



# ***Cadmium-geïnduceerde veranderingen in *Schmidtea mediterranea****

***Een vergelijking binnen en tussen blootgestelde generaties***

**Véronique Strauven**

promotor :  
dr. Karen SMEETS

co-promotor :  
Prof. dr. Tom ARTOIS

# Inhoudsopgave

<i>Inhoudsopgave</i> .....	<i>i</i>
<i>Lijst met afkortingen</i> .....	<i>ii</i>
<i>Dankwoord</i> .....	<i>iii</i>
<i>Samenvatting</i> .....	<i>iv</i>
<b>1 Inleiding</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Cadmium</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 <i>Verspreiding en vervuiling in het milieu</i> .....	1
<b>1.2 Cadmiumtoxiciteit</b> .....	<b>1</b>
1.2.2 <i>Cadmiumtoxiciteit bij invertebraten</i> .....	2
1.2.3 <i>Cellulaire effecten</i> .....	2
<b>1.3 Plathyhelminthes</b> .....	<b>5</b>
1.3.1 <i>Het fylum plathyhelminthes</i> .....	6
1.3.2 <i>Schmidtea mediterranea als modelorganisme</i> .....	6
1.3.3 <i>Effecten van Cd op planaria</i> .....	7
<b>1.4 Doelstelling</b> .....	<b>8</b>
<b>2 Materiaal en methoden</b> .....	<b>9</b>
<b>2.1 Testorganismen</b> .....	<b>9</b>
2.1.1 <i>Onderhoud en optimalisatie van de cultuur</i> .....	9
<b>2.2 Experimenten</b> .....	<b>9</b>
2.2.1 <i>Snijden van de organismen</i> .....	10
2.2.2 <i>Bepaling van de cadmium accumulatie</i> .....	10
2.2.3 <i>Bepaling van de genexpressie</i> .....	11
2.2.4 <i>Bepaling van de grootteverandering</i> .....	13
<b>2.3 Statistische analyse</b> .....	<b>14</b>
<b>3 Resultaten</b> .....	<b>15</b>
<b>3.1 Optimalisatie van de cultuur</b> .....	<b>15</b>
<b>3.2 Effecten op niveau van het organisme</b> .....	<b>16</b>
3.2.1 <i>Binnen generaties</i> .....	16
3.3.2 <i>Over generaties</i> .....	17
<b>3.3 Cadmium accumulatie</b> .....	<b>19</b>
<b>3.4 Moleculaire effecten</b> .....	<b>19</b>
3.2.1 <i>Binnen generaties</i> .....	21
3.2.2 <i>Over generaties</i> .....	22
<b>4 Discussie</b> .....	<b>23</b>
<i>Conclusie</i> .....	<b>27</b>
<i>Referenties</i> .....	<b>28</b>
<i>Bijlage</i> .....	<b>31</b>

## Lijst met afkortingen

<i>Bcl-2</i>	Gen van b-cell lymphoma 2
<i>CaMK</i>	Gen van Ca <sup>2+</sup> /calmodulin-afhankelijk proteïne kinase
<i>CCOS4</i>	Gen van cytochroom C oxidase subeenheid IV
<i>Cd</i>	Cadmium
<i>CdCl<sub>2</sub></i>	Cadmium chloride
<i>CK2a</i>	Gen van caseïne kinase II subeenheid alfa
<i>Cys</i>	Gen van cysteïne
<i>Cyt C</i>	Gen van cytochroom C
<i>Erk 1/2</i>	Gen van extracellulair signaal-gerelateerde kinasen 1 en 2
<i>Gapdh</i>	Gen van glyceraldehyde 3-fosfaat dehydrogenase
<i>GM2-AP</i>	Gen van ganglioside GM2-activator proteïne
<i>GPx</i>	Gen van glutathion peroxidase
<i>HSP70</i>	Gen van heat shock proteïne 70
<i>JNK</i>	Gen van jun N-terminal kinase
<i>Lox</i>	Gen van lipoxygenase
<i>Mapk p38</i>	Gen van mitogeen geactiveerd proteïne kinases p38
<i>Msh2</i>	Gen van mutS homolog 2
<i>Nf-κB</i>	Gen van nucleaire factor κB
<i>NOS</i>	Gen van stikstof oxide synthetase (nitric oxide synthase)
<i>p53</i>	Gen van proteïne 53 of tumor proteïne 53
<i>Pi3K</i>	Gen van fosfatidylinositol 3-kinases
<i>PKC</i>	Gen van proteïne kinase C
<i>PTEN</i>	Gen van fosfatase en tensin homolog
<i>Smedwi</i>	Gen van <i>Schmidtea mediterranea</i> PIWI proteïne
<i>SOD</i>	Gen van super oxide dismutase
<i>Wntp3</i>	Gen van wingles Int p3

## Dankwoord

Nu het einde van de stage en het schooljaar wel heel dichtbij komen, zijn er toch nog een aantal mensen die ik zou willen bedanken. Eerst en vooral wil ik prof. dr. Tom Artois en Karen Smeets bedanken om mij de mogelijkheid te geven om deel te uit te maken van dit onderzoek. Karen zou ik ook nog willen bedanken omdat ik bij haar altijd terecht kon als er iets scheelde en mij altijd gerust wist te stellen als er iets mis ging. Bovendien had je ook altijd wijze antwoorden klaar voor mijn soms domme vragen.

Vervolgens zou ik graag mijn begeleider, Olivier, willen bedanken. Jouw aanstekelijke enthousiasme over platwormen, zorgde ervoor dat het onderwerp mij bleef boeien. Zoveel zelfs dat ik het onderwerp na mijn juniorstage, ook voor mijn seniorstage koos. Verder wil ik je ook nog bedanken om mij altijd voort te helpen in het labo in tijden van nood.

Graag wil ik ook nog de mensen bedanken die mij in het labo vaak goed vooruitgeholpen hebben, waaronder Natasha en Dirk. Of het nu ging om een bepaald product te zoeken of het helpen bij experimenten, jullie stonden altijd klaar voor mij. Heel hartelijk bedankt voor de goede hulp die mij vaak veel tijd bespaard heeft.

Dan zijn er natuurlijk nog mijn medestudenten die een speciaal bedankje verdienen. Ik zal altijd met een goed gevoel terugdenken aan de toffe tijden die we samen beleefd hebben. Niet alleen op het labo maar ook tijdens de hele studie en de weekendjes niet te vergeten. Zonder jullie zou het nooit zo fijn geweest zijn.

Natuurlijk wil ik ook nog mijn mama en mijn zus bedanken om mij altijd te steunen, zelfs in de moeilijke en stresserende periodes (waaronder deze periode). Jullie stonden altijd voor mij klaar en zonder jullie zou ik nooit zover geraakt zijn.

## Samenvatting

Cadmium (Cd) is een toxisch metaal dat wijdverspreid in het milieu voorkomt. Dit zware metaal kan schade aanrichten in tal van organismen op verschillende niveaus. De schade die Cd veroorzaakt, is vooral het gevolg van zijn effecten op het cellulaire en moleculaire niveau. Hoewel het begrip Cd-toxiciteit alom bekend is, heerst er nog steeds een groot onbegrip over deze onderliggende mechanismen, zeker wat betreft generatie-effecten. Daarom wordt in deze studie een onderzoek verricht naar Cd-geïnduceerde veranderingen op verschillende niveaus, waarin men ook aandacht besteed aan de effecten van Cd over verschillende generaties. Als testorganisme wordt de platworm, *S. mediterranea*, gebruikt. Omwille van zijn enorme regeneratiecapaciteit wordt dit modelorganisme frequent gebruikt in regeneratie- en stamcelonderzoek, maar ook in moleculaire studies. Het unieke aan deze studie is dat hetzelfde organisme zowel binnen als over verschillende generaties heen kan worden gevolgd, waardoor een accumulatie van effecten bestudeerd kan worden. In de eerste fase van het onderzoek werd een optimalisatie van de voeding van de kweek uitgevoerd, waaruit bleek dat lever de beste voeding voor de organismen vormt. Vervolgens werd het effect van Cd op verschillende niveaus nagegaan. Op het niveau van het organisme werd de invloed van Cd op de grootte van de organismen onderzocht. Uit deze resultaten bleek dat Cd een daling van de procentuele grootteverandering induceert. Vervolgens werd op het cellulaire niveau nagegaan of bovenstaande effecten te wijten waren aan een verhoogde interne Cd concentratie. De resultaten van dit accumulatie-experiment geven aan dat de organismen meer Cd zullen opnemen naarmate de concentratie stijgt en dat ze ook meer Cd zullen accumuleren naarmate de organismen langer worden blootgesteld. Uiteindelijk werd het effect van Cd op het moleculaire niveau nagegaan door de invloed van Cd op de genexpressie te onderzoeken. Uit deze resultaten kan afgeleid worden dat er binnen generaties een significante daling van *Smedwi*, een gen betrokken bij de regeneratie van de organismen, plaatsvindt, wat overeenkomt met de resultaten van de bepaling van de verandering in grootte onder invloed van cadmium. Verder waren weinig andere effecten van de genexpressie waar te nemen. In de toekomst dient men meer experimenten uit te voeren op verschillende niveaus om een completer beeld te vormen van de onderliggende mechanismen van Cd-geïnduceerde schade en de werking van deze mechanismen over verschillende generaties.

# 1 Inleiding

## 1.1 Cadmium

Een groot deel van de zware metalen vormen een belangrijke en toenemende klasse van carcinogenen die in heel de atmosfeer verspreid worden. Hoewel het chemisch gezien simpele moleculen zijn, zijn hun actiemechanismen complex en nog niet volledig achterhaald. Cadmium vormt één van deze veel voorkomende toxische metalen.

### 1.1.1 Verspreiding en vervuiling in het milieu

Cadmium (Cd) werd in 1817 ontdekt door de Duitse wetenschapper, Friedrich Stromeyer. Het is een niet-essentieel element, wat betekent dat het niet gebruikt wordt in biologische processen die nodig zijn om het leven te onderhouden [1]. Cadmium kan zowel op natuurlijke wijze als door middel van antropogene activiteiten in het milieu terecht komen. Aangezien Cd slechts in lage concentraties (0.2 mg/kg) in de aardkorst voorkomt, is de verspreiding van dit toxische metaal op natuurlijke wijze maar gering. Een deel komt via de verwerking van rotsen in rivieren en via bosbranden en vulkaanuitbarstingen in de lucht terecht. Vooral antropogene activiteiten dragen bij aan de verspreiding van Cd in het milieu. Sinds zijn ontdekking werden veel industriële toepassingen gevonden voor dit metaal, waardoor een stijging van het gebruik van Cd plaatsvond op het einde van de 19<sup>e</sup> eeuw en het begin van de 20<sup>e</sup> eeuw. De historische non-ferro industrie heeft een belangrijke bijdrage geleverd aan de verspreiding van het metaal. Cadmium komt namelijk niet in zuivere vorm voor, maar bevindt zich vaak in ertsen van zink (Zn), koper (Cu) en lood (Pb). Als men deze metalen (Zn, Cu en Pb) uit de ertsen wilt extraheren door middel van verhitting, komt hierbij Cd vrij [1-3]. Ook via de landbouw zal dit toxische metaal verspreid worden in het milieu aangezien fosfaatmeststoffen en pesticiden vaak aanzienlijke hoeveelheden Cd bevatten [4]. Tegenwoordig komt Cd nog steeds in het milieu terecht door de verbranding van fossiele brandstoffen en roken. Bovendien wordt dit schadelijke metaal omwille van zijn unieke eigenschappen, zoals een uitstekende weerstand tegen corrosie en hoge elektrische en thermale conductiviteit, nog steeds gebruikt als pigment, stabilisator en deklaag. De voornaamste hedendaagse toepassing van dit metaal ligt echter in herlaadbare nikkel-cadmiumbatterijen [1-2].

## 1.2 Cadmiumtoxiciteit

Cadmium komt wijdverspreid in het milieu voor in zowel bodem, lucht als water. Bijgevolg zullen organismen in compartimenten van het ecosysteem last ondervinden van een

verhoogde blootstelling aan dit metaal. Het is een toxische stof die verschillende fysiologische en biologische processen bij zowel plant, dier als mens verstoort. Het metaal kan ernstige schade veroorzaken in zelfs relatief lage concentraties. Bovendien kan Cd, omdat het moeilijk te verwijderen is uit zowel het lichaam als uit het milieu, bioaccumuleren in organismen en ecosystemen. Cadmium toxiciteit vormt nog steeds een belangrijk probleem en wordt daarom in verschillende modelorganismen onderzocht. Invertebraten (= ongewervelden) vormen een populaire groep van modelorganismen voor dit onderzoek.

