v. de overeenkomstige generatieblanco. Een groene kleur duidt op upregulatie, een rode kleur op downregulatie. Genen op eenzelfde manier gereguleerd in meer dan één generatie werden gemarkeerd.

F1Zn (log ₂ FC)	F2Zn (log ₂ FC)	F3Zn (log ₂ FC)	Acc.nr.	Voorspelde proteïneklasse
Exoskelet gerelateerde proteïnen				
1,2367	-2,2907	1,1157	DW724452	cuticle protein
	-0,8397	-0,8443	DW724655	cuticle protein
		1,5236	DW985605	cuticle protein
1,7048	-3,0308		DW985606	cuticle protein
1,5483	-2,1795		DW724658	cuticle protein
1,9191	-3,7053	1,1169	DW724610	pupal cuticle protein
1,1239	-2,0910		DW985539	pupal cuticle protein
	0,8212		DW724686	pupal cuticle protein
	-1,6134		FD482878	pupal cuticle protein
1,8387	-3,6069	1,3148	DW985600	cuticular proteinrr-1 family (agap009869-pa)
1,6305	-3,0016		EG565384	cuticular proteinrr-1 family (agap009869-pa)
1,8597	-3,3119		DW724668	cuticle protein lcp6
1,4481	-2,2586		DW985607	cuticle protein lcp6
	-1,3170	0,8189	DV075837	cuticle protein lcp6
1,5898	-3,8767	1,3526	DW985490	cg30045-pa
1,7701	-3,6673		DW985543	cg30045-pa
	-1,9090		DW985548	cg30045-pa
	-1,1921		DW724595	obstructor-a cg17052-isoform a
Vertering				
	-1,5122		DW724556	midgut chitinase
Proteolyse				
	-1,0406		DW724480	carboxypeptidase a2
1,2549	-2,7968		DW985507	aminopeptidase n
	1,2385		FD466522	plasma glutamate carboxypeptidase
	-0,7586		DW724489	transglutaminase-like protein
-1,5347			DW724638	cathepsin l
0,7766			FD467096	matrix metalloproteinase
	-1,6545		FD466694	protease m1 zinc metalloprotease
	-0,9691		EH669312	cytl_tactrl-cystatin precursor
Proteïne plooiing				
		1,2069	FD466578	protein disulfide isomerase
Proteïne binding				
-1,5767			DW724697	fc fragment of binding protein
0,9518			EH669330	cg3209-isoform a
	-0,7882		FD466708	cg3209-isoform b
Monooxygenase				
		-0,8624	DW724637	hiu hydrolase
	3,6798		DW724582	cellobiohydrolase i-i
Signaaltransductie/Visuele respons				
1,1748	-2,3634		DW985549	spaetzle-like protein (agap006483-pa)

-1,2450		DW985524	spaetzle-like protein (agap006483-pa)	
0,7625		DW724460	gasp precursor	
0,8265		DY037370	thiamin pyrophosphokinase	
1,1675		DW724559	c-type lectin	
-0,7846		DW724560	long wavelength-sensitive opsin	
Celadhesie/Celinteractie/Celdeling/Cytoskelet				
-1,0654		FD466836	alpha-tubulin	
0,8652		FD467121	alpha-tubulin	
-0,8580		DW724465	myosin light chain 2	
-0,9252		EH669238	myosin heavynonmuscle or smooth muscle	
0,9862		FD466872	myosin regulatory light chain 2 smooth muscle	
	0,8101	DY037393	midline fasciclin	
1,7985		DV075823	heat shock protein 83	
Oxidatieve stressrespons				
0,7891		DY037415	superoxide dismutase	
Embryo-ontwikkeling				
0,7731		DY037254	vitellogenin fused with superoxide dismutase	
0,9667		DY037410	vitellogenin fused with superoxide dismutase	
1,0082	0,8708	DY037252	vitellogenin fused with superoxide dismutase	
0,9006		DY037273	vitellogenin	
-1,5034		DW724602	vitellogenin-like protein	
1,2014	-1,6630	1,1265	DV075833	cheerio cg3937-isoform d
DNA-repair				
0,8090		EG565379	6-4 photolyase	
Immuunrespons				
1,0922	-1,7042	DW985522	plus agglutinin	
	0,7806	FD466718	soluble liver antigen liver pancreas antigen (homo sapiens)like	
Zuurstoftransport/Haemmetabolisme				
-0,9737		DW724628	2-domain hemoglobin protein subunit	
	-0,7597	DY037395	2-domain hemoglobin protein subunit	
-1,0960	-0,7605	EG565362	2-domain hemoglobin protein subunit	
Energie- en ATP synthese				
1,0953		FD466672	atph+mitochondrial f0subunit e	
1,4997	-2,1863	DW985619	vacuolar atp synthase 16 kda proteolipid subunit	
Ionregulatie				
0,7573		FD466427	na+ k+ atpase alpha subunit	
	-0,8721	DW724449	calcium-transporting atpase sarcoplasmic endoplasmic reticulum type (calcium pump)	
Transport				
1,3381		FD466719	sec14-like 2	
0,7942		FD467123	transport protein sec61 gamma subunit	
	0,8041	FD466588	solute carrier family 25 (carnitine acylcarnitine translocase)member 20	
Transcriptie/RNA metabolisme/Ribosomale RNA proteïnen/Translatie				
0,8636		FD467124	elongation factor-1 alpha	
-1,1649		FD482895	elongation factor-1 gamma	
-0,7860		DW985481	ribosomal protein l10	
-0,8741		DW724534	60s ribosomal protein l12	
	0,7727	FD467271	ribosomal protein l18	
0,9981		FD466405	mitochondrial ribosomal protein l12	
-0,9145		DV075844	lsm1u6 small nuclear rna associated	
	1,2523	-0,9536	FD466770	transcription factor e74
	0,9409		FD467083	methionine-trna synthetase 2
		-0,8018	FD466688	u1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kda (u1 snrnp 70 kda)isoform 1
Lipidenmetabolisme				
0,8662		FD482909	apolipoprotein d	

0,8482	FD482928	cytochrome p450
Andere functies		
	0,7948	EG565385 im:7143923 protein C2 calcium-dependent membrane targeting
-0,8127	FD466860	fragile x mental retardation syndrome-related protein
-0,7642	FD482882	takeout like protein
-1,1683	FD466907	ecdysoneless homolog
0,8648	FD467160	max dimerization protein 1
0,7652	DY037387	coatamer proteinsubunit beta 1
-0,7709	EG565366	necap endocytosis associated 1
-1,3069	DW724634	proline rich protein
1,3375	EG565382	alpha-glucosidase isozyme i
1,3559	FD466844	procollagen-2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3
0,8844	EH669243	phage related lysozyme
	-0,8803	FD466500 chromosome 3 open reading frame 23
1,9123	-3,6752	DW985495 mgc131064 protein
1,3530	EH669347	s-adenosylhomocysteine hydrolase

In wat volgt werd enkel rekening gehouden met de genen die geannoteerd konden worden. Immers van de andere fragmenten kon niet bepaald worden of meerdere fragmenten mogelijk tot eenzelfde gen behoorden of niet. Indien wel met deze tellingen rekening gehouden wordt, kan dit een verkeerd beeld opleveren.

17 genen kwamen zowel tot expressie in F1Zn als in F2Zn. Hiervan werden geen op eenzelfde manier gereguleerd. In F2Zn en F3Zn kwamen 10 dezelfde genen tot expressie. Drie genen hiervan werden op eenzelfde manier gereguleerd. Tussen F1Zn en F3Zn werden 5 dezelfde genen gevonden, waarvan allen op eenzelfde manier gereguleerd werden. Tenslotte werden 5 genen gevonden die over alle generaties tot expressie kwamen. Deze 5 genen waren dezelfde dan deze gevonden bij vergelijking tussen F1Zn en F3Zn. Geen van deze vijf genen werden op eenzelfde manier gereguleerd over alle generaties heen. Genen die op eenzelfde manier gereguleerd werden in minstens twee opeenvolgende generaties, werden in tabel 4.8. en in bijlage 4 blauw gemarkeerd.

Na clustering kwamen in de verschillende aquaria F1Zn, F2Zn en F3Zn respectievelijk 33, 65 en 20 genen differentieel tot expressie (exclusief de niet gekarakteriseerde fragmenten, daar hiervan niet geweten kan zijn of er meerdere fragmenten tot eenzelfde gen behoren). In alle aquaria kwamen veel gelijkaardige genen gerelateerd met exoskeletopbouw en ontwikkeling tot expressie. Bij de genen gerelateerd met exoskeletopbouw werd de volgende tendens zichtbaar: genen die in F1Zn upgereguleerd werden, werden in F2Zn bijna steeds anderhalf tot dubbel zo veel keer downgereguleerd, terwijl in F3 Zn sommige genen hiervan terug in een vergelijkbare mate als in F1Zn upgereguleerd werden.

Genen gerelateerd met DNA *repair* en oxidatieve stressrespons, kwamen enkel differentieel tot expressie in de eerste generatie (F1Zn), waarbij ze in vergelijkbare mate upgereguleerd werden.

Differentiële expressie in F3Zn voor genen gerelateerd met proteolyse, proteïnebinding, signaaltransductie, immuunrespons, energie- en ATP-synthese en ionregulatie was niet waar te nemen, waar dit voor de andere twee generaties (F1Zn en F2Zn) wel het geval was.

Tenslotte kwamen in de laatste twee generaties (F2Zn en F3Zn) een aantal genen met uiteenlopende functies tot expressie die niet tot differentiële expressie kwamen in de eerste generatie (ZnF1). Opvallend is dat in beide generaties andere genen betrof die differentieel tot expressie kwamen.

4.3.4. Expressie in de nakomelingenlijn [F1Zn - F2ZnBI - F3ZnBIBI]

De differentieel tot expressie komende genen, na correctie voor de variabiliteit tengevolge van de generatie, worden weergegeven in tabel 4.9. Genen waarvan de functie niet achterhaald kon worden, worden slechts vermeld in bijlage 5. De eerdere werkwijze, zoals beschreven in 4.3.3., werd ook hier toegepast.

Tabel 4.9. Overzicht en voorspelde functie van de differentieel tot expressie komende genen in de nakomelingenlijn [F1Zn - F2ZnBI - F3ZnBIBI]. Expressie werd steeds gemeten t.o.v. de overeenkomstige generatieblanco. Een groene kleur duidt op upregulatie, een rode kleur op downregulatie. Genen op eenzelfde manier gereguleerd in meer dan één generatie werden gemarkeerd.

F1Zn (log ₂ FC)	F2ZnBI (log ₂ FC)	F3ZnBIBI (log ₂ FC)	Acc.nr.	Voorspelde proteïneklasse
Exoskelet gerelateerde proteïnen				
1,3409	-3,6019	1,7847	DW985605	cuticle protein
1,7048	-4,7751	1,0553	DW985606	cuticle protein
1,5483	-3,4712		DW724658	cuticle protein
		-0,8721	DW724655	cuticle protein
	-3,2303	1,4494	EG565387	cuticle protein
1,9191	-4,1958	1,6152	DW724610	pupal cuticle protein
1,3494	-2,3258		DW724488	pupal cuticle protein
	-1,3599		FD482878	pupal cuticle protein
1,8387	-4,7434	1,6121	DW985600	cuticular proteinrr-1 family (agap009869-pa)
1,6305	-3,5994	0,9345	EG565384	cuticular proteinrr-1 family (agap009869-pa)
	-1,0730		EG565404	cuticular proteinrr-2 family (agap012462-pa)
1,4481	-2,2937	1,2653	DW985607	cuticle protein lcp6
	-2,6479	1,1666	DV075837	cuticle protein lcp6
1,8597	-3,5579		DW724668	cuticle protein lcp6
1,5898	-3,9918	1,6114	DW985490	cg30045-pa
	-3,6633	1,4377	DW985548	cg30045-pa
	-1,0611	0,8706	DW724595	obstructor-a cg17052-isoform a
	0,7977		DW985604	chitinase 3-like 1
Proteolyse				
1,2549	-2,5683		DW985507	aminopeptidase n
	1,2457		FD466522	plasma glutamate carboxypeptidase
	-0,9549		DW724489	transglutaminase-like protein
-1,5347	0,8766	-1,7019	DW724638	cathepsin l
	1,1740		FD467238	cathepsin c precursor
	-1,5245		FD466694	protease m1 zinc metalloprotease
	-0,8344		EH669312	cytl_tactrl-cystatin precursor
		1,3817	DW985460	angiotensin i converting enzyme (peptidyl-dipeptidase a)isoform cra_i
	0,8185		FD466794	propionyl-carboxylase
	0,7571		DW724667	chymotrypsin-like serine proteinase

Proteïne plooiing				
1,5088		FD466578	protein disulfide isomerase	
Proteïne binding				
-1,5767	-1,5529	DW724697	fc fragment ofbinding protein	
0,9518		EH669330	cg3209-isoform a	
0,9380		EG565397	cg2145-isoform a	
Monooxygenase				
1,2758		DW724637	hiu hydrolase	
3,4744		DW724582	cellobiohydrolase i-i	
Signaaltransductie				
1,1748	-2,2202	1,2281	DW985549	spaetzle-like protein (agap006483-pa)
		0,7712	DW985524	spaetzle-like protein (agap006483-pa)
		0,8934	DW724460	gasp precursor
	-0,8162		DV075812	chaperonin containingsubunit 2
-0,8283			FD466539	ser thr protein phosphatase
Celdeling/Cytoskelet				
-1,1986		FD467217	beta-tubulin	
0,8732		EH669238	myosin heavynonmuscle or smooth muscle	
Oxidatieve stressrespons				
0,7891	-1,8008	DY037415	superoxide dismutase	
Sulfotransferase				
-0,9678		FD466942	estrogen sulfotransferase	
Embryo-ontwikkeling				
	-1,2578	DY037252	vitellogenin fused with superoxide dismutase	
0,7905	-1,0704	DY037274	vitellogenin fused with superoxide dismutase	
	-1,2921	DY037273	vitellogenin	
-1,5034	-1,7905	DW724602	vitellogenin-like protein	
1,2014	-1,8967	1,1096	DV075833	cheerio cg3937-isoform d
0,8076		DW724609	novel proteinvitellogenin 1	
DNA-repair				
0,8090		EG565379	6-4 photolyase	
Immuunrespons				
1,0922	-1,8880	1,0586	DW985522	plus agglutinin
Zuurstoftransport/Haemmetabolisme				
0,8805		DW724639	2-domain hemoglobin protein subunit	
Energie- en ATP-synthese				
1,0953		FD466672	atph+mitochondrial f0subunit e	
1,4997	-2,1825	DW985619	vacuolar atp synthase 16 kda proteolipid subunit	
	-1,3840	FD467184	6-phosphofructo-2-kinase fructose--bisphosphatase short form	
-0,7771		EH669284	nadh dehydrogenasefe-s protein30kda (nadh-coenzyme q reductase)	
Ionregulatie				
0,7573		FD466427	na+ k+ atpase alpha subunit	
Transport				
1,3381		FD466719	sec14-like 2	
0,7942		FD467123	transport protein sec61 gamma subunit	
	-0,8496	EH669353	sec63-like protein	
	1,1552	FD467107	secretory carrier membrane protein 3	
-0,8506		FD466687	riken cdna 4933439f18 gene	
Transcriptie/RNA metabolisme/Ribosomale RNA proteïnen/Translatie				
-1,5997		FD482895	elongation factor-1 gamma	
	-1,3916	DY037377	ribosomal protein l3	
	1,6488	FD466561	ribosomal protein l31	
-0,8804		FD466400	ribosomal protein l31	
	-0,7502	FD466988	ribosomal protein p0	

-0,7699		FD467284	ribosomal protein p0
0,8035		DW985457	ribosomal protein s5
	-1,1183	EH669240	ribosomal protein s12
0,9981		FD466405	mitochondrial ribosomal protein l12
	-0,8217	EH669338	acidic p0 ribosomal protein
-0,9604		FD466408	60s acidic ribosomal protein p0
	-0,8766	FD466823	origin recognitionsunit 1
-0,9145		DV075844	lsm1u6 small nuclear rna associated
	0,9198	DY037401	serine arginine repetitive matrix 2
	-0,9992	EH669271	ribonucleotide reductase m2 polypeptide
Lipidenmetabolisme			
	-1,3249	FD482909	apolipoprotein d
	-1,5344	DW985584	retinoid- and fatty-acid binding protein cg11064-pa isoform 1
	0,7923	FD466488	carnitine palmitoyltransferase i
	-1,2134	FD482904	cg15828-isoform b
	-1,8769	FD466630	acetyl-coenzyme a acetyltransferase 1
	-1,0127	EG565372	sphingomyelin phosphodiesteraseneutral membrane (neutral sphingomyelinase)
Andere functies			
	1,5599	EG565385	im:7143923 protein C2 calcium-dependent membrane targeting
	-0,9022	DW724634	proline rich protein
1,3375	-0,8683	EG565382	alpha-glucosidase isozyme i
	0,9631	EH669243	phage related lysozyme
1,9123	-5,1957	DW985495	mgc131064 protein
	0,8738	FD466812	timeless protein
	0,9321	FD467179	34 67 kd laminin binding protein
	-0,8731	FD467206	broad-complex core-protein isoform 6
	-1,3263	FD467008	inosine-5-monophosphate dehydrogenase
	1,1673	EG565370	moxd1 protein
	0,9057	FD466998	lin-10 homologisoform cra_b
	-1,1293	FD466533	wd repeat domain 37 isoform 1
	0,8304	DW724564	cg5065-pa isoform 2
	-0,7987	EG565366	necap endocytosis associated 1
	1,0024	DW985478	ngbr_brare nogo-b receptor precursor(nuclear undecaprenyl pyrophosphate synthase 1 homolog)
-1,6128	-1,8095	FD466604	sjchgc08080 protein

In F1Zn en F2ZnBI kwamen 18 dezelfde genen tot expressie (exclusief de genen waar geen klasse voor voorspeld kon worden, zie vorige paragraaf), waarvan geen op eenzelfde manier gereguleerd werden. 17 genen kwamen zowel tot expressie in F2ZnBI als in F3ZnBIBI. Hiervan werden wederom geen genen in dezelfde richting gereguleerd. Tussen F1Zn en F3ZnBIBI werden 17 dezelfde genen gevonden, waarvan 14 op eenzelfde manier gereguleerd werden. Over alle generaties kwamen 12 dezelfde genen tot expressie, waarvan geen enkel over de hele lijn op een eenzelfde manier gereguleerd werd. Genen die op eenzelfde manier gereguleerd werden in minstens twee opeenvolgende generaties, werden in tabel 4.9. en in bijlage 5 blauw gemarkeerd.

