

Het effect van cadmium op het moleculaire niveau bij M.lignano

Ellen Geerdens

promotor :
Prof. dr. Tom ARTOIS

co-promotor :
dr. Ann CUYPERS

INHOUDSOPGAVE

<u>Lijst met Afkortingen</u>	<u>iii</u>
<u>Lijst met Figuren</u>	<u>iv</u>
<u>Lijst met Tabellen</u>	<u>iv</u>
<u>Dankwoord</u>	<u>v</u>
<u>Samenvatting</u>	<u>vi</u>
<u>1 Inleiding</u>	<u>1</u>
1.1 Cadmium: vervuiling en verspreiding	1
1.2 Cadmiumtoxiciteit	1
1.2.1 Cellulaire effecten	1
1.2.2 Cadmiumtoxiciteit bij de mens	5
1.3 Een geschikt modelorganisme	6
1.3.1 Het fylum Platyhelminthes	6
1.3.2 Kenmerken van Platyhelminthes	6
1.3.3 Huidige kennis omtrent cadmiumtoxiciteit bij Platyhelminthes	7
1.3.4 Macrostomum lignano als modelorganisme	8
1.3.5 Kenmerken van M. lignano	9
1.3.6 Voordelen van M. lignano	10
1.4 Doelstelling	10
<u>2 Materiaal en Methodes</u>	<u>11</u>
2.1 Testorganisme	11
2.1.1 Oorsprong en onderhoud van de cultuur	11
2.1.2 Parasietbestrijding	11
2.1.3 Opstellen van de culturen voor experimenten	11
2.2 Optimalisatie	12
2.2.1 Lysis	12
2.2.2 RNA extractie	13
2.2.3 Bepaling van de concentratie RNA	13

2.2.4	<i>Bepaling van de integriteit van het RNA</i>	14
2.3	LC50-test	14
2.4	Bepaling van de genexpressie	14
2.4.1	<i>RNA extractie</i>	14
2.4.2	<i>RT-PCR</i>	15
2.4.3	<i>Primer ontwikkeling</i>	15
2.4.4	<i>Real-time PCR</i>	16
2.5	Visualisatie en lokalisatie ROS	19
2.6	Statistische analyse	19
3	Resultaten	20
3.1	Optimalisatie	20
3.2	Toxiciteitstest	24
3.3	Normalisatie-experiment	25
3.3.1	<i>geNormTM</i>	25
3.3.2	<i>NormFinder</i>	26
3.4	Genexpressie	27
3.5	ROS bij <i>M. lignano</i>	28
4	Discussie	31
4.1	Optimalisatie	31
4.2	Normalisatie	33
4.3	Genexpressie	34
4.4	Lokalisatie van ROS	36
5	Conclusie	38
	Referenties	39
	Bijlage	43

LIJST MET AFKORTINGEN

ASW	Artificieel zeewater
<i>β-ACT</i>	Gen van β-actine
<i>β-TUB</i>	Gen van β-tubuline
<i>CAM</i>	Gen van calmoduline
<i>CAT</i>	Gen van catalase
<i>CCOS</i>	Gen van cytochroom C oxidase subeenheid IV
Cd	Cadmium
CdO	Cadmiumoxide
CdSO ₄	Cadmiumsulfaat
<i>CK2</i>	Gen van caseïne kinase 2
Ct	Cycle threshold
<i>CYS</i>	Gen van cystatine
DAB	Diaminobenzidine
EST	Expressed sequence tag
<i>GAPDH</i>	Gen van glyceraldehyde 3-fosfaat dehydrogenase
<i>GM2-AP</i>	Gen van ganglioside GM2-activator proteïne
GSH	Glutathion
HO°	Hydroxylradicaal
H ₂ O ₂	Waterstofperoxide
HSP	Heat-shock proteïnen
<i>HSP60</i>	Gen van HSP60
<i>HSP90</i>	Gen van HSP90
LC50	Letale concentratie bij 50% van de testorganismen
<i>MORG1</i>	Gen van MAPK organizer 1
MT	Metallothioneïnes
NBT	Nitroblauw tetrazolium
O ₂ ^{o-}	Superoxide anion
<i>PS1</i>	Gen van fosfolipide scramblase 1
ROS	Reactieve zuurstofvormen
<i>RPL13</i>	Gen van ribosomaal proteïne L13a
<i>SYN</i>	Gen van synaptogyrine

LIJST MET FIGUREN

Figuur 1	Univalente reductie van O ₂ tot H ₂ O	3
Figuur 2	Een adult specimen van <i>Macrostomum lignano</i>	9
Figuur 3	RNA opbrengst (ng/μl) bij verschillende lysismethoden	20
Figuur 4	RNA integriteit bij verschillende lysismethoden	21
Figuur 5	RNA opbrengst (ng/μl) bij gebruik van de mixer mill	22
Figuur 6	RNA opbrengst (ng/μl) bij verschillende RNA-extractie protocols	22
Figuur 7	RNA integriteit bij verschillende RNA-extractie protocols	23
Figuur 8	RNA opbrengst (ng/μl) bij gebruik van het 'RNeasy mini kit' (Qiagen, Venlo)	24
Figuur 9	Gemiddelde expressiestabiliteit van de huishoudgenen volgens <i>geNorm</i> TM	25
Figuur 10	Bepaling van het optimaal aantal huishoudgenen voor normalisatie met <i>geNorm</i> TM	26
Figuur 11	Gemiddelde expressiestabiliteit van de huishoudgenen volgens <i>NormFinder</i>	26
Figuur 12	Genexpressie van enzymen die mogelijk betrokken zijn bij de verdediging na blootstelling aan Cd	27
Figuur 13	Genexpressie van heat-shock proteïnen die mogelijk betrokken zijn bij de verdediging na blootstelling aan Cd	28
Figuur 14	Adulte specimen van <i>M. lignano</i> na 24 uur incubatie in CdCl ₂ + DAB	29
Figuur 15	Hoofd (A) en staart (B) van een adult specimen van <i>M. lignano</i> na blootstelling aan 10 μM CdCl ₂ en incubatie in DAB (0,05 mg/ml) gedurende 24 uur	29
Figuur 16	Adulte specimen van <i>M. lignano</i> na 24 uur incubatie in CdCl ₂ + NBT	30

LIJST MET TABELLEN

Tabel 1	De huishoudgenen met hun functie en primer sequenties	17
Tabel 2	De stress-genen met hun functie en primer sequenties	18
Tabel 3	LC50 van <i>M. lignano</i> na blootstelling aan verschillende concentraties CdCl ₂ over 1 dag en 5 dagen	24

DANKWOORD

Maanden van werken en schrijven zijn voorbij gevlogen. Maar deze thesis zou zonder de hulp en steun van een aantal mensen niet tot stand gekomen zijn. Nu ik de laatste zinnen van mijn thesis schrijf zou ik van deze bladzijde gebruik willen maken om deze mensen te bedanken.

Als eerste gaat mijn dank uit naar mijn promotor, Prof. dr. Tom Artois, en mijn co-promotor, dr. Ann Cuypers. Zij gaven mij de mogelijkheid om deel te nemen aan dit onderzoek. Ze stonden de afgelopen 6 maanden steeds klaar met hun deskundige uitleg en suggesties. Daarnaast wil ik hun ook bedanken voor het kritisch nalezen en verbeteren van mijn thesis. Vervolgens wil ik mijn tweede lezer Prof. dr. Jan Colpaert bedanken, voor de tijd die hij besteed heeft aan het lezen en beoordelen van mijn thesis.

Verder ben ik ontelbaar veel dank verschuldigd aan Michelle Plusquin, die mij de wereld van het wetenschappelijk onderzoek heeft doen ontdekken. Ik wil haar bedanken voor de tijd die ze aan mij opofferde, voor het aanleren van de technieken, de hulp bij de experimenten, de steun indien er iets niet verliep zoals gepland,... Ze stond steeds enthousiast klaar bij het beantwoorden van mijn vragen. Ook wil ik haar bedanken voor het eindeloos nalezen en voor de goede raad en tips bij het verbeteren van de verschillende versies van deze thesis.

Karen Smeets verdient ook een speciaal bedankje, voor de hulp bij het opstellen van de experimenten, de interpretatie van de resultaten en het nalezen van mijn thesis. Daarnaast bedank ik ook alle andere leden en thesisstudenten van de afdeling dierkunde, milieubiologie en plantenfysiologie voor de aangename werksfeer en de praktische hulp in het labo.

Kim en Olivier mag ik hier zeker niet vergeten te vermelden. Ik wil hun bedanken voor alle toffe momenten de voorbije 4 jaren, zowel tijdens als na de lessen. Ik kon altijd bij hun terecht met mijn vragen en problemen. Ze zorgden voor ontspanning in en naast het labo en tijdens het schrijven van deze thesis.

Tot slot wil ik mijn ouders, mijn zussen Jolien en Ester en mijn broer Gerben bedanken voor hun interesse en steun tijdens mijn opleiding en mijn stageperiode.

Ellen Geerdens

SAMENVATTING

Cadmium is een toxisch metaal dat bij zowel mens als dier ernstige schade kan veroorzaken aan ondermeer de longen, de nier, de lever en het botweefsel. Deze schade is het gevolg van de effecten op cellulair niveau, waar het metaal oxidatieve stress induceert. Oxidatieve stress is een onevenwicht tussen de pro- en anti-oxidanten in de cel, waardoor een overschot aan pro-oxidanten ontstaat. Dit leidt tot de oxidatie van proteïnen, lipiden en DNA. Een cel beschikt over verschillende beschermingsmechanismen, waaronder het anti-oxidatief systeem met enzymen, zoals catalase en superoxidedismutase, en metabolieten, zoals glutathion en vitamine E. Verder kunnen er ook heat-shock proteïnen geïnduceerd worden om de cel te beschermen, en herstellen indien nodig.

In deze scriptie werd onderzoek verricht naar de effecten van blootstelling aan Cd op het cellulaire niveau bij het modelorganisme *Macrostomum lignano*. Momenteel wordt *M. lignano* reeds gebruikt als modelorganisme in ontogenetische studies, in onderzoek naar regeneratie en stamceldynamiek en in evolutionaire studies. Dankzij een EST-databank, die pas recent publiek beschikbaar werd gesteld, kan het onderzoek naar achterliggende, moleculaire effecten gestart worden. Het onderzoek dat in deze scriptie wordt voorgesteld vormt een eerste verkennende studie van moleculaire effecten veroorzaakt door Cd, een type onderzoek dat nog bij geen enkele platwormsoort werd uitgevoerd.

In eerste instantie was het noodzakelijk de lysis van het weefsel en de RNA extractie te optimaliseren. Hieruit kon besloten worden dat het mogelijk is om RNA te isoleren uit kleine hoeveelheden materiaal door de stalen te malen en vervolgens gebruik te maken van de 'RNeasy mini kit' (Qiagen, Venlo). Als tweede werd de LC50-waarde van Cd bij *M. lignano* bepaald over 1 dag en 5 dagen. Vervolgens werd er gezocht naar genen die stabiel blijven tijdens de behandeling met Cd met *geNorm*TM en *NormFinder*, en dus het meest aangewezen zijn om gebruikt te worden als referentiegenen in dit experiment. Hieruit blijkt dat β -tubuline, caseïne kinase 2 en cytochroom c oxidase subeenheid IV de meest geschikte referentiegenen zijn. Bij analyse van de genexpressie van catalase, calmoduline, heat-shock proteïne 60 en 90 werden er geen significante verschillen gevonden na Cd blootstelling. Tenslotte werden er reactieve zuurstofvormen *in vivo* gedetecteerd bij *M. lignano*. H_2O_2 komt voornamelijk aan de meest frontale lichaamswand en in de vesicula seminalis voor, $O_2^{\cdot-}$ is meer verspreid over het hele lichaam, maar ontbreekt in de gonaden.

1.1 Cadmium: vervuiling en verspreiding

In 1817 ontdekte de Duitse chemicus Friedrich Stromeyer het toxische metaal cadmium (1). Dit element is een bivalent kation en is niet-essentieel voor mens, dier en plant. Zuiver cadmium is een zacht, zilverwit metaal, maar het element komt voornamelijk voor als een anorganisch zout (bv. cadmiumoxide (CdO), cadmiumchloride (CdCl_2) of cadmiumsulfaat (CdSO_4)) (1-2). Commercieel wordt cadmium gebruikt in nikkel-cadmium batterijen en als kleurpigment in verf (3-4). Cadmium komt in zeer lage concentraties in de aardkorst voor. De natuurlijke verspreiding van het element is zeer gering en vindt plaats door vulkaanuitbarstingen, bosbranden en erosie. Antropogene activiteiten hebben de verspreiding van cadmium sterk doen toenemen (1-2). Door de uitstoot van de historische non-ferro industrie zijn bepaalde gebieden in België, zoals Noord-Limburg en de Antwerpse Kempen, vervuild met cadmium. Een andere belangrijke bron van cadmiumverspreiding door de industrie is de verbranding van fossiele brandstoffen. De landbouw heeft ook bijgedragen aan de verspreiding van dit toxisch metaal door fosfaatmeststoffen en sproeistoffen. Tegenwoordig probeert men deze problemen te remediëren, maar desondanks is er nog steeds uitstoot van cadmium en de vervuiling uit het verleden blijft natuurlijk nog in de omgeving aanwezig (1-3,5). Als gevolg van deze cadmiumvervuiling op het land zal de hydrosfeer ook aangetast worden. Dit veroorzaakt voornamelijk problemen voor grondwater en rivieren. Door de uitstroom van de rivieren in zeeën en oceanen zal ook hier vervuiling optreden (6-8). In de Noordzee neemt de concentratie metalen af van het sediment en het water kort bij de kust, naar de open zee toe (8).

1.2 Cadmiumtoxiciteit

Bij organismen die worden blootgesteld aan toxische metalen treden cellulaire effecten op die tot ernstige fysiologische gevolgen kunnen leiden.

1.2.1 Cellulaire effecten

Bij alle aërobe organismen zal cadmium op het cellulaire niveau aanleiding geven tot ontwikkeling van oxidatieve stress door de verstoring van de redoxbalans (pro- en anti-oxidanten). Cadmium is een niet redox-reactief element, maar kan indirect oxidatieve stress induceren (9).

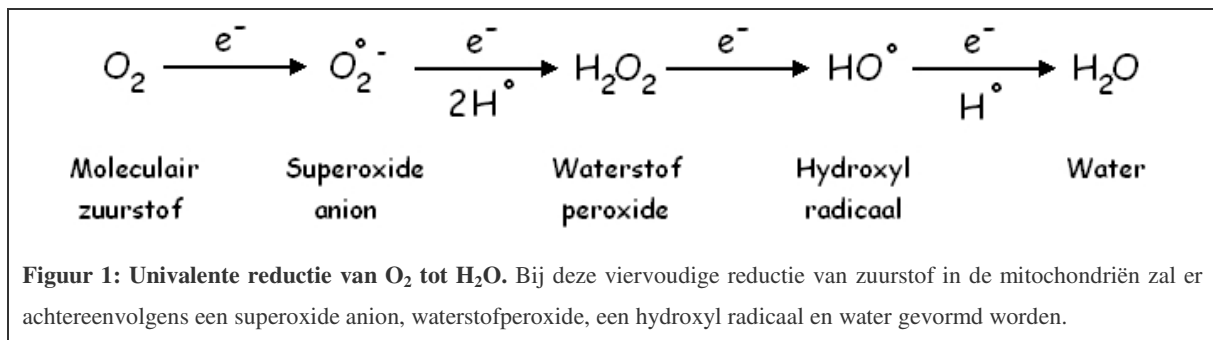
Reactieve zuurstofvormen

In normale omstandigheden worden reactieve zuurstofvormen (ROS) geproduceerd in de cel, maar deze worden in evenwicht gehouden door antioxidatieve enzymen en metabolieten. ROS zijn niet enkel een toxisch neveneffect, maar spelen ook een rol in bijvoorbeeld signaaltransductiepathways tijdens de regulatie van verschillende biologisch processen zoals ontwikkeling, celcyclus, geprogrammeerde celdood,... (10). Tijdens stresscondities, zoals blootstelling aan cadmium, zorgen de ROS voor een verstoring van de redoxbalans, waardoor er relatief meer pro- dan anti-oxidanten in de cel aanwezig zijn. (9). Cadmium kan op twee manieren indirect oxidatieve stress induceren. Enerzijds veroorzaakt het metaal een verhoogde vorming van ROS, door activatie van lipoxygenasen, NADPH-oxidasen,... (10). Anderzijds zorgt cadmium ook voor de depletie van glutathion (GSH) en sulfhydrylgroepen van proteïnen, waardoor er minder anti-oxidanten ter beschikking zijn voor de detoxificatie van pro-oxidanten (9-10). Als gevolg van dit onevenwicht tussen het aantal pro- en anti-oxidanten in de cel kunnen DNA, proteïnen en lipiden beschadigd worden (9,11). ROS kunnen in het DNA zorgen voor breuken, chromatine crosslinking en DNA-modificaties (4). Indien oxidatieve stress zorgt voor crosslinking tussen sulfhydrylgroepen (-SH) van proteïnen resulteert dit in verhoogde degradatie of verlies van enzymatische activiteiten. Daarnaast kunnen ROS ook polypeptiden fragmenteren. De dubbele bindingen in membraanlipiden zijn uiterst gevoelig voor oxidatieve stress. De interactie tussen lipiden en ROS zorgt voor de productie van peroxiden, die zelf ook onstabiel en reactief zijn. Hierdoor wordt er een autokatalytische ketenreactie, de lipidenperoxidatie, op gang gezet (4). Als gevolg van deze defecten in de cel kan oxidatieve stress uiteindelijk ook apoptose veroorzaken door de inductie van caspases en cytochroom C (11).

Bronnen van ROS

De mitochondriën zijn de grootste bron van ROS. Deze organellen zijn verantwoordelijk voor productie van ATP via de elektronentransportketen. Zuurstofmoleculen (O_2) worden in deze keten viervoudig gereduceerd om ten slotte water te vormen (Figuur 1). Bij dit proces wordt er achtereenvolgens een superoxide anion ($O_2^{\circ-}$), waterstofperoxide (H_2O_2) en een hydroxylradicaal (HO°) gevormd, maar dit proces gebeurt niet altijd volledig (11-12). De ontsnapping van onvolledig gereduceerde moleculen uit de elektronentransportketen kan leiden tot een ongecontroleerde accumulatie van ROS in de cellen. Enkele van deze ROS ($O_2^{\circ-}$ en HO°) bevatten een ongepaard elektron in hun buitenste schil en worden vrije radicalen genoemd. Wanneer deze radicalen reageren met niet-radicalen worden deze niet-

radicalen ook tot een radicaal omgevormd. De radicaalketen wordt beëindigd wanneer 2 radicalen met elkaar reageren (9).

