

**Die Bedeutung partikel-assoziierten Cadmiums
für die Bioverfügbarkeit und Bioakkumulation
im Nematoden *Caenorhabditis elegans***

Vom Promotionsausschuss der
Technischen Universität Hamburg-Harburg
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktorin der Naturwissenschaften
genehmigte Dissertation

von
Kirsten Offermann
aus Bremen
2009

1. Gutachter: PD. Dr. rer. nat. Wolfgang Ahlf
Technische Universität Hamburg-Harburg
Umwelttechnik und Energiewirtschaft
Eißendorfer Str. 40
21073 Hamburg

2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Rudolf Müller
Technische Universität Hamburg-Harburg
Technische Biokatalyse
Denickestr. 15
21073 Hamburg

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Dezember 2009

Für Sven, Lorenz und Arvid

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. Wolfgang Ahlf. Wolfgang ermöglichte mir stets die freie Gestaltung der Arbeit und hat mich gelehrt, dabei den Blick auf das Wesentliche zu lenken und sich nicht in Einzelheiten zu verlieren. Besonders schätze ich das Vertrauen, welches Wolfgang mir bei den vielen kleinen und großen Herausforderungen entgegen brachte. Wolfgang, ich war gerne in deiner Arbeitsgruppe.

Für die Bereitschaft sich meiner Arbeit anzunehmen danke ich meinem Zweitgutachter, Prof. Dr. Rudolf Müller und dem Vorsitzendem des Prüfungsausschusses Prof. Dr. Dr. Frerich Keil.

Dr. Helga Neumann-Hensel danke ich herzlich dafür, mir zu Beginn meiner Arbeit die Nutzung der Real-Time-PCR bei Dr. Fintelman und Dr. Meyer GmbH ermöglicht zu haben und mir somit den Einstieg in die Molekularbiologie zu erleichtern.

Für die technische Unterstützung danke ich herzlich Silke Hardtke, Britta Weseloh, Christoph Pohl und dem Zentrallabor.

Ein riesiges Dankeschön für die humorvolle und diskussionsreiche Zeit an der TU gilt der ökotoxikologischen Arbeitsgruppe. Prof. Dr. Susanne Heise und Dr. Carolin Floeter eröffneten mir durch die Einarbeitung in sämtliche Biotests die packende Welt der Ökotoxikologie. Neben ihnen danke ich auch Dr. Anett Matthäi und Dr. Pei-Chi Hsu für den facettenreichen Gedankenaustausch. Als unschlagbares Trio haben wir im kleinsten Raum an der TU den größten Spaß gehabt. Vielen Dank, ich weiß die Zeit mit euch allen zu schätzen!

Meiner Familie danke ich für die stetige Unterstützung mit der sie meinen Weg zur Promotion begleitet hat.

Dir Sven, möchte ich zutiefst für den immerwährenden Glauben an mich danken! Du standest mir immer zur Seite – sogar im Labor – und hast somit entscheidend zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	IV
Zusammenfassung.....	1
Summary.....	2
1. Einleitung.....	3
1.1 Partikel-assoziierte Schwermetalle	3
1.2 Cadmium in der Umwelt.....	5
1.3 Cadmiumaufnahme in die Zellen.....	6
1.4 Toxizität von Cadmium.....	7
1.5 Detoxifikation und Bioakkumulation von Schwermetallen.....	8
1.6 Verknüpfung der toxischen Wirkungen mit den verschiedenen Ebenen der biologischen Hierarchie.....	11
1.7 Ziel der Arbeit.....	12
2. Material und Methoden.....	15
2.1 Testorganismus.....	15
2.2 Kultivierung von <i>C. elegans</i>	16
2.3 Ernte der <i>C. elegans</i> -Kultur	16
2.4 Bakterien	17
2.5 Versuchsaufbau	17
2.6 Expositionspfade.....	19
2.6.1 Cadmium-Exposition über Flüssigphasen.....	19
2.6.2 Exposition über Lipopolysaccharide.....	19
2.6.3 Bakterien	20
2.6.3.1 Herstellung der Bakteriensuspensionen.....	21
2.6.4 Künstliche Partikel.....	21
2.6.4.1 Funktionelle Oberflächengruppen.....	22
2.6.4.2 Beschichtung von Mikropartikeln mit Lipopolysacchariden.....	22

2.6.4.3 Herstellung der Mikropartikelsuspensionen.....	22
2.7 Isolierung von RNA mit Trizol	23
2.8 Reverse Transkription	24
2.9 Real-Time-PCR.....	25
2.9.1 Actin als Housekeeping-Gen.....	28
2.9.2 Bestimmung der PCR-Effizienz.....	29
2.9.3 Primer und Sondenauswahl für die Real-Time-PCR	30
2.9.4 Überprüfung der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese.....	31
2.10 Cadmiumverteilung im Testsystem: Akkumulation in <i>C. elegans</i> , Partikelsorption und Konzentration im Überstand	32
2.11 Bestimmung der Adeninnucleotide und der Energieladung	33
2.12 Proteinbestimmung nach Biuret	34
2.13 Chronische Cadmiumtoxizität auf <i>C. elegans</i>	34
2.14 Zusammenfassung der Expositionsexperimente	35
2.15 Statistische Auswertungen	35
2.16 Geräte	37
2.17 Chemische Substanzen.....	37
3. Ergebnisse	39
3.1 <i>Cdr-1</i> -Genexpression und Bioakkumulation durch Cadmiumexposition über die Flüssigphase	39
3.2 <i>Cdr-1</i> -Genexpression und Bioakkumulation durch Cadmiumexposition über Bakterien als kontaminierte Nahrungspartikel	40
3.3 Einfluss der Hemmung von Transportproteinen auf <i>cdr-1</i> -Genexpression und Cadmiumanreicherung in Abhängigkeit von dem Expositionspfad	43
3.3.1 Bedeutung des <i>mrp-1</i> -Gens für die Cadmiumentgiftung	44
3.4 Einfluss der Partikelqualität auf die Bioverfügbarkeit und Bioakkumulation von Cadmium.....	47
3.4.1 Vergleich von Gram-negativen Bakterien und Gram-positiven Bakterien als Carrier für die Cadmiumexposition.....	47
3.4.2 Einfluss von anorganischen Partikeln mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen	48