In het bovenstaande werd om eerder vernoemde redenen geen rekening gehouden met de genen die niet geannoteerd konden worden. Ook in deze genen (bijlage 5) werden geen genen gevonden die over de hele lijn in eenzelfde richting gereguleerd werden.

In de aquaria F1Zn, F2ZnBI en F3ZnBIBI kwamen na clustering respectievelijk 35, 53 en 51 genen differentieel tot expressie. Voor F1Zn zijn dit twee genen meer dan in de vergelijking tussen de verschillende zinkgeneraties. Deze discordantie komt voort uit het feit dat twee genen in deze beschouwde nakomelingenlijn in de clusteranalyse in aparte groepen ondergebracht werden dan tijdens de clusteranalyse uitgevoerd bij de analyse van de expressie in de verschillende zinkgeneraties. Deze verschillende clustering komt enkel voort uit het feit dat de expressie van die genen in de twee volgende generaties (F2Zn en F3Zn voor de analyse van de zinkgeneraties, respectievelijk F2ZnBI en F3ZNBIBI voor de analyse van deze nakomelingenlijn) een ander expressiepatroon t.o.v. elkaar vertoonden.

Evenals in deze twee laatste aquaria kwamen in deze eerste nakomelingenlijn veel gelijkaardige genen gerelateerd met exoskeletopbouw en ontwikkeling tot expressie. Bij de genen gerelateerd met exoskeletopbouw was dezelfde tendens zichtbaar zoals beschreven bij vergelijking van de expressie in de zinkaquaria (zie 4.3.3.). De tendens in de genen gerelateerd met de ontwikkeling lag anders: over het algemeen vond downregulatie plaats in de laatste generatie (F3ZnBIBI), tenzij reeds downregulatie in de tweede generatie (F2ZnBI) plaatsvond. In dit laatste geval werden de genen in eenzelfde mate upgereguleerd als in de eerste generatie (F1Zn).

Over de drie generaties heen werd vooral een downregulatie in genen betrokken bij transcriptie (ribosomale proteïnen) genoteerd.

Alhoewel vele genen gerelateerd met exoskeletopbouw in eenzelfde klasse ondergebracht worden, verschilt hun expressieverloop over de drie generaties (zie tabel 4.9.).

Een aantal genen met een mono-oxygenase functie, zoals het cellobiohydrolase i-i en het hiu hydrolase, kennen een upregulatie in de laatste twee generaties (respectievelijk F2ZnBI en F3ZnBIBI). Genen gerelateerd met signaaltransductie werden over het algemeen upgereguleerd in de eerste generatie (F1Zn) en laatste generatie (F3ZnBIBI). Tenslotte zijn ook hier, net zoals bij de vergelijking van de genexpressie in de zinkaquaria, in de tweede (F2ZnBI) en derde generatie (F3ZnBIBI), enkele genen met verschillende uiteenlopende andere functies terug te vinden. Enkel het *mgc131064 protein* (DW985495) kwam daarin gezamenlijk voor beide generaties tot differentiële expressie, al wordt het niet in beide generaties in eenzelfde richting gereguleerd.

4.3.5. Expressie in de nakomelingenlijn [F2Zn - F3ZnBI]

De differentieel tot expressie komende genen, na correctie voor de variabiliteit tengevolge van de generatie, worden weergegeven in tabel 4.10. Genen waarvan de functie niet achterhaald kon worden, worden slechts vermeld in bijlage 6. De eerdere werkwijze, zoals beschreven in 4.3.3., werd ook hier toegepast.

Tabel 4.10. Overzicht en voorspelde functie van de differentieel tot expressie komende genen in de nakomelingenlijn [F2Zn – F3ZnBI]. Expressie werd steeds gemeten t.o.v. de overeenkomstige generatieblanco. Een groene kleur duidt op upregulatie, een rode kleur op downregulatie. Genen op eenzelfde manier gereguleerd in meer dan één generatie werden gemarkeerd.

F1Zn (log ₂ FC)	F2ZnBI (log ₂ FC)	Acc.nr.	Voorspelde proteïneklasse
Exoskelet gerelateerde proteïnen			
-2,0058	1,7431	EG565387	cuticle protein
-3,0308	1,3953	DW985606	cuticle protein
-3,1968	2,1872	DW985605	cuticle protein
-0,8397	-0,9282	DW724655	cuticle protein
-2,1795		DW724658	cuticle protein
-3,7053	1,9995	DW724610	pupal cuticle protein
-1,6134	0,7847	FD482878	pupal cuticle protein
-2,6750		DW724488	pupal cuticle protein
-3,0016	1,4301	EG565384	cuticular proteinrr-1 family (agap009869-pa)
-3,6069	2,0156	DW985600	cuticular proteinrr-1 family (agap009869-pa)
	-0,8323	DW724684	cuticular proteinrr-1 family (agap006497-pa)
-2,2586	1,5631	DW985607	cuticle protein lcp6
-3,3119		DW724668	cuticle protein lcp6
-3,8767	2,1374	DW985490	cg30045-pa
-1,9090	1,9170	DW985548	cg30045-pa
Vertering			
-1,5122		DW724556	midgut chitinase
Proteolyse			
-1,0406		DW724480	carboxypeptidase a2
-2,7968		DW985507	aminopeptidase n
1,2385		FD466522	plasma glutamate carboxypeptidase
-0,7586		DW724489	transglutaminase-like protein
	-1,2514	DW724638	cathepsin I
-1,6545		FD466694	protease m1 zinc metalloprotease
-0,9691		EH669312	cytl_tactrl-cystatin precursor
	0,8068	DW724512	secreted trypsin-like serine protease
Proteïnebinding			
	-1,1999	DW724697	fc fragment of binding protein
-0,7882		FD466708	cg3209-isoform b
Monoxygenase			
3,6798		DW724582	cellobiohydrolase i-i
Signaaltransductie/Visuele respons			
-1,2450		DW985524	spaetzle-like protein (agap006483-pa)
-2,3634	1,1383	DW985549	spaetzle-like protein (agap006483-pa)
	1,0326	DW724657	gasp precursor
0,7625		DW724460	gasp precursor
0,8265		DY037370	thiamin pyrophosphokinase
1,1675		DW724559	c-type lectin
	1,0993	FD482952	cdc6-related protein
-0,7846		DW724560	long wavelength-sensitive opsin
Celadhesie/Celinteractie/Celdeling/Cytoskelet			
0,8652		FD467121	alpha-tubulin
-0,8580		DW724465	myosin light chain 2
-0,9252		EH669238	myosin heavynonmuscle or smooth muscle
0,9862		FD466872	myosin regulatory light chain 2 smooth muscle
1,7985		DV075823	heat shock protein 83

Embryo-ontwikkeling		
1,0082	DY037252	vitellogenin fused with superoxide dismutase
0,9778 -1,2482	FD467125	vitellogenin fused with superoxide dismutase
0,7731	DY037254	vitellogenin fused with superoxide dismutase
0,9006	DY037273	vitellogenin
-1,1921	DW724602	vitellogenin-like protein
-1,6630 1,1629	DV075833	cheerio cg3937-isoform d
Immuunrespons		
-1,7042 0,9406	DW985522	plus agglutinin
0,7806	FD466718	soluble liver antigen liver pancreas antigen (homo sapiens)like
Zuurstoftransport/Haemmetabolisme		
-0,9737	DW724628	2-domain hemoglobin protein subunit
Energie- en ATP-synthese		
-2,1863	DW985619	vacuolar atp synthase 16 kda proteolipid subunit
0,9386	FD466567	h+ transporting f1 atp synthase epsilon subunit
Ionenregulatie		
0,7984	FD466427	na+ k+ atpase alpha subunit
-0,8721	DW724449	calcium-transporting atpase sarcoplasmic endoplasmic reticulum type (calcium pump)
Transport		
0,9265	FD466588	solute carrier family 25 (carnitine acylcarnitine translocase)member 20
0,9899	FD467107	secretory carrier membrane protein 3
Transcriptie/RNA metabolisme/Ribosomale RNA proteïnen/Translatie		
-1,1649	FD482895	elongation factor-1 gamma
1,2523	FD466770	transcription factor e74
-0,8606	EH669240	ribosomal protein s12
0,9706	DV075844	lsm1u6 small nuclear rna associated
0,8636	FD467124	elongation factor-1 alpha
0,7727	FD467271	ribosomal protein l18
0,8325	EH669345	splicing factor prp8
0,9409	FD467083	methionine-trna synthetase 2
0,9266	FD482937	suv3_drops atp-dependent rna helicase suv3mitochondrial precursor
Lipidenmetabolisme		
0,8662	FD482909	apolipoprotein d
0,8482	FD482928	cytochrome p450
-0,8560	FD482904	cg15828-isoform b
0,9970	DY037320	fatty acid binding proteinbrain
Andere functies		
-0,8127	FD466860	fragile x mental retardation syndrome-related protein
-0,7642	FD482882	takeout like protein
0,9301	FD482944	phd-finger 5a
-3,6752 1,5721	DW985495	mgc131064 protein
1,1902	EG565370	moxd1 protein
-1,2932	FD466604	sjchgc08080 protein
-1,3069 -1,0290	DW724634	proline rich protein
-0,7709	EG565366	necap endocytosis associated 1
0,8913	FD482950	proteasome beta 3 subunit
0,7525	FD482892	integral membranetmp21-i
0,8844	EH669243	phage related lysozyme
1,3559 -1,3733	FD466844	procollagen lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3
1,7126	FD466885	procollagen lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3
-1,1683	FD466907	ecdysoneless homolog
0,8212	DW724687	sel-1 suppressor of lin-12-like
0,8648	FD467160	max dimerization protein 1
0,7652	DY037387	coatomeer proteinsubunit beta 1

1,3530	EH669347	s-adenosylhomocysteine hydrolase
1,0688	EH669349	troponin i

In beide generaties (F2Zn en F3ZnBI) kwamen 18 dezelfde genen tot expressie. Hiervan werden er twee in dezelfde richting gereguleerd. Het betreft een cuticula proteïne (DW724655) en een proline rijk proteïne (DW724634). In de ongekaracteriseerde genen werden nog eens 3 fragmenten gevonden waarvan de genexpressie in eenzelfde richting gereguleerd werd. Echter is het hier, omwille van de redundantie van de fragmenten op de array, niet duidelijk of het werkelijk om verschillende genen gaat. Deze genen werden in tabel 4.10. en bijlage 6 blauw gemarkeerd.

Na clustering kwamen in beide aquaria, F2Zn en F3ZnBI respectievelijk 64 en 41 genen differentieel tot expressie (exclusief de genen die niet tot een bepaalde klasse ingedeeld konden worden, zie eerder vernoemde reden). Voor F2Zn komt in deze nakomelingenlijn één gen minder differentieel tot expressie dan bij de vergelijking van de expressie in de verschillende zinkgeneraties. Bovendien zijn ook de overige 64 genen niet volledig dezelfde. In beide analyses komen 3 genen voor die in de andere niet voorkomen. Deze genen waren wel in beide analyses aanwezig, maar werden op basis van de clustering, door rekening te houden met de genexpressie van de andere behandelingen in hun analyse, onderverdeeld in verschillende clusters. Zie ook de vorige paragrafen.

Ook hier kwamen veel gelijkaardige genen gerelateerd met exoskeletopbouw en ontwikkeling tot expressie. Bij de genen gerelateerd met exoskeletopbouw was dezelfde tendens zichtbaar zoals beschreven bij de vorige vergelijkingen (zie 4.3.3. en 4.3.4.). Bij de genen gerelateerd met ontwikkeling werden in de derde generatie (F3ZnBI) minder differentieel tot expressie komende genen gevonden.

Genen gerelateerd met proteolyse komen voornamelijk in de tweede generatie (F2Zn) tot differentiële downgereguleerde genexpressie.

In de derde generatie (F3ZnBI) komen, in vergelijking met de eerder besproken nakomelingenlijn, veel positief upgereguleerde genen die betrekking hebben op het transport in de cel en het behoud van de ionenbalans tot expressie.

In beide generaties komen over het algemeen upgereguleerde genen voor die betrekking hebben op transcriptie, RNA metabolisme, ribosomale RNA proteïnen en translatie.

4.3.6. Expressie extra toegevoegde genen

Nergens uit voorgaande analyses bleek dat de extra toegevoegde genen aan de array als differentieel gemarkeerd werden. Echter dient opgemerkt te worden dat, zoals beschreven in materiaal en methoden, genen die significant testten op de *modified* t-test ($p < 0,05$) wel differentieel tot expressie komen, maar mogelijk niet allemaal de gekozen cut-off waarde op $\log_2(FC)=0,75$ bereikten.

Geen van de extra toegevoegde genen (metallothioneïne A, metallothioneïne B, retinol dehydratase en ferritine) bleken in verschillende aquaria over de verschillende generaties heen differentieel tot expressie te komen.

5. Discussie

5.1. DNA-methylatie

DNA-methylatie en andere epigenetische processen werden nooit eerder bij *Daphnia magna* aangetoond. Nochtans kan een beter begrip van de aanwezigheid van DNA-methylatie en zijn functies in het genoom van dit ecotoxicologische modelorganisme zorgen voor een betere kijk op de mogelijke werkingsmechanismen van bepaalde toxicanten en hun mogelijke nawerkingen in de generaties volgend op de blootgestelde populatie. Indien deze nawerkingen goed begrepen en gekarakteriseerd kunnen worden, kunnen zij misschien, tot op zekere hoogte, helpen in het beschrijven van de geschiedenis van een populatie. Epigenetische processen kunnen ook een ander licht werpen op het uit te voeren milieubeleid op een bepaalde plaats. Wanneer, bijvoorbeeld vastgesteld wordt dat organismen gedurende veel generaties toch effecten van blootstelling van hun voorouders aan toxicanten blijven ondervinden, is het minder zinvol om op die plaats te streven naar zeer lage concentraties van die toxicant in het milieu.

Beschrijving en detectie van DNA-methylatie en de mogelijke gevolgen in *Daphnia magna* zou daarnaast ook kunnen bijdragen aan een beter begrip van DNA-methylatie in invertebraten. Immers, de kennis van epigenetische mechanismen in invertebraten is nog beperkt in vergelijking met deze verworven voor vertebraten (Bird, 2002). Bovendien blijkt niet alle kennis die gekend is voor vertebraten zo maar toepasbaar te zijn op invertebraten. Waar voor vertebraten het meeste mooi in regels te vatten is, is dit voor invertebraten veel minder homogeen. Wat waar is in de ene invertebraat is niet noodzakelijk waar voor de andere. Bij invertebraten kan DNA-methylatie andere functies hebben en vermoedt men dat DNA-methylatie in ieder taxon een verschillende tol kan vervullen (Field, 2000), waardoor het belangrijk wordt om zoveel mogelijk uiteenlopende invertebraten te onderzoeken om een zo volledig mogelijk beeld te verkrijgen.

Het feit dat het genoom van *Daphnia magna* gesequeneerd wordt, maakt de keuze van dit organisme des te gegrond. Immers, pas dan kunnen DNA-methylatie en andere epigenetische processen gekoppeld worden met veel functionelere zaken, zoals impact op genfunctie, impact op transcriptie en translatie...

Ondanks het feit dat wegens tijdsgebrek de bisulfietsequenering niet geoptimaliseerd kon worden voor stalen afkomstig van *Daphnia magna*, kan er toch vanuit gegaan worden dat de bekomen fragmenten uit het aangepaste AIMS-protocol methylatie bevatten. Het gebruik van methylatie-gevoelige restrictie enzymen is immers een betrouwbare methode voor het detecteren van DNA-methylatie indien de digesten volledig zijn. In sommige studies worden deze restrictie-enzymen zelfs gebruikt als validatie van DNA-methylatie detectie via bisulfietbehandeling (Mette, 2007). De optimalisatie van bisulfietbehandeling voor ieder ander type staal is dikwijls veel moeilijker en afhankelijk van meer factoren dan het gebruik van restrictie-enzymen, waardoor bij gebruik van deze laatste sneller tot een betrouwbaar resultaat gekomen kan worden (Dahl & Guldborg, 2003).