### 1.2.2 Cadmiumtoxiciteit bij invertebraten

Invertebraten worden wel vaker als modelorganisme gekozen. Één van de bekendste ongewervelde modelorganismen is de fruitvlieg, *Drosophila melanogaster*, bekend om zijn vele observeerbare mutaties. Andere typische modelorganismen zijn de rondworm, *Caenorhabditis elegans*, vooral gebruikt om ontwikkeling en fysiologie te bestuderen, en organismen die behoren tot het geslacht Hydra, die gebruikt worden om processen van regeneratie en morphogenese te onderzoeken.

Studies op *C. elegans* tonen onder andere aan dat, organismen blootgesteld aan cadmiumchloride ( $\text{CdCl}_2$ ), een verminderde groei en voortplanting ondervinden. Dit is mogelijk te wijten aan het feit dat Cd de opname en het metabolisme van nutriënten verhindert, die essentieel zijn voor de groei en voortplanting van deze organismen. Verder wordt ook bewezen dat het organisme zeer tolerant is tegen Cd [5-6]. In *D. melanogaster* kan Cd, toegediend onder de vorm van  $\text{CdCl}_2$ , zorgen voor een daling van het mitochondriale DNA en de enzymactiviteit. Het zal ook een effect hebben op de voortplanting en ontwikkeling door het leggen van eitjes en verschillende ontwikkelingsstadia te vertragen [7]. Verschillende Hydra soorten ondervinden morfologische veranderingen ten gevolge van de blootstelling aan Cd. De veranderingen beginnen aan het uiteinde van de tentakels onder de vorm van verkorting en vervorming van de tentakels. In het lichaam wordt de osmoregulatie aangetast, wat zorgt voor zwelling en uiteindelijk dood en desintegratie van het organisme [8].

### 1.2.3 Cellulaire effecten

De schade die Cd veroorzaakt, is vooral het gevolg van zijn effecten op cellulair niveau. De mechanismen die verantwoordelijk zijn voor Cd-geïnduceerde toxiciteit zijn multifactorieel. Zo kan Cd op cellulair niveau onder andere oxidatieve stress veroorzaken en de functie van essentiële proteïnen verstoren.

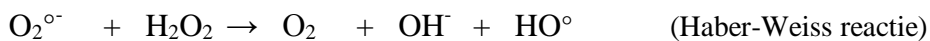


- Oxidatieve stress

Oxidatieve stress is een verstoring van de redoxbalans in het voordeel van pro-oxidanten (ROS, reactive oxygen species). In normale omstandigheden vindt in de cel een evenwicht plaats tussen de pro- en anti-oxidanten, maar een (externe) stressfactor, zoals Cd, kan ervoor zorgen dat deze balans verstoord wordt.

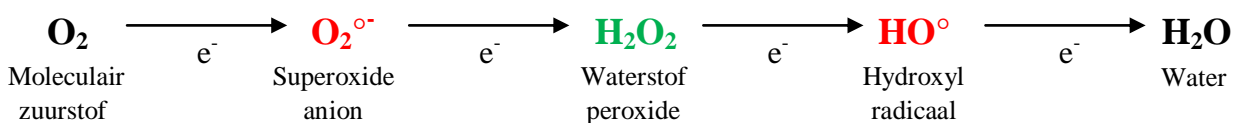
Reactieve zuurstofsoorten

ROS zijn reactieve moleculen die een zuurstof atoom bevatten. Door middel van elektronenoverdracht kunnen verschillende ROS gevormd worden (Figuur 1). Tot deze groep van moleculen behoren zowel vrije radicalen als niet-radicalen. Radicalen zijn moleculen die ongepaarde elektronen bevatten en zijn omwille van deze eigenschap uitermate reactief. Superoxide anionen ( $O_2^{\circ-}$ ) en hydroxyl radicalen ( $HO^{\circ}$ ) behoren tot deze groep. Tot de groep van niet-radicalen behoort onder andere waterstofperoxide ( $H_2O_2$ ) [9]. ROS kunnen gevormd worden via transitie-metalen, zoals bijvoorbeeld Fe, door middel van de volgende reacties:



Tijdens deze reacties komen zeer reactieve hydroxylradicalen vrij in biologische systemen [10].

De mitochondriale elektronentransportketen is één van de belangrijkste bronnen van ROS. Langs deze keten vindt oxidatieve fosforylatie plaats, waarbij de univalente reductie van zuurstof naar water plaatsvindt. Hierbij kunnen echter elektronen naar zuurstof lekken, wat zorgt voor de vorming van  $O_2^{\circ-}$ . ROS zijn dus een natuurlijk bijproduct van het normale cellulaire metabolisme en hoewel ze vooral bekend zijn omwille van hun schadelijke gevolgen, vervullen deze moleculen toch enkele belangrijke rollen. Zo zijn ze betrokken bij de verdediging tegen pathogenen (“oxidative burst”) en spelen ze een cruciale rol in cel signalisatie van essentiële processen zoals de celcyclus, celproliferatie en differentiatie, DNA herstel en apoptose, via bepaalde pathways zoals de Mapk-pathway (mitogen activated protein kinases), waartoe Mapk p38, Erk1/2 en JNK behoren [9, 11-12].



**Figuur 1:** Univalente reductie van  $O_2$  naar  $H_2O$ . Moleculen die in het rood weergegeven zijn, stellen radicalen voor, degene in het groen, niet radicalen. ( $e^-$  = elektron).

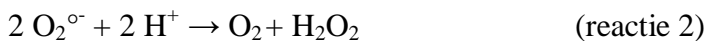
### Antioxidatief systeem

De cel kan zich op 2 manieren verdedigen tegen de schadelijke effecten van ROS. Enerzijds bezitten cellen antioxidatieve enzymen, zoals catalase (CAT), superoxidedismutase (SOD) en glutathion peroxidase (GPx), anderzijds kunnen ze rekenen op metabolieten, zoals glutathion en ascorbaat, om zich te beschermen tegen ROS.

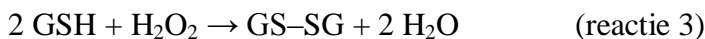
CAT komt vooral voor in de peroxisomen en in mindere mate in de mitochondriën van aërobe cellen. Dit enzym zal zorgen voor de afbraak van H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (reactie 1) [13, 15].



SOD's zorgen voor de omzetting van superoxide naar waterstofperoxide en zuurstof (reactie 2). Deze enzymen kunnen voorkomen in het cytosol, de mitochondriën en zelfs extracellulair [14-15].



GPx is een enzyme dat H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> omzet tot water door glutathion als cofactor te gebruiken (reactie 3). Het komt zowel in het cytoplasma als extracellulair voor [14-15].



Zware metalen vertonen vaak een hoge affiniteit voor sulfhydrylgroepen (= thiolgroepen). Omwille van deze eigenschap zullen metabolieten die rijk zijn aan sulfhydrylgroepen, zoals glutathion, deze metalen makkelijk kunnen binden en de cel op deze manier beschermen tegen de schadelijke effecten ervan [16]. Glutathion biedt eveneens een belangrijke beschermende rol tegen oxidatieve stress aangezien het niet alleen gebruikt wordt als cofactor van anti-oxidatieve enzymen, zoals glutathion peroxidase, maar het ook in staat is om rechtstreeks hydroxyl radicalen weg te vangen [15]. Glutathion komt veelvuldig voor in het cytosol, nuclei en mitochondria [11]. De cel kan zich ook nog beschermen tegen stress met behulp van algemene stressproteïnen, zoals heat shock proteïnen (HSP60 en 70) [17].

### Oxidatieve stress ten gevolge van Cd

Aangezien Cd een niet redox-actief element is, zal het vooral op een indirecte manier zorgen voor oxidatieve stress. Zo zal Cd onder andere zorgen voor een verhoging van ROS, cellulaire enzymen verstoren en nadelige effecten hebben op het antioxidatieve systeem en de thiolstatus. De mitochondriën zijn vaak één van de meest aangevallen intracellulaire doelwitten van verschillende stressoren, waaronder ook Cd. Het metaal kan de mitochondriale elektronentransportketen blokkeren. Bijgevolg wordt de oxidatieve fosforylatie geïnhibeerd

wat, door het lekken van elektronen, een verhoging van ROS in de cel tot gevolg zal hebben [18]. Naast het feit dat Cd kan zorgen voor een verhoging van ROS, is het metaal ook betrokken bij het verstoren van (antioxydatieve) enzymen. Als gevolg van zijn gelijkheid met elementen zoals Zn, calcium (Ca) en magnesium (Mg), op het gebied van chemische eigenschappen en lading, kan Cd deze elementen vervangen in verschillende biologische systemen. Dit kan leiden tot de verstoring van enzymfuncties, wat zal zorgen voor een verlaagde activiteit van verschillende anti-oxidatieve proteïnen, zoals catalase, SOD en glutathion reductase [19-20]. Glutathion en andere sulfhydrylgroepen, gebonden aan proteïnen, zullen ook beïnvloed worden door Cd. Het metaal zal namelijk een uitputting van glutathion veroorzaken, wat op zijn beurt zal resulteren in een verhoogde ROS-productie [16].

De inductie van oxidatieve stress kan schade veroorzaken aan verschillende cellulaire componenten zoals DNA, lipiden en proteïnen. ROS veroorzaken onder andere enkelstrengige breuken in het DNA en chromosomale afwijkingen [16]. Schade aan het DNA kan leiden tot celcyclus arrest, mutagenese, instabiliteit van het genoom, kanker en apoptose (celdood) [19]. ROS kan de structuur van proteïnen verstoren door de zijketens van aminozuren residuen van proteïnen aan te vallen. Bij de oxidatie van proteïnen kunnen zowel stabiele als reactieve producten gevormd worden. Deze reactieve producten kunnen opnieuw radicalen vormen [10]. Oxidatieve stress zal ook effect hebben op andere cellulaire componenten, zoals de polyonverzadigde vetzuren van fosfolipiden, die heel gevoelig zijn voor oxidatie [11]. Vrije radicalen vernietigen de dubbele bindingen tussen membraanlipiden en resulteren in een verhoging van lipide peroxidatie [16]. Op deze manier zal de lipide samenstelling en bijgevolg ook de cellulaire functies van celmembranen veranderd worden [19].

### 1.3 Platyhelminthes

Hoewel er massa's literatuur bestaat over de vele aspecten van Cd toxiciteit in de mens en verschillende modelorganismen, zijn de onderliggende moleculaire mechanismen die deze nadelige effecten veroorzaken nog niet helemaal achterhaald. Om een meer compleet beeld te vormen van de schadelijke gevolgen van Cd is het nodig om naast de traditionele modelorganismen zoals *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *D. melanogaster*, *C. elegans*,... ook andere groepen van organismen te onderzoeken. De Platyhelminthes (afkomstig uit het Grieks "platy", wat plat betekent en "helminth", wat worm betekent) vormen een fyllum van bilaterale, ongewervelde dieren en zijn één van deze groepen. Ze behoren tot het rijk van de metazoa en vormen de vierde meest diverse groep van dit rijk. Ook komen ze in een grote

variëteit aan habitats voor, zoals zout en zoet water (zowel stilstaand als stromend water), in en op vochtige bodems, onder houtblokken,... Daarom is deze groep van organisme uitermate geschikt om (eco)toxicologische studies op uit te voeren. Ondanks hun enorme biodiversiteit, is deze groep echter een relatief nieuwe groep om de effecten van zware metalen te onderzoeken [21-22, 32].