3.4.3 Einfluss von Lipopolysacchariden als Trägersubstanz	51
3.5 Einfluss der Cadmiumanreicherung auf die <i>cdr-1</i> -Expression	52
3.6 Die Bedeutung der Partikel-Schadstoffkonzentration für die interne Verfügbarkeit und Anreicherung von Cadmium in <i>C. elegans</i>	53
3.7 Zusammenhang der Wirkung einer direkten Cadmiumexposition und einer internen Cadmiumverfügbarkeit mit chronischen Toxizitätsparametern	62
4. Diskussion	67
4.1 Die relative Bedeutung der Expositionspfade für die biologische Verfügbarkeit, Bioakkumulation und Detoxifikation von Cadmium – Flüssigphase vs. Partikel	67
4.2 Bedeutung der Partikelqualität für die biologische Verfügbarkeit und Bioakkumulation von Cadmium	71
4.3 Bedeutung des Partikelschadstoffgehalts für die biologische Verfügbarkeit und Bioakkumulation	78
4.4 Energiestatus und chronische Cadmiumtoxizität	79
4.4.1 Der Energiestatus als Regulator der Cadmiumaufnahme und Bioakkumulation? ..	79
4.4.2 Chronische Toxizität: Bedeutung einer direkten Cadmiumexposition und einer bestehenden Cadmiumbelastung	81
5. Schlussfolgerungen.....	83
6. Literaturverzeichnis.....	87
Veröffentlichungen.....	97
Lebenslauf.....	99

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ABC-Transporter	ATP binding cassette-Transporter
<i>A. globiformis</i>	<i>Arthrobacter globiformis</i>
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
Aqua. dest.	Destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaar
BAF	Bioakkumulationsfaktor
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
C	Cytosin
cDNA	complementary DNA
<i>cdr-1</i>	Cadmium responsive-1 (Gen)
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
C _T -Wert	Schwellenzyklus (threshold cycle)
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nucleosid-5`-Triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FAM	Fluorescein-Addition-Monomer, Carboxy-Fluorescein
FAU	Formazine Attenuation Units
G	Guanin
ISO	Internationale Organisation für Normung (International Organization for Standardization)
K _p	Partikel-Wasser-Verteilungskonstante
LB-Medium	Lysogeny Broth Medium
LPS	Lipopolysaccharide
min	Minute(n)
Milli-Q-H ₂ O	durch eine Millipore-Anlage gereinigtes Wasser

mRNA	Messenger-RNA
<i>mrp-1</i>	Multidrug resistance-associated Protein-1 (Gen)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGM-Agar	Nematode-Growth-Medium-Agar
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pgp	P-Glykoproteine
<i>pgp-1</i>	P-Glykoprotein-1 (Gen)
REACH	Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung von Chemikalien (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals)
rpm	Umdrehung pro Minute (rounds per minute)
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
s	Sekunde(n)
ssDNA	einzelsträngige (single stranded) DNA
T	Thymin
TAMRA	6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin
TG	Trockengewicht
U	Einheit (Unit)
U.S. EPA	Environmental Protection Agency (USA)
w/v	Gewicht pro Volumen

Zusammenfassung

Umweltchemikalien können über verschiedene Expositionspfade von aquatischen Organismen aufgenommen werden. Der benthischen Nematode *Caenorhabditis elegans* kann gelöste Schadstoffe über das Porenwasser oder die Wassersäule sowie partikulär gebundene Schadstoffe durch Ingestion aufnehmen. Das Ausmaß der Schadstoffwirkung wird dabei sowohl durch die Stoffeigenschaften und Wirkungsmechanismen als auch durch die Exposition beeinflusst. Die Relevanz der einzelnen Expositionswege für die biologische Verfügbarkeit und Akkumulation von Metallen ist ungeklärt und wird in der Wissenschaft gegenwärtig diskutiert. Das wesentliche Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Bedeutsamkeit unterschiedlicher Expositionen für die interne Verfügbarkeit und Anreicherung von Cadmium in *C. elegans* zu untersuchen und Einblick in die zugrunde liegenden Mechanismen zu erlangen.

Mit der Annahme, dass für den partikelfressenden Nematoden *C. elegans* die interne Cadmiumaufnahme primär über die Ingestion von Partikeln erfolgt, galt der Exposition über Partikel verschiedener Beschaffenheiten besonderes Interesse. So wurden die Nematoden sowohl über unterschiedliche Bakterienarten (*E. coli* und *A. globiformis*) als auch Bakterienkonzentrationen sowie über abiotische Kunstpartikel mit unterschiedlichen funktionellen Oberflächengruppen und mit Lipopolysacchariden beschichtete Kunstpartikel dem Schadstoff exponiert. Da die Exposition aquatischer Organismen parallel über die Wassersäule und belastete Partikel erfolgt, erfolgten die Expositionen in dieser Studie stets über in Flüssigmedium suspendierte Partikel. Um die relative Bedeutung der Partikel im Vergleich zur Wasserphase beurteilen zu können, wurden die Nematoden weiterhin über reines Medium und in Medium gelöste Lipopolysaccharide exponiert.

Der Nachweis des biologisch verfügbaren Cadmiumanteils erfolgte durch die Bestimmung der veränderten *cdr-1*-Genexpression mittels Real-Time-PCR. Die Verwendbarkeit des lediglich durch Cadmium induzierbaren *cdr-1*-Gens als Biomarker für Expositionsuntersuchungen, wurde in dieser Arbeit als geeignet befunden. Weiterhin wurde die Anreicherung des bioverfügbaren Cadmiums im Gewebe der Nematoden bestimmt.

Die Hypothese, dass an Partikel, insbesondere Nahrungspartikel, gebundenes Cadmium die interne Verfügbarkeit des Schadstoffs erhöht, wurde bestätigt. So führte vor allem eine Exposition über Bakterien zu einer starken Induktion des *cdr-1*-Gens; die Cadmiumverfügbarkeit über die inerten, abiotischen Kunstpartikel war hingegen gering. Eine geringe Bioverfügbarkeit (*cdr-1*-Expression) und/oder effiziente Entgiftung des Cadmiums über Effluxtransporter lassen die Bedeutung der Wasserphase als Aufnahmepfad als irrelevant werten. Eine Hemmung der Transporterproteine durch Verapamil führte zu einer verstärkten Akkumulation des Cadmiums in den Nematoden und macht deren Bedeutung für die zelluläre Entgiftung des über die Flüssigphase aufgenommenen Cadmiums deutlich. Auch die Anreicherung des partikulär gebundenen Cadmiums war signifikant höher im Vergleich zur Exposition über die Wasserphase.