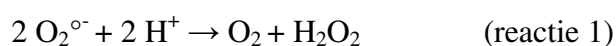


Verdediging

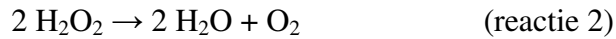
Aërobe organismen beschikken over mechanismen om deze metaal toxiciteit te voorkomen. De concentratie toxische metalen in de cel kan laag gehouden worden door beperking van metaal-opname via het plasmamembraan (13). Indien cadmium de cel toch kan binnendringen, door bijvoorbeeld in competitie te treden met andere tweewaardige ionen (bv. calcium (Ca²⁺) en zink (Zn²⁺)) voor bindingsplaatsen op membraanmoleculen (2), zal de efflux van het metaal uit het cytosol gestimuleerd worden (13). Daarnaast beschikt de cel ook over moleculen, zoals metallothioneïnes (MT), die aan de metalen binden. Zolang cadmium aan deze moleculen gebonden is zal het geen schadelijke effecten kunnen veroorzaken (13). Indien er, ondanks de beschikbaarheid van effluxmechanismen en metaal-bindende moleculen, toch oxidatieve stress optreedt zullen er verschillende beschermingsmechanismen geactiveerd worden. De cel zal de enzymen (bv. superoxidedismutasen, catalase en peroxidasen) en metabolieten (bv. GSH, vitamine E en ascorbaat) van het anti-oxidatief verdedigingssysteem activeren (12,14). Daarnaast zullen er ook bepaalde proteïnen (bv. heat-shock proteïnen) in het cytosol aanwezig zijn die de schade aan biomoleculen kunnen herstellen (13).

Anti-oxidatief verdedigingssysteem

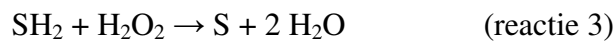
De superoxidedismutasen (SOD's) zijn een groep van metaalenzymen. Bij mens en dier zijn er 2 isozymen van SOD gekend: MnSOD en Cu/ZnSOD. MnSOD wordt aangetroffen in de mitochondriën en de peroxisomen. Cu/ZnSOD komt voor in het cytosol. De SOD's katalyseren de dismutatie van O₂^{o-} in O₂ en H₂O₂ (reactie 1) (12).



Catalase (CAT) bevindt zich in de peroxisomen en mitochondriën van aërobe cellen. Het is een heembevattend enzym en zorgt voor het verwijderen van H_2O_2 door de vorming van H_2O en O_2 (reactie 2) (12).



Peroxidasen bevinden zich in verschillende celcompartimenten. Voorbeelden van peroxidasen zijn glutathionperoxidase, ascorbaatperoxidase en syringaldazineperoxidase. Deze peroxidasen zijn allen verantwoordelijk voor het verwijderen van H_2O_2 en organische peroxiden. Ze verwijderen H_2O_2 door de oxidatie van andere organische substraten (SH_2) (reactie 3) (12).



GSH, vitamine E en ascorbaat zijn voorbeelden van antioxidatieve metabolieten (12). GSH is een disulfide reductans, het beschermt sulfhydrylgroepen op proteïnen. Daarnaast reageert het ook met HO° en zorgt het voor de regeneratie van ascorbaat. Vitamine E beschermt membranen tegen ROS. Ascorbaat heeft dezelfde functie als catalase, het vangt H_2O_2 weg. Mens en dier moeten ascorbaat verkrijgen via de voeding want ze kunnen dit zelf niet aanmaken (12).

Schade-herstellende mechanismen

Heat-shock proteïnen (HSPs) zijn zeer geconserveerde proteïnen die betrokken zijn bij de stressrespons. Cellen van alle organismen, van bacteriën tot de mens, reageren op stress door inductie van HSPs (15). De exacte functie van deze stressproteïnen is onbekend maar ze zijn zowel aanwezig onder normale omstandigheden als bij stresscondities. Voorbeelden van stressfactoren zijn hyperthermie, ischemie/reperfusie, overproductie van ROS, energiedepletie, enz. (15).

HSPs verschillen in moleculaire massa van ~15 tot 110 kDa en worden verdeeld in groepen op basis van deze grootte en hun functie. In de cel zijn ze aanwezig in het cytosol, de mitochondriën, het endoplasmatisch reticulum en de celkern. De HSPs met een moleculaire massa van ~60, 70, 90 en 110 kDa komen tot expressie bij een normale celtemperatuur, maar ook in stresscondities (15).

1.2.2 Cadmiumtoxiciteit bij de mens

In de volgende paragrafen zal besproken worden hoe het toxisch metaal cadmium opgenomen kan worden door de mens en welke de fysiologische gevolgen hiervan zijn.

Blootstelling

Cadmium is niet-essentieel voor de mens en kan niet worden afgebroken door het lichaam. Het heeft een zeer lange halfwaardetijd (tot 30 jaar) omdat het traag verwijderd wordt door het lichaam via urine en feces. De algemene populatie wordt voornamelijk blootgesteld aan cadmium via voeding, drinkwater, roken en fijn stof (16). Opname via de voeding kan plaatsvinden door het eten van bladgroenten (sla, spinazie en selder) of orgaanvlees (lever en nieren) van vee uit vervuilde gebieden (2). Cadmium kan bovendien binden aan fijne stofdeeltjes in de atmosfeer, die dan via de ademhaling kunnen opgenomen worden (17). Een andere belangrijke bron van cadmium in onze huidige leefwereld is sigarettenrook. Eén sigaret bevat namelijk 1 tot 2 μg cadmium. Niet enkel de roker zelf wordt hieraan blootgesteld, maar ook de mensen in zijn onmiddellijke omgeving (1-3,5). Via de longen zal er tot 65% van het ingeademde cadmium opgenomen worden, de gastro-intestinale absorptie is daarentegen maar 8% (1,5).

Fysiologische effecten

Door de hoge affiniteit van cadmium voor sulfhydrylgroepen in het lichaam zal de meerderheid van het cadmium in de circulatie een complex vormen met proteïnen, zoals albumine en MT, of met peptiden, zoals GSH en cysteïne (2). Gebonden aan deze biomoleculen wordt cadmium doorheen het lichaam getransporteerd. Enkel cadmium dat zich vrij in het lichaam bevindt kan negatieve effecten uitoefenen (2,5,14). De 4 belangrijkste doelorganen van cadmium zijn de lever, de nieren, de longen en het bot (1). De schade die er optreedt is afhankelijk van de dosis en de duur van blootstelling (1).

Acute blootstelling aan hoge concentraties cadmium veroorzaakt gastro-intestinale problemen met abdominale pijn, braken en diarree als gevolg. Bij chronische blootstelling accumuleert cadmium zich voornamelijk in de lever, van hieruit wordt het metaal via het bloed naar andere organen getransporteerd. In de nieren wordt cadmium gefilterd uit het bloed en vervolgens efficiënt gereabsorbeerd door de renale proximale tubulus (18-19). Cadmium zal hier in eerste instantie de reabsorptie aantasten. Zowel experimenten op proefdieren als epidemiologische studies hebben aangetoond dat cadmium aanleiding geeft tot proteïnurie, glucosurie, aminoacidurie en een verstoorde tubulaire reabsorptie van enzymen en hormonen (20-21).

Als gevolg van de verstoorde calcium- en fosfaathuishouding wordt het botstelsel poreuzer. Dit kan leiden tot osteoporose en een verhoogde kans op botbreuken (22-23). Anderzijds kan cadmium ook een rechtstreeks effect hebben op het botweefsel. Cadmium kan ervoor zorgen dat calcium wordt vrijgezet uit het bot, waardoor er minder bot aangemaakt zal worden (23). Cadmium is kankerverwekkend en geregistreerd als een humaan carcinogeen door het *International Agency for Research on Cancer* (IARC) (24). Langdurige blootstelling aan cadmium via de ademhaling kan longkanker veroorzaken (25). Verder is cadmiumblootstelling ook gekoppeld aan prostaat en nierkanker bij de mens. De exacte mechanismen van cadmiumgeïnduceerde carcinogenese zijn nog niet gekend (24).

1.3 Een geschikt modelorganisme

Om een volledig beeld te krijgen van de toxische effecten van cadmium is het belangrijk om fundamenteel onderzoek uit te voeren op bepaalde bewust gekozen modelorganismen. Het is nuttig om gebruik te maken van organismen uit verschillende ecosystemen. Op deze manier wordt er een duidelijker beeld verkregen over de effecten en kan er bepaald worden welke mechanismen algemeen en specifiek zijn.

1.3.1 Het fylum Platyhelminthes

Zowel de fylogenetische positie van het fylum Platyhelminthes (de platwormen), als de biologische eigenschappen van deze organismen hebben de wetenschappelijke interesse voor deze organismen de laatste jaren sterk doen toenemen. Het fylum Platyhelminthes bestaat uit parasitaire en vrijlevende soorten (Turbellaria) (26). Op basis van morfologische studies werd aangenomen dat de Platyhelminthes uit 4 monofyletische taxa bestonden: Acoela, Nemertodermatida, Catenulida en Rhabditophora. Recente moleculaire analyses suggereren echter dat het taxon polyfyletisch is en uiteenvalt in 2 monofyletische taxa. Enerzijds zijn er de Acoelomorpha (Acoela en Nemertodermatida), die zich aan de basis van de Bilateria bevinden, en anderzijds de echte Platyhelminthes (Catenulida en Rhabditophora) die gepositioneerd zijn binnen de Lophotrochozoa (26).

1.3.2 Kenmerken van Platyhelminthes

Platyhelminthes worden gekenmerkt door een triploblastisch, ongesegmenteerd bilateraal symmetrisch lichaam (26-27). De meeste platwormen beschikken over een subepidermale spierlaag, bestaande uit buitenste circulaire en binnenste longitudinale spiervezels. De grotere platwormen hebben hiernaast ook intermediaire diagonale spiervezels.

Een echte coeloomholte ontbreekt, maar het mesenchym, een losmazige weefselmassa, scheidt de epidermis van de darm. Binnen dit mesenchym zijn er osmoregulatorische structuren te vinden, de protonephridia. De meeste Turbellaria beschikken over een complexe darm met slechts één opening voor zowel voedselopname als uitscheiding. De mond leidt naar een farynx en vervolgens naar een blind eindigende darm. Het voortplantingssysteem van deze simultane hermafrodieten is zeer complex. Zuurstoftransport is enkel mogelijk via diffusie, aangezien een skelet, een bloedvaten- en een ademhalingsstelsel ontbreken. Hierdoor is de dorsoventraal afgeplatte lichaamsbouw van groot belang bij grote organismen. Bij kleine organismen is het oppervlakte/volume ratio al hoog genoeg, deze organismen blijven bijgevolg ook rond (26-27).

1.3.3 Huidige kennis omtrent cadmiumtoxiciteit bij Platyhelminthes

Bij Platyhelminthes is er voornamelijk onderzoek gebeurd naar de respons op farmacologische en toxische stoffen, zoals cyanide, catecholamines,... (28). Omtrent de gevolgen van toxische metalen voor deze organismen is er nog maar zeer weinig bekend. De weinige studies omtrent cadmiumtoxiciteit bij platwormen gebruikten enkel zoetwatertricliden (planaria's, een veel voorkomend taxon van rhabditophore platwormen) als testorganisme. Een overzicht van deze studies wordt hieronder gegeven.

Acute effecten

Om de acute toxische respons van tricliden op verschillende concentraties CdSO₄ na te gaan werden er LC50 testen uitgevoerd op deze organismen. Met een LC50-test wordt vastgesteld bij welke concentratie van een bepaalde toxische stof de helft van de testorganismen gestorven is, en dit gedurende een voorop vastgesteld tijdsinterval. Uit studies met de planaria *Dugesia dorotocephala* bleek dat de mortaliteit afhankelijk is van de dosis, ze steeg bij een hogere concentratie aan CdSO₄ (28-29). Daarnaast werden er neurotoxische effecten waargenomen worden bij tricliden. Deze neurotoxische effecten uiten zich in abnormale gedragspatronen zoals veranderingen in beweging of de inductie van bepaalde beschermingsmechanismen (29-30). Een ander gevolg was de onderdrukking van de asexuele voortplanting. Na blootstelling aan toxische stoffen werd namelijk vastgesteld dat de mitotische activiteit van de stamcellen (neoblasten) bij tricliden afnam. Deze neoblasten zijn de enige cellen die in het adulte organisme nog in staat zijn tot deling, en die dan ook instaan voor vervanging van dode cellen, regeneratie en, bij de soorten waar dat voorkomt, asexuele voortplanting. Het is dan ook onverantwoord dat ook een onderdrukking van de

aseksuele voortplanting werd vastgesteld. Bij de planaria *Polycelis felina* ging dit gepaard met verschillende mitotische en chromosomale abnormaliteiten en mitotische vertragingen (31). Cadmium is dus teratogeen voor Platyhelminthes tijdens aseksuele reproductie, regeneratie en embryogenese (32).

Biochemische effecten

Bij *Dugesia bengalensis* werden veranderingen in proteïnen en lipiden als gevolg van CdCl_2 bestudeerd (33). CdCl_2 zorgde voor een toename van proteïne-synthese in het organisme tot een bepaald niveau en daarna verminderde deze synthese geleidelijk. Cadmium kan de hoeveelheid proteïnen via verschillende pathways veranderen: de synthese en vrijlating van mRNA kan geïnhibeerd worden, waardoor er weinig RNA en bijgevolg ook weinig proteïnen zijn; de opname van aminozuren in de polypeptiden-keten kan echter ook geïnhibeerd worden bij de vorming van nieuwe proteïnen. De daling in proteïnen kan ook een indirect gevolg zijn doordat het lipidenmembraan afbreekt, waardoor er proteïnen kunnen lekken. Ook zal het lysosomale membraan afgebroken worden waardoor er proteolytische enzymen vrijkomen die zorgen voor de degradatie van proteïnen. De lipiden die vrijkomen zullen afbreken in vrije vetzuren, die gebruikt zullen worden voor de oxidatie van vet, omdat de cel extra energie nodig heeft als gevolg van de metaalstress (33).

Chronische effecten

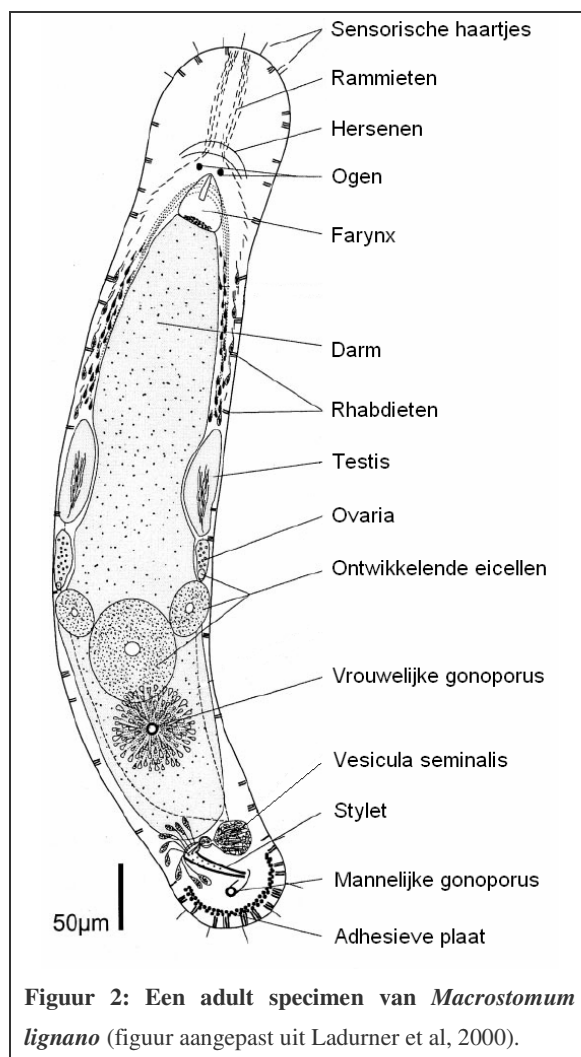
Chemische stoffen die carcinogeen zijn voor zoogdieren produceerden tumoren bij planaria's bij chronische blootstelling (30,34-35). Wanneer *D. dorotocephala* blootgesteld werd aan cadmium gedurende 10 dagen zorgde dit voor de ontwikkeling van niet-invasieve tumoren na 3-4 weken. Door de additie van 12-O-tetradecanoylforbol-13-acetaat (TPA) zag men dat het proces van tumorvorming versneld werd en de effecten ernstiger waren (30,34-35).

1.3.4 Macrostomum lignano als modelorganisme

Tot voor kort werden er uitsluitend tricladen gebruikt voor toxiciteitstudies bij Platyhelminthes, deze vormen echter een sterk afgeleide groep. Hierdoor worden ze gekenmerkt door een groot aantal unieke morfologische en ontogenetische kenmerken (26,28). Het zou dus beter zijn om te beschikken over een modelorganisme dat minder afgeleid is. *Macrostomum lignano* (Macrostomorpha, Platyhelminthes) vormt geen sterk afgeleide groep en is bijgevolg beter geschikt voor dit soort onderzoek.

1.3.5 Kenmerken van *M. lignano*

M. lignano is afkomstig uit het Italiaanse Lignano, Noord-Adriatische zee (45°41'31'' E; World Geodesic System 1984), en behoort tot de interstitiële zandfauna (36). Het organisme is slechts 1 tot 2 mm lang (Figuur 2). Een doorvoed adult specimen van *M. lignano* heeft een massa van ongeveer 300 µg (Willems M., pers. comm.). De hersenen zijn verbonden met een bilateraal symmetrisch longitudinaal zenuwstelsel. De epidermis bevat rhabdieten, dit zijn dorsolateraal staafvormige inclusies binnen de epidermiscellen. De epidermis produceert mucus als bescherming tegen uitdroging en aanvallers van buitenaf. Rostraal en caudaal (hoofd- en staartregio) bevinden er zich sensorische haartjes. De mondopening is ventraal gesitueerd, net caudaal van de ogen, en geeft toegang tot een farynx simplex die vervolgens uitmondt in een onvertakte, blindeindigende darm. Eliminatie van afvalstoffen vindt plaats door reflux via de mond. Zoals gebruikelijk bij platwormen is deze soort simultaan hermafrodiet en ze plant zich voort door kruisbevruchting (26-27,36).