Behandeling van DNA met bisulfiet geeft zelden een volledige reconversie van de niet gemethyleerde cytosines. Huidige rendementen liggen tussen 84% en 96% (Grunau *et al.*, 2001). Waarschijnlijk komt dit onvolledige rendement voort uit het feit dat bisulfiet enkel reageert met cytosines die niet betrokken zijn in een baseparing (Frommer *et al.*, 1992). Onvolledige denaturatie van het DNA of renaturatie tijdens de bisulfietbehandeling zelf kan aanleiding geven tot gebasepaarde cytosines. Anderzijds kan ook 2-5% van de gemethyleerde cytosineresidu's gedeamineerd worden tot uracil (Dahl & Guldborg, 2003). Bovendien is bisulfietbehandeling niet geheel onschadelijk voor de rest van het DNA en kan er DNA degradatie optreden door een zuurgekatalyseerde gedeeltelijke depurinatie. Dit levert DNA op dat moeilijk te amplificeren kan zijn. Ook kan deze gedeeltelijk depurinatie een foutief beeld van de omliggende DNA-sequenties rond de methylatiesite teweeg brengen.

Tenslotte, wanneer gebruik gemaakt wordt van PCR om het bisulfietbehandelde DNA te amplificeren zou hetzelfde primerpaar de gemethyleerde en ongemethyleerde sequenties niet even efficiënt kunnen amplificeren. Uiteraard kan dit leiden tot een vertekend beeld van de werkelijke methylatie distributie over het gehele genoom (Hajkova *et al.*, 2002; Dahl & Guldborg, 2003).

Bisulfietreconversie van het DNA geeft echter wel een vollediger beeld van het totale DNA-methylatie gehalte dan het gebruik van restrictie-enzymen, daar door middel van deze laatste enkel methylatie gedetecteerd kan worden in de herkenningssites van de enzymen. Hierdoor kan in het geval van het uitgevoerde experiment geen schatting gemaakt worden van het werkelijke DNA-methylatie gehalte in het genoom van *D. magna*. Men zou kunnen argumenteren dat dit gehalte vrij laag moet zijn aangezien gebruik gemaakt werd van vierknipper restrictie-enzymen die het genoom gemiddeld om de 256 bp knippen (ter vergelijking: het genoom van *Daphnia pulex* is $2,271 \cdot 10^8$ bp groot (*Daphnia Genomics Consortium*)) en slechts twee gemethyleerde banden gedetecteerd werden. Echter dient hierbij opgemerkt te worden dat het aantal werkelijke fragmenten gereduceerd werd door gebruik te maken van primers met twee selectieve nucleotiden. Eveneens kan er opgemerkt worden dat mogelijk meer gemethyleerde bandjes aanwezig waren, maar dat deze niet gedetecteerd konden worden vanwege de beperkte oppervlakte van de gel. Immers een deel van de banden liep telkens onderaan de gel af en bovenaan de gel werd een onvoldoende duidelijke scheiding van de banden bekomen om met voldoende zekerheid alle differentiële banden te kunnen detecteren. Bovendien is duidelijk, zoals ook in de literatuurstudie naar voren kwam, dat DNA-methylatie bij invertebraten moeilijk in regels te vatten is. Het is niet alleen moeilijk om te voorspellen hoeveel methylatie verwacht kan worden. Op basis van de aanwezige literatuur kan ook geen uitsluitel gegeven worden over het feit of DNA-methylatie bij *D. magna* enkel voorkomt in CpG dinucleotide verband of ook in een ander verband, bijvoorbeeld in het CpT dinucleotide verband zoals bij *Drosophila melanogaster* (Bird, 2002). Om het werkelijke gehalte aan DNA-methylatie te bepalen, is er bijkomend onderzoek nodig dat gebruik maakt van *whole genome* detectietechnieken (zie verder).

Echter door gebruik van de AIMS techniek is het mogelijk geweest om op relatief korte tijd aan te tonen dat er DNA-methylatie in het genoom van *Daphnia magna* voorkomt en dat deze zich

manifesteert op cytosines in het CpG dinucleotide verband. Of er ook methylatie voorkomt in andere verbanden, kan aan de hand van eenzelfde techniek aangetoond worden door gebruik te maken van restrictie-enzymes die al dan niet gevoelig zijn voor methylatie in een ander verband.

Bovendien is het volledige potentieel van de techniek nog niet benut. Door bijvoorbeeld het gebruik van andere primercombinaties is het mogelijk om methylatie op andere fragmenten te detecteren. Daarnaast kan de AIMS-techniek nog tal van andere toepassingen hebben: bijvoorbeeld voor een snelle validatie van bisulfietsequencing voor het gericht opsporen van DNA-methylatie (dit is zeker zo wanneer het genoom van *Daphnia* gekend zal zijn). Bovendien heeft de techniek een aantal interessante voordelen: hij is kleinschalig, gemakkelijk en snel toepasbaar, methylatie is snel onderscheidbaar en detecteerbaar via een differentieel bandenpatroon en gemethyleerde banden kunnen gemakkelijk gerecupereerd worden voor verdere analyses.

Het feit dat de techniek geoptimaliseerd kon worden voor *Daphnia magna*, doet ook vermoeden dat hij toepasbaar is op tal van andere organismen en weefsels.

Naast bisulfietsequencing zijn er tal van andere betrouwbare technieken om het gehalte aan DNA-methylatie in het *Daphnia* genoom te bepalen. De meeste van deze technieken, zoals het gebruik van reverse-phase HPLC, zijn echter destructief zodat er op het gebruikte DNA geen verdere analyses mogelijk zijn en het niet mogelijk is om de juiste plaats van methylatie in het genoom te achterhalen. Een mooi overzicht van alle technieken voor het bepalen van 5mC in DNA wordt gegeven door Dahl & Guldborg (2003).

Een andere, niet destructieve methode, kan het gebruik van micro-arrays zijn, zoals beschreven door Gant (2007). Uit genomisch DNA dat mechanisch of enzymatisch werd opgebroken, worden de gemethyleerde fragmenten opgepikt door precipitatie met een antilichaam gericht tegen 5-methylcytosine. Door enkel deze fragmenten op een micro-array te hybridiseren kan niet alleen nagegaan worden of het genoom differentieel gemethyleerde DNA-fragmenten bevatte, maar tevens op welke genen de methylatie voorkomt en welke functies ze bijgevolg kunnen beïnvloeden. Het werken met genomisch DNA dat op geen enkele manier omgezet kan worden zonder verlies van de cytosinemethylatie impliceert dat op zijn minst grote delen van het *Daphnia* genoom gekend dienen te zijn. Voor *Daphnia pulex* is dit reeds het geval, maar voor *Daphnia magna* nog niet (*Daphnia Genomics Consortium*, 2008).

Indien het genoom gekend zou zijn, zou het zoeken naar een mogelijk DNA-methyltransferase-like gen ook een idee kunnen geven over de DNA-methylatie.

Zoals reeds vermeld in de resultaten konden via NCBI BLAST en BLASTx geen aanvaardbare homologen gevonden worden. Mogelijk kan dit te verklaren zijn doordat de sequenties geen volledige genen omvatten daar het slechts willekeurige fragmenten uit het genomische DNA zijn. Er is zelfs de mogelijkheid dat ze delen van meer dan één gen bevatten. Toch biedt dit alleen geen afdoende verklaring: er werd slechts steeds gedeeltelijke homologie gedetecteerd tussen fragmenten

halverwege gelegen in de ingevoerde sequentie en sequenties uit de database, zonder dat deze homologie tot een uiteinde van de ingevoerde sequentie reikte, ook al was de sequentie uit de database langer dan de ingevoerde sequentie. Waarschijnlijk heeft het niet vinden van afdoende homologieën meer te maken met het feit dat het aantal gekarakteriseerde genen van invertebraten beduidend kleiner is dan deze gekarakteriseerd voor vertebraten of dat de genen species specifiek zijn.

Tenslotte, was er geen volledig uitsluitel of de gedetecteerde fragmenten werkelijk van het genoom van *D. magna* afkomstig zijn. Immers kunnen deze ook afkomstig zijn van algenresten die zich nog in de darm van het organisme bevonden. Hiervoor uitsluitel bekomen is echter eenvoudig door de organismen gedurende enkele dagen voor de oogst te laten uithongeren.

Dit experimentje werd uitgevoerd door Vandegehuchte en Kyndt (ongepubliceerd) waarbij *Daphnia*'s gedurende 24h blootgesteld werden aan een suspensie van kleipartikels (kaolinet klei) van 70 mg/L. Vijf replica's van 70 juvenielen die tijdens deze 24 h geboren zijn en dus nooit met algen in aanraking gekomen zijn, werden genomen voor DNA-extractie en in dit DNA werden beide sequenties teruggevonden. Dit toont aan dat de gedetecteerde fragmenten uit het genoom van *D. magna* zelf afkomstig zijn en dat er dus inderdaad DNA-methylatie bij *D. magna* voorkomt.

5.2. Fysiologische parameters

Voor de reproductie werd een significant lagere ($p < 0,05$) reproductie vastgesteld in de zinkaquaria in de eerste en tweede generatie t.o.v. de overeenkomstige blanco-aquaria. Waar dit verschil in de eerste generatie nog 27,2% bedroeg, daalde dit in de tweede generatie naar 15,0% om in de derde generatie te verdwijnen. Muysen en Janssen beschreven in 2005 het belang van acclimatisatie van *Daphnia magna* voor de gevoeligheid voor relevante zinkconcentraties in het milieu. Zij stelden vast dat bij testconcentraties lager dan de chronische EC_{50} voor reproductie, acclimatisatie een significant positieve invloed had op de reproductie: waar de reproductie in de blootgestelde organismen eerst nog significant lager was dan in de controleorganismen, kende de reproductie, na acclimatisatie, een positief significant herstel tot maximaal het niveau van de controleorganismen. Dit is ook hetgeen dat werd vastgesteld in het hier beschreven experiment.

Oorspronkelijk was het de bedoeling te werken met een zinkconcentratie in de buurt van de chronische EC_{50} -waarde voor reproductie. Op basis van de kritische waarde berekend door Heijerick *et al.* (2005) en de fysicochemische eigenschappen van het gebruikte testmedium werd met behulp van het *Biotic Ligand Model* een zinkconcentratie van 482 $\mu\text{g/L}$ gevonden. Door technische problemen werden de experimenten uiteindelijk uitgevoerd met een concentratie van 400 $\mu\text{g Zn/L}$. Om een inschatting te krijgen van de betrouwbaarheid van het model werd een experimenteel verkregen EC_{50} -waarde vergeleken met deze berekend door het model. d'Haese (2005) rapporteerde een waarde van

350 µg Zn/L, waar na berekening van het model een waarde van 320 µg Zn/L bekomen werd, wat een onderschatting van 8,6% is. Heijerick *et al.* (2005) meldt dat alle voorspelde EC₅₀-waarden maximaal een factor 1,5 van de experimentele waarden verschillen en dat 90,5% van de voorspelde waarden minder dan een factor 1,3 verschillen. Het lijkt aannemelijk om te stellen dat de voorspelde waarde voor het medium van dit experiment minder dan 30% verschilt van de werkelijke waarde. Indien de voorspelde waarde (482 µg Zn/L) echter zelfs slechts 10% kleiner is dan de werkelijke waarde ($482 + 0,1 \cdot 482 = 530,2$ µg Zn/L), betekent dit een tekort van 130,2 µg Zn/L ($530,2 - 400$ µg Zn/L) of bijna 25% om aan de chronische EC₅₀-waarde voor reproductie te komen.

Muyssen en Janssen (2001) vonden een optimum zinkconcentratie tussen 300 en 600 µg/L gebruik makend van een gelijkaardig medium en dezelfde kloon organismen. Zij maakten echter wel gebruik van een M4-medium dat EDTA bevatte in plaats van natuurlijk DOC, zoals toegepast in dit onderzoek. Om te kunnen vergelijken tussen de twee verschillende media werden de nominale zinkconcentraties omgerekend naar biobeschikbare Zn²⁺ concentraties aan de hand van de eigenschappen van het medium (WHAM IV, Lofts & Tipping, 2002). Voor de omzetting van DOC naar fulvozuur werd eerst vermenigvuldigd met een factor 2 voor omzetting naar organisch materiaal en vervolgens met een factor 0,82 (Cheng *et al.*, 2005) om het gehalte fulvozuur te bekomen. De hierboven beschreven range is dan gelijk aan 2,4 tot 86 µg Zn²⁺/L, waar voor het medium gebruikt in de hier beschreven experimenten een waarde van 160,9 µg Zn²⁺/L bekomen werd. Het is duidelijk dat de gebruikte zinkconcentratie buiten de optimale range valt. Deze vaststelling verklaart wel de waarnemingen van een significant verminderde reproductie in de eerste twee zinkgeneraties t.o.v. de overeenkomstige controle organismen, maar verklaart niet het feit dat er voor de andere parameters geen verschillen vastgesteld werden, alhoewel Muyssen *et al.* (2006) wel significante verschillen waarnam voor onder andere respiratiesnelheid en drooggewicht voor een medium dat 340 µg Zn/L (138 µg Zn²⁺/L) bevatte.

Mogelijk kan een verklaring hiervoor misschien gevonden in het feit dat de stamkloon gekweekt wordt in een medium op basis van C-gefilterd kraanwater. De zinkconcentratie in dit water is zeer variabel. TMVW (2007) noteert waarden 65 ± 59 µg Zn/L en ook metingen in het eigen labo duiden op een grote wisseling van de zinkconcentratie in de tijd: 27,7 µg Zn/L in augustus 2007 t.o.v. 116,8 µg Zn/L in december 2007. Voor de aanvang van de hier beschreven experimenten in oktober 2007 werd geen meting verricht, zodat ongeweten is aan hoeveel zink de organismen in de stamkloon op dat ogenblik blootstonden. Echter indien dit eerder aan de hoge kant was, kon er al een acclimatisatie-effect aan deze hogere zinkconcentratie voorkomen, waardoor de organismen een geringere gevoeligheid t.o.v. de zinkconcentratie in het testmedium vertoonden. Dit effect werd onder andere al eerder aangetoond voor veldgecollecteerde *Daphnia* stammen (Muyssen *et al.*, 2002).

Omgekeerd aan het voorgaande kan ook geredeneerd worden dat de zinkconcentratie in het controle testmedium niet optimaal was voor de groei van de organismen en dus de organismen in dit medium niet optimaal presteerden. Hierdoor kunnen door vergelijkingen tussen het controle- en het zinkmedium verschillen gedetecteerd worden die veroorzaakt werden door de niet optimale

omstandigheden in het controlemedium. De vrije Zn^{2+} concentratie in het controlemedium bedroeg echter $3,46 \mu\text{g Zn}^{2+}/\text{L}$, wat binnen de door Muysen en Janssen (2001) beschreven optimale range ligt.

De soms voorkomende afwijkingen in de fysiologische parameters gedurende de eerste dagen in de eerste generatie t.o.v. de latere generaties (zoals bv. bij drooggewicht in de nakomelingenlijn [F1Zn - F2ZnBI - F3ZnBI - F4 ZnBIBI]) kunnen waarschijnlijk verklaard worden door aanpassing van de organismen aan het nieuwe medium. Dit geldt zowel voor aanpassing aan het controlemedium als aan het zinkmedium, daar het medium gebruikt voor de stamkloon verschilde van het medium gebruikt in het experiment. Muysen *et al.* (2006) namen gedurende de tweede en derde week van blootstelling een analoog herstelmechanisme waar in *Daphnia*'s blootgesteld aan 80 tot $340 \mu\text{g Zn/L}$ (36 tot $138 \mu\text{g Zn}^{2+}/\text{L}$). Zij schreven dit toe aan (over)compensatie reacties op lagere niveaus dan dat van de biologische organisatie: interne calciumconcentratie (+24%) en filtratiesnelheid (+90%) namen toe in functie van toenemende zink blootstellingsconcentratie, terwijl de respiratiesnelheid (-29%) daalde. Dit resulteerde in energiereserves die constant bleven in functie van de zinkblootstelling. Het is echter moeilijk uit te maken of dit mechanisme ook aan de basis lag van het hier waargenomen herstelmechanisme, daar geen interne calciumconcentraties gemeten werden en de meting van de filtratiesnelheid door fouten in de experimentele set-up geen bruikbare data opleverde. Wel werd in de eerste generatie inderdaad een significante ($p < 0,05$) daling van de respiratiesnelheid genoteerd doorheen de hele generatie. De respiratiesnelheid genoteerd op het einde van de eerste generatie was vergelijkbaar met deze in de volgende generaties.

Het nagaan van deze compensatiemechanismen op het niveau van genexpressie was eveneens niet mogelijk, daar enkel microarrays gehybridiseerd werden met RNA afkomstig van organismen op het einde van iedere generatie. Op dat ogenblik was in de eerste generatie het compensatiemechanisme al voltrokken (gebaseerd op het verloop van de respiratiesnelheid).