### 1.3.1 Het fylum platyhelminthes

Platwormen zijn bilateraal symmetrische organismen, met een duidelijk te onderscheiden voor- en achterkant. Het zijn triploblastische organismen, waarbij het mesoderm (parenchym, mesenchym) een compact weefsel vormt tussen de endodermale weefsels (gastrodermis) en ectodermale weefsels (epidermis). Platwormen zijn (secundair) acoelomaat, een coeloomholte ontbreekt volledig. Ook een ademhalings- en bloedvatenstelsel ontbreekt. Gasuitwisseling gebeurt over de gehele lichaamsoppervlakte, wat een afplating van het lichaam tot gevolg heeft bij de grotere soorten om de diffusieafstand te verminderen. Het excretiestelsel wordt gevormd door een paar protonephridia. Het spijsverteringstelsel eindigt blind. Op enkele uitzonderingen na (soorten van *Schistosoma*) zijn alle platwormen hermafrodit. Hoewel relatief uitzonderlijk, staan enkele groepen bekend om het feit dat zij zich makkelijk ongeslachtelijk kunnen voortplanten. De meest bekende groepen die zich door fissie kunnen voortplanten zijn de Catenulida en de Tricladida, de groep waar *Schmidtea mediterranea* toe behoort. Waar voeger de Platyhelminthes onderverdeeld werden in vier groepen: Acoela, Nemertodermatida, Catenulida en Rhabditophora heeft recent moleculair onderzoek aangetoond dat de eerste twee groepen niet tot de platwormen behoren. Met Platyhelminthes bedoelt men nu dus enkel de Catenulida en Rhabditophora. De Tricladida behoren tot de Rhabditophora [23-27].

### 1.3.2 *Schmidtea mediterranea* als modelorganisme

Het is al bewezen dat bepaalde soorten van platwormen, zoals *S. mediterranea* en vooral *Macrostomum lignano*, een bepaalde tolerantie vertonen tegen Cd-geïnduceerde stress. Dit maakt deze organismen geschikt om de schadelijke effecten van Cd te onderzoeken.

*S. mediterranea* is een vrijlevende zoetwater platworm (planaria) die vooral voorkomt in landen rond de Middellandse Zee. Dit organisme biedt vele voordelen. Ze zijn niet alleen gemakkelijk te kweken onder laboratoriumomstandigheden, maar zijn ook uitermate geschikt om moleculaire studies op uit te voeren aangezien ze een relatief klein genoom hebben (dat

volledig gekend is), genetisch gemakkelijk te manipuleren zijn, zich asexueel kunnen voortplanten en over een immense regeneratieve capaciteit beschikken. Het organisme kan zelfs tot 1/279<sup>ste</sup> deel van zijn lichaam laten uitgroeien tot een nieuw individu. Dit unieke kenmerk biedt veel voordelen ten opzichte van andere traditionele modelorganismen zoals *C. elegans* en *D. melanogaster*. Processen zoals regeneratie, de werking van somatische stamcellen en weefselhomeostase kunnen beter in planaria bestudeerd worden [28-31].

Het organisme heeft zijn regeneratie te danken aan een populatie van totipotente, somatische stamcellen, ook wel neoblasten genoemd, die verdeeld zijn over het hele lichaam. Neoblasten zijn de enige delende cellen van deze planaria en ze kunnen 30-40 verschillende celtypes voortbrengen. Bij intacte organismen worden de neoblasten, verdeeld over het parenchym (mesenchym), gebruikt om cellen te vervangen tijdens weefselvernieuwing. Daarentegen als het organisme gesneden wordt of gewond raakt, zullen de neoblasten ingeschakeld worden voor de regeneratie van de ontbrekende structuren [25, 31-32].

### 1.3.3 Effecten van Cd op planaria

Over de effecten van Cd op *S. mediterranea* is nog maar relatief weinig bekend. Maar onderzoek op andere planaria heeft al een beeld gegeven van de toxische effecten van Cd op deze organismen. Zo hebben studies op *Dugesia dorocephala* een aantal neurotoxische effecten van Cd blootgelegd. Bij blootstelling aan verschillende concentraties van cadmium sulfaat (CdSO<sub>4</sub>) veroorzaakte het metaal namelijk neurologische en bewegingsstoornissen die verergerden naargelang de concentratie steeg [33]. Een gelijkaardig resultaat werd bekomen in een studie op *Dugesia etrusca* [34]. Een andere studie op *Polycelis felina* toonde dan weer aan dat CdSO<sub>4</sub> op een dosis afhankelijke manier zorgde voor de daling van de mitotische activiteit van de neoblasten. Dit ging gepaard met mitotische en chromosomale afwijkingen. Hieruit kan afgeleid worden dat Cd de regeneratie en dus ook de voortplanting verstoort [35]. In een aantal studies werd aangetoond dat Cd ook verantwoordelijk kan zijn voor de ontwikkeling van tumoren in planaria. Aangezien Cd voornamelijk een effect heeft op de mitotisch actieve cellen, de neoblasten, zullen de gevormde tumoren vooral afkomstig zijn van deze cellen [35-37].

In eerder onderzoek op *S. mediterranea* is al aangetoond dat Cd de asexuele voortplanting (fissie) kan verstoren. Dit werd aangetoond door middel van een splitsingsexperiment, waarbij de splitsing van de organismen onder verschillende concentraties van CdCl<sub>2</sub> werd nagegaan. Het effect was meer uitgesproken naargelang de concentratie steeg.

#### 1.4 Doelstelling

In deze studie wordt nagegaan welke veranderingen Cd zal induceren in het organisme *S. mediterranea*. Deze veranderingen worden zowel binnen als over generaties gevolgd. De organismen die binnen een generatie worden gevolgd, worden alleen in het begin van het experiment gesneden waarna effecten bestudeerd worden na 1, 2 en 3 weken blootstelling. De organismen die over generaties gevolgd worden, worden na 3 weken opnieuw gesneden, aangezien dit de tijd is waarover één generatie loopt. Het generatie effect wordt over twee generaties gevolgd. Op deze manier kan een accumulatie van effecten worden waargenomen, alsook het effect op regeneratie bestudeerd worden. Dankzij deze enorme regeneratiecapaciteit kunnen tijdens de experimenten dezelfde organismen gevolgd worden. Dit vormt een groot voordeel aangezien de effecten op hetzelfde organisme over verschillende generaties heen waargenomen kunnen worden.

In deze studie worden een aantal doelen gesteld om Cd-geïnduceerde veranderingen in *S. mediterranea* zowel binnen als over generaties te onderzoeken. Er wordt gestart met een optimalisatie-experiment van de kweek aangezien een goede kweek de basis vormt van het opzet van alle experimenten. Vervolgens zal het effect van Cd op verschillende niveaus worden onderzocht. Het effect van Cd op de grootteverandering van de organismen nagaan, vormt een eerste doel in deze studie. Een volgend doel bestaat uit het nagaan van de Cd-opname en Cd-accumulatie in de organismen. In een laatste doel zal men trachten de onderliggende mechanismen van Cd-geïnduceerde schade te achterhalen door op het moleculair niveau te gaan kijken. Hierbij wordt de invloed van dit zware metaal op de genexpressie onderzocht, waarbij verschillende groepen van stressgerelateerde genen worden getest, zoals genen betrokken bij oxidatieve stress (Cyt C, GPx, Lox en SOD), signaaltransductie genen (Erk1/2, JNK, Mapkp38, NOS en PKC), algemene stressgenen (HSP70) en tumorsupressorgenen (p53 en PTEN). Verder worden ook nog genen getest, die betrokken zijn bij de regeling van stamcellen (Smedwi) en regeneratie (Wntp3).

## 2 Materiaal en methoden

### 2.1 Testorganismen

Voor deze studie werd een diploïde, aseksuele stam van *S. mediterranea*, oorspronkelijk afkomstig van Barcelona, Spanje (labo van Emili Saló), gebruikt. De organismen vormen een pool van genetisch identieke organismen, aangezien ze oorspronkelijk afkomstig zijn van hetzelfde organisme.

#### 2.1.1 Onderhoud en optimalisatie van de cultuur

De organismen werden in medium, bestaande uit Bidi (dubbel gedistilleerd water) verrijkt met 1.6 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM KCl en 1.2 mM NaHCO<sub>3</sub>, bewaard. Ze werden bij een temperatuur van 20°C bewaard in glazen bakken en in het donker gehouden. Minstens één maal per week kregen ze eten, waarna ze overgebracht werden in vers medium.

Tijdens deze studie werd nagegaan welk soort eten, kalfslever of biefstuk, de meest geschikte voedingsbron voor de organismen was. Een eerste groep werd gevoed met kalfslever terwijl een tweede groep biefstuk kreeg. Binnen elke groep werden tien organismen bestudeerd. De organismen werden bij de start van het experiment gesneden. Vervolgens werden van elk (half) organisme drie foto's genomen met behulp van een 'Nikon Coolpix 5400' (Nikon Inc.; Melville, V.S.), bevestigd op een binoculair (SMZ8000, Nikon; Melville, V.S.). Na drie weken werden van elk individu opnieuw drie foto's genomen om zo de verandering in grootte te bestuderen.

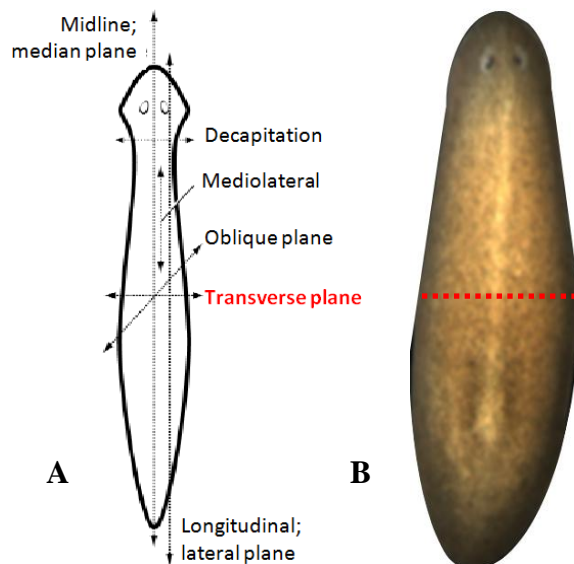
### 2.2 Experimenten

De organismen die gebruikt werden tijdens een experiment, kregen één maal per week eten. Na elke voederbeurt werden de organismen overgezet in vers medium. Één week voor de staalname werden de organismen niet meer gevoederd. In deze studie werden de organismen blootgesteld aan verschillende sublethale concentraties van CdCl<sub>2</sub> (Merck; Darmstadt, Duitsland), namelijk 2.5 µM en 5 µM. De groep organismen die niet blootgesteld werd, vormde in alle experimenten de controlegroep.

Tijdens de experimenten werden wormen zowel binnen als over generaties gevolgd. Bij binnen generaties werden om de week stalen genomen. Als een experiment over verschillende generaties liep werden de organismen na 3 weken, de tijd genomen voor één generatie, opnieuw gesneden. Vervolgens diende het ene deel (kop of staart) voor staalname en het andere deel gaf het ontstaan aan een volgende generatie. Voor het snijden werden alleen niet-gesplitste organismen gebruikt.

### 2.2.1 Snijden van de organismen

Het snijden vond plaats met behulp van een microscoop (SMZ645, Nikon; Melville, V.S.). De organismen werden samen met een beperkte hoeveelheid vloeistof overgebracht op een dekglasje. Hierop werden ze onder de microscoop transversaal in twee gesneden met een scheermesje, zodat een voor- en achterkant (kop en staart) bekomen werd (figuur 2).



**Figuur 2:** schematische (A) en realistische (B) weergave van snijmethode.

### 2.2.2 Bepaling van de cadmium accumulatie

Het doel van dit experiment bestond erin na te gaan of de gebruikte organismen wel effectief Cd opnemen en hoeveel ze opnemen onder invloed van verschillende concentraties. Dit gebeurde met behulp van ICP-OES (inductive coupled plasma – optical emission spectrometry).

Voor dit experiment werden de organismen blootgesteld aan 2.5, 10 of 25  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  in een petrischaal. Er werden tien pas gesneden wormen per concentratie gebruikt. Na 2 of 21 dagen werden stalen genomen. Dit gebeurde op de volgende manier: eerst werden de organismen uit het petrischaaltje twee maal overgezet naar een nieuw petrischaaltje met vers medium om de



organismen te wassen en af te spoelen. Vervolgens werden tien organismen één voor één overgebracht op een stukje aluminiumfolie (5x5 mm), vooraf gekoeld in vloeibare stikstof, met behulp van een tandenstoker en pasteurpipetten. Nadat de overtollige vloeistof was weggehaald, werden alle stukjes aluminiumfolie in een welletje van een zes wellplaat geplaatst, die vervolgens in een oven geplaatst werd gedurende 24 tot 48 uur op een temperatuur van 60°C om de stalen te drogen. Voor de analyse werd het gewicht van de stalen bepaald met behulp van een microbalans (0,001 mg). Nadat het gewicht bepaald werd, ondergingen de wormen een zuurextractie. Dit hield de metalen in oplossing en voorkwam dat deze zouden neerslaan. Vervolgens werd 12 ml van het staal in een ICP-OES-toestel gebracht. Met behulp van een standaardcurve kon de concentratie van Cd in het staal bepaald worden. Doordat het gewicht van de wormen op voorhand bekend was, kon de concentratie van Cd in het staal berekend worden.