1.3.6 Voordelen van *M. lignano*

M. lignano beschikt over een aantal voordelen waardoor zijn gebruik voor wetenschappelijk onderzoek aantrekkelijk wordt.

- *M. lignano* is fylogenetisch basaal gepositioneerd binnen de Platyhelminthes, maar behoort ook binnen de Rhabditophora tot de meest basale groep (Macrostomorpha) (26);
- *M. lignano* is klein (1 - 2 mm) en heeft een beperkt aantal cellen (± 25.000 cellen) (36);
- *M. lignano* is eenvoudig en goedkoop te kweken onder laboratoriumomstandigheden. Ze hebben een generatietijd van 3 weken en planten zich aan een hoog tempo voort (1 ei/worm/dag) (36);
- Door de afwezigheid van pigmentatie in de epidermiscellen (transparant) is *M. lignano* zeer nuttig voor lichtmicroscopische waarnemingen van interne structuren (36);
- *M. lignano* beschikt, net zoals andere Platyhelminthes, over neoblasten die belangrijk zijn bij onderzoek naar regeneratie. De delende stamcellen van *M. lignano* kunnen gemakkelijk gelabeld worden door de toevoeging van een DNA-precursor (BrdU) (37-38);
- Verder is er voor *M. lignano* een gedetailleerde Expressed Sequence Tag (EST) databank publiek beschikbaar. Dit zal in de toekomst toelaten om genen te identificeren die een cruciale rol spelen bij de ontwikkeling en regeneratie (39). De EST-databank kan ook gebruikt worden om de respons op milieuvervuilende stoffen moleculair te verklaren.

1.4 Doelstelling

De vrijlevende platworm *M. lignano* werd reeds als modelorganisme gebruikt bij evolutionaire en ontogenetische studies. Daarnaast zou het organisme ook zijn bijdrage kunnen leveren in onderzoek naar de gevolgen van toxische metalen. In deze scriptie werd voor het eerst een studie uitgevoerd naar de mogelijke effecten van cadmium op moleculair niveau bij *M. lignano*.

De doelstellingen van dit werk kunnen als volgt samengevat worden:

- Optimalisatie van een lysis- en RNA extractie-methode met zo weinig mogelijk weefsel en een zo groot mogelijke betrouwbare RNA opbrengst;
- Bepaling van de letaliteit van cadmium bij *M. lignano* aan de hand van een LC50-test over 1 dag en 5 dagen;
- Identificatie van geschikte referentiegenen bij lage, subletale cadmium concentraties;
- Studie van genexpressie van enkele genen die mogelijk betrokken zijn bij de verdediging na blootstelling aan cadmium;
- Detectie en lokalisatie van ROS (H_2O_2 en $O_2^{\circ-}$) *in vivo* bij *M. lignano*.

Platyhelminthes hebben de opmerkelijke mogelijkheid om te regenereren, daarom worden deze dieren intensief bestudeerd in stamcelonderzoek. Maar ze kunnen ook bijdragen in andere takken van wetenschappelijk onderzoek.

2.1 Testorganisme

Macrostomum lignano (Ladurner et al., 2005) is een lid van de Macrostromorpha, het meest basale subtaxon van de Platyhelminthes-Rhabditophora. Dit nieuwe organisme maakte al deel uit van verschillende evolutionaire en ontogenetische studies maar kan ook zijn bijdrage leveren bij toxiciteitsonderzoek.

2.1.1 Oorsprong en onderhoud van de cultuur

De dieren in cultuur zijn nakomelingen van een beperkt aantal organismen dat tijdens verschillende staalnamecampagnes in het Italiaanse Lignano werden verzameld. In het laboratorium wordt *M. lignano* gekweekt in petriplaten gevuld met f₂-medium. Dit f₂-medium bestaat uit artificieel zeewater (ASW:32‰, Wiegandt, Krefeld) aangereikt met sporenelementen. Er wordt een dag/nacht ritme (14u/10u) aangehouden bij 20°C en 50% humiditeit. De organismen worden ad libitum gevoed met de diatomee *Nitzschia curvilineata*. Het f₂-medium voorziet de nodige nutriënten voor de groei van de diatomeeën.

2.1.2 Parasietbestrijding

M. lignano culturen kunnen geïnfecteerd zijn met een parasitair ééncellige, behorende tot de Thraustochytriden (ééncellige flagellate protisten). De eerste symptomen worden ter hoogte van de staartplaat waargenomen en verspreiden zich van hieruit over het lichaam, met vaak lethale gevolgen voor de platwormen. Om besmetting te voorkomen tijdens een experiment moet de parasiet verwijderd worden uit de *M. lignano* culturen. De parasietbestrijding gebeurt door de eitjes van geïnfecteerde culturen gedurende 3 dagen te incuberen in Triton (0,25% Triton in ASW) en nadien goed te wassen met ASW.

2.1.3 Opstellen van de culturen voor experimenten

De testpopulatie die gebruikt werd voor de experimenten bestond uit parasietvrije wormen van dezelfde leeftijd. Hierdoor kon het uitgesloten worden dat waargenomen effecten te wijten zijn aan een leeftijdsverschil. Om zo'n populatie op te starten werden adulte wormen in

een nieuwe voederplaat geplaatst gedurende 24 uur, en er vervolgens weer uitgehaald. Vermits elk individu in deze periode gemiddeld 1 ei kan leggen zijn alle eieren in die voederplaat van dezelfde dag. Na 21 dagen levert dit een nieuwe cultuur op van volwassen wormen van exact dezelfde leeftijd. Vervolgens werden deze adulte organismen gedurende 24 uur blootgesteld aan verschillende subletale cadmiumconcentraties. Voor de experimenten werd er gebruik gemaakt van 0 μM ; 2,5 μM ; 5 μM en 10 μM CdCl_2 ($\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Merck) in ASW.

2.2 Optimalisatie

Aangezien er bij platwormen nog geen experimenten met real-time PCR uitgevoerd werden was het noodzakelijk bepaalde technieken te optimaliseren. Om de RNA extractie te optimaliseren werd er gebruik gemaakt van verschillende lysis-methoden en verschillende RNA-extractie protocols. De efficiëntie van de verschillende lysis-methoden en RNA-extractie protocols werd nagegaan door de concentratie en de integriteit van het RNA te bepalen.

2.2.1 Lysis

De wormen werden eerst gewassen met ASW in een embryoglaasje en verdoofd met MgCl_2 (7,14%). Vervolgens werden de verschillende lysismethoden getest met de 'RNeasy micro kit' (Qiagen, Venlo). Er zijn verschillende technieken mogelijk voor lysis van de wormen zoals malen, sonicatie of chemische lysis van de wormen.

Malen

De Mixer Mill (MM200, Retsch) wordt gebruikt voor het malen van biologische stalen in bevroren toestand. De stalen werden fijngemalen, door hevig te schudden, in een 2 ml epje met 2 glazen bolletjes ($d = 1\text{mm}$) of 1 stalen bolletje ($d = 4\text{mm}$) erin. Er werd gekeken naar de effecten op de RNA opbrengst en zuiverheid bij een variërende amplitude en duur van malen.

Sonicatie

De sonicator (Sonomatic 300, Langford Electronics) kan gebruikt worden om het celmembraan van biologische stalen te verstoren met behulp van geluidsgolven, waardoor de celinhoud vrijkomt. De stalen werden gedurende 5 minuten in de sonicator geplaatst. Vooraf werd er RNA later aan de stalen toegevoegd om het RNA te behouden.

Chemische lysis

Chemische lysis werd uitgevoerd door toevoeging van 25µl SDS buffer, 2,5 µl proteïnase K en 1 µl β-mercapto-ethanol aan het staal. Dit werd, samen met RNA later, gedurende 30 min in een warmwaterbad van 56°C geplaatst.

2.2.2 RNA extractie

Vervolgens werden er ook verschillende RNA extractie protocols uitgetest. Elk protocol is gebaseerd op een ander principe van RNA isolatie en vereist een aangepaste hoeveelheid materiaal. Deze protocols worden in de volgende paragrafen verder toegelicht.

Absorptie op siliconen membraan

Er werden 2 protocols uitgetest die gebaseerd zijn op de binding van het RNA op een siliconen membraan: 'RNeasy Micro Kit' (Qiagen, Venlo) en 'RNeasy Mini Kit' (Qiagen, Venlo). De micro- en minikit verschillen in de maximaal aangeraden hoeveelheid startmateriaal (micro: 5 mg; mini: 30 mg). Voor de micro kit werden 25 wormen en voor de mini kit 50 wormen gebruikt. Daarna werd de minikit ook getest voor 25, 35 en 45 wormen.

Absorptie op magnetische bolletjes

De 'Pickpen' (Quickpick, Isogen-life Sciences) kan gebruikt worden om het biologisch staal te mengen met magnetische partikels. In aanwezigheid van de geschikte buffer zal dit zorgen voor de binding van het RNA aan de magnetische partikels. Ander celmateriaal dat niet aan de magnetische partikels gebonden is kan vervolgens weggewassen worden. Voor deze techniek werd er gebruik gemaakt van 30 wormen.

Trizol-reagent

'Trizol®-reagent' (Invitrogen, Merelbeke) zorgt voor het behoud van de RNA integriteit tijdens de homogenisatie of lysis van het staal. Door de toevoeging van chloroform, gevolgd door centrifugatie, zal er een waterige en een organische waterige fase verschijnen. Het RNA bevindt zich enkel in de waterige fase. Isopropyl alcohol zal zorgen voor de precipitatie van het RNA. Er werd gebruik gemaakt van 500 wormen voor een Trizol®-extractie van RNA.

2.2.3 Bepaling van de concentratie RNA

Om de concentratie en de zuiverheid van het geëxtraheerde RNA te bepalen werd er gebruik gemaakt van de 'NanoDrop spectrofotometer' (ND-1000, Isogen Life Sciences). De RNA

opbrengst wordt gemeten bij een golflengte van 260 nm. De aanwezigheid van proteïnen en mogelijke onzuiverheden kan gedetecteerd worden bij een golflengte van respectievelijk 280 en 230 nm.

2.2.4 Bepaling van de integriteit van het RNA

De 'Bioanalyzer' (2100, Agilent Technologies) werd gebruikt om de zuiverheid van het RNA na te gaan. Dit toestel is een geautomatiseerd systeem dat gebaseerd is op een capillaire elektroforetische scheiding van RNA stalen.

2.3 LC50-test

Een LC50-test wordt uitgevoerd om de acute toxiciteit van een toxische stof bij een organisme te bepalen. De LC50 geeft de concentratie van de stof weer die voor 50% van de organismen letaal is tijdens een welbepaalde periode van blootstelling. Deze concentratie werd bepaald over 1 dag en 5 dagen. Er werd gestart met 10 wormen per conditie en het aantal dode wormen werd dagelijks geteld. Bij de LC50-test over 5 dagen werd *M. lignano* blootgesteld aan concentraties CdCl₂ van 0 µM tot 80 µM met een interval van telkens 5 µM. Bij de LC50-test over 24u werden de wormen blootgesteld aan concentraties tussen 0 µM en 600 µM CdCl₂ met een interval van 50 µM.

2.4 Bepaling van de genexpressie

Om de expressie van bepaalde genen te bepalen met behulp van real-time PCR dienen voorafgaand een aantal stappen doorlopen te worden, zoals lysis van het weefsel, extractie van het RNA en reverse transcriptie.

2.4.1 RNA extractie

Voor een RNA extractie werd er gebruik gemaakt van ongeveer 7,5 mg weefsel (25 wormen). De wormen werden eerst in een embryoglaasje gewassen met ASW en vervolgens gerelaxeerd met MgCl₂ (7,14%). De gefixeerde wormen werden in een 2 ml epje geplaatst met 2 glazen bolletjes (d = 1 mm). De disruptie van de wormen gebeurde mechanisch en in bevroren toestand met behulp van de Mixer Mill (MM200, Retsch; 45 sec, 80a). Om het staal te homogeniseren werd er een shredder (Qiagen, Venlo) gebruikt. De RNA extractie gebeurde met de 'RNeasy mini kit' (Qiagen, Venlo). De RNA-stalen werden geëluëerd in 17 µl RNase-vrij water. Het bekomen RNA werd ingevroren in vloeibare stikstof en vervolgens opgeslagen bij -70°C.

2.4.2 RT-PCR

De ‘QuantiTect Reverse Transcription (RT) Kit’ (Qiagen, Venlo) werd gebruikt voor de omzetting van RNA tot cDNA. Naast het Quantiscript Reverse Transcriptase bevat deze kit ook een stap om het genomisch DNA uit het RNA staal te verwijderen. De totale RT-reactie bestaat uit de volgende producten: 2 μ l gDNA Wipeout buffer, 1 μ l Quantiscript Reverse Transcriptase, 4 μ l Quantiscript RT buffer (bevat Mg^{2+} en dNTP's), 1 μ l RT-primer mix (random hexameren en oligo-dT) en 12 μ l template RNA. Voor de aanmaak van het cDNA werd het volgend PCR programma doorlopen met de ‘Eppendorf mastercycler gradient’ (Eppendorf, Hamburg):

- 30 minuten op 42°C: aanmaak van het cDNA door het reverse transcriptase
- 3 minuten op 95°C: inactivatie van het reverse transcriptase

Na amplificatie werden de stalen op dezelfde concentratie (50 ng/ μ l) gebracht door gebruik te maken van de RNA-concentraties die bepaald werden met de nanodrop (ND-1000, Isogen Life Sciences). Dit cDNA werd opgeslagen bij -20°C.

2.4.3 Primer ontwikkeling

De primer analyse software Primer Express v2.0 (Applied Biosystems, Lennik) werd gebruikt om primers te ontwikkelen op basis van de EST databank van *M. lignano*. De primerparen die ontwikkeld werden produceren een amplicon met ongeveer 100 baseparen. Aangezien er nog geen real-time experimenten uitgevoerd werden zijn er hiervoor nog geen geschikte primers beschikbaar voor *M. lignano*. Er werd gestart met het zoeken naar primersequenties voor mogelijke referentiegenen (β -actine, β -tubuline,...) en genen die betrokken kunnen zijn bij het verdedigingsmechanisme tegen cadmium (Catalase, HSP60,...). De primers werden getest door gebruikt te maken van PCR en gelelektroforese. Het cDNA werd geamplificeerd met behulp van het ‘Taq DNA polymerase’ (Qiagen, Venlo). De PCR mix bestaat uit 2,5 μ l van elk dNTP; 2,5 μ l CoralLoad PCR buffer; 0,25 μ l Taq DNA polymerase; 2,5 μ l forward primer (2 μ M); 2,5 μ l reverse primer (2 μ M) en 5 μ l RNase-vrij water. Er werd 2,5 μ l cDNA toegevoegd aan de PCR-mix. Om het volgende programma te doorlopen werd er gebruik gemaakt van de ‘Eppendorf mastercycler gradient’ (Eppendorf, Hamburg):

- 5 minuten op 95°C: activatie Taq DNA polymerase
 - 45 seconden op 95°C: denaturatie van het cDNA
 - 45 seconden op 40°C: aanhechting van de primers
 - 90 seconden op 72°C: extensie van het cDNA
 - 5 minuten op 72°C
- } 35 cycli

Na amplificatie werd het cDNA geladen op een 2% agarose gel in TBE buffer met GelRed (1 µl/10 ml) gedurende 40 min op 100 volt voor detectie van het amplicon.

2.4.4 Real-time PCR

Real-time PCR kan gebruikt worden voor amplificatie en vooral kwantificatie van het bekomen cDNA aan de hand van detectie met een fluorescente reporter. Het fluorescente signaal verandert in proportie met het gevormde cDNA in de reactie, en dit signaal wordt gevolgd in functie van de tijd. Aangezien er een kwantitatieve relatie bestaat tussen de hoeveelheid nucleïnezuren die er aanwezig zijn bij de start van de PCR reactie en de hoeveelheid die gevormd wordt tijdens de reactie kan de initiële hoeveelheid cDNA en dus ook de hoeveelheid RNA bepaald worden (40).

Een PCR reactie bestaat uit een exponentiële, een lineaire en een plateau fase. Tijdens de exponentiële fase verdubbelt het cDNA in elke cyclus. Wanneer de reactieproducten uitgeput raken zal de reactie vertragen, dit is de lineaire fase. Tenslotte zal de plateau fase bereikt worden, er wordt hier geen cDNA meer aangemaakt en het gevormde cDNA zal zelfs afgebroken worden. Kwantificatie moet dus gebeuren in de exponentiële fase, aangezien het PCR-product in deze fase gecorreleerd is met de initiële hoeveelheid RNA. Des te meer RNA er aanwezig is bij de start, des te sneller er een stijging in fluorescentie gedetecteerd wordt. Deze techniek biedt een voordeel ten opzichte van traditionele kwantitatieve PCR, waar de totale hoeveelheid cDNA pas wordt waargenomen na de plateau fase, als de reactie reeds afgelopen is (40). Bij real-time PCR wordt een drempelwaarde (Ct) bepaald in de log-lineaire fase na log-transformatie van de oorspronkelijke PCR-grafiek (40).

Voor fluorescentie-detectie werd gebruikt maakt van de ‘Power SYBR green master mix’ (Applied Biosystems, Lennik). Het AmpliTaq Gold[®] DNA polymerase wordt in deze master mix gebruikt om het cDNA te amplificeren. De SYBR green dye is een niet-sequentie specifieke fluorescerende intercalerende molecule die gebonden aan dubbelstrengig DNA oplicht. Bij denaturatie zal de dye bijgevolg niet fluoresceren. Bij primer-annealing zijn er enkele dyes die binden en tijdens de extensie zal dit aantal stijgen. Een nadeel van deze dye is dat primer-dimers ook fluoresceren. De specificiteit van de primers wordt gecontroleerd door, na afloop van de reactie, een smeltcurve op te stellen. Om een smeltcurve op te stellen wordt de fluorescentie gevolgd bij oplopende temperatuur waardoor het dubbelstrengig cDNA zal denatureren. Primer-dimers zijn korter en zullen bij een lagere temperatuur denatureren dan het specifieke product. De ‘ABIprism 7000’ (Applied Biosystems, Lennik) voert de PCR uit

en vangt de fluorescentie-emissie op. Deze fluorescentie wordt bij elke PCR cyclus na extensie gemeten en hierdoor kan de hoeveelheid cDNA gevolgd worden in de tijd.

Als controle wordt er bij real-time PCR ook gebruik gemaakt van een huishoudgen. Dit is een endogeen gen dat constant tot expressie komt in de cellen tijdens het experiment. Tijdens een real-time PCR komen er fouten voor die te wijten zijn aan kleine verschillen in de starthoeveelheid RNA of verschillen in de efficiëntie van cDNA-synthese en PCR-amplificatie. Door het gebruik van een huishoudgen als endogene controle kan de genexpressie genormaliseerd worden voor deze verschillen (40-41).