Die Untersuchungen der 16 verschiedenen Expositionsbedingungen zeigten deutlich, dass die Parameter *cdr-1*-Genexpression und Cadmiumakkumulation in *C. elegans* unabhängig voneinander durch den Aufnahmepfad beeinflusst werden. Dabei war nicht die Cadmiumbelastung der ingestierten Partikel oder die Konzentration im umgebenden Medium für die interne Verfügbarkeit und Anreicherung von Bedeutung, sondern die Art und Menge der Partikel maßgebend.

Die durch Cadmiumstress induzierten Verhaltensänderungen und Detoxifikationsmechanismen führen beim Organismus zu kompensatorischen Veränderungen des Energiemetabolismus und konnten im Ansatz durch eine Veränderung der Adeninnucleotidverhältnisse (AMP:ATP) nachgewiesen werden. Den größten Energiebedarf stellen allgemein das Wachstum und die Reproduktion für Organismen dar. Eine Gegenüberstellung chronischer Toxizitätsparameter und der durch Cadmiumstress hervorgerufenen *cdr-1*-Expression, zeigten eine signifikante Korrelation zwischen der Genexpression und dem Wachstum wie auch der Eiproduktion der Nematoden. Der mittels eines modifizierten Nematodentests untersuchte Einfluss einer bestehenden Cadmiumakkumulation auf die chronische Toxizität der Würmer erwies sich als unbedeutend und ließ keinen Zusammenhang zu den akuten Effekten erkennen.

The importance of particle-associated cadmium on bioavailability and bioaccumulation in the nematode *Caenorhabditis elegans*

Summary

The uptake of environmental pollutants by aquatic organisms can occur via different exposure routes. The benthic nematode *Caenorhabditis elegans* is able to take up dissolved pollutants from its environment via pore water or water column as well as bound to particles by ingestion. Material property, mechanisms and the way of exposition determine the degree of the toxic effect. However, the relative importance of each exposure pathway for metal bioavailability and accumulation is not clear yet and is still under discussion in science. The primary objective of the present study was to evaluate the importance of different exposure pathways on cadmium uptake and accumulation in *C. elegans* and the basic mechanisms involved.

It was assumed, that for the particle feeding nematode *C. elegans* the internal cadmium uptake would arise primarily from the ingestion of particles. Therefore, the dietborne metal exposure was investigated in particular. The exposure scenarios included evaluations of different bacteria species (*E. coli* and *A. globiformis*), varying bacteria concentrations, and artificial particles with different surface functional groups or coated with lipopolysaccharides. Because concurrent dietborne and waterborne exposure is likely to occur in natural environment, all particles used in experiments were solved in medium. To evaluate the relative importance of waterborne and dietborne exposure in addition nematodes were exposed via medium only and to lipopolysaccharides solved in medium.

Internal cadmium availability was determined using the *cdr-1* transcript level, as quantified by real-time PCR. The transcription of *cdr-1* is induced only in response to cadmium exposure and not by other stressors. In the present study the *cdr-1* gene was suitable as a biomarker. Furthermore, the accumulation of the internal cadmium uptake was determined by measuring the total tissue concentration of the nematodes.

The results of this study confirm that dietary exposure is the predominant contributor to internal cadmium availability. Nematodes exposed to bacteria displayed a significant higher level of *cdr-1* expression relative to artificial particles. The waterborne cadmium uptake was assumed to be unimportant and may be caused by both, a low bioavailability (*cdr-1* expression) and/or an efficient cadmium detoxification via efflux transporters. Waterborne exposure caused an increase in total cadmium body burden following inhibition of the transport proteins in nematodes. This may suggest that cadmium taken up by aqueous phase is detoxified preferentially by excretion. Furthermore the accumulation of particle-bound cadmium was higher compared to waterborne cadmium.

The investigation of 16 different exposure pathways shows no clear relationship between *cdr-1* expression and cadmium accumulation in *C. elegans*. Both, internal uptake and accumulation is independently influenced by exposure route. Dietary quality and quantity, rather than the total metal concentration of the ingested particles or the concentration of the medium, is clearly important for internal availability and accumulation in nematodes.

Cadmium stress induces behavioural changes and defense mechanisms, which causes increased energy costs through compensatory mechanisms and could be shown as a change in the adenine nucleotide ratio (AMP:ATP). Most of the energy demand of organisms is required for growth and reproduction. A significant correlation between *cdr-1* gene expression and growth, as well as gene expression and egg production was observed. Using a modified nematode life cycle test, the body burden of preexposed worms and long term effects was compared. No correlations was found between acute and chronic toxicity.

1. Einleitung

Metalle werden in aquatischen Systemen meist an anorganische oder organische Partikel gebunden und in dieser Form transportiert, wobei die Partikel letztlich absinken und im Sediment abgelagert werden. Seit die Metalle in unseren Gewässern als toxische Substanzen erkannt wurden, befassten sich Toxizitätsstudien mit Dosis-Wirkungsbeziehungen und den geochemischen Faktoren, die eine Giftwirkung verhindern. Insbesondere der Einfluss der Wasserzusammensetzung wie Wasserhärte und pH-Wert auf die Bioverfügbarkeit von Metallen wurde analysiert. Während der letzten zwei Jahrzehnte wurde in zahlreichen Untersuchungen aufgezeigt, dass geochemische Faktoren die chemischen Metallspeziation bestimmen und damit auch die Metallwirkung (Batley et al., 2004).

Obwohl allgemein bekannt ist, dass letztlich die Austauschvorgänge zwischen Wasser- und Sedimentphasen den Transport und auch die Expositionsbedingungen von Metallen für Organismen kontrollieren, ist der Anteil der partikel-gebundenen Metalle an der Gewässertoxizität unklar. Da einige Metalle in die Liste der prioritären Schadstoffe aufgenommen wurden, ist nach dem EU Technischen Leitfaden innerhalb von REACH eine Risikobewertung durchzuführen, die auch Eingang in andere gesetzliche Regelungen wie die Wasserrahmenrichtlinie findet, womit partikel-assoziierte Schwermetalle als potenzielle Gefahrenquellen an Bedeutung gewinnen (Förstner, 2009).