### 2.2.3 Bepaling van de genexpressie

In dit experiment werden de effecten van de verschillende concentraties CdCl<sub>2</sub> op moleculair niveau getest aan de hand van de genexpressie. Er werd gebruik gemaakt van real-time PCR (Real-Time Polymerase Chain Reaction) om de expressie van verschillende genen te bepalen. Hiervoor werden een aantal stappen uitgevoerd zoals RNA extractie en reverse transcriptie die over verschillende dagen werden uitgevoerd.

Tijdens dit experiment werden de organismen blootgesteld aan 2.5 of 5 µM CdCl<sub>2</sub> in zes well platen. Per concentratie werden voor elk tijdstip zeven organismen, voor binnen generatie-experiment, en acht organismen, voor over generatie-experiment, gesneden. Voor de organismen blootgesteld werden, werden ze eerst gedurende een half uur terug in medium geplaatst om de wonden laten dicht te groeien. Dit experiment werd zowel binnen als over generaties gevolgd. Bij beide opzetten stelde tijdstip 0 de staalname voor de blootstelling voor. Door stalen te nemen vlak voor de blootstelling werd een dubbele controle in het experiment ingebouwd, wat een extra voordeel biedt. Voor een experiment dat liep binnen een generatie werden om de week stalen genomen. Er werden op vier tijdstippen stalen genomen, namelijk vlak voor de blootstelling, na 1, 2 en 3 weken. Voor over generaties gebeurde de staalname om de 3 weken. Het experiment werd over twee generaties gevolgd.

- RNA extractie

Het protocol voor de RNA extractie is gebaseerd op dat van 'Chomzynski en Sacchi'. De RNA extracties werden uitgevoerd op het weefsel van halve wormen. De analyse van de stalen gebeurde met behulp van de NanoDrop spectrofotometer (ND-1000, Isogen Life Sciences; De Meern, Nederland). Van al de stalen waarop een RNA extractie werd uitgevoerd, werden uiteindelijk voor het experiment dat binnen een generatie liep 77 stalen (zeven of acht biologische herhalingen per conditie) geselecteerd voor verdere verwerking. Voor het experiment dat over generaties liep, werden 30 stalen (vijf biologische herhalingen per conditie) geselecteerd voor de verdere verwerking. Hierbij werd de hoogste concentratie (5  $\mu$ M) eruit gelaten omdat er van deze concentratie uiteindelijk te weinig herhalingen waren om mee verder te werken.

- Reverse transcriptie

Door de grote hoeveelheid van de stalen werd deze stap uitgevoerd over twee dagen. Bij reverse transcriptie werd van het enkelstrengig RNA complementair DNA (cDNA) gemaakt. Dit werd over een aantal stappen uitgevoerd. Eerst werd ervoor gezorgd dat gestart werd met gelijke hoeveelheden RNA (ongeveer 1000 ng). Daarom werden de RNA stalen verdund met RNase vrij water tot een eindvolume van 12  $\mu$ l. Vervolgens werd een gDNA wipeout stap uitgevoerd door Turbo DNase en bijhorende buffer van het kitje 'Turbo DNA-free' (Ambion, Austin, V.S.) toe te voegen. Hierna werd het mengsel gedurende 30 minuten op 37°C geïncubeerd in 'Eppendorf mastercycler gradient' (Eppendorf; Hamburg, Duitsland). Uiteindelijk werd een DNase inactivatie stap uitgevoerd door 'DNase Inactivation Reagent' toe te voegen. Dit mengsel werd gedurende twee minuten geïncuberen terwijl af en toe gevortexd werd. Na centrifugatie werd het RNA (supernatans) overgebracht naar een nieuw epje.

In een volgende stap werd een mastermix van het kitje 'High capacity cDNA reverse transcription' (Applied Biosystems; Foster City, V.S) gemaakt. Nadat de mastermix verdeeld was over de stalen, werden deze nog eens gecentrifugeerd. Met behulp van de 'Eppendorf mastercycler gradient' werd het cDNA aangemaakt (10 minuten op 25°C, 120 minuten op 37°C, 5 minuten op 85°C)

- Kwantitatieve analyse van de genexpressie van verschillende enzymen met RT-PCR

Efficiënties testen

Vooraleer de echte stalen onderworpen werden aan de RT-PCR, werden eerst de reactie-efficiënties getest. Deze test werd uitgevoerd om zeker te zijn dat de behandeling, in dit geval Cd, niet gaat interfereren met de primerbinding, enzymen of SYBR green. Om de reactie-efficiënties te testen, werd een verdunningsreeks van mengstalen gemaakt. Er werd één mengstaal gemaakt van alle stalen van binnen generaties, waarvan vervolgens een 1/4 verdunningsreeks gemaakt werd, gaande van 1/4 tot 1/256. De reactie-efficiënties van de volgende genen werden getest: Bcl-2,  $\beta$ -catenine, CaMK, Cycline B, Cyt C, Erk 1/2, JNK, Msh2, Nf- $\kappa$ B, NOS, Pi3K, PKC, PTEN, Wntp3. Van de andere genen die gebruikt werden om RT-PCR op uit te voeren, zijn de efficiënties eerder al getest.

Testen van genen van interesse

In dit experiment werden in totaal veertien genen getest: Cyt C, Erk1/2, GPx, HSP70, JNK, Lox, Mapk p38, NOS, p53, PKC, PTEN, Smedwi, SOD en Wntp3. Verder werden ook vijf huishoudgenen getest, namelijk CCOS4, Cys, CK2a, Gapdh, GM2-AP, om de resultaten van de genexpressie te kunnen normaliseren.

Eerst werden de cDNA-stalen 1/10 verdund met TE buffer (1/10 verdund). Vervolgens werd een mastermix gemaakt die de volgende componenten bevatte: Power SYBR green (Fast SYBR<sup>®</sup> Green Master Mix, Applied Biosystems; Foster City, V.S.), Forward en Reverse primers (10  $\mu$ M) en RNase vrij water. Alle stalen en mastermixen werden op 96 well platen gepipetteerd en voor elk gen werd ook een non template control (NTC) gepipetteerd om mogelijke contaminatie na te gaan. Ten slotte werd de plaat ingezet in de ABIprism 7900 HT (Applied Biosystems; Foster City, V.S.) (20 min op 95°C, 15 sec op 95°C, 1 min op 60°C).

2.2.4 Bepaling van de grootteverandering

Het doel van dit experiment bestond erin na te gaan wat het effect was van verschillende CdCl<sub>2</sub>-concentraties op een fysiologische parameter, de grootte. Dit werd bekomen door van elke organisme drie foto's te nemen met behulp van een 'Nikon Coolpix 5400', bevestigd op een binoculair. De oppervlakte van de organismen werd vervolgens bepaald met behulp van het beelden verwerkende programma ImageJ 1.43.

Tijdens dit experiment werd hetzelfde opzet als het genexpressie-experiment gevolgd aangezien deze experimenten samen vielen. Bij het experiment dat binnen een generatie liep, werden de organismen in het begin van het experiment gesneden, waarna telkens een kop- en staartgedeelte overhield. Deze delen liet men vervolgens gedurende drie weken terug uitgroeien tot volwassen organismen. Tijdens dit experiment ging men na of er een verschil zichtbaar was tussen de groei van kop en staartgedeelten. De foto's voor dit experiment werden vlak voor de staalname genomen. Bij het experiment dat over generaties liep, werden de organismen zo gesneden dat er uiteindelijk na twee generaties vier condities gecreëerd werden, namelijk kop/kop, kop/staart, staart/staart en staart/kop. Bij deze condities stelt het eerste deel, het deel voor dat overbleef na het snijden en staalname van de eerste generatie en het tweede deel stelt het deel voor dat overbleef na het snijden en staalname van de tweede generatie. Tijdens dit deel van het experiment werden de foto's een dag voor de staalname genomen.

### 2.3 Statistische analyse

De statistische analyses werden uitgevoerd met behulp van het programma SAS v9.2.

De gegevens van het voedsel- en genexpressie-experiment werden geanalyseerd met een twee weg-ANOVA test. In deze statistische test werd nagegaan of groepen significant van elkaar verschillen op basis van twee parameters namelijk tijd en concentratie. Voor de bepaling van de grootteverandering werd een drie-weg ANOVA test gebruikt, waarbij significante verschillen onderzocht werden op basis van drie parameters, namelijk tijd, concentratie en deel (kop of staart). Bij de analyse wordt op verschillende significantieniveaus gekeken, namelijk het 10% (p-waarde ligt tussen 0.10 en 0.05), 5% (p-waarde ligt tussen 0.05 en 0.01) en 1% significantieniveau (p-waarde < 0.01). De normaliteit en de homoscedasticiteit werden bij deze test steeds gecontroleerd. Indien de gegevens niet normaal verdeeld waren, werd een niet parametrische test (Kruskal-Wallis test) gebruikt om de gegevens te analyseren.

### 3 Resultaten

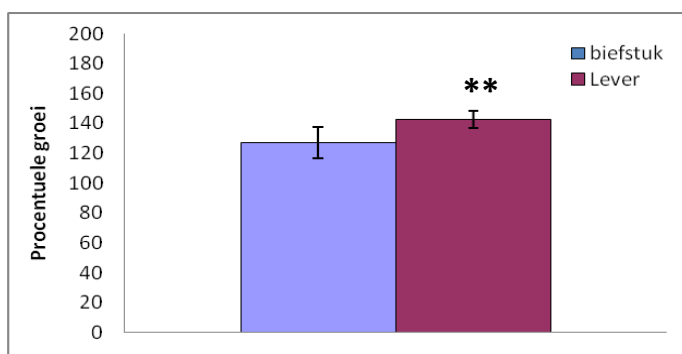
In deze studie wordt nagegaan welke veranderingen Cd zal induceren in het organisme *S. mediterranea*. Deze veranderingen worden zowel binnen als over generaties gevolgd. Door de organismen over verschillende generaties heen te volgen, kan een accumulatie van effecten worden waargenomen.

In een eerste fase wordt een optimalisatie-experiment van de kweek uitgevoerd door te testen onder welke omstandigheden, het geven van lever of biefstuk als eten, de groei van de kweek het beste gestimuleerd wordt. Vervolgens wordt het effect van Cd op verschillende niveaus onderzocht, namelijk op het niveau van het organisme (grootte), het cellulaire niveau (bepaling van de Cd-accumulatie) en het moleculaire niveau (genexpressie).

Bij de bepaling van de Cd-accumulatie worden de organismen blootgesteld aan 2.5, 10 en 25  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  gedurende 2 of 21 dagen. Het groottebepalings- en genexpressie-experiment volgen hetzelfde opzet, waarbij de organismen blootgesteld worden aan 2.5 en 5  $\mu\text{M}$ . Deze experimenten worden zowel binnen generaties, waar de staalname op 1, 2 en 3 weken gebeurt, als over generaties, waar de staalname op 3 en 6 weken gebeurt, gevolgd.

#### 3.1 Optimalisatie van de cultuur

Aangezien een goed lopende kweek de essentie vormt van het opzetten en uitvoeren van experimenten wordt tijdens deze studie nagegaan welk voedsel (lever of steak) de groei van de organismen het beste bevordert. De resultaten van het experiment zijn weergegeven in figuur 3.



**Figuur 3:** weergave van de gemiddelde procentuele groei van de organismen na 3 weken ten opzichte van organismen gesneden bij de start van het experiment, waarbij 10 organismen gedurende 3 weken ofwel lever ofwel biefstuk als voedsel kregen. De waarden stellen gemiddelden +/- st error voor (\*\* = p-waarde < 0,05)

Na 3 weken is een significant verschil ( $p = 0,036$ ) in de groei waarneembaar tussen de organismen die lever krijgen als voedsel en degene die biefstuk krijgen. De organismen, die gedurende 3 weken lever krijgen, zullen een grotere groei ondergaan dan de organismen die biefstuk krijgen.