Aangezien er voor *M. lignano* nog geen geschikt huishoudgen gekend is werd er gestart met een normalisatie-experiment met behulp van een Visual Basic Algoritme (VBA) van *geNormTM* (41) en *NormFinder* (42). Deze programma's zoeken naar de meest geschikte referentiegenen en rangschikken ze volgens hun expressiestabiliteit. *geNormTM* kijkt ook naar het optimaal aantal huishoudgenen dat gebruikt moet worden door de berekening van een betrouwbaarheidsfactor, de V-score (<0,15). Er werden verschillende mogelijke huishoudgenen getest (Tabel 1): β -actine (β -ACT), β -tubuline (β -TUB), cytochroom C oxidase subeenheid IV (CCOS), caseïne kinase 2 (CK2), cystatine (CYS), glyceraldehyde 3-fosfaat dehydrogenase (GAPDH), ganglioside GM2 activator proteïne (GM2-AP), mitogen-activated proteïne kinase organizer 1 (MORGI), fosfolipide scramblase 1 (PSI), ribosomaal proteïne L13a (RPL13) en synaptogyne (SYN).

Tabel 1 De huishoudgenen met hun functie en primer sequenties.

Naam	Functie	Forward primer	Reverse primer
<i>β-ACT</i>	Cytoskelet	TCGGAGAAGTATCGATGCTCATG	GTCTAACCAATGGCTGACGACC
<i>β-TUB</i>	Cytoskelet	CAAAGAAAGCAGGCAGTTGTAGG	TCTTGCTCAGCAAAATTCGCGAG
<i>CCOS</i>	Mitochondriaal	GCATCATCCATTCTTCATCGAAGCTT	CATCGGTATTCTCATGCTAGTGTTCAG
<i>CK2</i>	Proteïne kinase	GCCTGGTACTGCAGCTGATAG	GCTATTTTTAGTCCACCCGGAATACC
<i>CYS</i>	Degradatie	GGGCTGCTCCTCCGGTTCTG	ACTCCTCAGACATCGGGACA
<i>GAPDH</i>	Glycolyse	GAGGCATTGGACACCACCTTG	GTTATCATCTCCGCTCCGTCTG
<i>GM2-AP</i>	Lipidenmetabolisme	TAATCTTCAATGCGACCCTCAAGC	CATCACCTGCCCGAGATTC
<i>MORGI</i>	Signaal transductie	CAGAGGCTTGCACAGATTGTC	GTTCACTCTGGCGAATCTATACG
<i>PSI</i>	Membraanproteïne	ACCAGATGTGTTCTCTGCTGC	TGACAGGCTCCGTACACCTG
<i>RPL13</i>	Ribosomaal proteïne	TTTCTCGACGGCCTTGGAGCGAA	CGAGGTCGGCTGGAAATACCA
<i>SYN</i>	Membraanproteïne	CGAAGGTGCCAATAGAGAAAAATGAGAA	AGGTGTTTCATCGATTGAAGCTCAT

In een volgend experiment werd de genexpressie van een aantal enzymen die mogelijk betrokken zijn bij de anti-oxidatieve verdediging nagegaan (Tabel 2). De geteste genen zijn catalase (*CAT*), calmoduline (*CAM*), heat-shock proteïne 60 (*HSP60*) en heat-shock proteïne 90 (*HSP90*).

Tabel 2 De stress-genen met hun functie en primer sequenties.

Naam	Functie	Forward primer	Reverse primer
<i>CAT</i>	Stress respons	TGACTGGCAGTTGCATGTAGTTG	TACTGTCCGGCCACATGATC
<i>CAM</i>	Signaal transductie	CGTCTTCAAGTTCAACAGTAGCAAATTG	GCAACATGTTACTGCTGTCTAGCAT
<i>HSP60</i>	Stress respons	TTTGCCATCCTTGACGGTAATGGAA	GGTGGCCACTATTAGCGCTAAT
<i>HSP90</i>	Stress respons	TGGTCAGTTCGGTGTGGCT	CCCAGACGTATTGCTCGTGG

Bij deze 2 experimenten werd er gebruik gemaakt van 4 biologische herhalingen per conditie. Het cDNA werd eerst 20 keer verdund. Vervolgens werd er 5 µl van het verdunde cDNA gepipetteerd bij 20 µl PCR mix in duplo in een 96 well-plaat. Deze PCR mix bestaat uit 12,5 µl Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Lennik); 0,75 µl forward primer (10 µM); 0,75 µl reverse primer (10 µM) en 6 µl RNase-vrij water.

In elke real-time reactie werden er ook no-template controls (NTC's) meegenomen. Deze NTC's bevatten 5 µl RNase-vrij water in plaats van 5 µl staal. Bij deze NTC's is er normaal geen DNA aanwezig en mag er dus geen fluorescentie optreden. Indien er toch fluorescentie waargenomen wordt is dit een teken van contaminatie of van primer-dimers.

Om de efficiëntie van de real-time PCR reactie te verhogen werden er ook verschillende enhancers (BSA, DMSO, glycerol, tween80) toegevoegd aan de reactie. Er werd, in plaats van 1 µl RNase-vrij water, 1 µl van deze enhancers toegevoegd aan de reactie (BSA: 20 µg/µl, DMSO, glycerol en tween80).

De 96-well platen met stalen werden ingezet in de ABIprism 7000 (Applied Biosystems, Lennik). Vervolgens werd het reactievolume ingesteld op 25 µl en aangegeven dat er een dissociatie curve opgesteld moet worden voor primer-dimer detectie. Ten slotte werd het volgende programma gestart:

- 15 min op 95°C: activatie AmpliTaq Gold[®] DNA polymerase
 - 15 sec op 95°C: denaturatie van het cDNA
 - 30 sec op 50-60°C: aanhechting van de primers
 - 30 sec op 72°C: extensie van het cDNA
- } 40 cycli
- Smeltcurve: bepaling van de primer-specificiteit

Op het einde van de real-time PCR-reactie werden er cycle threshold (Ct)-waarden verkregen. De Ct-waarden van de ‘genes of interest’ werden vervolgens genormaliseerd ten opzichte van de huishoudgenen volgens de comparatieve Ct-methode ($\Delta\Delta Ct$) voor relatieve kwantificatie van de genexpressie (43).

2.5 Visualisatie en lokalisatie ROS

Voor de *in vivo* kleuring van ROS kan *M. lignano* geïncubeerd worden in diaminobenzidine (DAB) en nitroblauw tetrazolium (NBT). DAB en NBT polymeriseren lokaal indien ze in contact komen met respectievelijk H_2O_2 en O_2° . *M. lignano* werd geïncubeerd in DAB (0,05 mg DAB/ml ASW, pH 3,8) of NBT (0,05 mg NBT/ml ASW) en tegelijk blootgesteld aan 0; 5 of 10 μM $CdCl_2$. Per conditie werden er 4 wormen geïncubeerd. Na 24 uur incubatie werd het organisme verdoofd in 1:1 ASW $MgCl_2$ (7,14%) gedurende 5 min. Detectie vond plaats met behulp van de ‘Nikon eclipse 80i’ (Nikon corporation) met vaste spacers onder het dekglasje.

2.6 Statistische analyse

De observaties van de LC50-test werden gedaan met de 0-1 methode (0=dood; 1=levend). Er werden 10 wormen per conditie gebruikt. Deze gegevens werden vervolgens geanalyseerd aan de hand van een probit-functie. Voor de genexpressie werd er gebruik gemaakt van 4 biologische herhalingen per conditie. De gegevens van het genexpressie-experiment werden geanalyseerd met éénweg-anova. Dit is een statistische test die nagaat of de populatiegemiddelden van groepen van elkaar verschillen. Op basis van een p-waarde van 0,05 werd besloten of de groepen significant van elkaar verschillen. De normaliteit en de homoscedasticiteit werden steeds gecontroleerd. De statistische analyses werden uitgevoerd met behulp van SAS v9.1.

3 RESULTATEN

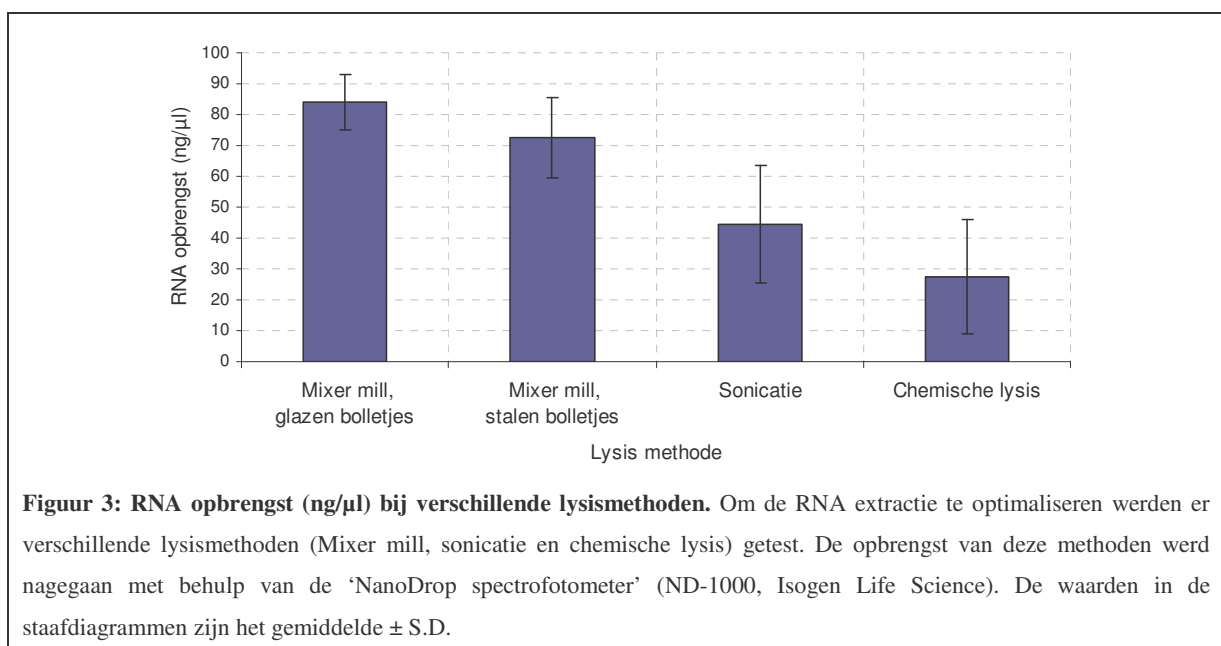
In deze studie werd gestart met het onderzoek naar de effecten van blootstelling aan cadmium op moleculair niveau bij de vrijlevende platworm *Macrostomum lignano*. Om na te gaan hoe dit organisme reageert op blootstelling aan dit metaal was het noodzakelijk een aantal technieken te optimaliseren. Vervolgens werd er gekeken naar de veranderingen in genexpressie van een aantal proteïnen betrokken bij de verdediging en naar de locatie van ROS in het organisme.

3.1 Optimalisatie

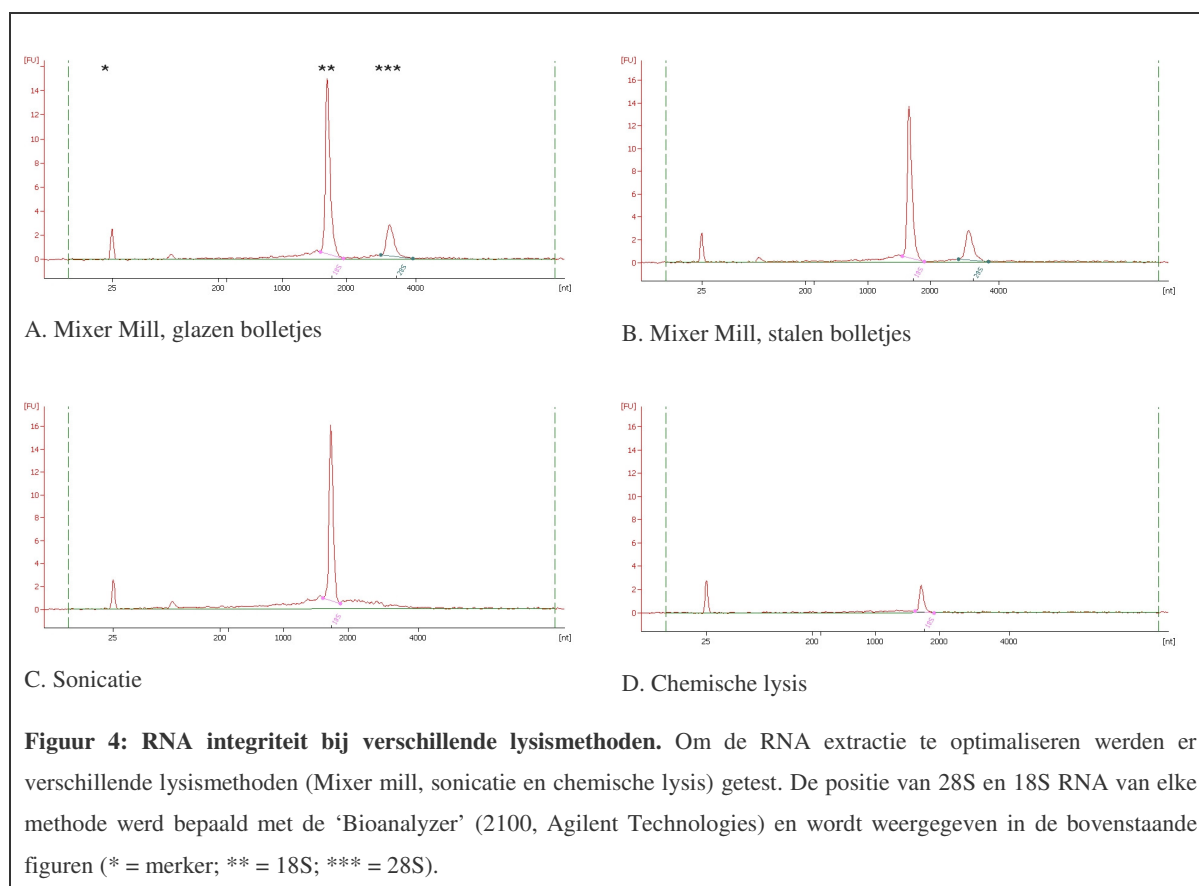
Bij een analyse op het niveau van genexpressie is het belangrijk te beschikken over RNA met hoge integriteit. Om de RNA extractie te optimaliseren werd er gekeken naar de opbrengst en zuiverheid, gebruik makende van verschillende lysis-methoden en RNA-extractie protocols.

Lysis

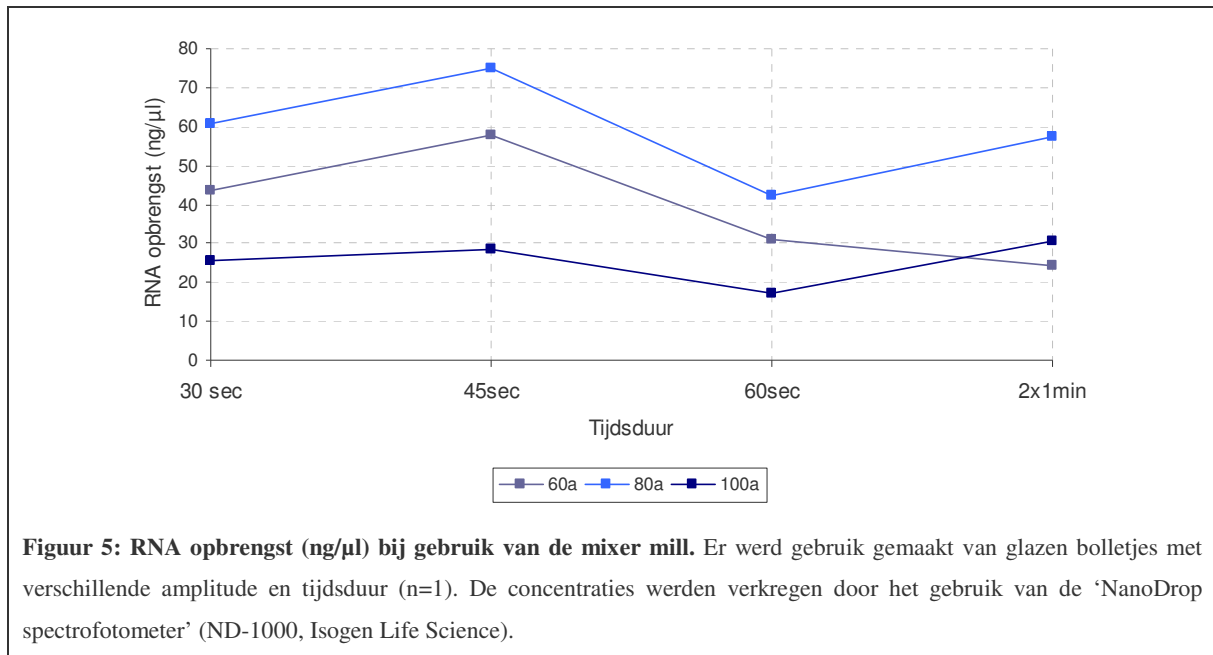
Er werden verschillende lysis-methoden getest met behulp van de ‘RNeasy micro kit’ (Qiagen, Venlo). Bij het gebruik van de Mixer Mill (MM200, Retsch) werden zowel glazen als stalen bolletjes gebruikt. Een tweede methode voor mechanische lysis was de sonicatie. Tenslotte werd er ook nog een chemische lysis uitgetest. De RNA opbrengst is het laagst bij de chemische lysis en de sonicatie. Bij het gebruik van de mixer mill is de RNA opbrengst het hoogst indien er gebruik gemaakt wordt van glazen bolletjes (Figuur 3).



Er werd ook gekeken naar de integriteit van het RNA bij de verschillende lysismethoden. Na sonicatie en chemische lysis wordt enkel 18S gedetecteerd, bij gebruik van de mixer mill zijn zowel 28S als 18S nog intact. Hieruit blijkt dat de integriteit niet behouden blijft bij sonicatie en chemische lysis, maar wel bij het gebruik van de Mixer Mill (MM200, Retsch) (Figuur 4).