1.1 Partikel-assoziierte Schwermetalle

Organismen aquatischer Ökosysteme werden gewöhnlich gleichzeitig über mehrere Expositionswege Metallen ausgesetzt. Zunächst sind es die in der Wassersäule gelösten Metalle, dann Metalle assoziiert mit unterschiedlichen Futterquellen sowie Schwermetalle an abiotischen Partikeln gebunden. Futter und abiotische Partikel können dabei sowohl in der Wasserphase suspendiert als auch im Sediment abgelagert vorliegen. Biota des aquatischen Lebensraumes sind somit in allen Kompartimenten kontaminierten (Futter)partikeln ausgesetzt. Die Schadstoffaufnahme benthischer Organismen kann sowohl über das Porenwasser, die Wassersäule oder durch Ingestion partikulär gebundener Schadstoffe erfolgen (Ahlf, 1995). Die relative Bedeutung der gelösten und der an Futter und abiotische Partikel assoziierten Schadstoffe für die Metalltoxizität wird dabei sowohl durch das Metall selbst, seine chemische Speziation, der Organismusspezies und verschiedenen abiotischen Faktoren beeinflusst.

Während der 1970iger- und 1980iger-Jahre wurden umfangreiche Studien zur Toxizität von Metallen gegenüber aquatischen Organismen mit dem Fokus auf die Metallexposition über die Wasserphase (d.h. nicht assoziiert mit Partikeln) durchgeführt. Eine Fütterung der Organismen erfolgte gar nicht oder lediglich mit unkontaminiertem Futter. Die Bedeutung vieler Faktoren, die die Bioverfügbarkeit und Toxizität von Metallen beeinflussen, wurde eruiert (z.B. Pagenkopf, 1983). Die U.S.EPA führte in diesem Zeitraum Richtlinien zum Schutz vor Metallen in aquatischen Systemen, die *Ambient Water Quality Criteria* (AWQC), ein. Neben der Metallexposition über die Wasserphase wurden jedoch alle anderen Expositionspfade (wie über das Futter) explizit ausgeschlossen.

Diese Entscheidungen wurden nicht willkürlich getroffen, sondern entsprachen dem damaligen Wissensstand. So folgerten Macek et al. (1979) aus ihrer Studie zum trophischen Transfer zahlreicher Schadstoffe (einschließlich Cadmium), dass, mit Ausnahme von DDT, eine Exposition über das Futter die Anreicherung im Organismus nur geringfügig im Vergleich zur Exposition über die Flüssigphase beeinflusst. Die Schlussfolgerungen vieler Untersuchungen waren weitgehend übereinstimmend: Mit Ausnahme von (Methyl-)Hg und Se schienen Metalle für die Biomagnifikation nicht wesentlich zu sein. Basierend auf den Ergebnissen jener Zeit wurde angenommen, dass

- 1.) die Aufnahme von Metallen über das Futter im Vergleich zur Aufnahme über das Wasser vernachlässigbar gering ist und
- 2.) aufgrund des chemischen Gleichgewichtsansatzes anzunehmen ist, dass die Aufnahme von Metallen über das Futter nicht zu einer höheren Akkumulation führen wird als eine Aufnahme allein über die Wasserphase (Di Toro et al. 1991; Ankley et al., 1994).

Neuere Studien hingegen liefern zahlreiche Beispiele dafür, dass die Akkumulation von Metallen oft primär aus einer Aufnahme über das Futter hervorgeht (Tab. 1.1). Dennoch gibt es auch Untersuchungen, die eine Exposition über das Futter nicht als bedeutend stützen (Luoma et al., 1992; Lee et al., 2000). Diese diskrepanten Ergebnisse lassen vermuten, dass die von partikel-assoziierten Metallen ausgehende Toxizität komplexen Mechanismen und Regulationen unterliegt.

Tab. 1.1 Studien, in denen die Akkumulation von Metallen primär aus einer Exposition über das Futter hervorgeht

Klasse	Spezies	Metall	Quelle
Bivalvia	<i>Macoma balthica</i>	Ag, Cd	Griscom et al. (2002)
	<i>Mytilus edulis</i>	Ag, Se, Zn	Wang et al. (1996)
Insecta	<i>Chaoborus punctipennis</i>	Cd	Munger und Hare (1997)
Polychaeta	<i>Capitella sp.</i>	Cd	Selck et al. (1998)
	<i>Nereis succinea</i>	Ag, Cd	Wang et al. (1999)

1.2 Cadmium in der Umwelt

Das nicht-essenzielle Schwermetall Cadmium kommt natürlicherweise im Mineralbestand der Erdkruste mit einer durchschnittlichen Konzentration von 0,1 bis 0,5 mg/kg vor. Die industrielle Nutzung von Cadmium führte zu Anreicherungen in Böden, Sedimenten, Luft und Wasser. So können aufgrund ihrer Bindungsfähigkeit große Mengen Schwermetalle in Böden und Sedimenten akkumuliert werden und die Stabilität vieler Ökosysteme bedrohen.

Die bereits in geringen Konzentrationen stark toxische Wirkung von Cadmium stellt nicht nur für die Umwelt ein Problem dar, sondern führt durch Nahrungsketteneffekte auch beim Menschen zu großen Gesundheitsproblemen. Bei der *Agency for Toxic Substances and Disease (ATSDR)* steht Cadmium an siebter Stelle in der Liste der prioritären Gefahrenstoffe. Berufsbedingte Inhalation, das Rauchen von Zigaretten und die Ingestion cadmiumkontaminierter Nahrung führen beim Menschen zu einer zunehmenden Cadmiumakkumulation vor allem im Leber-, Lungen- und Nierengewebe, was Nierenschäden, Atemwegserkrankungen sowie neurologische Funktionsstörungen zur Folge hat. Auch bei Invertebraten wird Cadmium überwiegend in stoffwechselaktiven und exkretorischen Organen wie dem Fettkörper bei Insekten und der Mitteldarmdrüse bei Mollusken angereichert (Posthuma und Van Straalen, 1993; Dallinger und Wieser, 1984). Weiterhin gilt Cadmium als karzinogen; berufsbedingte Expositionen wurden mit Lungen-, Prostata-, Pankreas- und Nierenkrebs in Verbindung gebracht (Waalkes, 2003). Immuntoxische Wirkungen des Cadmiums werden für Invertebraten wie Oligochaeten und Muscheln beschrieben (Galloway und Depledge, 2001).

Trotz dieser Erkenntnisse sind die Wirkmechanismen der Cadmiumtoxizität bisher noch nicht vollständig verstanden und die subzellulären Vorgänge der Cadmiumaufnahme in und das Ausschleusen aus der Zelle sind weitgehend unklar.