Aanpassing zou echter maar slechts één factor kunnen zijn. Uit studie van de gemeten gemiddelde zinkconcentraties per generatie komt naar voren dat de gemiddelde zinkconcentratie in het testmedium gedurende de eerste generatie ($401,4 \pm 21,7 \mu\text{g Zn/L}$) significant hoger (t-test, $p < 0,05$) ligt dan in de twee daarop volgende generaties (F2: $331,3 \pm 20,1 \mu\text{g Zn/L}$; F3: $325,0 \pm 31,4 \mu\text{g Zn/L}$), waartussen geen significant verschil was.

Het effect dat werd waargenomen in de eerste twee zinkgeneraties op de reproductie zette zich niet verder wanneer de organismen terug overgebracht werden naar het blanco-medium. Dit wijst erop dat het effect niet transgeneratieel overerfbaar was en dus waarschijnlijk niet door epigenetische mechanismen gereguleerd was.

5.3. Genexpressie

Poynton *et al.* verrichtten in 2007 onderzoek naar de genexpressie bij *Daphnia magna* na blootstelling aan diverse metalen. De organismen werden gedurende een tijdspanne van 24h blootgesteld aan onder andere een zinkconcentratie van 500 µg/L in een COMBO medium aangepast voor waterhardheid. Onder deze omstandigheden namen zij een downregulatie van genen gerelateerd met vertering en digestie waar (o.a. cellulase, endo-β-1,4-mannanase en α-amylase). In het experiment beschreven in deze scriptie wordt echter in geen enkele generatie downregulatie van deze genen waargenomen. Dit kan twee redenen hebben: ofwel was de zinktoxiciteit in het hier uitgevoerde experiment te laag om een effect op deze enzymen waar te nemen, zelfs op een termijn van drie generaties, ofwel bevatte de door ons gebruikte array geen genen gerelateerd met vertering. Echter de genensubset gerelateerd met energiemetabolisme werd verkregen door een Suppression Subtractive Hybridisation uit te voeren tussen organismen die gedurende bepaalde tijd uitgehongerd werden en normaal gevoede organismen. Het lijkt aannemelijk om aan te nemen dat de genexpressie van verteringsenzymen in de uitgehongerde dieren een toename kende om het schaarse voedsel zo snel en zo efficiënt mogelijk te kunnen benutten. In de overzichtstijl van alle geannoteerde genfragmenten die op de array terug te vinden zijn, werden inderdaad een aantal verteringsenzymen terug gevonden, zoals: α-amylase (DW724472), cellulase (DW724616) en endo-β-1,4-mannanase (DW724453). Indien deze genen differentieel tot expressie zouden zijn gekomen, zouden ze dus gedetecteerd moeten zijn.

Gedurende de tweede generatie zink (F2Zn) werd wel een downregulatie van een chitinase geassocieerd met de middendarm (DW724556) waargenomen ($\log_2FC = -1,5122$). Daar het chitinase geassocieerd wordt met de middendarm, wordt het aanzien als een enzyme dat tussenkomt in de vertering. Echter bij de BLASTx analyse van dit gen kwamen ook zeer veel hits voor met hoge scores voor chitinase. In dat geval zou het gen eerder gerelateerd zijn met de opbouw van het exoskelet. Het programma Blast2GO, dat, gebaseerd op een objectief algoritme op basis van de 20 beste hits in BLAST en BLASTx, de meest waarschijnlijk klasse aan een gen(fragment) toekent, klasseerde het als een chitinase geassocieerd met de middendarm.

Terwijl Poynton *et al.* (2007) vaststelden dat zink op negatieve wijze interfereert met de opbouw van het exoskelet en de vervelling werd in de hier uitgevoerde experimenten een andere tendens waargenomen. Downregulatie van genen betrokken bij cuticula- en exoskeletopbouw werd enkel waargenomen in de tweede zinkgeneratie (F2Zn). In de eerste en laatste generatie (F1Zn resp. F3Zn) werd een globale twee- tot drievoudige upregulatie van deze genen waargenomen. De downregulatie in de tweede generatie bedroeg gemiddeld wel het dubbel van deze upregulatie.

De upregulatie van de cuticula en exoskeletopbouw gerelateerde genen kan in de eerste generatie verklaard worden als een afweermecanisme of actief regulatiemecanisme van *Daphnia* tegen sublethale zinkconcentraties. Het is namelijk bekend dat het exoskelet een functie heeft als *sink* voor

verschillende metaalionen (zie 2.3.3.). Door versnelde en meer uitgebreide opbouw van de het (nieuwe) exoskelet kan *Daphnia* de biobeschikbare zinkconcentratie in zijn (nabije) omgeving doen dalen. Op langere termijn (tweede generatie) echter zal zink wel interfereren met de opbouw. De reactie van het organisme is echter, mogelijk ook tengevolge van de afnemende gemiddelde zinkconcentratie in deze generatie, te hevig, waardoor een soort *undershoot* in de expressie ontstaat. Voor deze *undershoot* wordt tenslotte in de laatste generatie gecorrigeerd door opnieuw een lichte opregulatie van de betrokken genen. Deze *overshoot/undershoot* theorie kan eveneens een verklaring bieden voor gelijkaardige fenomenen in de twee bestudeerde nakomelingenlijnen.

Bewijzen in de literatuur voor deze *overshoot/undershoot* hypothese toegepast op *Daphnia magna* of andere invertebraten werden niet gevonden. Maar een indicatie dat overcorrectie via genregulatie voorkomt kan o.a. gevonden worden in een studie van Becker *et al.* (1995). Zij onderzochten dieet en diabetes geïnduceerde veranderingen van de genexpressie van het *ob* gen in adiposeweefsel. Vasten veroorzaakte een scherpe daling (95%) in het aanwezige *ob* mRNA. Snelle bijvoeding herinduceerde de genexpressie en binnen 24h was het normale expressieniveau terug bereikt. mRNAs coderende voor fatty acid syntethase (FAS) en GLUT4 vertoonden eenzelfde evolutie, terwijl het mRNA niveau van fosfoenolpyruvaat carboxykinase (PEPCK) tegengesteld evolueerde. In het adiposeweefsel van streptozotocin-diabetische ratten, kende het mRNA niveau van het *ob* gen een 80% lagere expressie t.o.v. het normale niveau. Een insulinebehandeling gedurende vier dagen veroorzaakte nauwelijks een stijging in het *ob* mRNA niveau, maar de expressie van FAS, GLUT4 en PEPCK werd overgecorrigeerd en vertoonde een significant hoger, resp. lager, niveau dan het normale niveau.

Alhoewel downregulatie van exoskeletopbouwende proteïnen normaal een impact heeft op de reproductie van *Daphnia*, omdat ze pas een nieuw broedsel kunnen afwerpen wanneer ze vervellen (Zaffagnini, 1987), werd in de eerste generatie toch een significant verschil waargenomen in de reproductie t.o.v. de generatieblanco, ondanks het feit dat deze genen daar toch opgereguleerd worden. In de tweede generatie daarentegen werd wel een significant verschil waargenomen en werden de genen wel downgereguleerd.

Een mogelijke verklaring voor deze waarnemingen kan gevonden worden in het asynchroon zijn van de verschillende organismen in de testweek. Alhoewel alle organismen op eenzelfde tijdstip gesampled werden, zijn ze toch niet allen even oud of staan ze even ver in hun ontwikkeling. Dit komt voort uit het feit dat bij de start van iedere generatie vertrokken werd van organismen die tussen 0 en 24h oud waren. Een generatie werd als ten einde beschouwd vanaf het ogenblik dat in een van de testbuisjes voor het opvolgen van de reproductie (zie 3.2.4.2.) een 5^e broedsel waargenomen werd. Het is mogelijk dat in de tweede zinkgeneratie het merendeel van de gesamplede organismen toevallig op het punt stonden hun vijfde broedsel af te werpen. Op dat ogenblik is de aanmaak van een nieuwe cuticula al grotendeels voltooid en zijn genen betrokken in deze vorming van nature downgereguleerd. In de eerste en laatste zinkgeneratie stonden de meeste organismen misschien nog niet zo ver in hun ontwikkeling op het moment dat in de buisjes het eerste 5^e broedsel waargenomen werd. Er dient opgemerkt te worden dat deze redenering ook toegepast kan worden op

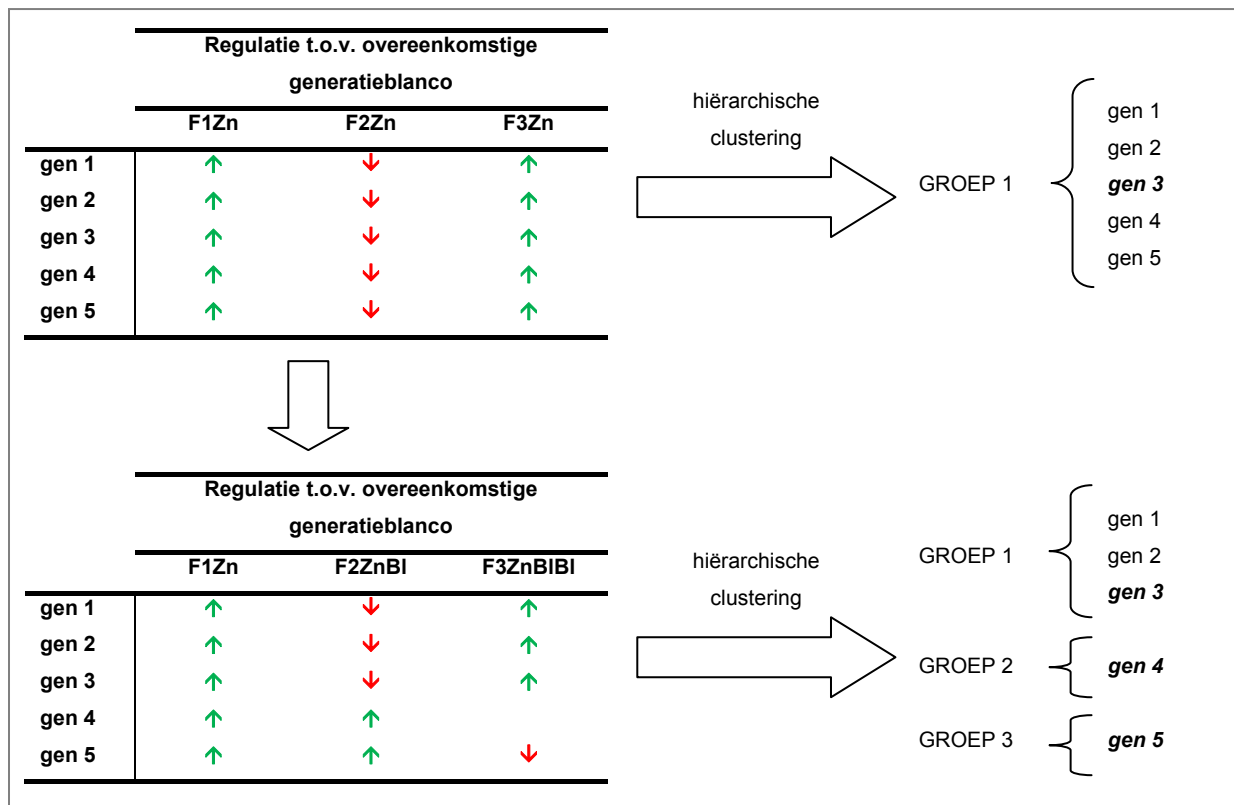
de controleorganismen. Differentieel tot expressie komende genen werden telkens bepaald door vergelijking met de overeenstemmende generatieblanco. Hierdoor is het mogelijk dat bepaalde genen een up- of downregulatie vertoonden omdat deze in de controleorganismen in verschillende generaties anders tot expressie kwamen tengevolge van het levensstadium waarin de organismen verkeerden. Deze redenering zou de discrepantie tussen de waargenomen expressieniveaus (gedeeltelijk) kunnen verklaren. Deze verklaring doet een deel afbreuk aan de verklaring van een *overshoot*-mechanisme maar sluit deze niet noodzakelijk geheel uit.

Deze waarneming kan mogelijk ook een afdoende verklaring bieden voor de variabiliteit die werd waargenomen in de controleorganismen over de generaties heen.

Verder onderzoek naar de impact van een specifiek levensstadium op de genexpressie zou hierover uitsluitsel kunnen geven. In de tot hiertoe beschreven microarray experimenten met *Daphnia magna* werden de organismen enkel gedurende een acute (24 of 48h) of subchronische (7 dagen) tijdspanne aan de toxicant blootgesteld (Poynton *et al.*, 2007; Watanabe *et al.*, 2007; Soetaert *et al.*, 2006, 2007a en 2007b) waardoor deze variatie nooit eerder uit data naar voren is gekomen. Indien echter blijkt dat genexpressie afhankelijk is van het specifieke levensstadium van de gesamplede organismen, dienen alle ecotoxicologische microarray experimenten uitgevoerd met *Daphnia magna*, met de nodige voorzichtigheid geïnterpreteerd te worden. Zeker in de zoektocht naar biomerkers, specifieke genen die na blootstelling aan een specifieke toxicant differentieel tot expressie komen, kan deze waarneming tot heel wat moeilijkheden leiden, aangezien deze niet meer toelaat om microarray experimenten als een absoluut gegeven te beschouwen.

Daarnaast, werd zoals eerder al kort aangehaald in de resultaten, vastgesteld dat het aantal differentieel tot expressie komende genen voor een bepaalde behandeling in een bepaalde generatie kan variëren. Dit is het gevolg van het feit dat van bepaalde genen verscheidene genfragmenten op de microarray staan, wat louter een gevolg is van de procedure gebruikt voor de aanmaak van de array (zie materiaal en methoden).

Om analyse en interpretatie van de array mogelijk te maken was het nodig deze redundante fragmenten uit te filteren. Dit werd gedaan door hiërarchische clustering van de fragmenten die allen tot eenzelfde proteïneklasse behoorden. Fragmenten binnen die klasse met een vergelijkbaar genexpressiepatroon doorheen de generaties en behandelingen die onderling vergeleken werden, werden als eenzelfde gen beschouwd. Deze clustering is echter afhankelijk van de arrays die in eenzelfde vergelijking beschouwd worden. Hierdoor kunnen bepaalde genen die in de ene vergelijking in een welbepaalde groep worden onder gebracht, in een vergelijking met andere microarrays in een andere of aparte groep ondergebracht worden (figuur 5.1.). Die bepaalde genen in de andere arrays in beide vergelijkingen kunnen een verschillend expressiepatroon hebben (omwille van de behandeling) waardoor deze andere classificatie plaatsvindt (figuur 5.1.). Dit uit zich niet alleen in verschillende aantallen differentieel tot expressie komende genen voor een bepaalde behandeling in een bepaalde generatie, maar ook in het feit dat niet alle andere differentieel tot expressie komende genen noodzakelijk dezelfde zijn.



Figuur 5.1. Variatie in het aantal differentieel tot expressie komende genen na hiërarchische clustering. Vermits alle genfragmenten in de eerste vergelijking tussen de verschillende zinkgeneraties een vergelijkbaar genexpressiepatroon hebben, worden ze na clustering in eenzelfde groep ondergebracht. Genfragment 3 wordt uit de groep weerhouden als representatief zijnde voor de groep. In de tweede vergelijking van F1Zn met F2ZnBI en F3ZnBIBI kent het expressiepatroon van genfragment 4 en 5 een ander verloop omwille van het feit dat deze anders gereguleerd werden dan dat ze gereguleerd werden in F2Zn en F3Zn. Hierdoor worden deze na clustering in een aparte groep ondergebracht, waardoor in dit geval 3 genfragmenten weerhouden worden, nl. fragment 3, 4 en 5. Na clustering worden in beide gevallen dus een verschillend aantal genen weerhouden. “↑” wijst op upregulatie van het genfragment, “↓” wijst op downregulatie.

Aan het probleem van de redundantie van de genfragmenten kon ook tegemoet gekomen worden door de fragmenten in contigs onder te brengen. Op basis van overlap tussen de fragmenten worden ze tot eenzelfde contig gerekend. Wanneer geen overlap meer tussen de fragmenten in de contig en de andere fragmenten gevonden wordt, start men een nieuwe contig. Omwille van het feit dat introns bij eukaryoten uitgesplitst worden, wordt verondersteld dat iedere contig één gen bevat. Omwille van het bestaan van mogelijke processen zoals alternatieve *splicing* bij eukaryoten is dit echter niet steeds het geval en dit uitte zich ook in het feit dat genfragmenten met een verschillende voorspelde proteïneklasse toch onderverdeeld werden in eenzelfde contig. Hieromtrent kan uiteraard de discussie gevoerd worden welke van beide algoritmes het bij het foute eind heeft: het algoritme voor het verdelen in contigs of het algoritme voor het voorspellen van de proteïneklassen? Zonder genetische informatie omtrent genen en genfunctie in *D. magna* kan echter voor geen van beide uitsluitsel bekomen worden en blijft de techniek van het onderverdelen van de genfragmenten in contigs niet volledig betrouwbaar om de redundantie van de fragmenten uit te filteren. Omdat bovendien deze

contiganalyse nog onvolledig was en geen andere techniek gekend was om de redundantie uit te filteren, werd in de hier uitgevoerde analyses toch geopteerd voor de clustering strategie. Alhoewel, zoals eerder beschreven, ook deze strategie tekortkomingen had, die in combinatie met voorgaande opmerking over de invloed van het specifiek levensstadium op de expressie, het zeer moeilijk maakte om accurate conclusies uit de genexpressiepatronen te trekken.