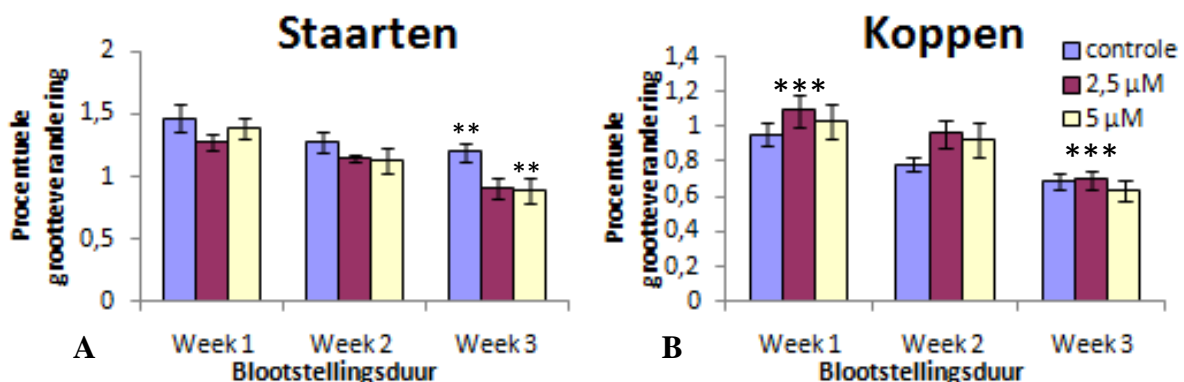
Nu dit geweten is, worden verschillende experimenten opgericht om te onderzoeken welke schade Cd kan aanrichten op verschillende niveaus. Hierbij beginnen we het onderzoek bij het hoogste niveau, namelijk het niveau van het organisme.

### 3.2 Effecten op niveau van het organisme

Eerst en vooral worden de effecten op het niveau van het organisme onderzocht door te bepalen op welke manier Cd de grootteverandering van de organismen zal beïnvloeden. Het experiment werd zowel binnen als over generaties gevolgd.

#### 3.2.1 Binnen generaties

De resultaten voor het experiment dat binnen een generatie wordt gevolgd, zichtbaar in figuur 4, zijn gecorrigeerd ten opzichte van de startwaarden, namelijk tijdstip 0 (voor de blootstelling), vlak na het snijden van de wormen. De kop- en staartgedeelten liet men vervolgens gedurende 3 weken terug uitgroeien tot volwassen organismen. Het effect van Cd op staart- en kopgedeelten wordt apart in de figuur weergegeven.



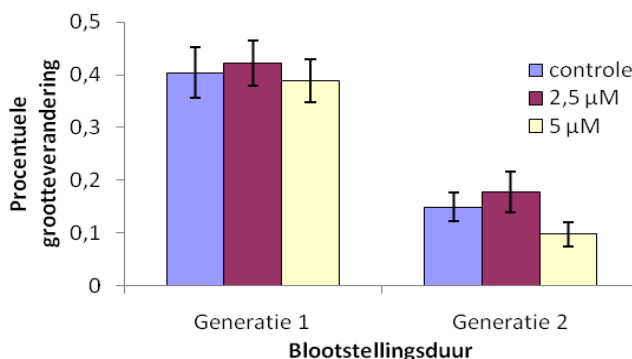
**Figuur 4:** verschil in de gemiddelde procentuele grootteverandering tussen staarten (A) of koppen (B) onder de invloed van 2,5 of 5  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  bij 1, 2 en 3 weken ten opzichte van de groottes bij tijdstip 0. Bij elk tijdstip worden per concentratie 7 herhalingen gebruikt. De waarden stellen gemiddelden +/- st error voor (\*\* = p-waarde < 0,05, \*\*\* = p-waarde < 0,1)

Bij zowel staart- als kopgedeelte, weergegeven in figuur 3, werd een significant tijdseffect waargenomen. Bij beide condities is voor alle concentraties een daling van de procentuele grootteverandering zichtbaar tussen 1 en 3 weken. De p-waarden voor staart- en kopgedeelte bedragen respectievelijk 0,065 en 0,0618. Bij de koppen is zelfs na 3 weken duidelijk sprake van krimpen van de organismen. De grootte van de organismen bedraagt hier nog 80% van de oorspronkelijke organismen na snijden. Verder kan ook nog een significant concentratie effect ( $p = 0,0324$ ) worden waargenomen bij de staarten op 3 weken. De procentuele grootteverandering ligt bij de organismen blootgesteld aan 5  $\mu\text{M}$  namelijk lager dan bij de organismen van de controlegroep.

### 3.3.2 Over generaties

De resultaten voor het experiment dat over generaties wordt gevolgd, weergegeven in figuur 5 en 6, zijn gecorrigeerd ten opzichte van de startwaarden, namelijk tijdstip 0 (voor de blootstelling) en vlak voor het snijden. Er worden hele organismen ten opzichte van elkaar vergeleken aangezien na 3 weken en 6 weken (de tijdstippen waarop men de organismen opnieuw gaat bekijken) ze terug volledig volgroeid zijn. Na 3 weken worden de organismen opnieuw gesneden, waarbij één van de delen, bijvoorbeeld kop, gebruikt wordt voor de staalname en het andere deel, bijvoorbeeld staart, terug kan uitgroeien tot een nieuw organisme. Bij 6 weken werd dit proces opnieuw herhaald. Op deze manier kan men vier condities creëren, namelijk kop/kop, kop/staart, staart/kop en staart/staart.

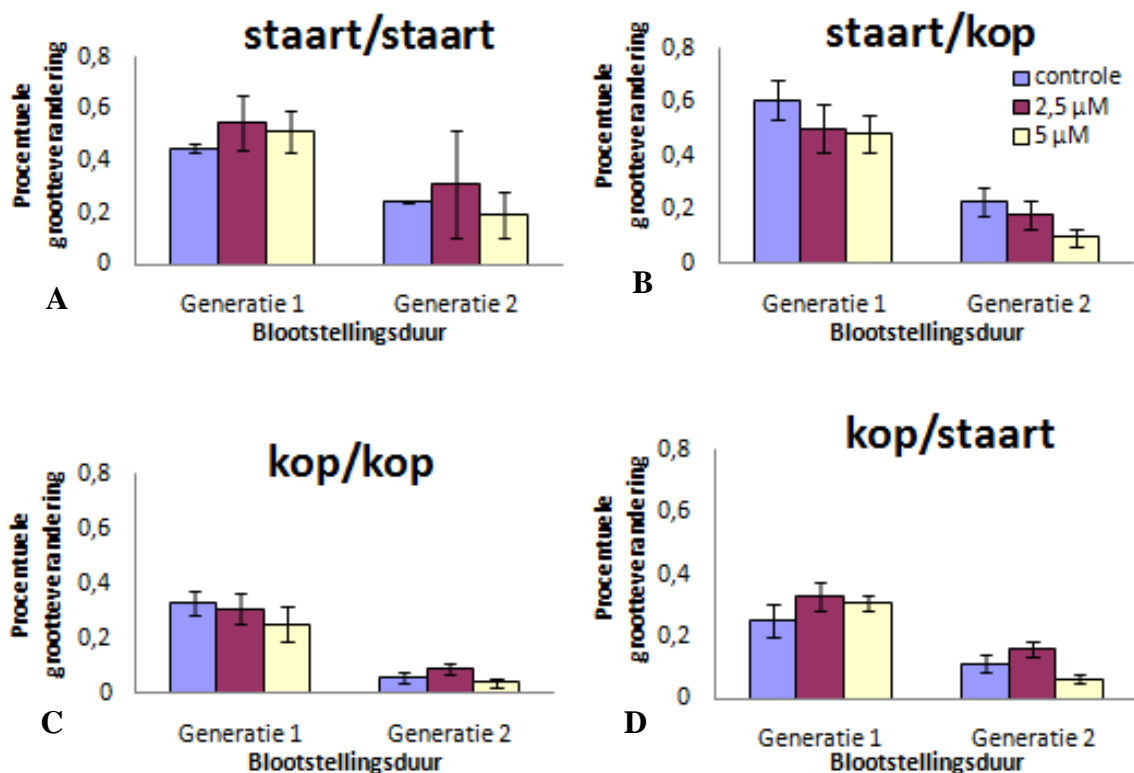
In figuur 4 wordt een algemeen effect van de concentraties op de grootteverandering van de organismen onderzocht. Hierbij werd er geen onderscheid gemaakt tussen de vier kop/staart condities .



**Figuur 5:** verschil in de gemiddelde procentuele grootteverandering tussen de organismen blootgesteld aan 2.5 of 5  $\mu\text{M}$  CdCl<sub>2</sub> bij 1 en 2 generaties (3 en 6 weken) ten opzichte van de groottes bij tijdstip 0. Bij elk tijdstip worden per concentratie 8 herhalingen gebruikt. De waarden stellen de gemiddelden +/- st error voor

Op deze figuur kan voor alle concentraties worden waargenomen dat de grootte van de organismen na één generatie tot 40% gereduceerd is ten opzichte van de startwaarden. Na twee generaties bedraagt deze grootte nog maar 20% van de originele grootte, waargenomen voor de blootstelling. Deze daling van de procentuele grootteverandering wordt binnen elke concentratie significant ( $p < 0,0001$ ) bevonden.

In figuur 6 worden de verschillende condities apart (staart/staart, staart/kop, kop/kop en kop/staart) onder invloed van Cd onderzocht.



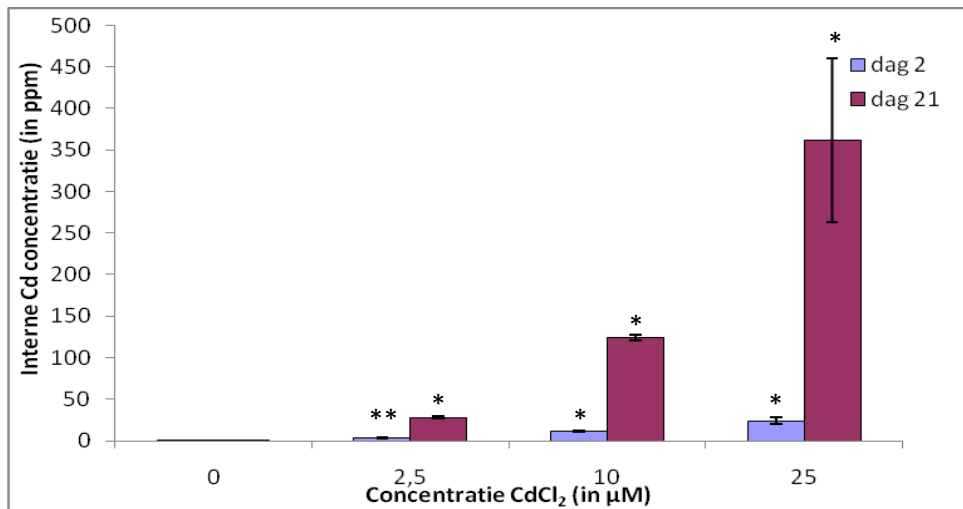
**Figuur 6:** verschil in de gemiddelde procentuele grootteverandering bij staart/staart (A), staart/kop (B), kop/kop (C) en kop/staart (D) onder de invloed van 2.5 of 5 µM CdCl<sub>2</sub> bij 1 en 2 generaties (3 en 6 weken) ten opzichte van de groottes bij tijdstip 0. Bij elk tijdstip worden per concentratie 8 herhalingen gebruikt. De waarden stellen de gemiddelden +/- st error voor

Uit deze figuur kan hetzelfde worden afgeleid als uit figuur 4. Bij alle condities is een significante ( $p < 0,0001$ ) afname van de procentuele grootteverandering waarneembaar. Verder is ook duidelijk dat de conditie kop/kop de grootste daling ondervindt van alle condities. Uiteindelijk zal de grootte van deze organismen minder dan 10% van de originele grootte bedragen.



### 3.3 Cadmium accumulatie

In een volgende fase wordt nagegaan in welke mate de organismen Cd zullen opnemen onder invloed van verschillende concentraties. De resultaten hiervan kunnen zijn terug te vinden in figuur 7.