1.3 Cadmiumaufnahme in die Zellen

Voraussetzung für die Aufnahme von Stoffen ist ihre biologische Verfügbarkeit. Für die Aufnahme des nicht-essenziellen Metalls Cadmium in die Zellen existieren keine spezifischen Transportsysteme in den Membranen. Die Aufnahme kann sowohl über aktive als auch passive Transportmechanismen erfolgen, sind bisher aber sowohl für Vertebraten- als auch Invertebratenzellen nicht in allen Einzelheiten verstanden. In Zellkulturen wird Cadmium durch verschiedene Proteine in Bakterien-, Hefen-, Pflanzen- und Säugetierzellen transportiert; inwiefern ihre spezifische Funktion zu der Cadmiumtoxizität beiträgt ist jedoch ungewiss. Eine Extrapolation von Zellkulturen auf intakte Organismen erweist sich somit als schwierig. Cadmium kann in Form anionischer Komplexe aus Karbonat-, Bikarbonat-, Hydroxyl-, oder Chloridionen über Anionen-Kanäle die Zellmembran passieren (Foulkes, 2000). Verschiedene Studien deuten darauf hin, dass die Cadmiumaufnahme in die Zelle durch Transport- und Ionenkanäle erfolgt, die der Passage physiologischer Metalle, wie Zn^{2+} , Mn^{2+} und Ca^{2+} , dienen (Waalkes und Poirier, 1985; Yanagiya et al., 2000; Zalups und Ahmad, 2003). Dalton et al. (2005) beschreiben die Cd-Ionen bei der Aufnahme über den Zn^{2+} - und Mn^{2+} -Transporter ZIP8 in Endothelzellen von Mäusen als Opportunisten, die bevorzugt in die Zellen aufgenommen werden und dort zu einer erhöhten Akkumulation und Toxizität führen.

Die Ingestion von partikel-assoziiertem Cadmium stellt ebenfalls eine Art Mimikry für den Schadstoff dar. Das Metall kann das Darmepithel als gelöstes anorganisches Ion, komplexiert durch organische Liganden (wie z.B. Histidin und Cystein) oder durch Phagozytose passieren. Die Art der Partikel, deren Konzentration sowie die zwischen Vertebraten und Invertebraten stark differierende Darmmorphologie, -funktion und -physiologie, sind bei diesen Prozessen von großer Bedeutung.

Eine starke Verringerung der Cadmiumaufnahme durch thiolblockierende Agenzien lässt auf eine Beteiligung von SH-Gruppen am Transport von Cd^{2+} -Ionen schließen (Beyersmann und Hechtenberg, 1997). Zweifelsohne existieren für die Cadmiumaufnahme mehrere parallele Transportmechanismen, die unter anderem vom Zelltyp und dem jeweiligen Gewebe abhängig sind (Foulkes, 2000). Darüber hinaus können indirekte Wirkmechanismen nicht ausgeschlossen werden. So können Cd^{2+} -Ionen mit den Oberflächenrezeptoren der Zellen interagieren und intrazelluläre Signale hervorrufen, ohne direkt in die Zelle aufgenommen zu werden (Beyersmann und Hechtenberg, 1997).

Die Cadmiumaufnahme in die Zellen erfolgt daher sowohl bei Invertebraten als auch bei Vertebraten parallel über verschiedene Transportmechanismen, die ursprünglich dem

Transport essenzieller Spurenelemente dienen. Die Schadstoffaufnahme in Form einer Art Mimikry stellt die Zellen somit vor das Problem, die zelluläre Versorgung mit Spurenelementen und Nährstoffen aufrechtzuerhalten, ohne gleichzeitig Schadstoffe in toxischen Konzentrationen aufzunehmen. Verschiedene Entgiftungs-, Reparatur- und Schutzmechanismen ermöglichen eine Regulation dieser Prozesse.

1.4 Toxizität von Cadmium

Cadmiuminduzierte Zellschädigungen können durch verschiedene Wirkmechanismen hervorgerufen werden. So kann Cadmium mit Molekülen biologischer Systeme direkt Komplexe ausbilden, die die Funktion beeinträchtigen oder komplett zum Funktionsverlust der Strukturen führen. Weiterhin kann es die Zellen indirekt durch Bildung von freien Radikalen und dem dadurch hervorgerufenem oxidativen Stress schädigen.

Die indirekte Ausbildung freier Radikale durch Cadmium erfolgt vor allem durch eine effektive Verdrängung anderer zweiwertiger Kationen wie Fe^{2+} und Cu^{2+} aus ihren Proteinbindungen. Die sich dadurch im Cytosol der Zelle anreichernden Eisen- und Kupfer-Ionen sind in der Lage, freien Sauerstoff zu Superoxid-Ionen und Wasserstoffperoxid zu reduzieren und somit den Ausgangspunkt zur Entstehung von Hydroxylradikalen zu bilden. Die reaktiven Sauerstoffspezies können zu DNA-Strangbrüchen und Lipidperoxidationen führen. Außerdem kann Cadmium die antioxidativen Prozesse in den Zellen hemmen. Durch seine hohe Affinität zu Glutathion, wird einerseits der Gehalt freier Cd^{2+} -Ionen reduziert, andererseits wird der Gehalt des Radikalfängers Glutathion gesenkt und der intrazelluläre oxidative Stress erhöht.

Weiterhin kann Cadmium durch eine nichtspezifische Bindung an die freien Sulfhydrylgruppen von Proteinen zu deren Inaktivierung/Denaturierung führen, wodurch es zu Beeinträchtigungen verschiedener Stoffwechselwege, wie beispielsweise des Glutathion-Metabolismus, kommen kann. Die Verdrängung von Zink aus den Bindungsstellen verschiedener Proteine hat ähnliche Auswirkungen zur Folge. Ferner beeinflusst Cadmium verschiedene Schritte der intrazellulären Signaltransduktion (Einfluss auf die Proteinkinase C und calmodulinabhängige Proteinkinase) sowie die zelluläre Calcium- und Zink-Homöostase (Beyersmann et al., 1994; Beyersmann und Hechtenberg, 1997).

1.5 Detoxifikation und Bioakkumulation von Schwermetallen

Um cadmiuminduzierten Zellschädigungen entgegenzuwirken, wird die Transkription proteincodierender Gene für Schutz- und Reparaturmechanismen erhöht. Bei chronischer Belastung ermöglichen diese den Organismen und Populationen eine gewisse Anpassung an Umweltchemikalien und somit, ursprünglich toxische Konzentrationen ohne sichtbare Schädigung, zu überleben (Fent, 1998).