Daarnaast laat de sequentiehomologie tussen nauw verwante leden van eenzelfde genfamilie, bijvoorbeeld methallothioneïnes, niet altijd toe om deze specifiek te detecteren met een cDNA array (Murphy, 2002). Niet alle probes op een cDNA array zijn even lang: kortere probes (< 1 kbp) laten in zulk geval minder specifieke hybridisatie toe. Langere probes echter (> 1 < 2 kbp) garanderen een hogere sensitiviteit.

Tenslotte dient ook benadrukt te worden dat microarrays slechts een momentopname zijn van de genexpressie. Indien een bepaald gen niet differentieel tot expressie komt, wil dit niet noodzakelijk zeggen dat het proteïne waarvoor het gen codeerde niet in het weefsel aanwezig is. Het is mogelijk dat op het moment van RNA-extractie een bepaald gen net terug downgereguleerd werd omdat (voorlopig) genoeg proteïne in het weefsel aanwezig was. In het ideale geval zouden expressiestudies d.m.v. microarrays dan ook gecombineerd moeten worden met analyses op het proteïneniveau (Van Hal *et al.*, 2000)

Zoals eerder kort aangehaald kan er in de regulatie van de genen gerelateerd met exoskeletopbouw geen verklaring gevonden worden voor het feit dat in de eerste en tweede zinkgeneratie een significant lagere reproductie waargenomen werd t.o.v. de overeenkomstige generatieblanco. Zoals eveneens al eerder aangehaald in de algemene discussie van de fysiologische parameters, kan de vaststelling dat deze lagere reproductie enkel in deze twee eerste generaties waargenomen werd, verklaard worden door acclimatisatie. Aanwijzingen hiervoor zijn echter niet in het expressiepatroon te vinden. Immers voor een deel van de genen, nl. dewelke een lagere reproductie tot gevolg hebben, kan verwacht worden dat ze in de eerste twee zinkgeneraties op eenzelfde manier gereguleerd zijn en in de derde generatie niet meer. Dit komt echter nergens in het expressiepatroon voor. Enkel bij de ongeraketeriseerde genen komen drie fragmenten (EG565360, DW985559 en DW985576) voor die in de eerste twee generaties een opregulatie kennen en in de derde generatie niet meer differentieel tot expressie komen. Of het hier gaat over verschillende genen of niet kan niet besloten worden omwille van de redundantie. Een mogelijke indicatie hiervoor, zou gevonden kunnen worden in de vergelijking van de gensequenties. Echter biedt deze benadering geen volledig uitsluitel daar de overlap tussen de sequenties slechts beperkt kan zijn, ondanks het feit dat de fragmenten wel tot eenzelfde gen kunnen behoren.

Opmerkelijk is het feit dat enkel in de eerste zinkgeneratie genen opgereguleerd werden die gerelateerd zijn met DNA-repair of met oxidatieve stressrespons, zoals het superoxide dismutase. Beide zijn betrokken in de respons t.o.v. zinkstress. Mogelijk kan dit te maken hebben met een afnemende zinkconcentratie of met acclimatisatie in de latere twee generaties.

Het DNA-repair proteïne wijst waarschijnlijk op een grotere DNA-schade t.o.v. de latere twee generaties. De Coen & Janssen (2003) toonden aan dat DNA-schade niet enkel een impact heeft op overleving, maar ook op verschillende andere supraorganismale parameters, zoals groei en reproductie. Dit vormt een bijkomende mogelijke verklaring voor de significant lagere reproductie in de zinkaquaria in de eerste generatie.

Vermits genexpressie in beide beschouwde nakomelingenlijnen om eerder vernoemde redenen vrij variabel was, was het moeilijk om hieruit herkenbare patronen te destilleren. Over het algemeen zijn beide expressiepatronen zeer gelijkend en lijkt er weinig verschil te bestaan tussen de blootstellingsduur aan zink. Meest opvallende verschil is de verandering in expressie bij drie dehydrogenasen in de nakomelingenlijn [F1Zn - F2ZnBI - F3ZnBIBI] die in de andere lijn niet differentieel tot expressie kwamen. Een afdoende verklaring kan hiervoor echter niet gevonden worden.

De nakomelingenlijnen geven eveneens de mogelijkheid om mogelijk epigenetisch gereguleerde genen te onderscheiden. Indien ervan uitgegaan wordt dat bepaalde epigenetische *imprints* gedurende meerdere generaties kunnen blijven bestaan, zal de expressie, welke in de zinkgeneraties vorm kreeg, geen verandering ondergaan wanneer de organismen opnieuw in blancomedium gebracht worden. Over het algemeen lijken na twee generaties zinkblootstelling meer genen potentieel epigenetisch gereguleerd te worden. In de NK-lijn [F2Zn - F3ZnBI] werden twee genen (en drie ongekaracteriseerde fragmenten) geïdentificeerd die gedurende alle generaties in eenzelfde richting gereguleerd worden. Het betrof een prolinerijk proteïne (DW724634) en een cuticula proteïne (DW724655). In de NK-lijn [F1Zn - F2ZnBI - F3ZnBIBI] werden zo geen genen geïdentificeerd.

Deze waarneming dient echter enigszins in een juist daglicht geplaatst te worden aangezien genen in de NK-lijn [F1Zn - F2ZnBI - F3ZnBIBI] gedurende een generatie langer blootgesteld werden aan een blancomedium dan deze in de andere NK-lijn. Het aantal genen in de eerste NK-lijn dat gedurende de eerste twee generaties in eenzelfde richting gereguleerd werd, bedroeg immers vier. Het betrof allemaal niet gekarakteriseerde genfragmenten (EG565360, DW985576, DW724581 en FD467200). Deze vier genen kenden dus een veranderende expressie in de derde generatie. Van de vijf genen (twee gekarakteriseerde en drie ongekaracteriseerde) in NK-lijn [F2Zn - F3ZnBI] is echter niet geweten hoeveel ervan mogelijk een veranderende expressie zouden kennen in een volgende generatie. Indien met meer zekerheid geweten moet zijn of de initiële blootstellingduur een invloed heeft op het later aantal potentieel epigenetisch gereguleerde genen, dient een vierde generatie op genexpressie onderzocht te worden. Om toch een extra indicatie te hebben of het over een mogelijk epigenetisch effect gaat in de NK-lijn [F2Zn - F3ZnBI], kan gekeken worden naar de expressie van die genen in F3Zn. Indien ze daar op eenzelfde manier tot expressie kwamen, geeft dit een extra aanwijzing of het over een epigenetisch effect gaat. Van de vijf (gekaracteriseerde en ongekaracteriseerde) genfragmenten in de NK-lijn [F2Zn - F3ZnBI] kwamen er twee op eenzelfde manier tot expressie, nl. het gekarakteriseerde cuticula proteïne (DW724655) en een ongekaracteriseerd fragment (FD467003).

Bovendien zou het kunnen voorkomen dat bepaalde genen in de NK-lijn pas vanaf de tweede generatie (F2ZnBI) differentieel tot expressie komen onder regulatie van een epigenetisch kenmerk. In dat geval zou de imprint onder invloed van de zinkstress in de eerste generatie gevormd zijn gedurende de embryo-ontwikkeling zonder dat een veranderende genexpressie (ten gevolge van epigenetica) in het adulte organisme waargenomen werd. Immers in vele organismen, zowel vertebraten als invertebraten, wordt het epigenoom gedurende de vroege embryonale ontwikkeling gewist om later terug hersteld te worden. Tijdens deze periode is het organisme ook gevoeliger voor bijkomende epigenetische veranderingen (bv. onder invloed van zinkstress) (Rakyan & Beck, 2006). Echter wanneer dit het geval zou zijn, zou van hetzelfde gen eenzelfde regulatie in de tweede zinkgeneratie terug te vinden moeten zijn als in de F2ZnBI generatie. Dit is echter nergens het geval.

Geen van de extra toegevoegde genen (metallothioneïne A, metallothioneïne B, retinol dehydratase en ferritine) kwam differentieel tot expressie gedurende het hele experiment, ondanks het feit dat deze in de literatuur beschreven staan als metaalgevoelig. Ferritine-expressie wordt onrechtstreeks gereguleerd door oxidatieve stress (Hintze & Theil, 2005). Ondanks het feit dat in de eerste zinkgeneratie wel tekenen van oxidatieve stress (opregulatie van SOD) werden waargenomen, werd geen differentiële expressie van ferritine waargenomen. Poynton *et al.* (2007) detecteerden dit echter ook niet. Het was pas in een aansluitend RT-PCR experiment dat ze opregulatie met een factor 2,36 waarnamen. Zij detecteerden in hun microarray experiment echter wel downregulatie van het retinol dehydratase. Eveneens detecteerden zij bij Zn-blootstelling geen differentiële expressie in de potentiële metallothioneïnes. Waarschijnlijk was zowel in hun experiment als in het experiment hier beschreven de oxidatieve stress onvoldoende intens of langdurig om deze genen tot expressie te brengen. Immers, zoals aangehaald in de literatuurstudie zullen MTs in eerste instantie slechts in beperkte mate instaan voor chelatie van metaalionen. Antioxidant enzymen, zoals het SOD, zullen het meeste werk voor hun rekening nemen (zie 2.3.4.1.).

Alhoewel uit het bovenstaande blijkt dat toepassing van cDNA-microarrays voor het detecteren van transgeneratiele effecten (nog) niet geschikt is en de interpretatie ervan met voldoende voorzichtigheid dient te gebeuren, moet het potentieel nut van microarrays in de (eco)toxicologie niet onderschat worden. Gant (2007) beschrijft o.a. nog een aantal mooie toepassingen die het onderzoeken waard zijn. Zeker indien het genoom en de genfuncties van *D. magna* bekend zullen zijn en gewerkt kan worden met de performantere oligonucleotide arrays zullen waarschijnlijk heel wat bruikbare en betrouwbare toepassingen mogelijk zijn. Al dient het gebruik en relevantie van iedere toepassing op zich uiteraard opnieuw nagegaan te worden. In dat stadium zal ook een verder doorgedreven standaardisatie voor het gebruik van microarray experimenten in het veld van de ecotoxicologie mogelijk zijn waardoor resultaten onderling (zelfs indien ze uitgevoerd werden met een verschillend platform) gemakkelijker vergeleken kunnen worden (Barrett & Kawasaki, 2003). Daarnaast zal tenslotte ook gewerkt moeten worden aan het verhogen van de reproduceerbaarheid van de microarray experimenten (Vrana *et al.*, 2003).

6. Besluit

Bij invertebraten is de kennis omtrent epigenetische processen, zoals DNA-methylatie, heel wat minder uitgebreid dan bij vertebraten. Bovendien blijkt dat de effecten en de processen van epigenetica zoals ze zich voordoen in vertebraten niet zonder meer naar invertebraten geëxtrapoleerd kunnen worden. Nochtans kunnen deze epigenetische processen bijvoorbeeld in het (eco)toxicologische modelorganisme *Daphnia magna* belangrijke implicaties hebben tot het beter begrijpen van werkingsmechanismen van bepaalde toxicanten en hun mogelijke nawerkingen in de generaties volgend op de blootgestelde populatie. Immers, epigenetische invloeden kunnen (gedeeltelijk) transgeneratieel overgeërfd worden.

In een eerste luik van deze scriptie werd een techniek voor detectie van DNA-methylatie, beschreven voor humane kankercellen, geoptimaliseerd voor methylatiedetectie bij *D. magna*.

Met de geoptimaliseerde techniek werden twee gemethyleerde DNA-fragmenten gedetecteerd. Alhoewel verder onderzoek van deze methylatie d.m.v. bisulfietsequencing niet plaatsvond wegens tijdsgebrek, kan er toch vanuit gegaan worden dat de bekomen fragmenten uit het aangepaste AIMS-protocol methylatie bevatten. Het gebruik van methylatie-gevoelige restrictie-enzymen is immers een betrouwbare methode voor het detecteren van DNA-methylatie indien de digesten volledig zijn.

Deze techniek toonde niet alleen aan dat DNA-methylatie voorkomt bij *D. magna* maar ook dat deze zich in een CpG dinucleotide verband bevindt. Of er nog methylatie in andere verbanden in het genoom voorkomt kan onderzocht worden door minieme adaptaties in de techniek.

Het potentieel van de geoptimaliseerde techniek is groot en nog niet volledig benut. Minieme variaties kunnen andere gemethyleerde fragmenten aan het licht brengen. De techniek is bovendien kleinschalig, gemakkelijk en snel toepasbaar, methylatie is snel onderscheidbaar en detecteerbaar via een differentieel bandenpatroon en gemethyleerde banden kunnen gemakkelijk gerecupereerd worden voor verdere analyses.

Met het aantonen van het voorkomen van DNA-methylatie in *D. magna* is de weg opengelegd naar tal van andere technieken en verdere analyses, zoals o.a. het bepalen van de volledige methylatiegraad van het *Daphnia* genoom. Door het feit dat dit genoom binnen afzienbare tijd volledig gesequeneerd zal zijn, worden de toepassingen almaar interessanter: DNA-methylatie zal bijvoorbeeld gekoppeld kunnen worden aan veel functionelere zaken, zoals impact op genfunctie, impact op transcriptie en translatie...

In een tweede luik werd de invloed van chronische sublethale zinkblootstelling gedurende drie generaties op de epigenetica en transgeneratiele processen in het organisme onderzocht. Dit werd onrechtstreeks gedaan door de impact van de zinkstress te bestuderen op organismaal, fysiologisch niveau en op het niveau van genexpressie. Parameters op het organismale, fysiologische of genexpressieniveau die zich na het wegvallen van de zinkstress, in een volgende generatie, toch nog

op een gelijkaardige manier voordeden als voor het wegvallen van de stress, werden potentieel epigenetisch gereguleerd.

Er werd een significant lagere reproductie vastgesteld in de eerste twee zinkgeneraties t.o.v. hun overeenkomstige blanco. In de eerste generatie bedroeg dit effect nog 27,2%, waar het in de tweede generatie nog maar 15,0% bedroeg om in de derde generatie verdwijnen. Acclimatisatie van de organismen werd vastgesteld. In de eerste generatie werd een significante daling van de respiratiesnelheid genoteerd doorheen de hele generatie. De respiratiesnelheid genoteerd op het einde van de eerste generatie was vergelijkbaar met deze in de volgende generaties. Deze daling wijst op een compensatiereactie op lagere niveaus dan dat van de biologische organisatie.

In de overige parameters, (drooggewicht, overleving en lengte) werden over het algemeen geen significante verschillen gevonden tussen blootgestelde en niet-blootgestelde organismen, alhoewel dit met de beoogde zinkconcentratie gelegen rond de EC_{50} voor reproductie toch verwacht werd. De voornaamste mogelijke redenen waarom toch geen verschillen waargenomen werden, zijn technische problemen waardoor in het begin reeds vertrokken werd met een concentratie die 17% lager lag dan de EC_{50} voorspeld door het Biotisch Ligand Model op basis van de eigenschappen van het gebruikte medium. Onderschatting van de EC_{50} door het model en mogelijke voorafgaande acclimatisatie aan variabele zinkconcentraties in de stamkweek kunnen als mogelijke verklaringen aangevoerd worden.

Het waargenomen effect op reproductie zette zich niet verder in nakomelingen die overgeplaatst werden in blanco-medium na blootstelling aan zink gedurende één of twee generaties. Dit wees erop dat hier geen transgenerationeel overerfbaar epigenetisch effect aanwezig was.

Het bestuderen van de acclimatisatie en mogelijk transgenerationele effecten op het niveau van de genexpressie leverde een onverwacht resultaat op. Daar waar in de eerste twee zinkgeneraties toch verwacht werd dat een aantal genen gerelateerd met reproductie op eenzelfde manier gereguleerd zouden worden, bleek dit niet het geval. Genen in de tweede generatie werden in de tegengestelde richting gereguleerd dan deze in de eerste generatie. Een verklaring voor deze waarneming werd gezocht in de invloed van het fysiologische stadium van het organisme op de genexpressie. In een populatie bevinden nooit alle organismen zich in eenzelfde fysiologisch stadium en dit kan de genexpressie beïnvloeden. Naast deze effecten op het niveau van het individuele organisme, werd ook variatie vastgesteld tussen verschillende controlegeneraties. Het is niet uitgesloten dat beide beschreven processen deels met elkaar interageren. In het domein van de ecotoxicologie dient interpretatie van microarray resultaten omwille van deze variatie met de nodige voorzichtigheid te gebeuren.

Ook op het niveau van genexpressie werden geen gekarakteriseerde potentieel epigenetisch gereguleerde genen gevonden. Wel werden enkele niet gekarakteriseerde genfragmenten gevonden die gedurende één generatie na blootstelling nog op eenzelfde manier gereguleerd werden.

Alhoewel uit het bovenstaande blijkt dat toepassing van cDNA-microarrays voor het detecteren van transgenerationele effecten (nog) niet optimaal geschikt is en de interpretatie ervan met voldoende voorzichtigheid dient te gebeuren, moet het potentieel nut van microarrays in de (eco)toxicologie niet onderschat worden. Zeker indien het genoom en de genfuncties van *D. magna* bekend zullen zijn en gewerkt kan worden met de performantere oligonucleotide arrays zullen waarschijnlijk heel wat bruikbare en betrouwbare toepassingen mogelijk zijn. Al dient het gebruik en relevantie van iedere toepassing op zich uiteraard opnieuw nagegaan te worden en dient er gewerkt te worden aan het verhogen van de reproduceerbaarheid van de microarray experimenten.