**Figuur 7:** de gemiddelde Cd-accumulatie in de organismen blootgesteld aan 2,5, 10 of 25 μM CdCl<sub>2</sub> gedurende 2 of 21 dagen. Bij elk tijdstip worden per concentratie 10 herhalingen gebruikt. De waarden stellen de gemiddelden +/- st error voor. (\* = p-waarde < 0,0001, \*\* = p-waarde < 0,05)

Uit de analyse van de gegevens kunnen effecten worden waargenomen voor concentratie en tijd. Beide hebben namelijk een p-waarde < 0,0001. Er wordt ook een interactie-effect waargenomen tussen concentratie en tijd met een p-waarde van 0,1. Op figuur 7 zijn deze verschillen duidelijk waarneembaar. Bij dag 2 is slechts een lichte stijging van de accumulatie voor de verschillende concentraties zichtbaar. Dit effect is duidelijker zichtbaar bij dag 21, waar men een grotere stijging van de Cd-accumulatie kan waarnemen tussen de verschillende concentraties. Verder kan bij dezelfde concentraties duidelijk een stijging van de accumulatie worden waargenomen tussen dag 2 en 21.

### 3.4 Moleculaire effecten

In een laatste fase van het onderzoek werden de moleculaire effecten van cadmium nagegaan, meer bepaald werd gekeken naar transcriptionele veranderingen. Hoewel er is al veel geweten is over de effecten van Cd op de genexpressie, is nog niet veel onderzoek verricht naar deze effecten over generaties. Daarom wordt een groot deel van deze studie gewijd aan het proberen te ontrafelen hoe de genexpressie onder invloed van Cd verandert zowel binnen als

over generaties. Hierbij worden verschillende groepen van stressgerelateerde genen getest om te bepalen welke rol zij spelen bij Cd toxiciteit in *S. mediterranea*.

Eerst worden de reactie-efficiënties van een aantal genen (tabel 1) getest om zeker te zijn dat de behandeling, in dit geval Cd, niet gaat interfereren met de primerbinding, enzymen of SYBR green. Van alle geteste genen wordt eerst een curve gemaakt waarin de Ct-waarden geplotted worden ten opzichte van de concentratie van de verdunningsreeks van het mengstaal, bestaande uit stalen van binnen generaties. Vervolgens worden de correlatiecoëfficiënt ( $R^2$ ) en de efficiëntie-waarden berekend voor elke gen. De efficiëntie-waarden die tussen 85% en 115% liggen voldoen aan de normen.

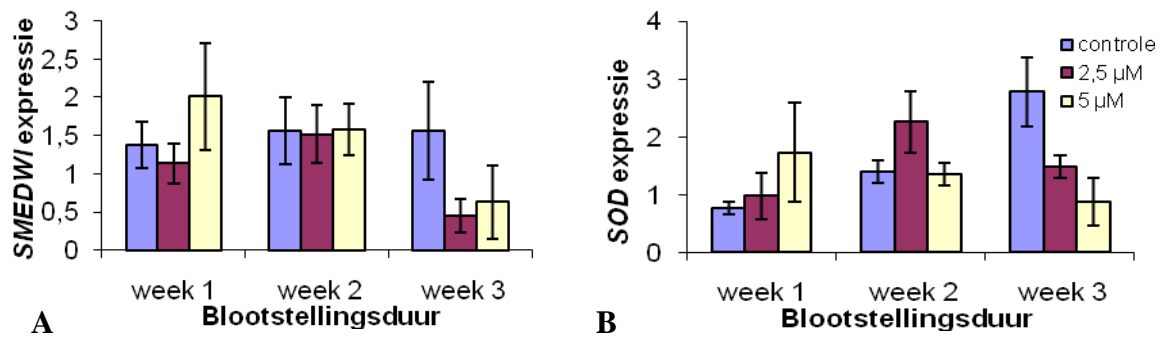
Tabel 1: genen weergegeven met hun correlatiecoëfficiënt ( $R^2$ ) en efficiëntie-waarden. De waarden die in het groen weergegeven zijn, voldoen aan de normen.

<b>Gen</b>	<b><math>R^2</math></b>	<b>Efficiëntie-waarde (in %)</b>
<i>Bcl-2</i>	0,5555	19
<i>b-catenine</i>	0,2029	1158
<i>CamK</i>	/	/
<i>Cycline B</i>	/	/
<i>Cyt C</i>	0,9849	106
<i>Erk1/2</i>	0,9938	98
<i>JNK</i>	0,984	106
<i>Msh2</i>	0,9547	124
<i>NfkB</i>	0,5802	-16
<i>NOS</i>	0,9857	103
<i>Pi3K</i>	/	/
<i>PKC</i>	0,9993	105
<i>PTEN</i>	0,9999	114
<i>Wntp3</i>	0,9563	90

Vervolgens wordt eerst een GeNorm analyse uitgevoerd om te bepalen met hoeveel huishoudgenen men de gegevens verder zal analyseren. Deze analyse wordt zowel voor het experiment dat binnen als over generaties liep, uitgevoerd. Uitgaande van deze analyse wordt ervoor geopteerd om drie huishoudgenen (*Cys*, *Gapdh* en *GM2-AP*) te gebruiken voor de normalisatie van de resultaten van de genexpressie.

### 3.2.1 Binnen generaties

De resultaten voor dit experiment zijn gecorrigeerd ten opzichte van de startwaarden, namelijk tijdstip 0 (voor de blootstelling), vlak na het snijden van de wormen. Er worden verschillende genen getest maar slechts voor een aantal genen (Smedwi en SOD) worden, na een statistische analyse, significante resultaten bekomen (figuur 8) van het experiment.

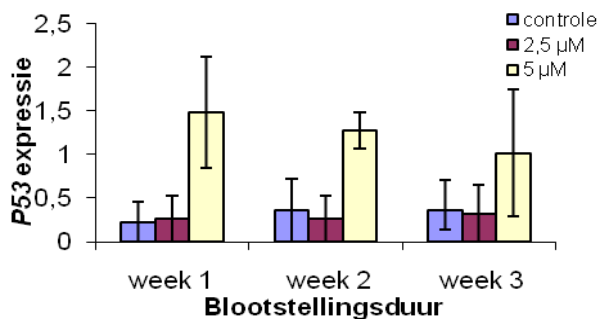


**Figuur 8:** genexpressie patroon van Smedwi (A) en SOD (B) onder de invloed van 2.5 en 5 µM bij 1, 2 en 3 weken. Bij elk tijdstip worden per concentratie 7 herhalingen gebruikt. De waarden stellen de gemiddelden +/- st error voor.

Het genexpressie patroon van Smedwi, weergegeven in figuur 7 A, vertoont enkel een significant verschil in de tijd ( $p = 0,0097$ ). Tussen 2 en 3 weken vindt namelijk een daling van de expressie plaats.

In het expressiepatroon van SOD, weergegeven in figuur 7 B, kan eveneens een significant tijdseffect ( $p = 0,0078$ ) worden waargenomen. Er vindt een stijging van de genexpressie plaats tussen 1 en 2 weken.

Voor de andere genen worden geen significante resultaten bekomen, maar p53 vertoonde wel een duidelijke cadmium-gerelateerde trend (figuur 9).

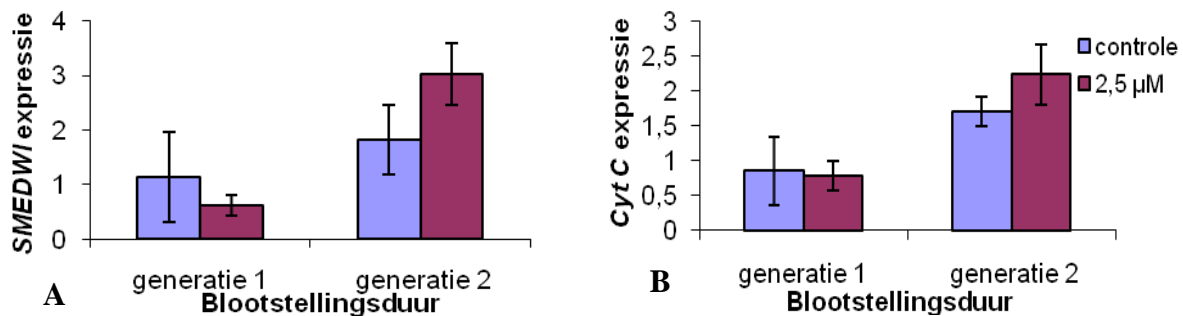


**Figuur 9:** genexpressie patroon van p53 onder de invloed van 2.5 en 5 µM bij 1, 2 en 3 weken. Bij elk tijdstip worden per concentratie 7 herhalingen gebruikt. De waarden stellen de gemiddelden +/- st error voor

Het genexpressie patroon van p53 vertoont op 1 en 2 weken eenzelfde trend, namelijk 5  $\mu\text{M}$  heeft een veel hoger expressieniveau dan de controle en 2.5  $\mu\text{M}$ . De grote standaardafwijking bij 5  $\mu\text{M}$  op 3 weken maakt het moeilijk om te bepalen of de genexpressie werkelijk hoger ligt dan de controle en 2.5  $\mu\text{M}$ .

### 3.2.2 Over generaties

Voor de analyse van deze gegevens wordt de hoogste concentratie weggelaten aangezien er te weinig herhalingen aanwezig zijn. De resultaten, weergegeven in figuur 9, zijn al gecorrigeerd ten opzichte van de startwaarden, namelijk tijdstip 0 (voor de blootstelling), vlak voor het snijden. Er worden voor een aantal genen, namelijk Smedwi en Cyt C, significante resultaten tussen de 2 tijdstippen bekomen (figuur 10).



**Figuur 10:** genexpressie patroon van Smedwi (A) en Cyt C (B) onder de invloed van 2.5 en 5  $\mu\text{M}$  bij 1, 2 en 3 weken. Bij elk tijdstip worden per concentratie 8 herhalingen gebruikt. De waarden stellen de gemiddelden +/- st error voor

Het genexpressie patroon van Smedwi, weergegeven in figuur 10 A, vertoont een significant tijdseffect ( $p = 0,0437$ ). Op de figuur is namelijk duidelijk zichtbaar dat er van generatie 1 naar 2 een stijging van de expressie plaatsvindt.

Bij Cyt C, weergegeven in figuur 10 B, is voor beide concentraties een significant tijdseffect ( $p = 0,0597$ ) zichtbaar in het expressie patroon. Er kan op de figuur worden waargenomen dat er een stijging van de expressie plaatsvindt.

## 4 Discussie

Cadmium is een uitermate toxisch metaal dat vele veranderingen kan induceren op verschillende niveaus. In deze studie wordt *S. mediterranea* als testorganisme gebruikt om deze effecten en de mogelijk onderliggende oorzaken te onderzoeken zowel binnen als over generaties. Deze studie is uniek in dat opzicht dat er onderzoek wordt verricht naar de effecten van Cd over verschillende generaties, waardoor een accumulatie van effecten kan worden waargenomen. Om deze studie te realiseren werden verschillende experimenten uitgevoerd. Eerst en vooral werd een optimalisatie-experiment van de kweek uitgevoerd om na te gaan welk voedsel de groei van de wormen het meest stimuleert. Vervolgens werden de effecten van Cd op verschillende niveaus nagegaan. Hierbij werden eerst veranderingen op het hoogste niveau (het niveau van het organisme) nagegaan om uiteindelijk de onderliggende oorzaken proberen te achterhalen op de diepere niveaus, namelijk het cellulaire maar vooral het moleculaire niveau.

Een constante en controleerbare groei van de organismen is een noodzaak in elk experimenteel design. Om na te gaan welk voedsel de groei van de wormen het best bevordert, werd een optimalisatie-experiment uitgevoerd (figuur 3). Overeenkomstig met bevindingen uit de literatuur, blijkt dat lever de beste voedselkeuze is [32]. Lever is echter niet de meest evidente keuze indien men onderzoek naar metaalstress verricht aangezien de lever één van de organen is die het gemakkelijkste metalen zullen accumuleren. Een mogelijke verklaring voor de resultaten uit dit experiment is dat lever ook vele essentiële stoffen bevat die de organismen nodig hebben om te groeien.