Folgende Schutzmechanismen gegen eine Schwermetallvergiftung sind dabei für die Zellen von Bedeutung: (I) Synthese komplexbildender Proteine, die die Metallionen durch Bindung in eine biologisch inaktive Form überführen, (II) Expression von Proteinen, die als Pumpen für Metall-Thiolat-Komplexe oder freie Ionen fungieren, (III) Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, welche die Transkription von Genen aktivieren, die in die Detoxifizierung oder in spezifische Reparaturmechanismen eingebunden sind, (IV) Aktivierung proteolytischer Abbauwege. Die Gewichtung der einzelnen Schutzreaktionen kann zwischen unterschiedlichen Organismen variieren.

Viele Proteine, die infolge einer metallaktivierten Stressreaktion induziert werden, zeigen einen hohen Grad der evolutionären Konservierung. Zwischen *C. elegans* und höheren Organismen ist dies zutreffend für Metallothioneine (Freedman et al., 1993), Superoxiddismutase, Ubiquitin (Stringham et al., 1992), Hitzeschockprotein 70 (Heschl und Baillie, 1990), Glutathion, (Tawe et al., 1998), Katalase (Taub et al., 1999) und Multidrug Resistance-associated Protein (Broeks et al., 1996).

Anhand von toxikogenomischen Analysen konnten in *C. elegans* 290 Gene identifiziert werden, deren Expression infolge einer Cadmiumexposition verändert wurden (Cui et al., 2007). Einige Gene, darunter *cdr-1* und die Metallothioneine *mtl-1* und *mtl-2*, sind bekannt dafür, an der Detoxifikation beteiligt zu sein. In den meisten Fällen ist der Zusammenhang zwischen einer cadmiuminduzierten Veränderung des mRNA-Levels und den resultierenden biologischen Auswirkungen nicht bekannt. Nur wenige der Gene wurden bisher hinsichtlich ihrer Bedeutung für eine Cadmium-Resistenz untersucht. Ein Knockout der Metallothioneine 1 und 2 in Mäusen (Klaasen et al., 1999) und eine Hemmung des *cdr-1*-Gens (*cadmium-responsive gene-1*) in *C. elegans* (Liao et al., 2002) durch RNAi führten zu einer Hypersensitivität gegenüber Cadmium und machen die Bedeutung der Proteine im Schutz gegen eine cadmiuminduzierte Toxizität deutlich.

Das in *C. elegans* identifizierte cadmium-responsive gene-1 (*cdr-1*) codiert für ein hydrophobes, integrales Membranprotein der Lysosomen, dessen Transkription ausschließlich in den Darmzellen post-embryonaler Nematoden erfolgt (Liao et al., 2002). Untersuchungen

von Liao et al. (2002) und Dong et al. (2005) deuten darauf hin, das CDR-1 der Osmoregulation in *C. elegans* dient und möglicherweise Cadmium oder andere Ionen in die Lysosomen pumpt. Lysosomen dienen der intrazellulären Speicherung von Metallen. So führt eine Cadmiumexposition bei Schnecken und Ratten zu einer Akkumulation des Metalls in den Lysosomen (Marigómez, 1990, Diep et al, 2005). Die Induktion der *cdr-1*-Transkription infolge einer Cadmiumexposition erfolgt parallel zu der der Methallothioneine *mtl-1* und *mtl-2* in *C. elegans*. Einzigartig für *cdr-1* ist, dass nur Cadmium und keine weiteren Umweltstressoren die Transkription des Gens induziert. Gewöhnlich wird die Transkription von Metall- oder Stressproteinen durch verschiedene Stressoren aktiviert.

Eine weitere Möglichkeit für *C. elegans* in einer widrigen Umgebung zu überleben und sich anzupassen, besteht in der aktiven Elimination von Schadstoffen durch Transportproteine. Das Phänomen, dass Zellen mittels Transportproteinen eine Resistenz gegenüber Schadstoffen entwickeln können, wird als Multidrug Resistance (MDR) beschrieben. Proteine mit MDR-Funktion besitzen die Fähigkeit, cytotoxische Substanzen/Medikamente aus Zellen (z.B. Tumorzellen) zu pumpen. Eine Überexpression dieser Efflux-Pumpen führt in (menschlichen) Tumorzellen zu einer Unempfindlichkeit gegenüber Chemotherapeutika. Zugehörig zu diesen Membran-Transportproteinen sind die ABC-Transporter. Die ABC-Transportproteine bilden eine umfangreiche, hochgradig konservative Großfamilie, die durch ATP-Hydrolyse eine Vielzahl von Molekülen durch eine Membran transportieren. *C. elegans* verfügt in seinem Genom über ungefähr 60 ABC-Transporter-Gene. Zur Unterfamilie der ABC-Transportersysteme gehören die P-Glykoproteine (PGP) und die Multidrug-Resistance assoziierten Proteine (MRP). Neben der Detoxifikation durch CDR-1 und Metallothioneinen, sind für Nematoden auch die Gene *pgp-1* und *mrp-1* zur Cadmium-Entgiftung von großer Relevanz. *Pgp-1*- und *mrp-1*-Deletionsmutanten von *C. elegans* reagierten im Vergleich zum Wildtyp gegenüber einer Cadmiumexposition überempfindlich (Broeks et al., 1996).

Cui et al. (2007) teilten Gene, deren Expressionshöhe in *C. elegans* durch eine Cadmiumexposition signifikant verändert wurde, in drei Gruppen ein: 1.) die früh antwortenden Gene 2.) die verzögert antwortenden Gene und 3.) die runterregulierten Gene. Den früh antwortenden Genen zugehörig sind *cdr-1*, *mtl-1*, *mtl-2* sowie Phase-I- und Phase-II-Metabolismus-Gene. Eine 4-stündige Cadmiumexposition führte in derselben Studie zu einer Überexpression von Genen, die für zelluläre Lokalisations-/Bindungs- und Transportproteine sowie Stoffwechsellzyme codieren. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die erste Reaktion auf eine Cadmiumintoxikation eine transkriptionale Anpassung zur Aufrechterhaltung der Ionen-Homöostase und Regulierung der Energieversorgung ist. Eine

Verlängerung der Expositionszeit (24 h) führte zu einer Überexpression von Genen, die an der Proteolyse beteiligt sind, was auf eine Anreicherung beschädigter Proteine hinweist. Dass eine Cadmiumexposition mit einer Beschädigung von Proteinen einhergeht, wurde bereits an anderer Stelle erläutert. Abschwächungen der Expression von Genen, die am Fettsäure-Stoffwechsel, zellulären Lipid-Stoffwechsel und Zellwand-Katabolismus beteiligt sind, deuten auf eine Zerstörung mehrerer Zellfunktionen durch Cadmiumtoxizität hin.