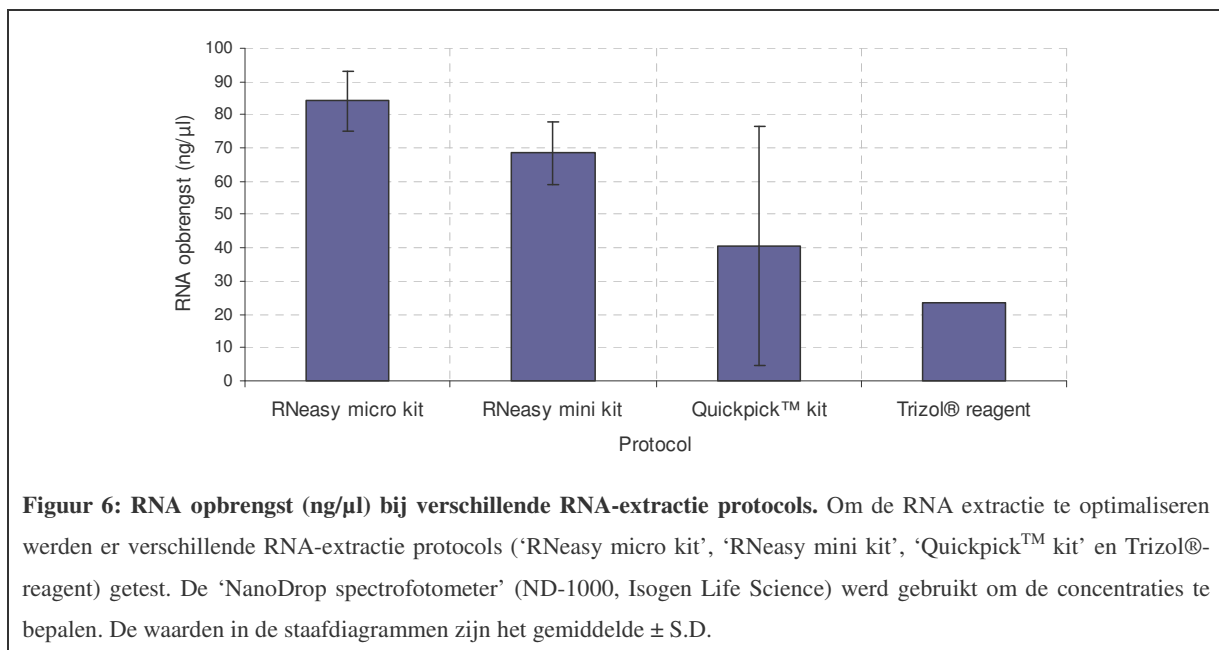


Aangezien de opbrengst het hoogst is bij gebruik van de mixer mill en glazen bolletjes werd er vervolgens gekeken naar de RNA opbrengst door de amplitude en de tijdsduur van het malen te variëren. Er is een toename van de RNA opbrengst (ng/μl) bij malen van 30 sec tot 45 sec, bij langere tijdsduur is de RNA opbrengst terug gedaald. De RNA opbrengst is het hoogste na malen van het staal bij amplitude 80 gedurende 45 seconden (Figuur 5).

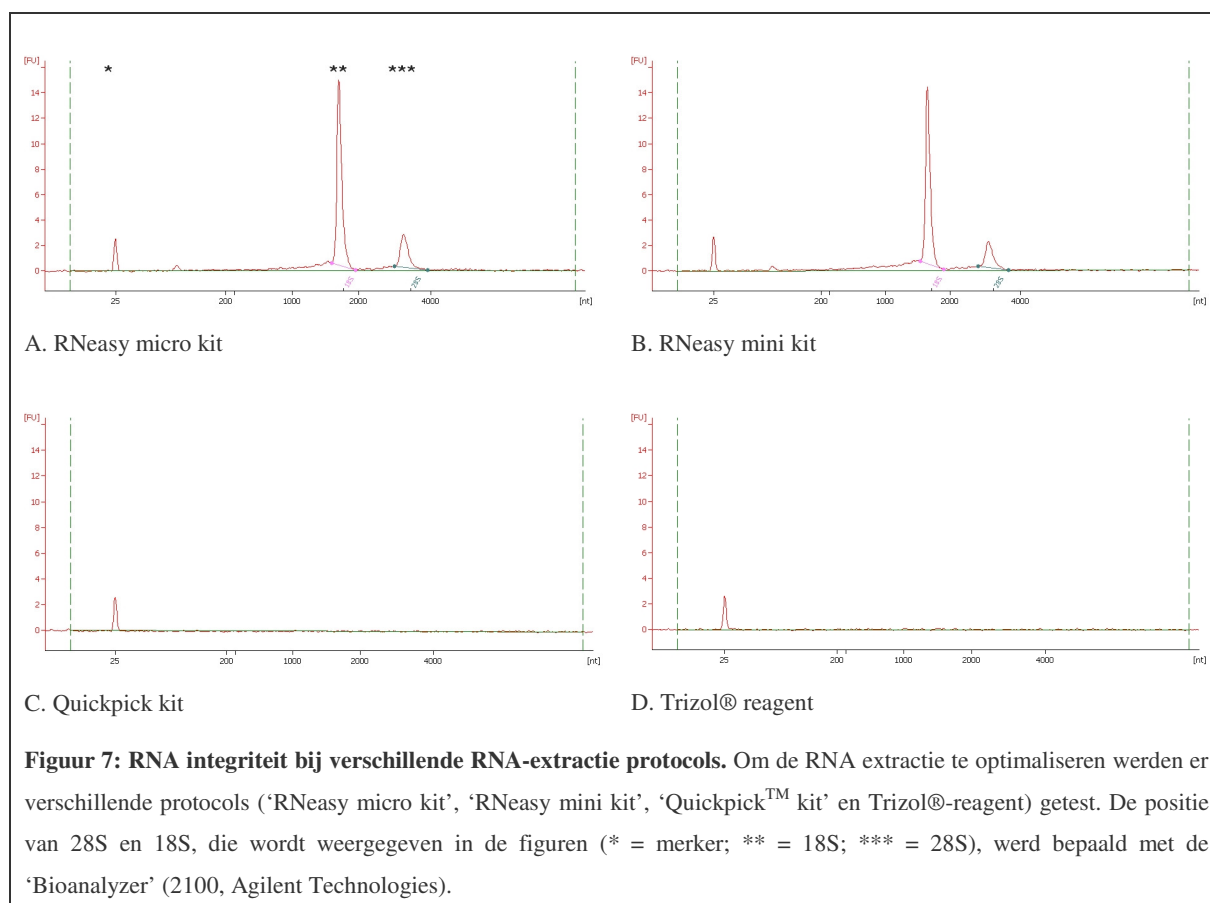


RNA-extractie protocols

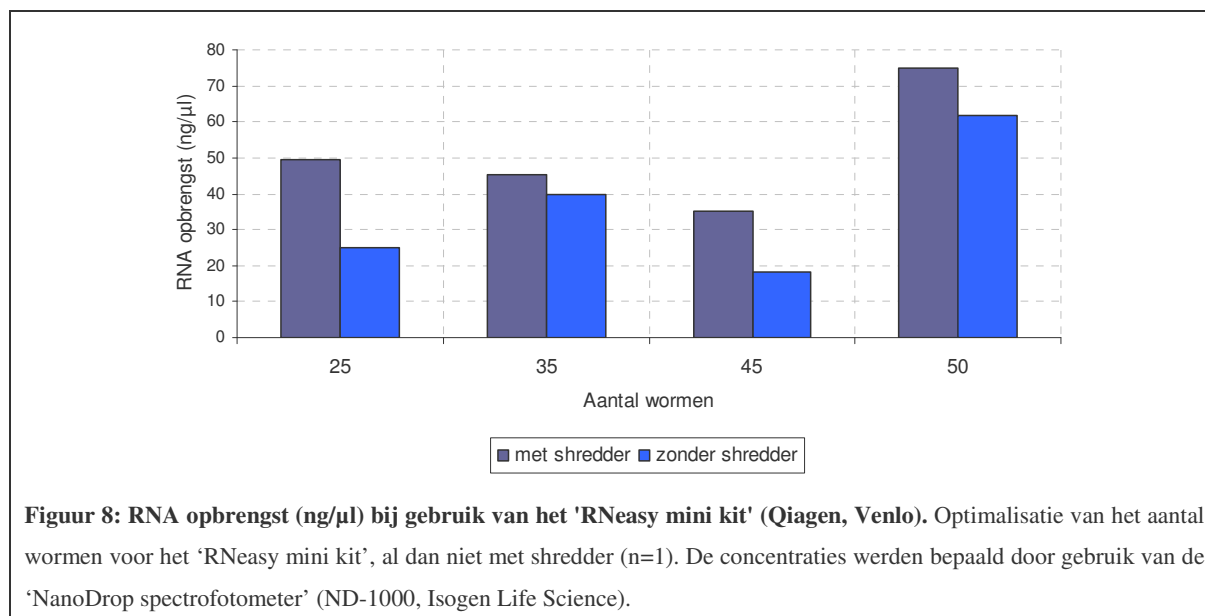
Om de RNA extractie te optimaliseren werden er verschillende RNA-extractie protocols uitgetest. De 'RNeasy micro kit' (Qiagen, Venlo) en 'RNeasy mini kit' (Qiagen, Venlo) hebben de hoogste RNA opbrengst. De RNA opbrengst bij het gebruik van de 'Quickpick kit' (Isogen-life sciences) was erg variabel en lag gemiddeld lager dan bij de 'RNeasy micro en mini kit'. De RNA opbrengst van de Trizol®-extractie (Invitrogen, Merelbeke) is het laagst. (Figuur 6). Deze Trizol®-extractie werd éénmalig uitgevoerd.



Na analyse van de RNA-integriteit bij de verschillende RNA-extractie protocols bleek, aan de hand van de aanwezigheid van 28S en 18S, dat deze enkel behouden blijft bij gebruik van de 'RNeasy micro kit' en 'RNeasy mini kit'. Bij de 'Quickpick kit' en de Trizol®-extractie zijn 28S en 18S niet intact en blijft de integriteit van het RNA dus niet behouden (Figuur 7).



Voor een RNA extractie met de 'RNeasy mini kit' werden normaal 50 wormen gebruikt. De kit werd ook getest met minder dan 50 wormen, met of zonder shredder (Qiagen, Venlo) voor homogenisatie. De RNA opbrengst is over de hele lijn hoger bij het gebruik van een shredder. Een RNA extractie met minder dan 50 dieren blijkt nog voldoende opbrengst te geven om mee verder te werken (Figuur 8).



Real-time PCR

De real-time PCR-reactie werd eveneens geoptimaliseerd. Er werden verschillende enhancers (BSA, DMSO, glycerol en tween80) toegevoegd aan de reactie om aspecifieke bindingen te reduceren. Maar de reactie verloopt hierdoor niet efficiënter in vergelijking met een reactie zonder de toevoeging van enhancers (resultaten niet weergegeven).

3.2 Toxiciteitstest

Er werd voor *M. lignano* een LC50-waarde gevonden van 350,26 μM CdCl₂ (1 dag) en 55,12 μM CdCl₂ (5 dagen) (Tabel 3).

Tabel 3: LC50 van *M. lignano* na blootstelling aan verschillende concentraties CdCl₂ over 1 dag en 5 dagen.

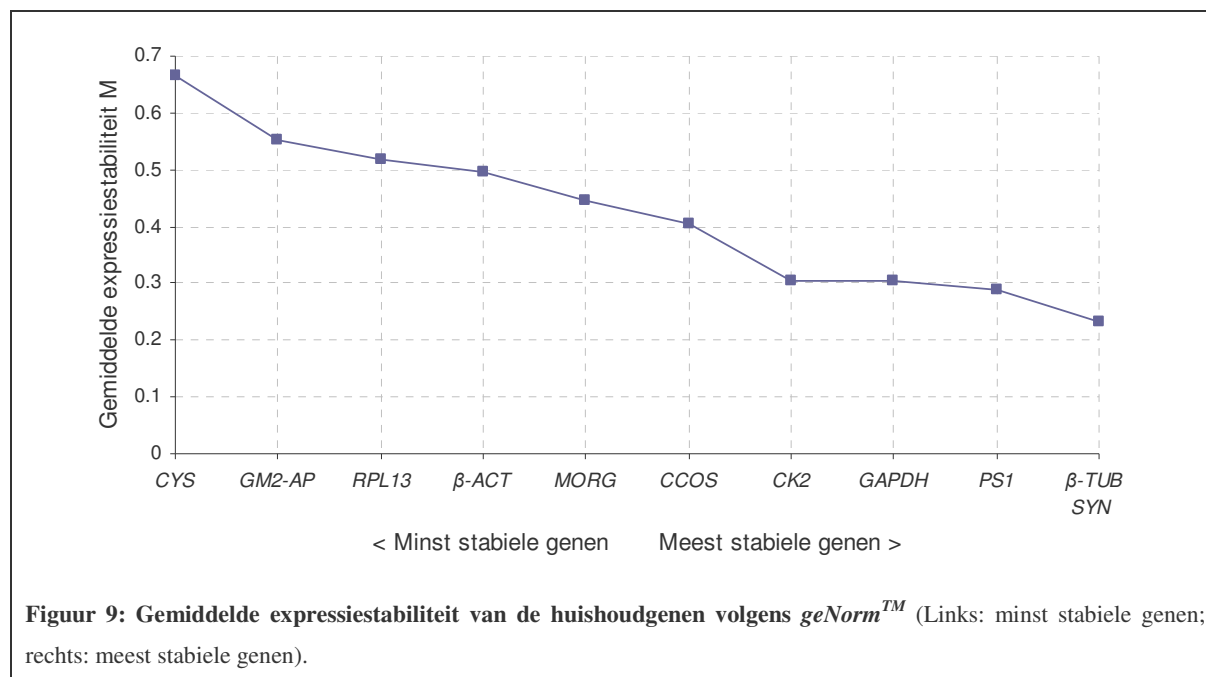
	LC50 (μM CdCl ₂)	95% betrouwbaarheidsinterval (μM CdCl ₂)	
1 dag	350,26	199,95	410,95
5 dagen	55,12	47,76	62,97

3.3 Normalisatie-experiment

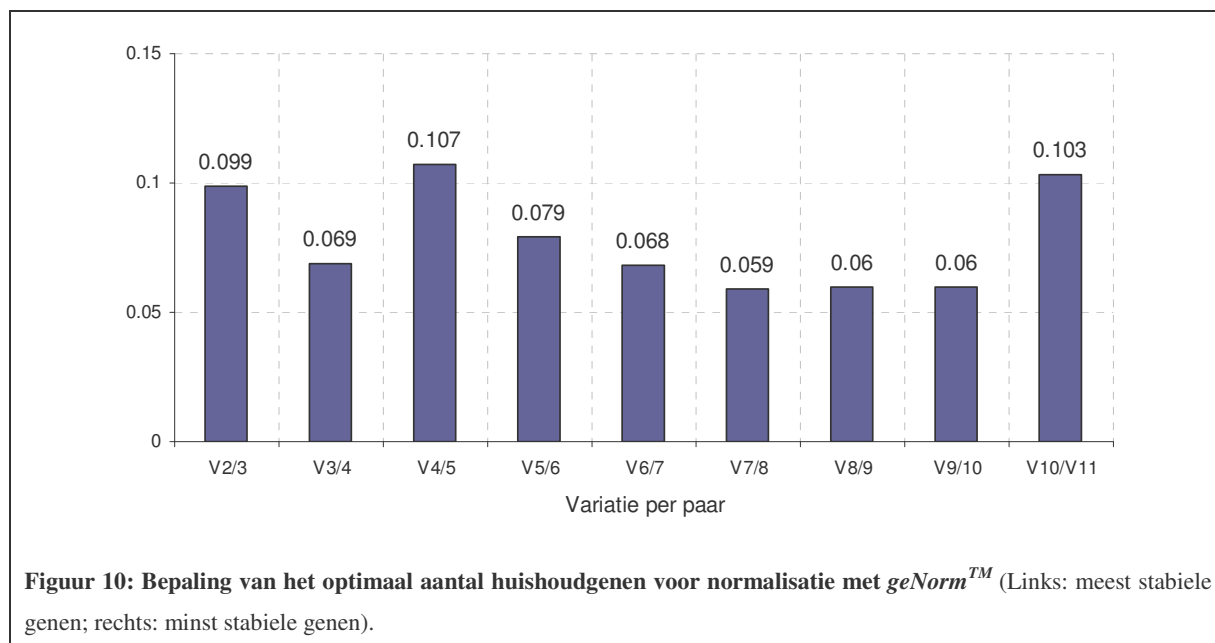
Bij real-time PCR is het belangrijk te beschikken over een endogeen gen dat stabiel blijft gedurende de behandeling met cadmium. Er werd gezocht naar stabiele huishoudgenen met een programma van *geNorm*TM (41) en *NormFinder* (42).

3.3.1 *geNorm*TM

*geNorm*TM rangschikt de genen volgens een stabiliteitswaarde M, van het minst stabiele (grote M-waarde) tot het meest stabiele (kleine M-waarde): *CYS* - *GM2-AP* - *RPL13* - β -*ACT* - *MORG* - *CCOS* - *CK2* - *GAPDH* - *PS1* - β -*TUB/SYN*. *geNorm*TM stelt β -*TUB* en *SYN* voor als beste combinatie bij blootstelling van *M. lignano* aan verschillende concentraties cadmium (0, 5 en 10 μ M CdCl₂; n=4) (Figuur 9).

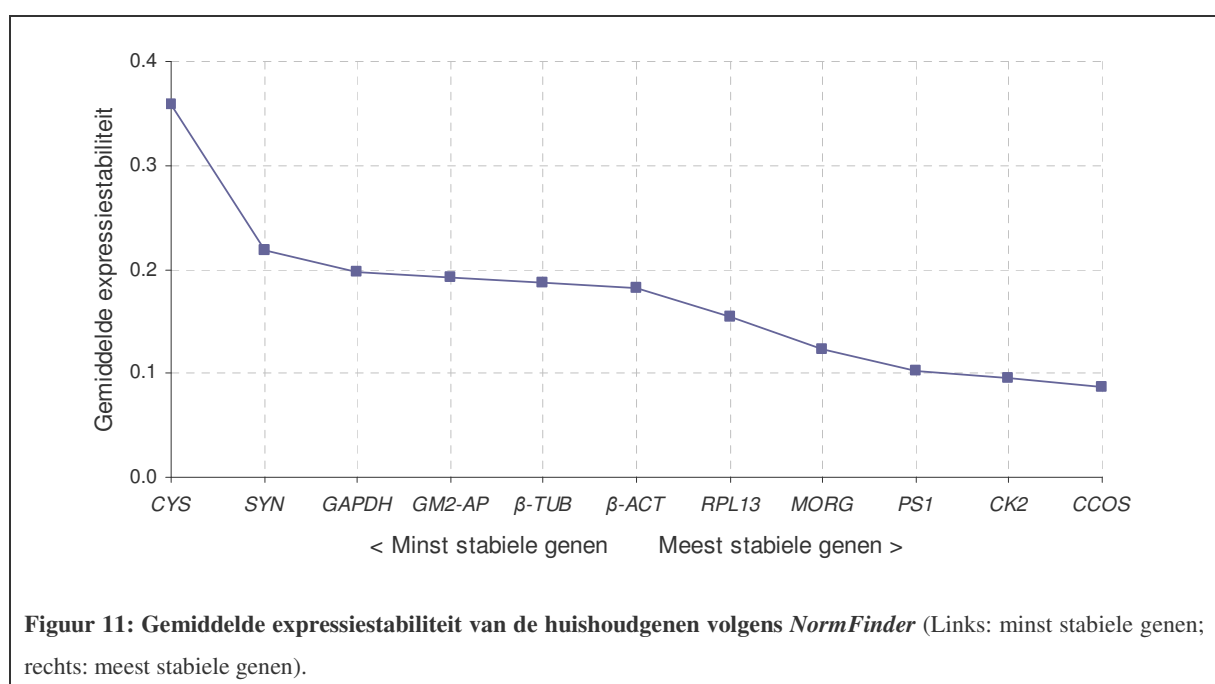


Er wordt een stabiliteitswaarde V bekomen van 0,099 bij de 2 meest stabiele genen. De toevoeging van een derde huishoudgen zal de betrouwbaarheid van de normalisatie niet doen toenemen (Figuur 10).