De effecten van Cd binnen een generatie werden op verschillende niveaus bestudeerd. Op het niveau van het organisme werd een bepaling van de grootteverandering onder de invloed van Cd uitgevoerd, op het cellulaire niveau werd de Cd-accumulatie in de organismen nagegaan en op het moleculaire niveau werd het effect van Cd op de genexpressie onderzocht.

Tijdens het experiment, waarin men de invloed van Cd op de grootte onderzocht, werden de organismen in het begin van het experiment gesneden, waarna men de kop- en staartgedeelten gedurende 3 weken terug liet uitgroeien tot volwassen organismen. Algemeen kan uit de resultaten van figuur 4 worden afgeleid dat de procentuele grootteverandering bij zowel de staart- als de kopgedeelten daalt naarmate de organismen langer worden blootgesteld.

De eerste week ondergingen de organismen de grootste groei ten opzichte van de controle conditie. Dit is logisch aangezien het organisme in de eerste week nieuwe structuren gaat vormen, waardoor het organisme een groei zal ondergaan. Op 2 en 3 weken kan men duidelijk zien dat de organismen steeds minder hard groeiden ten opzichte van de controleconditie. Bij de koppen is na een blootstelling van 3 weken zelfs sprake van krimpen van de organismen.

Uit figuur 4 kan ook afgeleid worden dat de koppen een mindere groei ondergaan dan de staarten. Dit is ook wat men verwacht. Koppen zullen namelijk moeilijker regenereren en nieuwe structuren aanmaken dan staarten. Dit is ook gebleken uit voorgaande experimenten, waarin de regeneratie van structuren van koppen en staarten werd nagegaan.

De effecten van Cd op de groei zijn relatief beperkt. Tussen de verschillende concentraties is na 1 en 2 weken blootstelling geen verschil waarneembaar. Na 3 weken blootstelling kan men echter waarnemen dat er een verschil bestaat tussen de controle en blootgestelde groepen van de staarten. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat Cd bij 1 en 2 weken nog geen of een minimaal effect heeft op de groei en dat dit effect pas zichtbaar is bij een langere blootstelling. De effecten op het cellulaire niveau bieden hierbij meer duidelijkheid. In figuur 7 kan namelijk een heel duidelijke stijging van de Cd-accumulatie worden waargenomen na 3 weken (21 dagen).

De schade die Cd veroorzaakt, is vooral het gevolg van zijn effecten op de diepere niveaus, met name het moleculaire niveau. Daarom wordt een groot deel van deze studie gewijd aan de effecten die Cd op de genexpressie heeft. Om de transcriptionele effecten van Cd te achterhalen, werden stressgerelateerde genen van verschillende groepen getest, zoals genen betrokken bij oxidatieve stress (Cyt C, GPx, Lox en SOD), signaaltransductie genen (Erk1/2, JNK, Mapkp38, NOS en PKC), algemene stressgenen (HSP70) en tumorsupressorgenen (p53 en PTEN). Verder werden ook nog genen getest, die betrokken zijn bij de regeling van stamcellen (Smedwi) en regeneratie (Wntp3).

In eerste instantie kan uit de resultaten afgeleid worden dat Cd een effect heeft op de regeneratie en groei van de organismen. Er is namelijk een duidelijke daling van Smedwi, een gen dat betrokken is bij de regeneratie van *S. mediterranea*, waarneembaar bij 2.5 en 5  $\mu\text{M}$  Cd na 3 weken blootstelling (figuur 8 A). Uitgaande van deze resultaten zou men dus kunnen zeggen dat de regeneratie verstoord wordt na 3 weken onder de invloed van Cd. Aangezien

regeneratie mede de groei van de organismen bepaalt, kan een link gelegd worden naar de resultaten van de bepaling van de grootteverandering waarin men ook duidelijk een daling in de groei kan waarnemen na 3 weken. Cadmium zal echter niet alleen een effect hebben op de groei van de organismen maar zal ook oxidatieve stress veroorzaken. Bijgevolg zal het organisme zich proberen te beschermen tegen deze stress door de expressie van anti-oxidatieve genen te verhogen. Dit verklaart het resultaat dat in figuur 8 B kan worden waargenomen. SOD zal na 2 weken bij 2.5  $\mu\text{M}$  hoger tot expressie komen om het organisme te beschermen tegen oxidatieve stress [38]. Ook andere genen, zoals p53, zullen een verhoogde expressie ondervinden onder de invloed van oxidatieve stress. P53 is namelijk betrokken bij tal van cellulaire processen, zoals de regeling van de celcyclus, apoptose en genetische instabiliteit. Oxidatieve stress zorgt voor een verstoring van de processen, wat een stimulatie van p53 tot gevolg heeft [39, 40]. Dit biedt een verklaring voor de verhoogde expressie van p53 bij een concentratie van 5  $\mu\text{M}$  (figuur 9). Deze stimulatie wordt niet waargenomen bij 2.5  $\mu\text{M}$  aangezien deze concentratie mogelijk te laag is om voor een stimulatie van de expressie te zorgen.

In een tweede deel werden bovenstaande bevindingen vergeleken met Cd-geïnduceerde effecten over verschillende generaties. Blootstellingseffecten van Cd werden onderzocht op het niveau van het organisme alsook werden onderliggende moleculaire mechanismen bestudeerd.

Uit de bepaling van de grootteverandering (figuur 5) die over generaties loopt, kan men een duidelijke daling van de procentuele groei van de organismen waarnemen. Hieruit kan men afleiden dat deze dalende trend zich ook verder zet bij een langere blootstelling. Na twee generaties bedraagt de grootte van de organismen nog maar 10% van de originele grootte, gemeten bij de start van het experiment. Uit voorgaande experimenten, waarin het effect van Cd op de regeneratie en voortplanting onderzocht werd, kon men afleiden dat organismen na veelvuldig snijden steeds minder goed groeien en regenereren. Mogelijk speelt dit fenomeen een rol bij deze drastische daling.

Uit figuur 6 kan men afleiden dat de conditie kop/kop na 2 generaties, waarbij men het kopgedeelte twee maal (bij 3 en 6 weken) gesneden heeft om vervolgens te laten uitgroeien tot een volledig organisme, de grootste daling zal ondergaan van alle condities. Uiteindelijk zal de grootte van deze organismen tot minder dan 10% van de oorspronkelijke organismen gereduceerd zijn. Dit is waarschijnlijk te wijten aan de moeilijkere regeneratie van koppen, die al gebleken is uit voorgaande experimenten.

Als men de genexpressie over generaties gaat volgen, bekomt men voor de expressie van Smedwi (figuur 10 A) een ander resultaat dan wat men kan waarnemen bij binnen generaties. Het gen kent namelijk een verhoogde expressie na 6 weken (generatie 2), in tegenstelling tot de daling die men waarnam bij binnen generaties. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat Smedwi, buiten regeneratie, ook nog betrokken is bij andere functies in de cel, die onder de invloed van Cd een verhoogde expressie kennen, zoals bijvoorbeeld homeostase van cellen. Na twee generaties zal oxidatieve stress ook zorgen voor een stimulatie van de expressie van Cyt C (figuur 10 B). Dit gen zal namelijk, als een antioxidatief gen, gestimuleerd worden om de cel te beschermen tegen deze oxidatieve stress [41].

Hoewel er bij zowel binnen als over generaties voor de meeste geteste genen geen significant resultaat bekomen werd, wilt dit niet zeggen dat deze genen niet beïnvloed worden door Cd. Van de meeste genen is hun rol bij Cd-toxiciteit al bewezen, maar mogelijk komt deze rol minder tot uiting in het gebruikte organisme, *S. mediterranea*. Het is ook mogelijk dat sommige genen pas een reactie vertonen op Cd bij een blootstelling aan hogere concentraties of bij een langere blootstelling.



## Conclusie

Uit deze studie kan besloten worden dat Cd wel effectief opgenomen wordt door het testorganisme, *S. mediterranea*. Daaruit kan men afleiden dat de effecten die worden waargenomen tijdens deze studie hoogstwaarschijnlijk worden veroorzaakt door de verhoogde interne Cd concentraties. De vermindering van de groei die kan worden geobserveerd, is waarschijnlijk een gevolg van deze stijgende interne Cd-concentratie, die mogelijk zorgt voor een inhibitie van Smedwi. Weinig andere effecten waren te zien op transcriptieel niveau. Om de onderliggende effecten verder te ontrafelen, kan men de organismen ook blootstellen aan hogere concentraties of gedurende een langere periode blootstellen. Verder kunnen ook andere genen getest worden, waarvan de reactie-efficiënties nu nog niet in orde waren. Hoewel er zowel binnen als over generaties effecten van Cd merkbaar waren, kwamen deze niet altijd overeen met elkaar. Dit zou kunnen omdat bij bijvoorbeeld het genexpressie-experiment bepaalde data, zoals de gegevens van 5  $\mu\text{M}$ , ontbraken. Een uitgebreider experiment, waarin men bijvoorbeeld met meer herhalingen van elke conditie het experiment start of de organismen blootstelt aan andere concentraties, zal hierover uitsluitsel geven.

In de toekomst kunnen nog meer effecten van Cd toxiciteit op verschillende niveaus onderzocht worden, aangezien schade ook meestal voorkomt op meerdere niveaus. Zo kan men op fysiologisch niveau regeneratie en gedrag nagaan en op cellulair niveau kan het effect op de stamcellen onderzocht worden. Verder kan ook het effect van Cd op oxidatieve stress getest worden door het niveau van ROS, zoals  $\text{H}_2\text{O}_2$ , of glutathion te bepalen onder verschillende Cd-concentraties. De eerste stappen naar de optimalisatie van de metingen voor  $\text{H}_2\text{O}_2$  en glutathion zijn al gezet, maar moeten nog verder uitgewerkt worden. Het hoofddoel van het onderzoek naar al deze effecten bestaat er uiteindelijk uit om een beter begrip te krijgen van de onderliggende mechanismen die betrokken zijn bij Cd-geïnduceerde schade en hoe deze werken over verschillende generaties.

## Referenties

1. Godt J, Scheidig F, Grosse-Siestrup C, et al. The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. *Journal of occupational medicine and toxicology*. 2006 September; 1: 22.
2. WHO (World Health Organisation). Cadmium-environmental aspects: toxicity to aquatic organisms. *Environmental Health criteria 135 IPCS*, Geneva (1992).
3. WHO (World Health Organisation). Chapter 6.3: cadmium. *Air Quality Guidelines - Second Edition*, Copenhagen (2000).
4. Satarug S, Baker JR, et al. A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupational exposed population. *Toxicology Letters*. 2003 Januari; 137(1): 65-83.
5. Popham J.D, Webster J.M. Cadmium Toxicity in the Free-Living Nematode, *Caenorhabditis elegans*, *Environmental research*. 1979; 20: 183-191.
6. Roh J, Lee J, Choi J. Assessment of stress-related gene expression in the heavy metal-exposed nematode *Caenorhabditis elegans*: a potential biomarker for metal-induced toxicity monitoring and environmental risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2006; 25 (11): 2946–2956.
7. Jacobson K, Opresko L, Owenby R, Nelwyn T. Effects of Cadmium on *Drosophila*: Toxicity, Proteins, and Transfer RNAs. *Toxicology and applied pharmacology*. 1981; 60: 368-378.
8. Karntanut W, Pascoe D. The toxicity of copper, cadmium and zinc to four different *Hydra* (Cnidaria: Hydrozoa). *Chemosphere*. 2002; 47: 1059–1064.
9. Halliwell B. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiology*. 2006 June; 141: 312–322.
10. Kehler J. The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*. 2000; 149: 43–50.
11. Valko M, Leibfritz D, Moncola J, Cronin M, Mazura M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2007; 39: 44–84.
12. Tibbles L en Woodgett J. The stress-activated protein kinase pathways. *Cellular and Molecular Life Science*. 1999 Augustus; 55(10): 1230–1254.
13. Toren Finkel, Nikki J. Holbrook. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 2000 November; 408(6809): 239-47.
14. Muller F, Lustgarten M, Jang Y, Richardson A, Van Remmen H. Trends in oxidative aging theories. *Free radical biology and medicine*. 2007 Augustus; 43(4): 477-503.
15. Valko M, Rhodes C.J, Moncola J, Izakovic M, Mazura M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. 2006; 160: 1–40.
16. Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2001 December; 1(6):529-39.