In deze studie werden geen stabiele transgenerationele wijzigingen in genexpressie vastgesteld.

7. Referenties

- Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J. & Rainbow, P.S. (2006). Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology*, 76, 160-202.
- Anway, M.D., Cupp, A.S., Uzumcu, M. & Skinner, M.K. (2005). Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science*, 308, 1466-1469.
- Anway, M.D. & Skinner, M.K. (2006). Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. *Endocrinology*, 147(6), S43-S49.
- Barata, C., Navarro, J.C., Varo, I., Riva, M.C., Arun, S. & Porte, C. (2005). Changes in antioxidant enzyme activities, fatty acid composition and lipid peroxidation in *Daphnia magna* during the aging process. *Comparative biochemistry and physiology. Biochemistry and molecular biology*, 140(1), 81-90.
- Barnes, R.D. (1980). *Invertebrate zoology*. Molt Saunders College Publishing, Philadelphia, 1089 p.
- Barrett, J.C. & Kawasaki, E.S. (2003). Microarrays: the use of oligonucleotides and cDNA for the analysis of gene expression. *Drug Discovery Today*, 8(3), 134-141.
- Baylin, S.B. & Herman, J.G. (2000). DNA hypermethylation in tumorigenesis: Epigenetics joins genetics. *Trends in genetics*, 16, 168-174.
- Becker, D.J., Ongemba, L.N., Brichard, V., Henquin, J.-C. & Brichard, S.M. (1995). Diet- and diabetes-induced changes of *ob* gene expression in rat adipose tissue. *FEBS Letters*, 371(3), 324-328.
- Benjamini, Y. & Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society, B.57*, 289-300.
- Bestor, T. & Tycko, B. (1996). Creation of genomic methylation patterns. *Nature genetics*, 12, 363-367.
- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes and Development*, 16, 6-21.
- Bird, A.P., Taggart, M.H., Nicholls, R.D. & Higgs, D.R. (1987). Non-methylated CpG-rich islands at the human α -globin locus: Implications for evolution of the α -globin pseudogene. *The EMBO Journal*, 6, 999-1004.
- Bongiorni, S., Cintio, O. & Prantera, G. (1999). The relationship between DNA methylation and chromosome imprinting in the Coccid *Planococcus citri*. *Genetics*, 151, 1471-1478.
- Bossuyt, B.T.A. & Janssen, C.R. (2003). Acclimation of *Daphnia magna* to environmentally realistic copper concentrations. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 136C, 253-264.

- Bradley, M.C., Naylor, C., Calow, P., Baird, D.J., Barber, I. & Soares, A.M.V.M. (1993). Reducing variability in *Daphnia* toxicity tests - A case for further standardization. In: Soares, A.M.V.M & Calow, P. (eds.). Progress in standardization of aquatic toxicity tests. New Jersey, Lewis Publishers, 57-70.
- Burczynski, M.E., McMillian, M., Ciervo, J., Li, L., Parker, J.B. & Dunn, R.T. (2000). Toxicogenomics-based discrimination of toxic mechanism in HepG2 human hepatoma cells. *Toxicological sciences*, 58, 399-415.
- Campiche, S., L'Ambert, G., Tarradellas, J. & Becker-van Slooten, K. (2007). Multigeneration effects of insect growth regulators on the springtail *Folsomia candida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67, 180-189.
- Chen, C. & Liao, S. (2003). Zinc toxicity on neonatal cortical neurons: involvement of glutathion chelation. *Journal of neurochemistry*, 85, 443-453.
- Cheng, T., De Schamphelaere, K., Loftis, S., Janssen, C. & Allen, H.E. (2005). Measurement and computation of zinc binding to natural dissolved organic matter in European surface waters. *Analytica Chimica Acta*, 542, 230-239.
- Chong, S. & Whitelaw, E. (2004). Epigenetic germline inheritance. *Current Opinion in Genetics and Development*, 14, 692-696.
- Clescerl, L.S., Greenberg, A.E. & Eaton, A.D. (1998). Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th Edition: Part 2000 Physical and Aggregate Properties: Hardness. Alexandria, USA, Water Environment Federation (WEF).
- Cuypers, A., Vangronsveld, J. & Clijsters, H. (2001). The redox status of plant cells (AsA and GSH) is sensitive to zinc imposed oxidative stress in roots and primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Plant physiology and biochemistry*, 39, 657-664.
- Dahl, C. & Guldberg, P. (2003). DNA methylation analysis techniques. *Biogerontology*, 4, 233-250.
- Daphnia* Genomics Consortium. (2008a). DGC Projects: Genetic Maps for *Daphnia pulex* and *D. magna*. Bloomington Campus, The center for Genomics and Bioinformatics, and The Trustees of Indiana University. Online beschikbaar op: <http://daphnia.cgb.indiana.edu/projects/geneticmaps/> (17/05/08).
- Daphnia* Genomics Consortium. (2008b). The DGC Projects: Compelling reasons for choosing *Daphnia* as a model species. Bloomington Campus, The center for Genomics and Bioinformatics, and The Trustees of Indiana University. Online beschikbaar op: <http://daphnia.cgb.indiana.edu/people/modelsystem/> (17/05/08).
- De Coen, W. & Janssen, C.R. (2003). A multivariate biomarker-based model predicting population-level responses of *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22(9), 2195-2201.
- De Coninck, D., Landschoot, S., Metsu, M., Vermeulen, B. & Vleugels, T. (2007). Epigenetica - dirigent van het DNA. Project, Gent, Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen, p. 34.

- D'Haese P (2005). Effecten van zink bij de watervlo *Daphnia magna* na chronische blootstelling via water en voedsel. Scriptie, KaHO St. Lieven, Graduaat Chemie, optie Milieuzorg.
- Duffus, J.H. (2002). Heavy metals - a meaningless term?. *Pure and applied chemistry*, 74(5), 793-807.
- Durbin, B.P., Hardin, J.S., Hawkins, D.M. & Rocke, D.M. (2001). A variancestabilizing transformation for gene-expression microarray data. *Bioinformatics*, 18, S105–S110.
- Elendt, B.P. & Bias, W.R. (1990). Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing. Effects of the optimization of culture conditions on life history parameters of *D. magna*. *Water Research*, 24, 1157-1167.
- Evers, E.G. & Kooijman, S. (1989). Feeding, digestion and oxygen consumption in *Daphnia magna*: a study in energy budgets. *Netherlands Journal of Zoology*, 39(1-2), 56-78.
- Feil, R. (2006). Environmental and nutritional effects on the epigenetic regulation of genes. *Mutation Research*, 600(1), 46-57.
- Field, L.M. (2000). Methylation and expression of amplified esterase genes in the aphid *Myzus persicae* (Sulzer). *The Biochemical journal*, 349, 863-868.
- Field, L.M., Lyko, F., Mandrioli, M. & Prantera, G. (2004). DNA methylation in insects. *Insect molecular biology*, 13(2), 109-115.
- Frigola F., Ribas M., Risques R.-A. & Peinado M.A. (2002). Methylome profiling of cancer cells by amplification of inter-methylated sites (AIMS). *Nucleic Acids Research*, 30(7), e28.
- Frommer, M., McDonald, L.E., Millar, D.S., Collis, C.M., Watt, F., Grigg, G.W., Molloy, P.L. & Paul, C.L. (1992). A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89, 1827-1831.
- Fuks, F. (2005). DNA methylation and histone modifications: Teaming up to silence genes. *Current Opinion in Genetics and Development*, 15, 490-495.
- Gant, T.W. (2007). Novel and future applications of microarrays in toxicological research. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 3(4), 599-608.
- Gauld D.T. (1951). The grazing rate of planktonic copepods. *Journal of Marine and Biological Associations U.K.*, 29, 695-705.
- Gillis, P.L., Chow-Fraser, P., Ranville, J.F., Ross, P.E. & Wood, C.M. (2005). *Daphnia* need to be gut-cleared too: the effect of exposure to and ingestion of metal-contaminated sediment on the gut-clearance patterns of *D. magna*. *Aquatic Toxicology*, 71(2), 143-154.

- Grunau, C., Clark, S.J. & Rosenthal, A. (2001). Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acids Research*, 29(13), e65.
- Guilhermino, L.C., Diamantino, T., Silva, M.C. & Soares, A. M. V. M. (2000). Acute toxicity test with *Daphnia magna*: an alternative to mammals in the prescreening of chemical toxicity?. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 46, 357-362.
- Gurdon, J.B. (1999). Genetic reprogramming following nuclear transplantation in *Amphibia*. *Seminars in cell & developmental biology*, 10, 239-243.
- Hajkova, P., El-Maarri, O., Engemann, S., Oswald, J., Olek, A. & Walter, J. (2002). DNA-methylation analysis by the bisulfite-assisted genomic sequencing method. In: Mills, K.I. & Ramsahoye, B.H. (eds.). *DNA methylation protocols, Methods in molecular biology*, vol. 200. Totowa, New Jersey, Humana Press, 143-154.
- Hebert, P.D.N. (1978). The population biology of *Daphnia* (Crustacea, Daphnidae). *Biological reviews*, 53(3), 387-426.
- Heijerick, D.G., De Schamphelaere, K.A.C., Van Sprang, P.A. & Janssen, C.R. (2005). Development of a chronic zinc biotic ligand model for *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 62, 1-10.
- Hessen, D.O. & Rukke, N.A. (2000). The costs of moulting in *Daphnia*, mineral regulation of carbon budgets. *Freshwater biology*, 45, 169-178.
- Hintze, K. J. & Theil, E. C. (2005). DNA and mRNA elements with complementary responses to hemin, antioxidant inducers, and iron control ferritin-L expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 15048-15052.
- Hogstrand, C., Balesaria, S. & Glover, C.N. (2002). Application of genomics and proteomics for study of the integrated response to zinc exposure in a non-model fish species, the rainbow trout. *Comparative biochemistry and physiology*, 133B, 523-535.
- Huber, W., von Heydebreck, A., Sülthmann, H., Poustka, A. & Vingron, M. (2002). Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. *Bioinformatics*, 18, S96-S104.
- Hughes, R.N. (1989). *A functional biology of clonal animals*. Chapman and Hall, London, 331 p.
- Iannaconne, P.M. (2001). Toxicogenomics - the call of the wild chip. *Environmental health perspectives*, 109, A8-A11.
- Issa, J.P. (2000). CpG-island methylation in aging and cancer. *Current topics in microbiology and immunology*, 249, 101-118.
- Jaenisch, R., Harbers, K., Jahner, D., Stewart, C. & Stuhlmann, H. (1982). DNA methylation, retroviruses, and embryogenesis. *Journal of cellular biochemistry*, 20, 331-336.

- Jenkins, D.G. & Buikema, A.L. (1998). Do similar communities develop in similar sites? A test with zooplankton structure and function. *Ecological monographs*, 68(3), 421-443.
- Kaiser, J. (2005). Developmental biology. Endocrine disrupters trigger fertility problems in multiple generations. *Science*, 308, 1391-1392.
- Kleiven, O., Larsson, P. & Hobaek, A. (1992). Seksual reproduction in *Daphnia magna* requires 3 stimuli. *Oikos*, 65(2), 197-206.
- Koivisto, S. (1995). Is *Daphnia magna* an ecological representative zooplankton species in toxicity tests?. *Environmental Pollution*, 90(2), 263-267.
- Korsloot, A., van Gestel, C.A.M. & van Straalen, N.M. (2004). Environmental stress and cellular response in arthropods. Boca Raton, Florida, CRC Press LLC.
- Koskinen, H., Pehkonen, P., Vehniainen, E., Krasnov, A., Rexroad, C., Afanasyev, S., Molsa, H. & Oikari, A. (2004). Response of rainbow trout transcriptome to model chemical contaminants. *Biochemical and biophysical research communications*, 320, 745-753.
- Laayoun, A. & Smith, S.S. (1995). Methylation of slipped duplexes, snapbacks and cruciforms by human DNA(cytosine-5)methyltransferase. *Nucleic Acids Research*, 23, 1584-1589.
- Lampert, W. (1993). Phenotypic plasticity of the size at first reproduction in *Daphnia*: The importance of maternal size. *Ecology*, 74(5), 1455-1466.
- Larkin, P., Sabo-Attwood, T., Kelso, J. & Denslow, N.D. (2002). Gene expression analysis of largemouth bass exposed to estradiol, nonylphenol, and p,pVDD. *Comparative biochemistry and physiology*, B133, 543-557.
- Lasenby, D.C. & Van Duyn, J. (2004). Zinc and cadmium accumulation by the opossum shrimp *Mysis relicta*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 23(2), 179-183.
- Lavens, P. & Sorgeloos, P. (1996). Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper, no. 361, Rome, FAO, 295 p.
- LeBlanc, G.A., Schoenfeld, D.A. & Surprenant, D.C. (1983). Effects of food concentration, animal interactions and water volume on survival, growth and reproduction of *Daphnia magna* under flow-through conditions. In: Bishop, W.E., Cardwell, R.D. & Heidolph, B.B. (eds.). *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Sixth Symposium*, St. Louis, Baltimore, ASTM STP802, 494-508.
- Lofts, S. & Tipping, E. (2002). Windermere Humic Aqueous Model – Equilibrium chemical speciation for natural waters – Version 6.0. Centre for Ecology and Hydrobiology, CEH Windermere, Cumbria, UK.
- Lyko, F., Ramsahoye, B.H. & Jaenisch, R. (2000). DNA methylation in *Drosophila melanogaster*. *Nature*, 408, 538-540.

- MacLeod, D., Clark, V. & Bird, A. (1999). Absence of genomewide changes in DNA methylation during development of the zebrafish (*Danio rerio*). *Nature reviews Genetics*, 23, 139-140.
- Madlung, A. & Comai, L. (2004). The effect of stress on genome regulation and structure. *Annals of botany*, 21, 1-15.
- Mark, U. & Solbé, J. (1998). Analysis of the ECETOC Aquatic Toxicity (EAT) Database: V - The relevance of *Daphnia magna* as a representative test species. *Chemosphere*, 36(1), 155-166.
- Marshall, W.S. (2002). Na, Cl, Ca and Zn transport by fish gills: retrospective review and prospective synthesis. *Journal of experimental zoology*, 293, 264-283.
- Matzke, M., Matzke, A.J. & Kooter, J.M. (2001). RNA: Guiding gene silencing. *Science*, 293, 1080-1083.
- Mette, M. (2007). Plant DNA methylation analysis by bisulfite genomic sequencing. Epigenome Network of Excellence, <http://www.epigenome-noe.net>
- Miao, V.P., Freitag, M. & Selker, E.U. (2000). Short TpA-rich segments of the ζ - η region induce DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Journal of molecular biology*, 300, 249-273.
- Mitchell, S.E., Read, A.F. & Little T.J. (2004). The effect of a pathogen epidemic on the genetic structure and reproductive strategy of the crustacean *Daphnia magna*. *Ecology Letters*, 7(9), 848-858.
- Murphy, D. (2002). Gene expression studies using microarrays: principles, problems and prospects. *Advances in Physiology Education*, 26, 256-270.
- Muyssen, B.T.A. & Janssen, C.R. (2001). Multigeneration zinc acclimation and tolerance in *Daphnia magna*: Implications for water-quality guidelines and ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(9), 2053-2060.
- Muyssen, B.T.A. & Janssen, C.R. (2002). Zinc accumulation and regulation in *Daphnia magna* Straus: links with homeostasis and toxicity. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 43, 492-496.
- Muyssen, B.T.A. & Janssen, C.R. (2005). Importance of acclimation to environmentally relevant zinc concentrations on the sensitivity of *Daphnia magna* toward zinc. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(4), 895-901.
- Muyssen, B.T.A., Janssen, C.R. & Bossuyt, B.T.A. (2002). Tolerance and acclimation to zinc of field-collected *Daphnia magna* populations. *Aquatic Toxicology*, 56, 69-79.
- Muyssen, B.T.A., De Schamphelaere, K.A.C. & Janssen, C.R. (2006). Mechanisms of chronic waterborne Zn toxicity in *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology*, 77, 393-401.
- Naylor, C., Cox, E.J., Bradley, M.C. & Calow, P. (1992). Effect of differing maternal food ration on susceptibility of *Daphnia magna* Straus neonates to toxic substances. *Aquatic Toxicology*, 24(1-2), 75-82.