Ist die Aufnahme von Schadstoffen höher als die Elimination, kommt es zur Akkumulation der Fremdstoffe im Organismus. Voraussetzung für die Anreicherung im Organismus ist die Bioverfügbarkeit und Aufnahmefähigkeit der Chemikalie; nur der bioverfügbare Teil wird aufgenommen. Nach der Aufnahme sind die Verteilung innerhalb des Organismus sowie der Metabolismus und die Elimination von Bedeutung und bestimmen somit im Wesentlichen die Bioakkumulation von Schadstoffen. Die Gesamtheit der Prozesse, denen eine Chemikalie im Organismus unterliegt, wird als Toxikokinetik beschrieben. Sie umfasst die Aufnahme- und Eliminationsraten, die interne Verteilung und den Metabolismus (Biotransformation) von Schadstoffen und bestimmt somit sowohl die interne Konzentration als auch die Konzentration einer Chemikalie am Zielort. Die Toxikodynamik beschreibt die Wechselwirkung der Substanz mit den molekularen Strukturen der Zelle und des Organismus. Die Vorherbestimmung der von Metallen ausgehenden Toxizität anhand ihrer Konzentration im Expositionsmedium erweist sich als ungenau, da die Mechanismen die der Metallakkumulation unterliegen sehr komplex und zudem speziesspezifisch sind. Weiterhin werden die Prozesse der Toxikokinetik durch den Expositionspfad beeinflusst. So konnten Studien zeigen, dass z.B. die Verteilung von Metallen in marinen Invertebraten in Abhängigkeit vom Aufnahmepfad erfolgt. Metalle, die über die Wasserphase aufgenommen wurden, waren hauptsächlich in den Körperoberflächen, wie dem chitinösen Exoskelett von Crustaceen oder Muschelschalen, und weniger im Weichgewebe nachzuweisen (Fisher et al, 1983, 1996). Ob die vom Organismus aufgenommenen Metalle temporär oder permanent akkumuliert oder gänzlich eliminiert werden, kann ebenso durch den Expositionsweg beeinflusst werden. Für die Toxizität der Metalle ist dabei nicht die Konzentration des akkumulierten Metalls, sondern vielmehr die Überschreitung eines bestimmten Grenzwertes von Bedeutung. Die Bestimmung der Metallgewebekonzentration in Organismen kann somit einen Aufschluss über die Interaktionen zwischen der Exposition und dem daraus resultierenden Effekt geben.

1.6 Verknüpfung der toxischen Wirkungen mit den verschiedenen Ebenen der biologischen Hierarchie

Sind Organismen suboptimalen Umweltbedingungen ausgesetzt, kommt es zu stressbedingten Mobilisierungen der metabolischen Ressourcen und führt zu einer verringerten Energieverfügbarkeit für Entwicklungs- und Reproduktionsprozesse. Der Einfluss von Stressoren auf den physiologischen Energiezustand von Organismen kann somit z.B. durch die Bestimmung von Wachstum, Reproduktion und Überleben ermittelt werden. Die für das Wachstum benötigte Energie stellt ein sensibles Maß für den Stress von Organismen dar (Calow, 1998). Der Wachstumsvorgang repräsentiert die Verbindung bedeutender physiologischer Prozesse; insbesondere die Balance zwischen den Prozessen der Energiebeschaffung (Fressen und Assimilation) und den Energieaufwendungen für Metabolismus und Exkretion werden verkörpert (Smolders et al., 2004). Dieser physiologische, energetisch-basierende Ansatz wird als *Scope for Growth* (SFG) bezeichnet und wurde bereits umfassend bei Invertebraten untersucht (Maltby et al., 1990 a, b). Eine weitere biochemische Alternative zum physiologischen SFG bietet die Bestimmung des Energieumsatzes auf zellulärer Ebene anhand des sogenannten *Cellular Energy Allocation* (CEA) (De Coen und Janssen, 2003). Bei diesem Ansatz werden die Energiereserven (Glykogen-, Protein- und Lipidgehalt) und der Energieverbrauch auf zellulärer Ebene bestimmt und als Stressindikator genutzt.

Trotz verschiedener Modelle erweist es sich als schwierig, einen direkten Zusammenhang zwischen den zellulären und biochemischen Reaktionen und deren Einfluss auf das Individuum oder die Population herzustellen. Cui et al. (2007) fanden bei *C. elegans* nach einer Cadmiumexposition eine veränderte Genexpression von Genen, die zuvor bereits mit embryonaler Sterblichkeit, verlangsamtem Wachstum, larvalem Wachstumsstillstand, Sterilität und anormalen Bewegungen in Zusammenhang gebracht wurden. Dieselbe Arbeitsgruppe untersuchte durch eine Genexpressionshemmung verschiedener cadmiuminduzierter Gene deren Einfluss auf das Wachstum der Nematoden. Neben *cdr-1* führte auch die Hemmung der für die Detoxifikation bedeutenden Gene *mtl-1* und *mtl-2* zu einem verlangsamten Wachstum der Nematoden bei Cadmiumexposition. Insgesamt konnte der Einfluss von 50 cadmiuminduzierten Genen auf das Nematodenwachstum nachgewiesen werden.

Studien wie diese zeigen deutlich, dass den toxischen Auswirkungen von Schadstoffen auf organismischer Ebene die Effekte auf der zellulären und subzellulären Ebene vorausgehen. So wird die Expression verschiedener Gene reguliert, um den Stoffwechsel aufrecht zu

erhalten und die Energieversorgung für den Organismus zu gewährleisten. Inwiefern die Art der Schadstoff-Exposition einen Einfluss auf die Prozesse der Genregulation im Allgemeinen und auf den Energiehaushalt von Organismen im Speziellen hat, wurde bisher kaum untersucht. Zusammenfassend stellt die Abbildung 1.1 die beschriebenen Vorgänge der Exposition, internen Verfügbarkeit und verschiedenen Phasen der toxischen Wirkung von Cadmium vereinfacht dar.