3.3.2 *NormFinder*

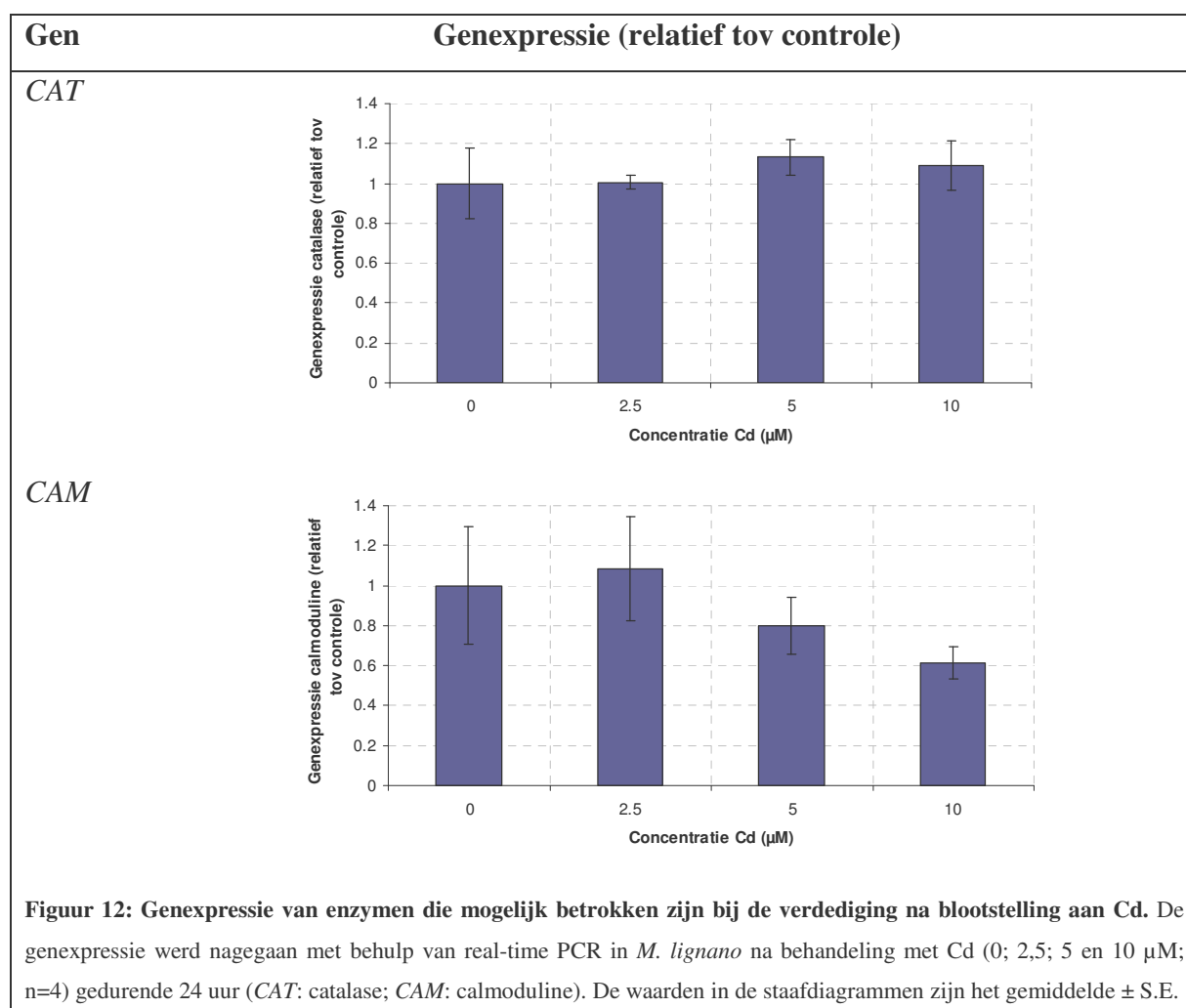
NormFinder rangschikt de genen volgens een stabiliteitswaarde, van het minst stabiele (grote stabiliteitswaarde) tot het meest stabiele (kleine stabiliteitswaarde): *CYS* - *SYN* - *GAPDH* - β -*TUB* - *GM2-AP* - β -*ACT* - *RPL13* - *PS1* - *MORG* - *CK2* - *CCOS*. Bij blootstelling van *M. lignano* aan verschillende concentraties cadmium (0, 5 en 10 μ M CdCl₂; n=4) blijkt volgens *NormFinder* een combinatie van *CK2* en *CCOS* het beste voor normalisatie te zijn (Figuur 11).

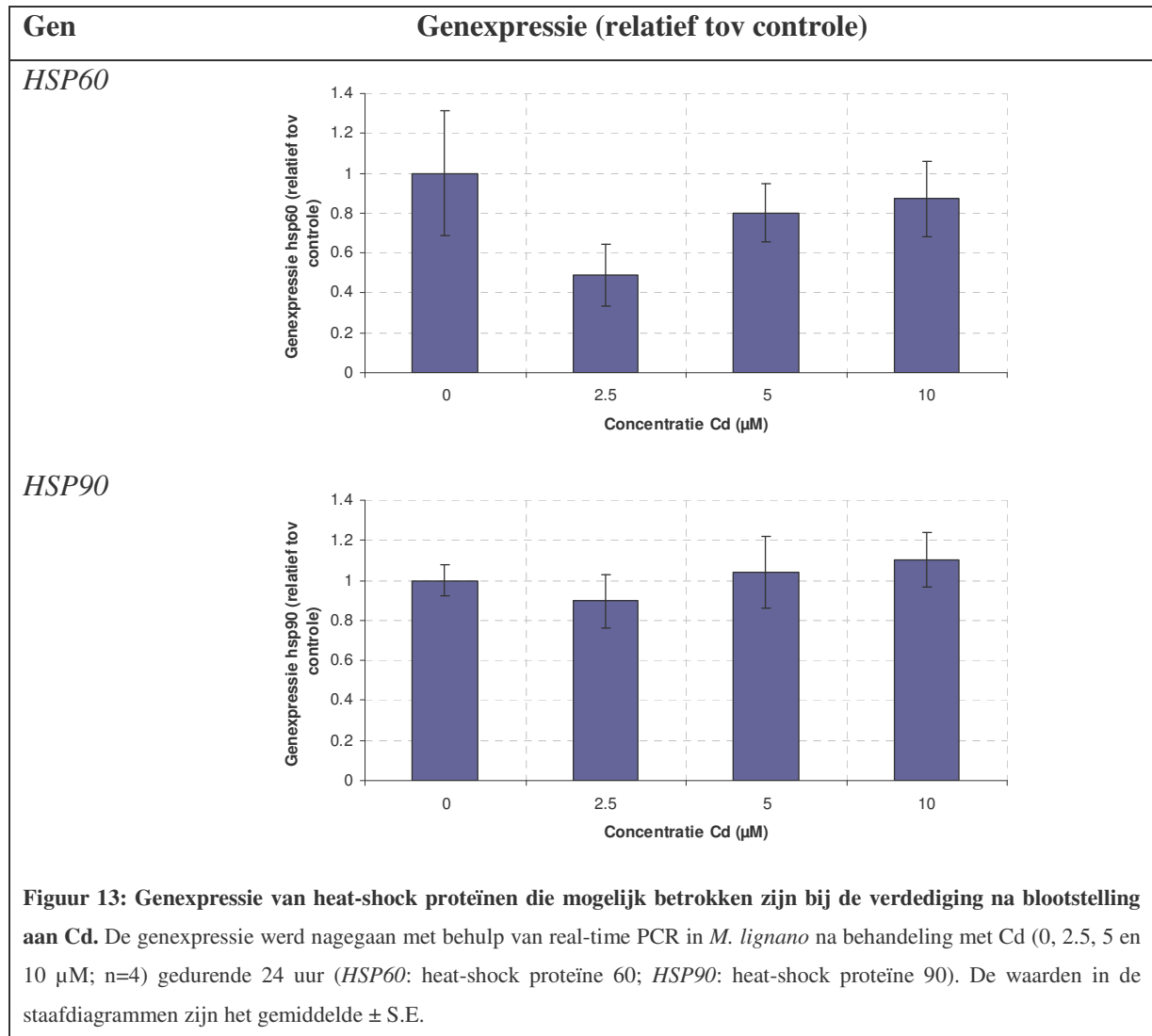


3.4 Genexpressie

De genexpressie van enkele enzymen die mogelijk betrokken zijn in de verdediging na blootstelling aan cadmium werd nagegaan met behulp van real-time PCR. Dit werd gemeten in adulte specimen van *M. lignano* na blootstelling aan verschillende concentraties Cd (0; 2,5; 5 en 10 μM CdCl₂) gedurende 24 uur. Er werd genormaliseerd voor 3 huishoudgenen die het meest geschikt waren volgens de analyses van *geNorm*TM en *NormFinder*. Er werd ook nagegaan of er een verschil in genexpressie was indien er genormaliseerd werd voor 2 huishoudgenen (resultaten niet expliciet weergegeven). De resultaten van de genexpressie van *CAT*, *CAM*, *HSP60* en *HSP90* worden weergegeven in figuur 12 en 13.

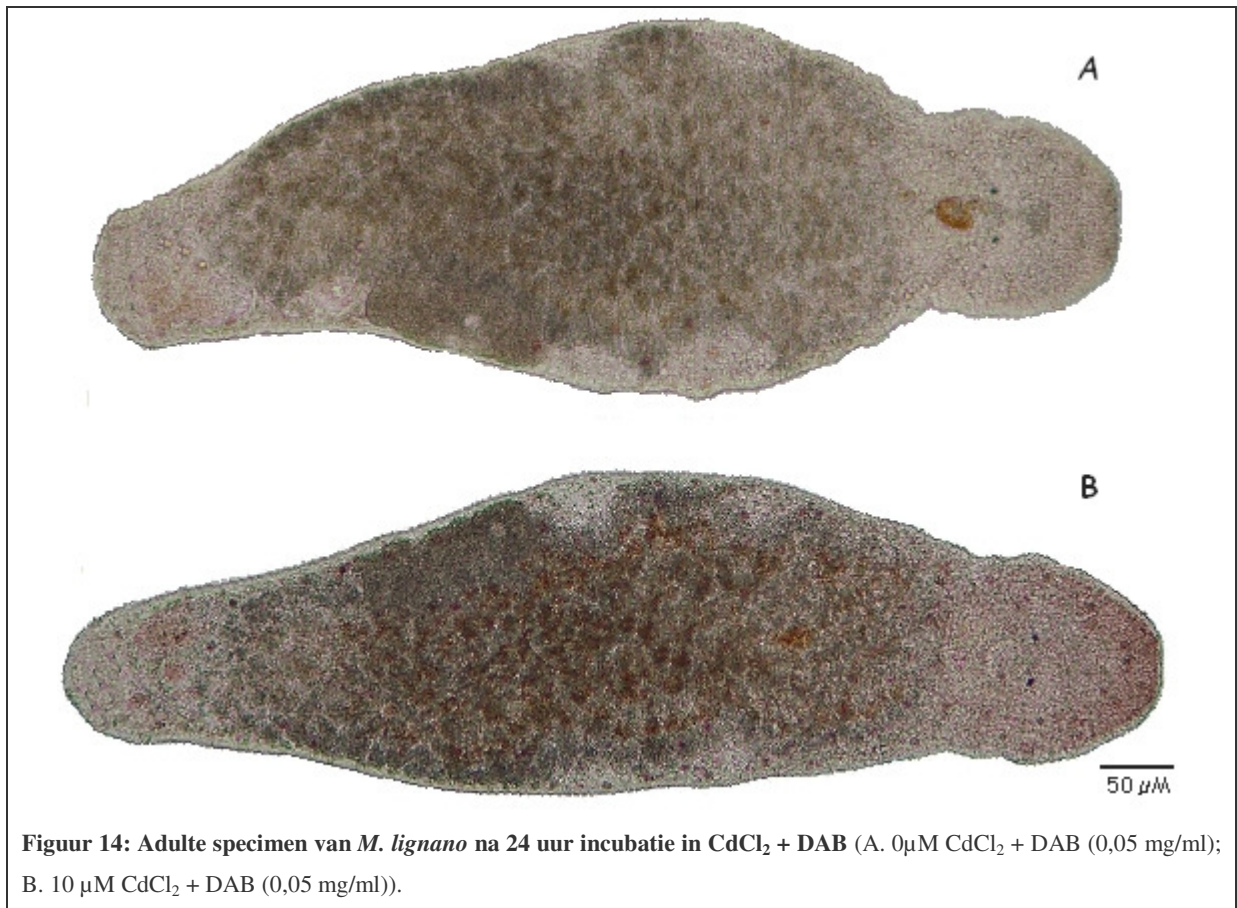
Er zijn geen significante verschillen na blootstelling aan Cd (0; 2,5; 5 en 10 μM) bij de 4 geteste enzymen (*CAT*: $p = 0,9289$; *CAM*: $p = 0,4113$; *HSP60*: $p = 0,5109$; *HSP90*: $p = 0,8246$). De genexpressie van *CAT* en *HSP90* vertoont geen visuele verschillen. *HSP60* daalt gering na blootstelling aan 2,5 μM Cd. Bij *CAM* wordt er een lichte daling waargenomen na blootstelling aan 5 en 10 μM Cd.