- Neumann, N.F. & Galvez, F. (2002). DNA microarrays and toxicogenomics: applications for ecotoxicology?. *Biotechnology Advances*, 20, 391-419.
- O'Brien, J.J., Kumari, S.S. & Skinner, D.M. (1991). Proteins of Crustacean exoskeletons: I. Similarities and differences among proteins of the four exoskeletal layers of four *Brachyurans*. *The Biological bulletin*, 181(3), 427-441.
- Oja, S.S., Janaky, R., Varga, V. & Saransaari, P. (2000). Modulation of glutamate receptor functions by glutathione. *Neurochemistry international*, 37, 299-306.
- Oller, A. & Bates, H. (2003). Metals in perspective. *Journal of environmental monitoring*, 5(5), 95-102.
- Oommen, A.M., Griffin, J.B., Sarath, G. & Zemleni, J. (2005). Roles for nutrients in epigenetic events. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16, 74-77.
- Pfeifer, G.P., Steigerwald, S.D., Hansen, R.S., Gartler, S.M. & Riggs, A.D. (1990). Polymerase chain reaction-aided genomic sequencing of an X chromosome-linked CpG island: Methylation patterns suggest clonal inheritance, CpG site autonomy and an explanation of activity state stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 8252-8256.
- Poynton, H.C., Varshavsky, J.R., Chang, B., Cavigiolio, G., Chan, S., Holman, P.S., Loguinov, A.V., Bauer, D.J., Komachi, K., Theil, J.E., Perkins, E.J., Hughes, O. & Vulpe C.D. (2007). *Daphnia magna* ecotoxicogenomics provides mechanistic insights into metal toxicity. *Environmental Science Technology*, 41(3), 1044-1050.
- Rainbow, P.S. & Dallinger, R. (1993). Metal uptake, regulation and excretion in freshwater invertebrates. In: Dallinger, R. & Rainbow, P.S. (eds.). *Chelsea, USA, Lewis Publishers*, 119-131.
- Rakyan, V.K. & Beck, S. (2006). Epigenetic variation and inheritance in mammals. *Current Opinion in Genetics and Development*, 16, 573-577.
- Ravera, O. (2001). Monitoring of the aquatic environment by species accumulator of pollutants: a review, *Journal of limnology*, 60(1), 63-78.
- Reik, W., Wolf, D. & Walter, J. (2001). Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*, 293, 1089-1093.
- Reiner, A., Yekutieli, D. & Benjamini, Y. (2003). Identifying differentially expressed genes using false discovery rate controlling procedures. *Bioinformatics*, 19(3), 368-375.
- Rhee, I., Jair, K.W., Yen, R.W., Lengauer, C., Herman, J.G., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Baylin, S.B. & Schuebel, K.E. (2000). CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1. *Nature*, 404, 1003-1007.
- Riggs, A.D. (1975). X-inactivation, differentiation and DNA methylation. *Cytogenetics and cell genetics*, 14, 9-25.

- Rocke, D.M. & Durbin, B. (2001). A model for measurement error for gene expression analysis. *Journal for Computational Biology*, 8, 585-614.
- Ruden, D.M., Xiao, L., Garfinkel, M.D. & Lu, X. (2005). Hsp90 and environmental impacts on epigenetic states: a model for the transgenerational effects of diethylstilbestrol on uterine development and cancer, *Human molecular genetics*, 14, R149-R155.
- Russo, V.E.A., Martienssen, R.A. & Riggs, A.D. (1996). *Epigenetic mechanisms of gene regulation*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 692p.
- Shapiro S.S. & Wilk M.B. (1965). An analysis of variance test for normality. *Biometrika*, 52(3), 591-599.
- Simmen, M.W., Leitgeb, S., Charlton, J., Jones, S.J.M., Harris, B.R., Clark, V.H. & Bard, A. (1999). Nonmethylated transposable elements and methylated genes in a chordate genome. *Science*, 283, 1164-1167.
- Skinner, M.K. (2008). What is an epigenetic transgenerational phenotype?. *Reproductive toxicology*, 25(1), 2-6.
- Smyth G.K. (2005). LIMMA: Linear Models and for Microarray Data, In: *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor*, R. Gentleman, V. Carey, S. Dudoit, R. Irizarry, W. Huber (eds.), Springer, New York, p. 397-420.
- Smyth G.K. (2004). Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology*, 3(1), Article 3.
- Smyth, G. K., Yang, Y. H. & Speed, T. (2003). Statistical issues in cDNA microarray data analysis. *Methods in Molecular Biology*, 224, 111-136.
- Snape, J.R., Maund, S.J., Pickford, D.B. & Hutchinson, T.H. (2004). Ecotoxicogenomics: the challenge of integrating genomics into aquatic and terrestrial ecotoxicology. *Aquatic Toxicology*, 67, 143-154.
- Soetaert, A., Moens, L.N., Van der Ven, K., Van Leemput, K., Naudts, B., Blust R. & De Coen, W.M. (2006). Molecular impact of propiconazole on *Daphnia magna* using a reproduction-related cDNA array. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 142, part C, 66-76.
- Soetaert, A., Van der Ven, K., Moens, L.N., Vandenbrouck, T., van Remortel, P. & De Coen, W.M. (2007a). *Daphnia magna* and ecotoxicogenomics: Gene expression profiles of the anti-ecdysteroidal fungicide fenarimol using energy-, molting- and life stage-related cDNA libraries. *Chemosphere*, 67, 60-71.
- Soetaert, A., Vandenbrouck, T., Van der Ven, K., Maras, M., van Remortel, P. & Blust, R. & De Coen, W.M. (2007b). Molecular responses during cadmium-induced stress in *Daphnia magna*: Integration of differential gene expression with higher-level effects. *Aquatic Toxicology*, 83, 212-222.
- Soto, M., Marigómez, I. & Cancio, I. (2003). *Biological aspects of metal accumulation and storage*. University of the Basque Country, Faculty of Science and Technology, Zoology and Animal Cell Biology Department., Cell Biology and Histology Laboratory.

- Spada, F., Vincent, M. & Thompson, E.M. (2005). Plasticity of histone modifications across the invertebrate to vertebrate transition: histone H3 lysine 4 trimethylation in heterochromatin. *Chromosome research*, 13(1), 57-72.
- Stancheva, I. & Meehan, R.R. (2000). Transient depletion of xDnmt1 leads to premature gene activation in *Xenopus* embryos. *Genes & Development*, 14, 313-327.
- Stanley, F.J. (2003). Studies on the metal-containing granules in the mussels *Mytilus galloprovincialis* and *Velesunio angasi*. PhD Doctor of Philosophy at Murdoch University, p. 182.
- Tapiero, H. & Tew, K.D. (2003). Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. *Biomedicine and pharmacotherapy*, 57, 399-411.
- Thomas, R.S., Rank, D.R., Penn, S.G., Zastrow, G.M., Hayes, K.R. & Pande, K. (2001). Identification of toxicologically predictive gene sets using cDNA microarrays. *Molecular pharmacology*, 60, 1189-1194.
- Turker, M.S. (1999). The establishment and maintenance of DNA methylation patterns in mouse somatic cells. *Seminars in cancer biology*, 9, 329-337.
- Van der Ven, K., De Wit, M., Keil, D., Moens, L., Van Leemput, K., Naudts, B. & De Coen, W. (2005). Development and application of a brain-specific cDNA microarray for effect evaluation of neuro-active pharmaceuticals in zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative biochemistry and physiology*, B141, 408-417.
- van Hal, N.L.W., Vorst, O., van Houwelingen, A.M.M.L., Kok, E.J., Peijnenburg, A., Aharoni, A., van Tunen, A.J. & Keijer, J. (2000). The application of DNA microarrays in gene expression analysis. *Journal of Biotechnology*, 78, 271-280.
- Vatamaniuk, O.K., Bucher, E.A., Ward, J.T. & Rea, P.A. (2001). A new pathway for heavy metal detoxification in animals: phytochelatin synthase is required for cadmium tolerance in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of biological chemistry*, 276, 20817-20820.
- Verloo M.G., Singh S.P. & Tack F.M. (1999). Leaching behaviour of Cd, Cu, Pb and Zn in surface soils derived from dredged sediments. *Environmental Pollution*, 106(1), 107-114.
- Vrana, K.E., Freeman, W.M. & Aschner, M. (2003). Use of microarray technologies in toxicology research. *NeuroToxicology*, 23, 321-332.
- Wang, Y., Jorda, M., Jones, P.L., Maleszka, R., Ling, X., Robertson, H.M., Mizzen, C.A., Peinado, M.A. & Robinson, G.E. (2006). Functional CpG methylation system in a social insect. *Science*, 314(5799), 645-647.
- Waring, J.F., Ciurlionis, R., Jolly, R.A., Heindel, M. & Ulrich R.G. (2001). Microarray analysis of hepatotoxins in vitro reveals a correlation between gene expression profiles and mechanisms of toxicity. *Toxicology letters*, 120, 359-368.

- Watanabe, H., Tatarazako, N., Oda, S., Nishide, H., Uchiyama, I., Morita, M. & Iguchi, T. (2005). Analysis of expressed sequence tags of the water flea *Daphnia magna*. *Genome*, 48, 606-609.
- Watanabe, H., Takahashi, E., Nakamura, Y., Oda, S., Tatarazako, N. & Iguchi, T. (2007). Development of a *Daphnia magna* DNA microarray for evaluating the toxicity of environmental chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26(4), 669-676.
- Waterland, R.A., Lin, J.-R., Smith, C.A. & Jirtle, R.L. (2006). Post-weaning diet affects genomic imprinting at the insulin-like growth factor 2 (Igf2) locus. *Human molecular genetics*, 15, 705-716.
- Wheatly, M.G. (1999). Calcium homeostasis in Crustacea: the evolving role of brancial, renal, digestive and hypodermal epithelia. *Journal of experimental zoology*, 283, 1079-1086.
- Wigler, M., Levy, D. & Perucho, M. (1981). The somatic replication of DNA methylation. *Cell*, 24, 33-40.
- Wilkins, J.F. (2005). Genomic imprinting and methylation: epigenetic canalization and conflict. *Trends in Genetics*, 21, 256-365.
- Williams, T.D., Gensberg, K., Minchin, S.D. & Chipman, J.K. (2003). A cDNA expression array to detect toxic stress response in European flounder (*Platichthys flesus*). *Aquatic Toxicology*, 65, 141-157.
- Yanagisawa, H., Sato, M., Nodera, M. & Wada, O. (2004). Excessive zinc intake elevates systemic blood pressure levels in normotensive rats - potential role of superoxide-induced oxidative stress. *Journal of Hypertension*, 22(3), 543-550.
- Zaffagnini, F. (1987). Reproduction in *Daphnia*. In: Peters, R.H. & de Bernardi, R. (eds.). *Daphnia*. Memorie dell'Istituto Italiano di Idrobiologia, Pallanza, 45, 245-284.

Bijlage 1

De sequenties opgepikt uit het AIMS-protocol.

>1A, 763 bp					
1	11	21	31	41	51
CGGGGCTCGC	CATAGGCCGC	CCTCTGACTT	CCAGTCCTTG	GGTCCTGAGC	CAGGTCCAGG
61	71	81	91	101	111
AAACCCACCC	TCGTACCACT	GCACCCACTC	GTCGATGTCG	GCGTGGTTTC	GCGGCAACCT
121	131	141	151	161	171
CCTCCAAACC	TTTTCGACGA	CCACATTGTT	TGCGAGTTTT	ATGCCGCTTT	CATACCACCC
181	191	201	211	221	231
CTCTGGTCCA	ATCCACTGTT	TTGTGTTCTT	ATCGTAATCC	CAACCCTCGG	GCCATTCCGC
241	251	261	271	281	291
AGAGTCCTGT	GGCCAATTTT	GACCCGTGCT	GTTTTCGTAC	GACTCGACCC	ATTCTGCAAT
301	311	321	331	341	351
GTCCCGCCAA	TTCCTAGGTG	GTTGCAGTAT	TGTGCCCATA	TCGGTGGCAG	GTACCGACTC
361	371	381	391	401	411
GGGGGGCAAC	TTGTTGACAA	TGTCATAGAC	ACTCTCTTCT	AGTTCACCGC	CGTCTTCCTC
421	431	441	451	461	471
TATGAAATCT	GCCATGTCGT	TGGCTGTGTG	TTCGCCTGGC	GGCGTGTAAT	CTTCAAGGGG
481	491	501	511	521	531
AACTTCGGGG	TCCCACTTGC	CCGTGAATAT	AAGGAAAGCC	CTTCCGAACA	GCGCAAGCTG
541	551	561	571	581	591
GTCGTCGGGT	GTCCAGTCGC	ATGCCACCA	CAGCCTCGTC	TCCGCCCAA	ACCGCGCAGA
601	611	621	631	641	651
GCTACCGTCG	CCTACGTGGT	CGATCTGGTA	GTCCTTAACG	AGTGTGTACA	ATGCGAGGTG
661	671	681	691	701	711
CGCCGCGTCT	CTGGCACGCA	CCATCATTTT	CTCAAAC TGG	ACACTTGAAC	CTCCAATCTG
721	731	741	751	761	
GGA CTGACT	TCACCCAGTA	GTT CGAAGTC	GTCGTCGTCC	CCG	

>2A, 620 bp

1	11	21	31	41	51
CGGGGACAAA	GATGCAGAGG	CATCGGACGC	GTGTACATTC	ACTGCCGCAG	AGGACGTGTA
61	71	81	91	101	111
CGCCCGCATT	CGCACGGCCA	TGTTTGAAAA	GGGGCCAAAA	CATTCGCGGG	TTATCGAAGG
121	131	141	151	161	171
CGGGGGGTGT	CGAGAGCCGT	GGATTATAGA	CGACCTAGAA	CGCTATGCCT	GCAAGTGGAA
181	191	201	211	221	231
AATCGAAATC	GACCGCGCCA	CTGACGTCCA	GAACCTACCTG	ATTGAACTAT	ATACGTGGAG
241	251	261	271	281	291
CAAAGATAAG	GCCTCCGCCG	ACATGCCCGC	CCCGCCATGG	CTGAAAGAGA	CTGAAGGCTT
301	311	321	331	341	351
GATCGAATGG	ATAGGGGACT	ATGGCATCAT	GCCATATGAC	ATTACAAACT	TCACCGAGGA
361	371	381	391	401	411
TGTATACCGC	AGGGTCCGTT	ACATCATCTT	CCAGCGGTGC	TCCCTCTCCA	CGCAGGAACA
421	431	441	451	461	471
GCTCGACCAC	GAGGCCCAAT	TGGCCATCTT	CCAGGCGGAG	CAAAGCAAGC	TCACCAACAA
481	491	501	511	521	531
CGCTCGGCGG	TGTATGTAAG	ATCTTTTCTG	TGTTACATCT	AAATGGTCAA	GAAACCACAA
541	551	561	571	581	591
CAGGGGTCTT	ATGGGTCCAT	CGAAGCCGAG	GTCGCCGCCC	TCGAGGCGTT	GGTGTCAAGA
601	611				
GTCAATGGGT	TGACGCCCCG				

Bijlage 2

De sequentie 1A met upstream en downstream sequenties bepaald door genome walking. De oorspronkelijke sequentie bekomen uit het AIMS-protocol werd in *italic* aangeduid en de (gemethyleerde) restrictieplaatsen werden in het zwart (**CCGG**) aangeduid.

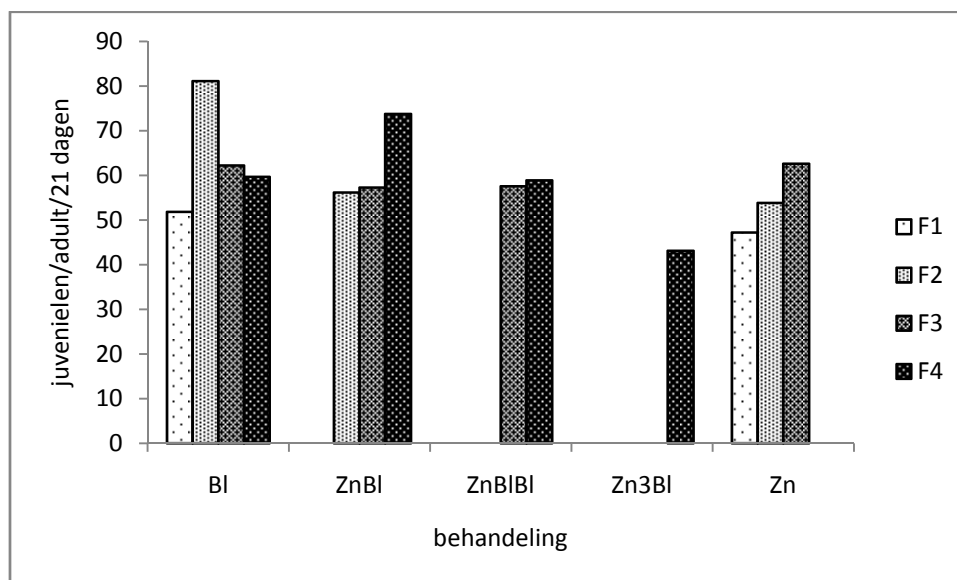
>1A met upstream en downstream sequenties, 1696 bp