17. Bukau B, Horwich A. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*. 1998 Februari; 92(3): 351-66.
18. Cannino G, Ferruggia E, Luparello C, Rinaldi A.M. Cadmium and mitochondria. *Mitochondrion*. 2009; 9: 377–384.
19. Bertin G, Averbeck D. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences. *Biochimie*. 2006; 88: 1549–1559.
20. Flora S, Mittal M, Mehta A. Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian Journal of Medical Research*. 2008 Oktober; 128: 501-523.
21. Ball I. The taxonomy, habitat and distribution of the freshwater triclad *Panaria torva* (Platyhelminthes: Turbellaria) in Britain, *Journal of Zoology*. 1969; 157: 99-123.
22. Sluys R. Global diversity of land planarians (Platyhelminthes, Tricladida, Terricola): a new indicator-taxon in biodiversity and conservation studies. *Biodiversity and Conservation*. 1999; 8: 1663–1681.
23. Adoutte A, Balavoine G, Lartillot N, de Rosa R. Animal evolution: the end of the intermediate taxa? *Trends in genetics*. 1999 maart; 15(3): 104-108.
24. Newark P, Alvarado A. Not your father's planarian: a classic model enters the era of functional genomics. *Nature reviews: genetics*. 2002 Maart; 3(3):210-219.
25. Alvarado A, Kang H. Multicellularity, stem cells, and the neoblasts of the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Experimental Cell Research*. 2005 Juni; 306(2): 299-308.
26. Giribet G, Distel D, Polz M, Sterrer W, Wheeler W. Triploblastic Relationships with Emphasis on the Acoelomates and the Position of Gnathostomulida, Cycliophora, Plathelminthes, and Chaetognatha: A Combined Approach of 18S rDNA Sequences and Morphology. *Systematic biology*. 2000 September; 49(3): 539-562.
27. Egger B, Gschwentner R, Rieger R. Free-living flatworms under the knife: past and present. *Development genes and evolution*. 2007 Februari; 217(2): 89–104.
28. Lagadic L, Caquet T. Invertebrates in Testing of Environmental Chemicals: Are They Alternatives? *Environmental Health Perspectives*. 1998 April; 106(Supplement 2): 593-611.
29. Alvarado A. Planarians. *Current Biology*. 2004 September; 14(18): R737-R738.
30. Kiefer J. Emerging Developmental Model Systems. *Developmental dynamics*. 2006 Juli; 235(10): 2895-2899.
31. Alvarado A, Reddien P, Newark P, Nusbaum C. Proposal for the Sequencing of a New Target Genome: White Paper for a Planarian Genome Project. 2003
32. Alvarado A, Newark P, Robb S, Juste R. The *Schmidtea mediterranea* database as a molecular resource for studying platyhelminthes, stem cells and regeneration. *Development*. 2002 December; 129(24): 5659-65.

33. Grebe E en Schaeffer DJ. Neurobehavioral toxicity of Cadmium Sulphate to the Planarian *Dugesia dorotocephala*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 1991 Mei; 46(5): 727-30.
34. Calevro F, Filippi C, Deft P, Albertosi C, Batistoni R. Toxic effects of aluminium, chromium and cadmium in intact and regenerating freshwater planarians. *Chemosphere*. 1998 Augustus; 37(4): 651-659.
35. Kalafati M, Kopjarb N en Besendorfer V. The impairments of neoblast division in regenerating planarian *Polycelis felina* (Daly.) caused by in vitro treatment with cadmium sulphate. *Toxicology in Vitro*. 2004 Februari; 18(1): 99-107.
36. Schaeffer DJ. Planarians as a model system for in vivo tumorigenesis studies. *Ecotoxicology and environmental safety*. 1993 Februari; 25(1): 1-18.
37. Best J en Morita M. Toxicology of planarians. *Hydrobiologia*. 1991 December; 227(1): 375-383.
38. Lopez E, Arce C, Oset-Gasque M.J., Canadas S, González M.P. Cadmium induces reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in cortical neurons in culture, *Free Radical Biology & Medicine*. 2006; 40: 940 – 951.
39. Beyersmann D. en Hechtenberg S. Cadmium, Gene Regulation, and Cellular Signalling in Mammalian Cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1997; 144 (2): 247-261.
40. Han E, Muller F, Perez V, Qi W, Liang H, Xi L, Van Remmen H en Richardson A. The in vivo Gene Expression Signature of Oxidative Stress. *Physiological Genomics*. 2008; 34(1): 112–126.
41. Achard M, Gonzalez P, Marie V, Baudrimont M en Bourdineaud JP. Cytochrome c oxydase subunit I gene is up-regulated by cadmium in freshwater and marine bivalves. *BioMetals*. 2006; 19: 237–244.

# Bijlage

## Bijlage 1

Gen	Omschrijving	Functie
Bcl-2	<i>Anti-apoptotisch gen</i>	Gen van proteïne dat de permeabiliteit van de buitenste membraan van de mitochondriën regelen.
$\beta$ -catenine	<i>Signaaltransductie gen</i>	Gen van proteïne dat deel uitmaakt van adherens juncties en de wnt-siginaal pathway. Het zou ook betrokken zijn bij het specificieren van kop of staart tijdens de regeneratie van <i>Schmidtea mediterranea</i> .
CaMK	<i>Signaaltransductie gen</i>	Gen van serine/threonine-specifieke proteïne kinasen die geregeld worden door $Ca^{2+}$ /calmodulin complex. Het speelt een rol in vele processen zoals secretie van neurotransmitters en transcriptiefactor regulatie .
CCOS4	<i>Huishoudgen</i>	Gen van het laatste enzym in de elektronentransportketen van de mitochondriën. Hierbij wordt $O_2$ omgezet tot twee moleculen $H_2O$ .
CK2a	<i>Huishoudgen</i>	Gen van een serine/threonine-selectief proteïne kinase dat betrokken is bij celcyclus controle, DNA herstel en andere cellulaire processen.
Cycline B	<i>Celprogressie gen</i>	Gen van een proteïne dat de progressie van de cel controleert via de celcyclus. Cycline B regelt de voortgang van de $G_2$ naar de M fase door cycline afhankelijke kinasen te activeren.
Cys	<i>Huishoudgen</i>	Gen van een niet-essentieel aminozuur met anti-oxidante functies (is precursor van glutathion).
Cyt C	<i>Oxidatief stressgen (anti-oxidant)</i>	Gen van een heem proteïne dat een belangrijke rol vertolkt in de elektronentransportketen in de mitochondriën en betrokken is bij de initiatie van apoptose.
Erk 1/2	<i>Signaaltransductie gen</i>	Gen van intracellulaire signaalmoleculen, die deel uitmaken van de MAPK/ERK pathway, betrokken bij meiose, mitose en postmitotische functies.
Gapdh	<i>Huishoudgen</i>	Gen van een enzyme dat de zesde stap van de glycolyse katalyseert en zou betrokken zijn bij cellulaire processen zoals transcriptie en apoptose.
GM2-AP	<i>Huishoudgen</i>	Gen van een niet-enzymatisch lipide transfer proteïne dat functioneert als cofactor bij de degradatie van GM2 ganglioside naar GM3.
GPx	<i>Oxidatief stressgen (anti-oxidant)</i>	Gen van een selenium-bevattend glycoproteïne dat zorgt voor de omzetting van: <ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>H_2O_2</math> naar <math>H_2O</math></li> <li>• lipide hydroperoxiden naar alcoholen (bescherming van membranen)</li> </ul>
HSP70	<i>Algemeen stressgen</i>	Gen van een proteïne betrokken bij proteïnevouwing en transmembranair transport van proteïnen. Het voorkomt ook proteïne aggregatie bij thermale en oxidatieve stress.

JNK	<i>Signaaltransductie gen</i>	Gen van een kinase dat behoort tot de MAP kinasen die reageren op stress-stimuli zoals UV-straling, osmotische shock en apoptose.
Lox	<i>Oxidatief stressgen (pro-oxidant)</i>	Gen van een enzym dat zorgt voor de afbraak van membranen door middel van lipideperoxidatie.
Mapk p38	<i>Signaaltransductie gen</i>	Gen van een proteïne kinase dat geactiveerd wordt door stressstimuli en betrokken is bij celdifferentiatie en apoptose.
Msh2	<i>DNA herstellend gen</i>	Behoort tot de mismatch repair genen. Het gen codeert voor een proteïne dat een rol speelt bij DNA herstel. Het proteïne herstelt fouten die gemaakt worden tijdens de DNA replicatie in voorbereiding op de celdeling.
Nf-κB	<i>Signaaltransductie gen</i>	Gen dat codeert voor een proteïne complex dat de transcriptie van DNA controleert. Het is betrokken bij cellulaire responsen op stimuli zoals stress, vrije radicalen en cytokines.
NOS	<i>Signaaltransductie gen</i>	Gen van een enzyme dat zorgt voor de omzetting van L-arginine naar NO, wat een belangrijk cellulair signaalmolecule is.
p53	<i>Tumor suppressor gen</i>	Gen van een proteïnen dat betrokken is bij de regeling van de celcyclus, apoptose en genetische instabiliteit en bezit anti-kanker mechanismen.
Pi3K	<i>Signaaltransductie gen</i>	Gen dat codeert voor enzymen die betrokken zijn bij cellulaire functies zoals celgroei, proliferatie en differentiatie.
PKC	<i>Signaaltransductie gen</i>	Gen van een familie van enzymen, betrokken bij de controle van de functie van andere proteïnen via de fosforylatie van hydroxylgroepen residues op deze proteïnen. Het enzyme speelt een belangrijke rol bij de controle van celgroei en differentiatie.
PTEN	<i>Tumor suppressor gen</i>	Gen van een proteïne dat deel uitmaakt van een pathway, die de cel signalen geeft om te stoppen met delen, wat ongecontroleerde celgroei, die tot kanker zou kunnen leiden, voorkomt.
Smedwi	<i>Stamcel regulerend gen</i>	Gen van een proteïne, dat behoren tot de Argonaute/PIWI proteïne familie en komt voor in de neoblasten van <i>Schmidtea mediterranea</i> . Het is betrokken bij regeneratie en homeostase van de cel.
SOD	<i>Oxidatief stressgen (anti-oxidant)</i>	Gen van een enzyme dat zorgt voor de omzetting van O <sub>2</sub> <sup>-</sup> (superoxide) tot O <sub>2</sub> en H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .
Wntp3	<i>Regeneratie/proliferatie gen</i>	Gen dat behoort tot de Wnt genen en is betrokken bij het specificeren van de polariteit van de anterior posterior as.

## Auteursrechtelijke overeenkomst

Ik/wij verlenen het wereldwijde auteursrecht voor de ingediende eindverhandeling:

**Cadmium-geïnduceerde veranderingen in Schmidtea mediterranea: een vergelijking binnen en tussen blootgestelde generaties**

Richting: **master in de biomedische wetenschappen-milieu en gezondheid**

Jaar: **2010**

in alle mogelijke mediaformaten, - bestaande en in de toekomst te ontwikkelen - , aan de Universiteit Hasselt.

Niet tegenstaand deze toekenning van het auteursrecht aan de Universiteit Hasselt behoud ik als auteur het recht om de eindverhandeling, - in zijn geheel of gedeeltelijk -, vrij te reproduceren, (her)publiceren of distribueren zonder de toelating te moeten verkrijgen van de Universiteit Hasselt.

Ik bevestig dat de eindverhandeling mijn origineel werk is, en dat ik het recht heb om de rechten te verlenen die in deze overeenkomst worden beschreven. Ik verklaar tevens dat de eindverhandeling, naar mijn weten, het auteursrecht van anderen niet overtreedt.

Ik verklaar tevens dat ik voor het materiaal in de eindverhandeling dat beschermd wordt door het auteursrecht, de nodige toelatingen heb verkregen zodat ik deze ook aan de Universiteit Hasselt kan overdragen en dat dit duidelijk in de tekst en inhoud van de eindverhandeling werd genotificeerd.

Universiteit Hasselt zal mij als auteur(s) van de eindverhandeling identificeren en zal geen wijzigingen aanbrengen aan de eindverhandeling, uitgezonderd deze toegelaten door deze overeenkomst.

Voor akkoord,

**Strauven, Véronique**

Datum: **15/06/2010**