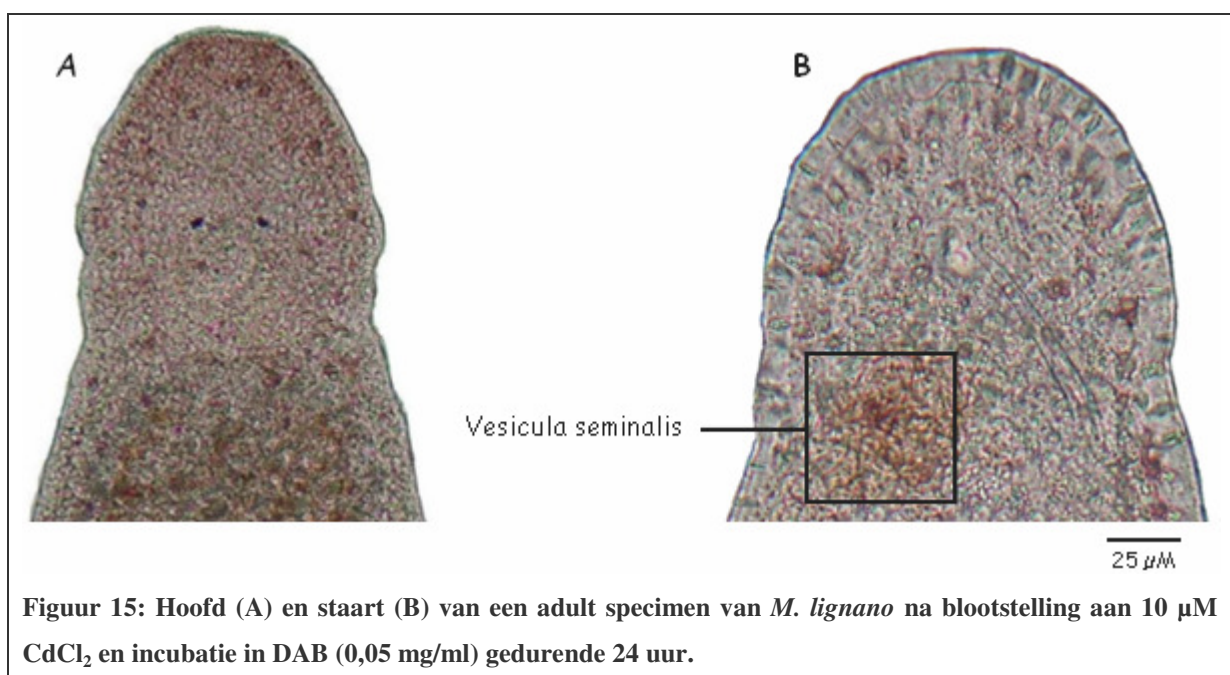


3.5 ROS bij *M. lignano*

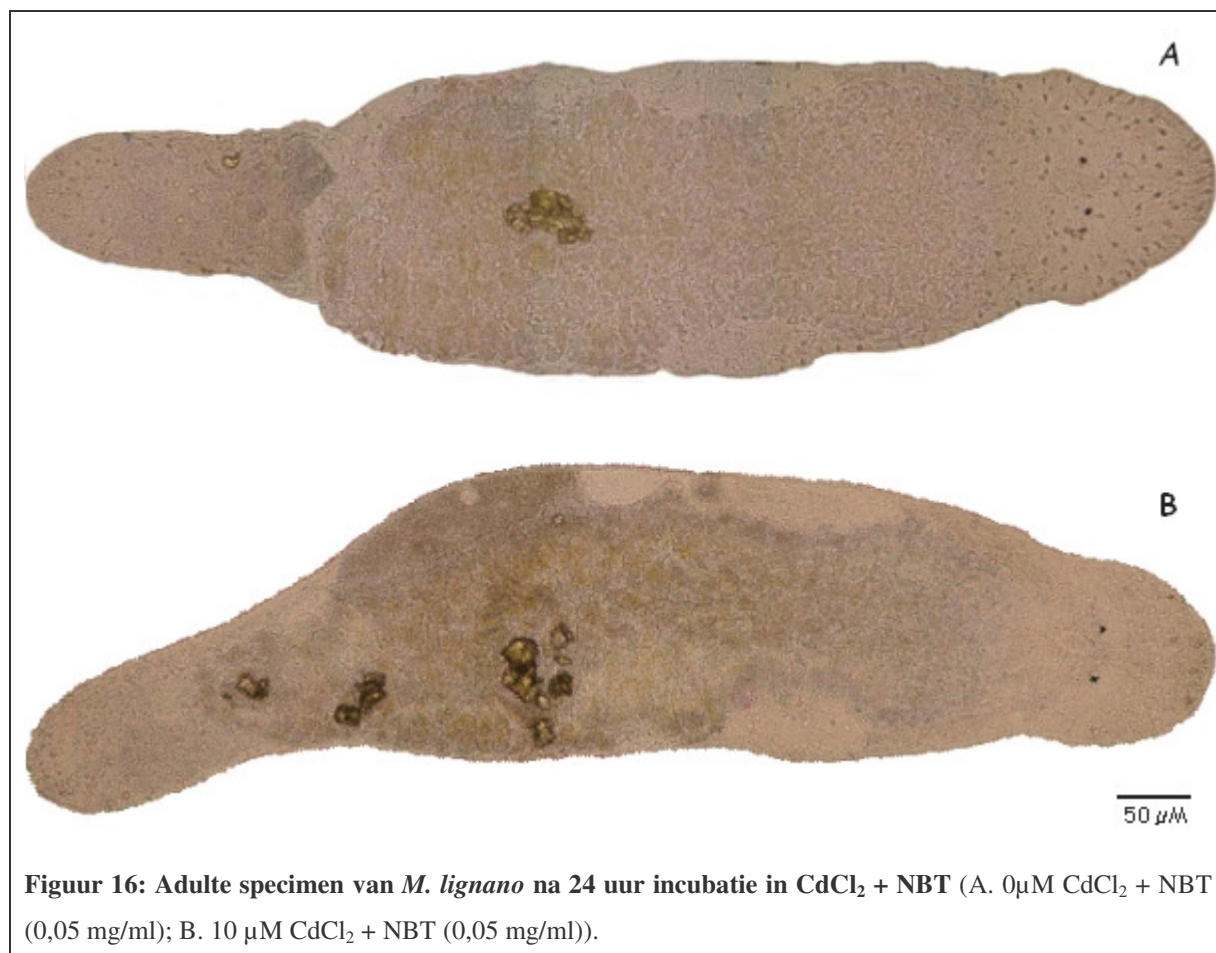
Om ROS te detecteren bij *M. lignano* werd het organisme gedurende 24 uur blootgesteld aan cadmium en tegelijk geïncubeerd in DAB en NBT (Figuur 14, Figuur 16). Indien het organisme blootgesteld wordt aan 0 µM CdCl₂ is er, bij incubatie in DAB (0,05 mg/ml), geen verkleuring waarneembaar (Figuur 14A). De rood-bruine kleuring in de darm bij beide wormen wordt niet veroorzaakt door de incubatie in DAB maar dit is het voedsel dat de organismen opgenomen hebben. Bij blootstelling aan 5 µM CdCl₂ is er een licht rood-bruine kleur waar te nemen. Bij blootstelling aan 10 µM is deze kleuring intensiever (Figuur 14B).



De rood-bruine kleuring na blootstelling aan 10 μM CdCl₂ en incubatie in DAB gedurende 24 uur komt vooral in de kop en de staart tot uiting, meer bepaald in kliertjes rostraal van de ogen en in de vesicula seminalis (Figuur 15).



Indien het organisme blootgesteld werd aan $0 \mu\text{M CdCl}_2$ is er, bij incubatie in NBT ($0,05 \text{ mg/ml}$), geen verkleuring waarneembaar (Figuur 16A). Bij blootstelling aan $10 \mu\text{M CdCl}_2$ is er een duidelijke blauwe kleuring die over het gehele lichaam verspreid is, maar opvallend ontbreekt in de testes en ovaria (Figuur 16B).



Figuur 16: Adulte specimen van *M. lignano* na 24 uur incubatie in $\text{CdCl}_2 + \text{NBT}$ (A. $0 \mu\text{M CdCl}_2 + \text{NBT}$ ($0,05 \text{ mg/ml}$); B. $10 \mu\text{M CdCl}_2 + \text{NBT}$ ($0,05 \text{ mg/ml}$)).

4.1 Optimalisatie

Grote hoeveelheden platwormen kweken is intensief werk en vraagt veel tijd. Daarenboven zijn RNA extracties vertrekkende van kleine hoeveelheden materiaal een delicate procedure. Ook vereisen transcriptoom analyses zoals real-time PCR en micro-array een hoge integriteit en kwaliteit van het RNA. Het is dus belangrijk om een efficiënte methode voor RNA extractie te ontwikkelen met zo weinig mogelijk startmateriaal.

Lysis

Lysis van het weefsel is een belangrijke stap tijdens een RNA extractie, er mag geen materiaal verspild worden. De hoogste opbrengst en de beste RNA integriteit werd bekomen met de mixer mill met glazen bolletjes. Sonicatie en chemische lysis waren minder efficiënt en behielden de integriteit van het RNA niet. Deze resultaten kunnen op 2 manieren verklaard worden. Ten eerste vindt het malen van de stalen plaats in bevroren toestand, in tegenstelling tot de sonicatie en chemische lysis. Hierdoor krijgt het RNA minder kans om te degraderen tijdens de lysisstap. Een tweede verklaring is dat de epjes gesloten blijven tijdens het malen van de stalen, net zoals tijdens de sonicatie, zodat er geen contaminatie met RNases kan optreden. Op basis van onze resultaten blijkt duidelijk dat gebruik van de mixer-mill en glazen bolletjes in dit geval de meest efficiënte methode is voor lysis van het materiaal. Uit een studie met platenmateriaal bleek dat zowel het malen van de stalen, als het gebruik van mortier en stamper de hoogste RNA opbrengst en de beste integriteit van het RNA leverde (44). De mortier en stamper kunnen bij *M. lignano* echter niet gebruikt worden omdat de hoeveelheid beschikbaar materiaal te klein is voor deze techniek.

De resultaten laten duidelijk zien dat het malen de beste resultaten levert bij een amplitude van 80 gedurende 45 sec (Figuur 5). Bij een amplitude van 60 is de lysis niet compleet, maar een amplitude van 100 is te hoog waardoor het RNA wordt afgebroken. Een tijdsduur van 30 sec is te kort, maar indien er langer als 45 sec gemixt wordt ontdooit het materiaal waarschijnlijk, waardoor de RNA opbrengst lager ligt. Indien er gemixt wordt gedurende 2 keer 1 min ligt de opbrengst terug hoger, aangezien er langer gemixt wordt en het materiaal ondertussen opnieuw wordt ingevroren.

RNA extractie

Om de RNA extractie te optimaliseren werden er verschillende commerciële kits getest. Elke kit is gebaseerd op een ander principe van RNA isolatie en vereist een aangepaste hoeveelheid materiaal. De 'RNeasy micro kit' (Qiagen, Venlo) kan gebruikt worden bij een kleinere hoeveelheid startmateriaal dan de 'RNeasy mini kit' (Qiagen, Venlo). De 'Pickpen' (Quickpick, Isogen-life Sciences) is qua startmateriaal vergelijkbaar met de 'RNeasy mini kit'. De Trizol[®]-extractie vereist het gebruik van veel weefsel.

Bij gebruik van een 'RNeasy kit' is de opbrengst hoog en blijft de integriteit van het RNA behouden (Figuur 6, Figuur 7A-B). De resultaten van de 'Pickpen' zijn erg variabel en de integriteit blijft niet behouden (Figuur 6, Figuur 7C). In tegenstelling tot gegevens uit de literatuur (44), geeft de Trizol[®]-extractie in ons onderzoek een zeer lage RNA opbrengst, waarbij de integriteit van het RNA ook niet behouden blijft (Figuur 6, Figuur 7D). De variabele resultaten van de 'Pickpen' kunnen te wijten zijn aan het feit dat het materiaal chemisch gelyseerd en slecht gehomogeniseerd werd. Een Trizol[®]-extractie is in dit soort experimenten praktisch niet haalbaar doordat deze extractie relatief grote hoeveelheden startmateriaal vergt, en dus een groot aantal wormen vereist. De 'RNeasy micro kit' levert de beste resultaten, maar indien er rekening gehouden wordt met zowel de kostprijs als het aantal dieren dat nodig is, is het aantrekkelijker om gebruik te maken van de 'RNeasy mini kit', liefst met minder dan 50 wormen. Uit de resultaten blijkt dat de RNA opbrengst bij de 'RNeasy mini kit' optimaal is bij het gebruik van 50 wormen. Maar indien er 25 wormen gebruikt worden is er ook nog voldoende RNA opbrengst om mee verder te werken (Figuur 8). Uit de resultaten blijkt eveneens dat het gebruik van een shredder (Qiagen, Venlo) voor homogenisatie van het weefsel een hogere RNA opbrengst geeft, onafhankelijk van de hoeveelheid materiaal (Figuur 8).

De meest ideale methode voor RNA-extractie bij *M. lignano*, rekening houdend met zowel opbrengst, integriteit als arbeidsintensiteit, start dus van 25 wormen. De lysis wordt uitgevoerd met de mixer-mill en 2 glazen bolletjes. Er wordt gemixt met een amplitude van 80 gedurende 45 sec. De RNA extracties worden uitgevoerd met behulp van de 'RNeasy mini kit' (Qiagen, Venlo) en een shredder voor homogenisatie.

Real-time PCR

Bij PCR is het nuttig om enhancers toe te voegen indien er zich inhibitoren in het staal bevinden (45). Inhibitoren kunnen in deze studie mogelijk afkomstig zijn van het ASW waar de organismen in leven of de $MgCl_2$ waarin de organismen verdoofd worden. Toevoeging van enhancers leverde geen meerwaarde op in ons experiment (resultaten niet weergegeven). Om zeker te zijn of er inhibitoren in het staal aanwezig zijn kan er een spud-assay uitgevoerd worden (46).

4.2 Normalisatie

Normalisatie van genexpressie is noodzakelijk omdat de stalen die men wilt vergelijken verschillen kunnen vertonen in de hoeveelheid startmateriaal, de hoeveelheid inhibitoren, de kwaliteit van het cDNA,... (47). Om betrouwbare resultaten te verkrijgen wanneer de biologische significantie van genexpressie bestudeerd wordt, is het noodzakelijk te normaliseren ten opzichte van een endogeen referentiegen. De expressie van dit huishoudgen mag niet beïnvloed worden door de behandeling. Oorspronkelijk werd er voornamelijk gebruik gemaakt van *GAPDH*, β -*ACT*, *18S* en *28S rRNA* als intern controlegen (48). Deze genen bleken echter bij verschillende studies niet altijd even stabiel te zijn (40,49). Zo is β -actine een veel gebruikt huishoudgen (48), maar bij de aardworm *Lumbricus rubellus* werd vastgesteld dat dit gen in sommige gevallen niet geschikt was als interne controle (50). Bij blootstelling aan koper waren er geen significante verschillen, maar na behandeling met cadmium werd er wel een significante verandering waargenomen in de expressie van β -actine (50). Er bestaat dus geen universeel huishoudgen, waardoor het aangewezen is om te zoeken naar een optimaal huishoudgen voor elk specifiek experiment en/of organisme.

Om de meest stabiele genen te identificeren bij blootstelling aan cadmium in dit experiment werd er gebruik gemaakt van 2 verschillende Visual Basic Algoritmes (VBA): *geNormTM* (41) en *NormFinder* (42). *geNormTM* vergelijkt de relatieve expressie voor 2 genen in verschillende stalen. Bij elke vergelijking wordt het gen met de grootste variatie geëlimineerd, en dit proces wordt herhaald tot er één paar genen overblijft (41). Deze 2 genen worden verondersteld optimale controle genen te zijn. *NormFinder* kijkt naar de variatie tussen de behandelingsgroepen. Voor elk gen wordt zowel de variatie binnen één groep als tussen de groepen berekend. *NormFinder* selecteert 2 genen met compenserende expressie als optimale controle genen (42). Volgens *geNormTM* zijn β -*TUB* en *SYN* de 2 meest stabiele genen in onze studie (Figuur 9). *NormFinder* stelt *CK2* en *CCOS* voor als de beste combinatie voor normalisatie van de genexpressie (Figuur 11). *geNormTM* kijkt ook naar het optimaal aantal

huishoudgenen voor normalisatie. Bij gebruik van de 2 meest stabiele huishoudgenen werd er een V-score verkregen van 0,099 die aangeeft dat het gebruik van een derde huishoudgen de betrouwbaarheid niet verder doet toenemen (Figuur 10). Opmerkelijk is dat er in dit experiment geen volledige overeenkomst is tussen de analyse met *geNorm*TM en *NormFinder*. In een studie naar xenobiotica in mariene zoogdieren met huidbiopsies van dolfijnen waren de resultaten van *geNorm*TM en *NormFinder* meer identiek aan elkaar (51).

Volgens *geNorm*TM is het in onze studie voldoende indien er gebruik gemaakt wordt van de 2 meest stabiele huishoudgenen. Maar indien er met zowel *geNorm*TM als *NormFinder* rekening gehouden wordt zullen er meer dan 2 huishoudgenen gebruikt moeten worden bij analyse van de resultaten. De 2 genen die *geNorm*TM voorstelt zijn beide even stabiel, de genen die *NormFinder* voorstelt komen compenserend tot expressie. Er werd beslist gebruik te maken van één gen dat voorgesteld werd door *geNorm*TM en de twee genen die door *NormFinder* voorgesteld werden als beste combinatie. Er werd gekozen voor *CK2* en *CCOS* omdat deze gebaseerd zijn op de verschillen in expressie en *β-TUB* omdat dit een veel gebruikt en algemeen aanvaard huishoudgen is. In het genexpressie-experiment wordt er nagegaan of er een verschil in expressie is als er genormaliseerd wordt ten opzichte van 2 of 3 genen.

4.3 Genexpressie

De zoektocht naar primers voor genen betrokken bij de verdediging bij *M. lignano* gebeurt aan de hand van de EST-databank. Dit blijkt niet zo efficiënt te zijn aangezien de beschikbare stressgenen in deze databank beperkt zijn en bovendien minder betrouwbaar dan een echte genoom-databank. De gevonden primerparen werden getest door middel van PCR en agarose-gelelektroforese (resultaten niet weergegeven) voordat er gestart werd met de eigenlijke analyse van de genexpressie met real-time PCR. De beperking van de EST-databank kan opgelost worden door op zoek te gaan naar interessante genen in databanken van andere platwormen, zoals *Schmidtea mediterranea* (52).

Voor catalase, dat verantwoordelijk is voor het verwijderen van H₂O₂ (12), zijn er in dit experiment geen significante verschillen waar te nemen na blootstelling van *M. lignano* aan cadmium (0; 2,5; 5 en 10 μM) gedurende 24 uur (Figuur 12). Calmoduline daarentegen komt minder tot expressie bij blootstelling aan 10 μM CdCl₂ gedurende 24 uur, maar dit verschil is niet significant (Figuur 12). Calmoduline speelt mogelijks een rol bij signaaltransductie pathways als gevolg van cadmiumtoxiciteit. Volgens enkele studies activeert cadmium

namelijk de genexpressie van enzymen via signaaltransductie pathways, die gemedieerd zijn door proteïne kinase C, cAMP afhankelijk proteïne kinase of calmoduline (53-54). Bij *M. lignano* wordt deze pathway blijkbaar minder geactiveerd bij blootstelling aan 10 μM cadmium gedurende 24 uur, wat zou kunnen wijzen op een toxisch effect van cadmium. Heat-shock proteïne 60 en 90 spelen een rol bij zowel normale cellulaire homeostase als onder stresscondities (15). Blootstelling aan cadmium en de indirecte productie van ROS worden gezien als stresscondities waar heat-shock proteïnen een rol spelen tijdens het herstel van de cel (15). De genexpressie van heat-shock proteïne 90 verandert in dit experiment niet significant bij blootstelling aan verschillende cadmiumconcentraties (Figuur 13). Heat-shock proteïne 60 vertoont ook geen significante verschillen, maar bij 2,5 μM komt dit proteïne minder tot expressie (Figuur 13). Uit deze resultaten blijkt dat de expressie van *HSP90* onveranderd blijft bij blootstelling van *M. lignano* aan cadmium (0 μM – 10 μM CdCl_2). De expressie van *HSP60* vermindert bij blootstelling aan 2,5 μM CdCl_2 .

Aangezien er geen significante verschillen zijn, werd er vervolgens gekeken of het patroon van de genexpressie verschillend is indien er genormaliseerd wordt ten opzichte van 2 van de 3 geselecteerde genen in vergelijking met normalisatie voor de 3 huishoudgenen. Er wordt echter geen verschil in genexpressie gevonden bij normalisatie ten opzichte van 2 huishoudgenen (resultaten niet weergegeven). Normalisatie ten opzichte van 2 huishoudgenen zou in dit geval dus ook voldoende zijn om de genexpressie te bepalen.

Er kunnen verschillende verklaringen gevonden worden voor het feit dat de genexpressie van deze eiwitten in dit experiment niet significant verschilt na blootstelling aan cadmium. Ten eerste bestaan er in de cel verschillende isovormen van de eiwitten waarvan de genexpressie nagegaan wordt in dit experiment. Het zou kunnen dat er in de genexpressie van deze isovormen wel veranderingen waarneembaar zijn na cadmiumblootstelling. Een andere verklaring kan gevonden worden bij de lage cadmiumconcentraties waaraan de organismen blootgesteld worden. Er werd gekozen voor subletale concentraties en deze zijn klein in vergelijking met de concentraties van het toxische metaal koper waaraan men, in studie naar proteïnen betrokken bij de verdediging, de planaria *Dugesia schubarti* heeft blootgesteld (55). In onze studie bestaat dus de mogelijkheid dat deze lage, subletale concentraties geen effect uitoefenen op de expressie van de geteste genen, of dat de organismen maar een zeer kleine hoeveelheid van het cadmium opnemen. Deze opname is namelijk gelimiteerd door de diffusie doorheen de epidermis, opname via de diatomeeën en door het mogelijk beperkt aantal vrije Cd-ionen in het ASW, aangezien Cd complexeert met chloriden in dit ASW (8).