1	11	21	31	41	51
CTGGTGACCG	TCAAGGTCCC	CAATCAGAAG	AAGACCTTCA	AGCTGGTCTA	CGACGCTGGC
61	71	81	91	101	111
TCGGAGAACA	GCTACATCGA	CCTAGAAGTG	GCGAATGCAT	GGGGGCTAAT	GGACGGACGT
121	131	141	151	161	171
AAACCATTGG	TCCCTCACAC	GGAGTCCAAC	ACCATCGACT	CTAACGGCAA	CATCCACAAG
181	191	201	211	221	231
AGTATACGCC	TCACCAAGGT	CCCTATCGAC	ATCCTGTGCC	CCGACGGCCA	GTGGCGCCCG
241	251	261	271	281	291
TGCCACGGCG	CTCTGGAGGT	GTGCCTCGAC	CGCAAGGTTA	ACAAACACGG	GCGACTGTTC
301	311	321	331	341	351
GGGGTCAGTC	ATATGCGTAC	ACTGCGGGAC	AGTGTGCGGT	ACGTGGTGGA	CTACCAGGTG
361	371	381	391	401	411
TGTGGGAGAA	AGTAACTGAC	CTGGGGATCA	CTCGGCTGTT	TCGGCCTGGT	CTGTCACGTT
421	431	441	451	461	471
TTTACCTTCT	TCTTGCTTAC	CGAATGCCAC	TGCCCATTTG	AATAAACCCA	ACCGGGTGGC
481	491	501	511	521	531
GCCGTGCCGT	TTGCAATGGC	ACCAGTTGAT	GTAACCCCGT	GCTTGTACCA	CCGTTGCCAC
541	551	561	571	581	591
TCATCCAACC	TTTTCCAATT	AGCCGGCCAT	TCGGCAACTT	CGCACACCCA	ATTTGCGTTA
601	611	621	631	641	651
CAGTGCCACC	CCGG GGCTCG	CCATAGGCCG	CCCTCTGACT	TCCAGTCCTT	GGGTCTTGAG
661	671	681	691	701	711
CCAGGTCCAG	GAAACCCACC	CTCGTACCAC	TGCACCCACT	CGTCGATGTC	GGCGTGGTTT
721	731	741	751	761	771
CGCGGCAACC	TCCTCCAAAC	CTTTTCGACG	ACCACATTGT	TTGCGAGTTT	TATGCCGCTT
781	791	801	811	821	831
TCATACCACC	CCTCTGGTCC	AATCCACTGT	TTTGTGTTCC	TATCGTAATC	CCAACCCTCG
841	851	861	871	881	891

<i>GGCCATTCCG</i>	<i>CAGAGTCCTG</i>	<i>TGGCCAATTT</i>	<i>TGACCCGTGC</i>	<i>TGTTTTCGTA</i>	<i>CRACTCGACC</i>
901	911	921	931	941	951
<i>CATTCTGCAA</i>	<i>TGTCCCGCCA</i>	<i>ATTCCTAGGT</i>	<i>GGTTGCAGTA</i>	<i>TTGTGCCCAT</i>	<i>ATCGGTGGCA</i>
961	971	981	991	1001	1011
<i>GGTACCGACT</i>	<i>CGGGGGGCAA</i>	<i>CTTGTTGACA</i>	<i>ATGTCATAGA</i>	<i>CACTCTCTTC</i>	<i>TAGTTCACCG</i>
1021	1031	1041	1051	1061	1071
<i>CCGTCTTCCT</i>	<i>CTATGAAATC</i>	<i>TGCCATGTCG</i>	<i>TTGGCTGTGT</i>	<i>GTTGCGCTGG</i>	<i>CGGCGTGTA</i>
1081	1091	1101	1111	1121	1131
<i>TCTTCAAGGG</i>	<i>GAACTTCGGG</i>	<i>GTCCCACTTG</i>	<i>CCCGTGAATA</i>	<i>TAAGGAAAGC</i>	<i>CCTTCCGAAC</i>
1141	1151	1161	1171	1181	1191
<i>AGCGCAAGCT</i>	<i>GGTCGTCGGG</i>	<i>TGTCCAGTCG</i>	<i>CATGCCCACC</i>	<i>ACAGCCTCGT</i>	<i>CTCCGCCCAA</i>
1201	1211	1221	1231	1241	1251
<i>AACCGCGCAG</i>	<i>AGCTACCGTC</i>	<i>GCCTACGTGG</i>	<i>TCGATCTGGT</i>	<i>AGTCCTTAAC</i>	<i>GAGTGTGTAC</i>
1261	1271	1281	1291	1301	1311
<i>AATGCGAGGT</i>	<i>GCGCCGCGTC</i>	<i>TCTGGCACGC</i>	<i>ACCATCATTT</i>	<i>TCTCAAAC TG</i>	<i>GACACTTGAA</i>
1321	1331	1341	1351	1361	1371 site2
<i>CCTCCAATCT</i>	<i>GGGACTCGAC</i>	<i>TTCACCCAGT</i>	<i>AGTTCGAAGT</i>	<i>CGTCGTCGTC</i>	<i>CCCGG</i> TGAAC
1381	1391	1401	1411	1421	1431
<i>GCGGCGACGC</i>	<i>ATCTATGTTG</i>	<i>CACCTGCTGG</i>	<i>CTAATTGCTG</i>	<i>AGTAATCCAT</i>	<i>GTTGCTTTTC</i>
1441	1451	1461	1471	1481	1491
<i>ATCTCCTGTA</i>	<i>ATTGAAAGGC</i>	<i>TGTACGGGTA</i>	<i>AACCCCTTGA</i>	<i>TCCAACACAC</i>	<i>CCCCGATACA</i>
1501	1511	1521	1531	1541	1551
<i>AACTCGAAAA</i>	<i>AGTCCTCGTC</i>	<i>GGCTTCCCAT</i>	<i>TCCCATATCT</i>	<i>CAGCCATGGC</i>	<i>AGTTCTGAGT</i>
1561	1571	1581	1591	1601	1611
<i>GCTTGAAGTC</i>	<i>GGGCCCTCCA</i>	<i>TTCCGGGGTT</i>	<i>ACATCGTCCA</i>	<i>TGCTCTCTCC</i>	<i>CGAAAGCGCA</i>
1621	1631	1641	1651	1661	1671
<i>TCCCCGTTGC</i>	<i>ACGTGCACAT</i>	<i>TTCTATTCTC</i>	<i>CACCAGGCCG</i>	<i>ATCCATGTTG</i>	<i>GTCATCTAAA</i>
1681	1691				
<i>CTATCTCTTT</i>	<i>TAGKGG</i>				

Bijlage 3

Reproductie per adult organisme per 21 dagen in de aquaria.



Bijlage 4

Ongekaracteriseerde differentieel tot expressie komende genfragmenten in de verschillende zinkgeneraties.

F1Zn (log ₂ FC)	F2Zn (log ₂ FC)	F3Zn (log ₂ FC)	Acc.nr.	F1Zn (log ₂ FC)	F2Zn (log ₂ FC)	F3Zn (log ₂ FC)	Acc.nr.
0.7521			DW724451		1.0871		DY037414
0.7679			DW724665		0.9274		DY037382
0.8336			DW985530		0.9747		DV075815
0.8408			FD466827		0.8352		FD467129
0.8089			FD466888		0.8541		FD467220
1.3022			FD466915		0.9948		DY037417
0.9187			FD467101		0.8694		DY037396
1.0691			FD466805		1.9658		DY037322
-0.8796			DW724619		1.8425		DY037402
-1.1320			DW724618		1.3859		DW985555
-0.8815			DW724581		1.3374		DW985562
-0.8967			EH669254		-0.8183		FD466288
-1.0154			DW724633		-1.0441		EG565352
-1.3524			FD466824		-0.8290		DW724600
-0.7730			DY037344		-1.1412		EG565355
-1.1015			FD467118		-0.8740		DW724530
-1.1145			DV075807		-0.9710		DW724553
-1.3342			DY037362		-0.8138		FD466404
	1.2207		FD466705		-0.9718		FD466425
	0.7578		DW724459		-1.0004		EG565376
	0.9339		FD466298		-1.0707		DW985475
	0.8240		FD466303		-0.7508		FD482884
	0.9157		DW724499		-1.0089		FD482877
	0.7643		DW985492		-1.6828		DW985508
	2.3384		DW985561		-0.9841		FD466723
	1.2968		FD466771		-0.9470		EH669296
	1.0646		DW985571		-0.8383		EH669314
	2.0285		DW985578		-1.5122		DW724456
	1.5531		DY037343		-0.8580		DW724465
	1.0497		EG565411			1.5026	FD466282
	1.5274		FD467078			1.0952	DW985565
	1.5646		DW985590			-0.9834	DW724577
	0.8480		DW985591			-1.5395	FD466571
	0.9717		DW724425			-0.8515	DW985449
	0.7554		FD466873			-0.8675	FD466674
	1.0877		EH669331			-0.9998	FD466703
	1.7489		EG565389			-0.9162	FD466969
	1.3224		FD466832			-0.7937	FD466803
	1.2367		EG565390			-1.1629	DW985563
	2.8487		DW985570	1.1348	1.6259		EG565360
	0.9528		DW985567	1.0065	0.9681		DW985559
	1.5515		DV075830	1.3461	1.4417		DW985576
	1.4224		DY037400		-1.2774	-0.8162	DW985585
	1.1554		FD467224		2.1260	0.8553	DW724629

F1Zn (log ₂ FC)	F2Zn (log ₂ FC)	F3Zn (log ₂ FC)	Acc.nr.	F1Zn (log ₂ FC)	F2Zn (log ₂ FC)	F3Zn (log ₂ FC)	Acc.nr.
	1.0292		DY037325		1.7561	-1.0093	DW985519
	1.1140		DY037388	-0.8536	0.7700		DW985487
	2.4512	1.0640	FD482900	1.2155	-2.8404		DW985542
	1.1934	1.0686	DW985566	0.7727	-2.2521		DW985546
	1.4240	0.8333	EG565391	1.7862	-3.2440		DW985525
	1.2688	1.0467	FD467003	0.9561	-1.4882		EH669294
	1.9786	0.8273	DW985596	1.7656	-2.9340		DW985617
	0.8875	1.4773	DW985586	1.1195	-2.2648		DW985533
1.4316	-3.0775	2.5502	DW985547	1.3494	-2.6750		DW724497
1.1026	-1.9058	1.2386	FD482938	0.9616	-1.2214		EH669236
1.8729	-3.6356	1.3716	DW724661	0.8739	-1.4767		FD466660
1.3039	-2.5981	0.7502	DW985608	1.5701	-2.4245		DW985511

Bijlage 5

Ongekaracteriseerde differentieel tot expressie komende genfragmenten in de nakomelingenlijn [F1 Zn - F2 ZnBI - F3 ZnBIBI].

F1Zn (log ₂ FC)	F2ZnBI (log ₂ FC)	F3ZnBIBI (log ₂ FC)	Acc.nr.	F1Zn (log ₂ FC)	F2ZnBI (log ₂ FC)	F3ZnBIBI (log ₂ FC)	Acc.nr.
1.5701			DW985511		-0.8725		DW724606
1.3855			DY037404		-0.8171		DW724577
1.3022			FD466915		-0.7959		FD466598
1.0065			DW985559		-0.7733		EG565352
0.8408			FD466827			1.4351	FD482935
0.8089			FD466888			1.7399	FD467003
0.7521			DW724451			1.4117	FD467212
-1.3524			FD466824			1.3290	DW724573
-1.3342			DY037362			0.8529	DW985514
-1.1015			FD467118			0.7960	FD466702
-1.0154			DW724633			0.7589	DW724505
-0.8967			EH669254			-1.3605	DV075822
-0.7730			DY037344			-1.3605	DY037417
	2.5285		DW985519			-1.3144	DY037414
	2.0396		DY037400			-1.2636	DW985563
	1.4840		DW985558			-1.2475	DY037367
	1.4410		DW724629			-1.1960	DV075799
	1.4037		DW985561			-1.1678	EG565411
	1.3663		DV075774			-1.0958	DY037349
	1.2630		DW985578			-1.0782	DY037280
	1.1665		DW985562			-1.0703	DY037343
	1.0911		DY037325			-1.0471	DW985449
	1.0325		FD482889			-0.9478	DV075787
	0.9745		DW724459			-0.8761	DW985555
	0.9702		DW985492			-0.7626	EH669315
	0.9409		DY037419	1.1348	1.2646		EG565360
	0.9074		EG565390	1.3461	1.0977		DW985576
	0.8667		DY037396	-0.8815	-0.8274		DW724581
	0.8555		FD466832	-1.2591	-2.4416		FD467200
	0.8485		FD466639		1.1937	1.0319	FD467078
	0.8472		DY037402	1.2155	-3.2276		DW985542
	0.8408		FD467220	1.3039	-3.2454		DW985608
	0.8273		DW724425	1.7656	-3.5198		DW985617
	0.8196		DY037403	0.9616	-1.1705		EH669236
	0.8187		FD466771	0.8739	-2.2200		FD466660
	0.8090		FD466916	1.3075	-1.5033		DV075836
	0.7944		FD466298	0.7727	-1.9346		DW985546
	-2.6399		DW985508		0.9561	-2.0789	EH669294
	-1.3578		EH669296		1.0964	-1.1321	DW724551
	-1.3384		FD482877		0.7985	-1.3094	DV075830
	-1.1813		DV075828		1.0891	-1.2580	DY037322
	-1.0284		EG565376		2.3021	-1.4088	DV075827
	-0.9693		EH669258		0.9882	-0.8105	DW985570
	-0.9475		EG565355		1.0174	-0.8694	EG565389

F1Zn (log ₂ FC)	F2ZnBI (log ₂ FC)	F3ZnBIBI (log ₂ FC)	Acc.nr.	F1Zn (log ₂ FC)	F2ZnBI (log ₂ FC)	F3ZnBIBI (log ₂ FC)	Acc.nr.
	1.3911	-0.9745	DW985596	-0.8796	0.8894	-1.2651	DW724619
-0.8536	0.7644		DW985487	-1.1320	0.9308	-1.6910	DW724618
-0.8451	0.7728		FD467268	1.1026	-2.1633	1.1459	FD482938
	-1.2308	1.1339	DV075789	1.8729	-4.7420	1.8836	DW724661
	-1.9313	0.7853	DW985620	1.7862	-5.6135	1.4152	DW985525
0.8336		1.1208	DW985530	1.1195	-2.3705	1.2911	DW985533
-1.1145		0.9609	DV075807	1.4316	-3.5927	1.9318	DW985547
-1.1947		0.7513	DV075840	0.9187	-0.8501	1.0518	FD467101

Bijlage 6

Ongekaracteriseerde differentieel tot expressie komende genfragmenten in de nakomelingenlijn [F2 Zn - F3 ZnBI].

F2Zn (log ₂ FC)	F3ZnBI (log ₂ FC)	Acc.nr.	F2Zn (log ₂ FC)	F3ZnBI (log ₂ FC)	Acc.nr.
0.9717		DW724425	-2.9340	1.0088	DW985617
	0.8106	DW724444	-0.9841		FD466723
0.8416		DW724557	-2.2648	1.7066	DW985533
0.7578		DW724459		0.9582	DW985620
	0.8455	DW724561	-0.9470		EH669296
-3.6356	2.2634	DW724661	-2.8404		DW985542
-1.2214		EH669236	-0.8383		EH669314
-0.8183		FD466288	-2.2521		DW985546
-1.0441		EG565352	-3.0775	2.4012	DW985547
	0.7648	DW724585		1.3490	EH669302
	0.8525	DW724669		-1.1927	DW985563
-1.9058	1.4929	FD482938	1.2968		FD466771
-0.8290		DW724600	1.3859		DW985555
0.9339		FD466298	2.4512		DW985558
0.8240		FD466303	2.3384		DW985561
-1.1412		EG565355	0.9681		DW985559
	-0.7653	EH669239	1.3374		DW985562
0.9157		DW724505		0.8252	DW985565
	-0.8141	DW724618	1.1934		DW985566
-0.8740		DW724530	1.0970		DW985570
1.6259		EG565360	2.8487		DW985570
-0.9710		DW724553	0.9528		DW985567
-0.8138		FD466404	1.3224		FD466832
-0.9718		FD466425	1.7489		EG565389
2.1260		DW724629	1.2367		EG565390
	0.9624	FD482949	1.4240		EG565391
	1.1196	FD482951		0.8393	DW985623
0.7700		DW985487	1.0646		DW985571
	-1.1464	DW985449	2.0285		DW985578
0.7643		DW985492	1.4417	1.3034	DW985576
-1.0707		DW985475			
-1.4767		FD466660	0.7554		FD466873
-1.0004		EG565376	1.0877		EH669331
-2.5981	0.9150	DW985608	-1.2774		DW985585
-0.7508		FD482884	0.8875		DW985586
-1.0089		FD482877	1.5646		DW985590
-2.4245	0.8595	DW985511	0.8480		DW985591
1.7561		DW985519	1.9786		DW985596
1.2207		FD466705	1.5669	1.8985	DV075838
	0.8802	EH669313		1.3834	DV075789
	0.8001	FD466713	1.2688	1.6896	DY037258
-3.2440	1.7641	DW985525	1.2688	1.5621	FD467003
-1.4882		EH669294	1.2421		DV075840
	1.7351	DW985530	1.5531		DY037343

F2Zn (log ₂ FC)	F3ZnBI (log ₂ FC)	Acc.nr.	F2Zn (log ₂ FC)	F3ZnBI (log ₂ FC)	Acc.nr.
1.0497		EG565411	3.1000		DV075827
1.5274		FD467078	-0.9994		DV075828
	1.0204	FD467101		1.7882	DV075829
0.8447		FD467268	0.8679		DV075848
0.9747		DV075815	1.5515		DV075830
0.8352		FD467129	0.8541		FD467220
1.0871		DY037414	1.4224		DY037400
0.9274		DY037382	-1.0358		DV075836
1.1140		DY037388	1.9658		DY037322
-2.7018		FD467200	1.8425		DY037402
0.9948		DY037417	1.0292		DY037325
1.1554		FD467224	0.8058		DY037404
0.8694		DY037396			