Daarnaast bestaat de kans dat er op eiwit- of metabolisch niveau wel veranderingen optreden bij de gebruikte cadmiumconcentraties, maar in deze scriptie werd er enkel gekeken naar de veranderingen in genexpressie. Ten slotte bestaat de mogelijkheid dat de cel andere verdedigingsmechanismen aanspreekt dan de pathways die hier bestudeerd worden. Maar het onderzoek hiernaar wordt beperkt door de informatie die er in de EST-databank van *M. lignano* beschikbaar is. Het aantal genen betrokken bij de stressrespons is beperkt in deze databank, en van de genen die er wel in terug gevonden worden zijn er geen of weinig verschillende isovormen gekend.

In de toekomst zijn er verschillende mogelijkheden om deze studie verder uit te werken. Er kan gestart worden met het zoeken naar primers voor de verschillende gekende isovormen van de geteste genen of van andere genen. Op deze manier kan er nagegaan worden of er isovormen zijn waarvan de expressie wel significant verschilt bij blootstelling aan de cadmiumconcentraties die er hier gebruikt worden. Daarnaast kan men kijken naar de effecten bij blootstelling aan andere cadmiumconcentraties gedurende 24 uur om na te gaan bij welke concentratie er een significant effect wordt waargenomen (range-finding) bij dezelfde genen betrokken bij celverdediging. Vervolgens kan er ook gekeken worden naar de effecten in de tijd bij *M. lignano* door het organisme aan een bepaalde cadmiumconcentratie bloot te stellen gedurende verschillende uren/dagen. Op deze manier wordt er een idee verkregen over de concentratie die veranderingen in genexpressie veroorzaakt en over de duur van blootstelling waarbij deze concentratie het grootste effect veroorzaakt. Ten slotte kan er ook nagegaan worden welke genen differentieel tot expressie komen bij blootstelling aan cadmium, door middel van een micro-array op basis van de EST-databank of een AFLP-analyse. Op deze manier wordt een meer open screening uitgevoerd naar de veranderingen in expressie als gevolg van blootstelling aan cadmium, die vervolgens met behulp van real-time PCR bepaald bevestigd kunnen worden.

4.4 Lokalisatie van ROS

Om de locatie van ROS bij *M. lignano* te bepalen werden de organismen gedurende 24 uur blootgesteld aan Cd en tegelijk geïncubeerd in DAB of NBT. DAB zorgt voor de kleuring van H₂O₂. Deze kleuring kwam voornamelijk aan de meest frontale lichaamswand en in de vesicula seminalis tot uiting (Figuur 14). Vooraan in het dier bevinden zich meer chemoreceptoren (27). Hierdoor zal dit deel van de platworm meer reageren op chemische

stimuli, zoals Cd en DAB (Figuur 15A). De inductie van H_2O_2 na contact met cadmium hoeft echter niet alleen schade te betekenen. Recent is al meerdere malen aangetoond dat H_2O_2 een belangrijke signalisatiefunctie heeft tijdens stress-situaties zoals cadmiumstress (57). In de vesicula seminalis was er eveneens een intensieve rood-bruine kleuring waarneembaar (Figuur 15B). In dit orgaan worden eigen spermacellen opgeslagen tot het moment van copulatie. Er werden ook gekleurde spermacellen in de vrouwelijke gonoporus gevonden (resultaten niet visueel weergegeven). Blijkbaar bevatten de spermacellen meer H_2O_2 indien ze blootgesteld worden aan Cd. Ook hier zou het geïnduceerde H_2O_2 een signalisatirol kunnen uitoefenen. Uit een andere studie blijkt dat blootstelling van ratten aan cadmium zorgt voor een verminderde motiliteit van de spermacellen en een lagere spermaconcentratie (56). Er werden eveneens meer dode en abnormale cellen gevonden (56). Uit deze studie bleek ook dat deze effecten van cadmium op de spermacellen verminderden indien er anti-oxidanten zoals vitamine E en β -caroteen werden toegevoegd (56). Dit kan verklaard worden doordat de antioxidanten zorgen voor minder oxidatieve stress door het wegvangen van ROS. Indien $O_2^{\cdot-}$ gekleurd wordt door incubatie van *M. lignano* in NBT wordt er een algemene blauwe kleuring waargenomen in de organismen (Figuur 16). Deze kleuring is een algemene respons over het hele lichaam, er wordt geen kleuring waargenomen in één specifiek orgaan.

Het experiment zou uitgebreid kunnen worden door *M. lignano*, samen met Cd en DAB of NBT, te incuberen in anti-oxidanten, zoals vitamine E, β -caroteen en ascorbaat. Er wordt verwacht dat er dan een verminderde kleuring waarneembaar zal zijn, aangezien deze anti-oxidanten zorgen voor het wegvangen van ROS.

5 CONCLUSIE

Deze scriptie roept verschillende nieuwe vragen op, waarvan het interessant zou zijn om ze in de toekomst te onderzoeken. Zo zou de bepaling van de genexpressie uitgebreid kunnen worden door de effecten van meerdere genen betrokken bij de verdediging na te gaan bij verschillende cadmiumconcentraties. Er kan ook gekeken worden naar de kinetische respons van verschillende cadmiumconcentraties. Tijdens de lokalisatie van ROS kan de werking van anti-oxidanten, zoals vitamine E, β -caroteen en ascorbaat, nagegaan worden. Men verwacht dat dit zal zorgen voor een mindere kleuring, aangezien de anti-oxidanten zorgen voor het wegvangen van ROS. Daarnaast kan er ook gekeken worden naar biochemische effecten van cadmium, zoals lipidenperoxidatie, en kan de antioxidatieve verdediging ook op metabolisch niveau bestudeerd worden. Zeker GSH-bepalingen zijn de moeite om in de toekomst uit te voeren, aangezien in het verleden het belang van GSH tijdens cadmiumstress reeds is aangetoond (58). Voordat deze effecten bepaald kunnen worden dienen de specifieke technieken die hierbij gebruikt worden geoptimaliseerd te worden. Deze optimalisatie is in deze studie reeds van start gegaan (resultaten niet weergegeven), maar de bepaling van deze effecten bij *M. lignano* is niet efficiënt aangezien het een zeer klein organisme is. Een optie om de biochemische effecten van cadmium bij platwormen na te gaan is de overschakeling naar grotere organismen zoals tricladen.

REFERENTIES

1. Godt J, Scheidig F, Groneberg DA et al. The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. *J. Occup. Med. Toxicol.* 2006;22(1):1-6.
2. Zalups RK, Sarfaraz A. Molecular handling of cadmium in transporting epithelia. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2003;186(3):163-88.
3. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention. 3th National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. 2005;3:26-30.
4. Stohs SJ, Bagchi D, Hassoun E, Bagchi M. Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 2001;20(2):77-88.
5. U.S. Department of Health and Human Services. *Toxicol. Prof. Cd.* 1999;2:1-439.
6. Stoeppler M, Piscator M. Cadmium in the environment. In: *Environmental toxin series cadmium.* Springer-Verlag: Berlin; 1985. p. 159-94.
7. Scholten MC, Kramer KJ, Laane RW. Trends and variation in concentration of dissolved metals (Cd, Cu, Pb, and Zn) in the North Sea (1980-1989). *J. Mar. Sc.* 1998;55:825-34.
8. Bryan GW, Langston WJ. Bioavailability, accumulation and effects of heavy metals in sediments: a review. *Environ. Poll.* 1992;76:89-131.
9. Wang Y, Fang J, Leonard SS, Rao KM. Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* 2004;36(11):1434-43.
10. Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Plant Sc.* 2002;7(9):405-10.
11. Robbins SL, Kumar V, Cotran RS. *Basic pathology: Cell injury, adaptation and death.* Saunders, 2003.p.3-31.
12. Winston GW, Di Giulio TD. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 1991;19.p.137-161.
13. Hall JL. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.* 2002;53(366):1-11.
14. Newman MC, Unger MA. *Fundamentals of Ecotoxicology.* Lewis Publishers, 2002.p.124-26.
15. Kregel KC. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J. Appl. Physiol.* 2002;92.p.2177-86.
16. Lauwerys R, Bernard A, Buchet JP, Nick L et al. Does environmental exposure to cadmium represent a health risk? Conclusions from the Cadmibel study. *Acta Clinica Belgica.* 1991;46(4):219-25.
17. Hogervorst J, Plusquin M, Vangrondsveld J, Staessen JA et al. House dust as possible route of environmental exposure to cadmium and lead in the adult general population. *Environ. Res.* 2007;103(1):30-7.

18. Margeli AP, Theocharis SE, Spiliopoulou C, Koutselinis A. Hepatic stimulator substance administration affects cadmium-induced hepatotoxicity in the rat. *Internat. Hep. Comm.* 1996;5:128-34.
19. Shaikh ZA, Vu TT, Zaman K. Oxidative stress as a mechanism of chronic cadmium-induced hepatotoxicity and renal toxicity and protection by antioxidants. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1999;154:256-63.
20. Staessen JA, Lauwerys RR, Ide G, Amery A et al. Renal function and historical environmental pollution from zinc smelters. *The Lancet.* 1994;343:1523-27.
21. Buchet JP, Lauwerys R, Roels H, Nick L et al. Renal effects of cadmium body burden of the general population. *The Lancet.* 1990;336:699-702.
22. Staessen JA, Amery A, Bernard A, Thijs L et al. Effects of exposure to cadmium on calcium metabolism: a population study. *Br. J. Ind. Med.* 1991;48:710-14.
23. Wilson AK, Cerny EA, Smith D, Bhattacharyya H et al. Effects of cadmium on osteoclast formation and activity in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1996;140(2):451-60.
24. Waalkes MP. Cadmium carcinogenesis. *Mutat. Res.* 2003;533:107-20.
25. Nawrot T, Plusquin M, Hogervorst J, Staessen JA et al. Environmental exposure to cadmium and risk of cancer: a prospective population-based study. *Lancet Oncol.* 2006;7:119-26.
26. Brusca RC, Brusca GJ. Phylum Platyhelminthes. In: *Invertebrates.* Sunderland: Massachusetts; 2002. p. 285-318.
27. Rieger RM, Tyler S, Smith JPS, Rieger GE. Platyhelminthes: Turbellaria. In: Harrison FW, editor. *Microscopic anatomy of invertebrates: Volume 3 Platyhelminthes and nemertinea.* New York: Wiley-Liss; 1991. p. 7-140.
28. Best JB, Morita M. Toxic responses of planarians to various waterborne heavy metals. *Adv. Environ. Sci. Tech.* 1983;13:137-54.
29. Grebe E., Schaeffer DJ. Neurobehavioral toxicity of Cadmium Sulphate to the Planarian *Dugesia dorotocephala*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1991;46:727-30.
30. Best JB, Morita M. Toxicology of planarians. *Hydrobiologia.* 1991;227:375-83.
31. Kalafatić M, Kopjar N, Besendorfer V. The impairments of neoblast division in regenerating planarian *Polycelis felina* (Daly.) caused by in vitro treatment with cadmium sulphate. *Toxicol. in Vitro.* 2004;18(1):99-107.
32. Best JB, Morita M. Planarians as a model system for in vitro teratogenesis studies. *Teratog. Carcinog. and Mutag.* 1982;2:277-91.
33. Mitra S, Kar S, Aditya AK. Impact of CdCl₂ on biochemical changes in planaria, *Dugesia bengalensis* Kawakatsu. *Indian J. Exp. Biol.* 2003;41(8):921-3.

34. Schaeffer DJ. Planarians as a model system for in vivo tumorigenesis studies. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 1993;25(1):1-18.
35. Hall F, Morita M, Best JB. Neoplastic formation in the Planarian: I. Cocarcinogenesis and histopathology. *J. Experiment. Zool.* 1986;240(2):211-27.
36. Ladurner P, Schärer L, Salvenmoser W, Rieger RM. A new model organism among the lower Bilateria and the use of digital microscopy in taxonomy of meiobenthic Platyhelminthes: *Macrostomum lignano*, n. sp. (Rhabditophora, Macrostomorpha). *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 2005;43(2):114-26.
37. Ladurner P, Rieger R, Baguna J. Spatial distribution and differentiation potential of stem cells in hatchlings and adults in the marine Platyhelminth *Macrostomum* sp.: A bromodeoxyuridine analysis. *Dev. Biol.* 2000;226:231-41.
38. Nimeth KT, Egger B, Rieger R, Gschwetner R et al. Regeneration in *Macrostomum lignano* (Platyhelminthes): cellular dynamics in the neoblast stem cell system. *Cell Tissue Res.* 2007;327:637-46.
39. Morris J, Ladurner P, Rieger R, Hartenstein V et al. The *Macrostomum lignano* EST database as a molecular resource for studying Platyhelminth development and phylogeny. *Dev. Genes Evol.* 2006;216:695-707.
40. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrin.* 2000;25:169-93.
41. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Speleman F et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Gen. Biol.* 2002;3(7):1-12.
42. Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 2004;64:5245-50.
43. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods.* 2001;25:402-08.
44. Portillo M, Fenoll C, Escobar C. Evaluation of different RNA extraction methods for small quantities of plant tissue: Combined effects of reagent type and homogenization procedure on RNA quality-integrity and yield. *Physiol. Plant.* 2006;128:1-7.
45. Al-Soud WA, Radstrom P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J. Clin. Microbiol.* 2001;39(2):485-93.
46. Nolan T, Hands RE, Ogunkolade W, Bustin SA. SPUD: a quantitative PCR assay for the detection of inhibitors in nucleic acid preparations. *Anal. Biochem.* 2006;351(2):308-10.

47. Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Gen. Immun.* 2005;6:279-84.
48. Suzuki T, Higgins PJ, Crawford DR. Control selection for RNA quantitation. *Biotechn.* 2000;29(2):332-7.
49. Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, Heinen E et al. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J. Biotechnol.* 1999;75:291-5.
50. Spurgeon DJ, Stürzenbaum SR, Svendsen C, Kille P. Toxicological, cellular and gene expression responses in earthworms exposed to copper and cadmium. *Comp. Biochem. Physiol.* 2004;138:11-21.
51. Spinsanti G, Panti C, Lazzeri E, Fossie CM et al. Selection of reference genes for quantitative RT-PCR studies in striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) skin biopsies. *Mol. Biol.* 2006;32(7):1-11.
52. Alvarado AS, Newmark PA, Robb SMC, Juste R. The *Schmidtea mediterranea* database as a molecular resource for studying Platyhelminthes, stem cells and regeneration. *Dev.* 2002;129:5659-65.
53. Wang Z, Templeton DM. Induction of *c-fos* Proto-oncogene in mesangial cells by cadmium. *J. Biol. Chem.* 1998;273:73-9.
54. Liao VH, Freedman J. Cadmium-regulated genes from the nematode *C. elegans*. *J. Biol. Chem.* 1998;273(48):31962-70.
55. Guecheva TN, Erdtmann B, Benfato MS, Henriques JAP. Stress protein response and catalase activity in freshwater planarian *Dugesia (Girardia) schubarti* exposed to copper. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2003;56:351-57.
56. El-Demerdash FM, Yousef MI, Kedwany FS, Baghdadi HH. Cadmium-induced changes in lipid peroxidation, blood haematology, biochemical parameters and semen quality of male rats: protective role of vitamin E and β -carotene. *Food Chem. Toxicol.* 2004;42:1563-71.
57. Veal E, Day AM, Morgan BA. Hydrogen peroxide sensing and signalling. *Molecular cell.* 2007;26(1):1-14.
58. Semane B, Cuypers A, Smeets K, Vangronsveld J et al. Cadmium responses in *Arabidopsis thaliana*: glutathione metabolism and antioxidative defence system. *Physiologia Plantarum.* 2007;129:519-28.

In deze bijlagen zijn de protocols die bekomen en gebruikt werden in deze thesis terug te vinden.

1. Sample preparation RNA extraction

- Expose animals (25 animals / sample) to different cadmium concentrations (0, 2.5, 5, 10 μM) during 24 hours in a 6 well plate with diatoms.
- Prepare the sample in a 2 ml tube:
 - Wash the animals 3 times with ASW (32‰) in an embryo dish (no dirt in RNA isolation)
 - Gradually relax the animals with 7,14% MgCl_2 in an embryo dish : first 15 minutes in 1/1 ASW/ MgCl_2 , next 15 minutes in MgCl_2 pure
 - Transfer the 25 animals to a labelled 2 ml tube
- Centrifuge the labelled tubes with the animals during 1 min at 11 000 g (rcf)
- Dispose the liquid
- Put 2 glass beads in the tube
- Immediately put the tubes in liquid nitrogen
- Store the samples at -70°C

2. Lysis of the sample

Disrupt the tissue using the Retsch mixer mill: pre-cool the buckets in -70°C freezer during at least 30 min, prepare a polystyrene bucket with a layer of liquid nitrogen at the bottom, in which a tube rack is placed for the labelled tubes with the sample. Make sure the sample and the buckets stay frozen at all times. Transfer the tubes (containing sample and 2 glass beads) to the buckets and shake the samples with an amplitude of 80 during 45 seconds to disrupt the tissue. Immediately place back in the liquid nitrogen.

3. RNA isolation

The 'Qiagen mini kit' (Qiagen, Venlo) can be used for the RNA isolation. The protocol of this kit was followed for isolation of the RNA. The RNA was eluted in 17 μ l RNase-free water.

The concentration en quality of the RNA can be detemined with 'NanoDrop' (ND-1000, Isogen Life Sciences) and 'Bio-analyzer' (2100, Agilent Technologies) analysis.

4. Reverse transcription

The protocol of the Qiagen QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen, Venlo) was used for reverse transcription of the RNA. This kit contains a DNA-elimination step. 12 μ l of the RNA was added to the reverse transcription mix. The master mix with the RNA was incubated for 30 minutes at 42°C, followed by 3 minutes at 95°C.

5. Real-time PCR

Power SYBR green (Applied Biosystems, Lennik) was used for real-time PCR. A cDNA dilution of 1/20 was used. The master mix consists of 12,5 μ l Power SYBR green; 0,75 μ l forward primer (10 μ M); 0,75 μ l reverse primer (10 μ M) and 6 μ l RNase-free water. 5 μ l of the diluted cDNA will be added to the master mix.

Auteursrechterlijke overeenkomst

Opdat de Universiteit Hasselt uw eindverhandeling wereldwijd kan reproduceren, vertalen en distribueren is uw akkoord voor deze overeenkomst noodzakelijk. Gelieve de tijd te nemen om deze overeenkomst door te nemen, de gevraagde informatie in te vullen (en de overeenkomst te ondertekenen en af te geven).

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

Het effect van cadmium op het moleculaire niveau bij M.lignano

Richting: **Master in de biomedische wetenschappen**

Jaar: **2007**

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.

Ik ga akkoord,

Ellen Geerdens

Datum: **19.06.2007**