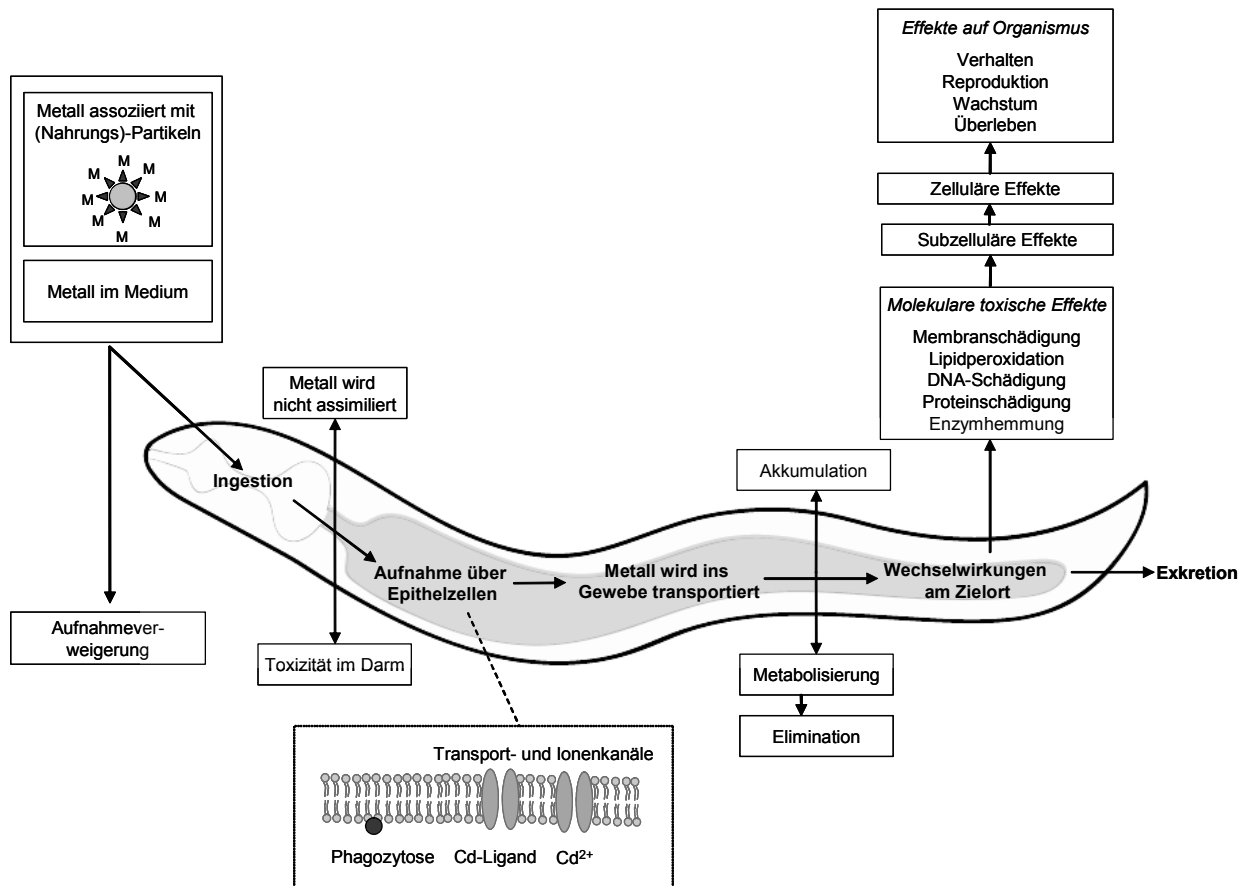


Abb. 1.1 Aufnahme und Schicksal von Metallen im Nematoden *Caenorhabditis elegans*

1.7 Ziel der Arbeit

Obwohl die vom Cadmium ausgehende Gefährdung lange bekannt ist, sind die Prozesse der Toxikokinetik und Toxikodynamik dieses Metalls weitgehend unbekannt. Ob für diese Prozesse gebundenes Cadmium oder die freien Metall-Ionen bzw. deren Aquo-Komplexe von Bedeutung sind, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Wie auch für andere Metalle ist die Bioverfügbarkeit und Bioakkumulation von Cadmium speziesabhängig und für den Nematoden *Caenorhabditis elegans* noch nicht vollständig geklärt. Die Mechanismen der

biologischen Verfügbarkeit und Akkumulation von Cadmium anhand dieses Modellorganismus zu verstehen, kann aufgrund seiner hohen Konservierung der Genfunktionen - auch zu krankheitsassoziierten humanen Genen (ca. 60 %) - einen bedeutenden Beitrag im weiteren Verständnis zur Cadmiumtoxizität leisten.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung verschiedener Expositionspfade für die interne Verfügbarkeit und Anreicherung von Cadmium in *C. elegans* zu beurteilen und einen Einblick in die zugrunde liegenden Mechanismen zu erlangen. Als Biomarker für die biologische Verfügbarkeit des Metalls wurde die Veränderung der Genexpression des *cdr-1*-Gens in Abhängigkeit von dem Expositionsweg untersucht. Die Cadmiumanreicherung in den Nematoden wurde anhand der Gesamtgewebekonzentration ermittelt. Die Würmer wurden über die reine Flüssigphase (Medium) oder in Medium suspendierte Partikel dem Schadstoff exponiert. Folgenden Fragestellungen wurde dabei nachgegangen:

1. Welchen Einfluss haben in Flüssigkeit gelöste Partikel im Vergleich zur reinen Flüssigphase auf die biologische Verfügbarkeit? Ist die Beschaffenheit und Konzentration der Partikel von Bedeutung?
2. Gibt es Unterschiede in der Cadmiumakkumulation in Abhängigkeit vom Expositionspfad? Lassen sich im Ansatz expositionsbedingte Unterschiede bei der Entgiftung erkennen?
3. Besteht ein Zusammenhang zwischen der biologischen Cadmiumverfügbarkeit (*cdr-1*-Genexpression) und der Cadmiumbioakkumulation?
4. Kann dem Energiestatus der Nematoden eine Art Regulatorfunktion für die Cadmiumverfügbarkeit und -anreicherung beigemessen werden?
5. Kann anhand der *cdr-1*-Genexpression und/oder Cadmiumakkumulation die chronische Cadmiumtoxizität bei *C. elegans* abgeschätzt werden? Welche Bedeutung hat eine bestehende Cadmiumakkumulation für die chronische Toxizität?

2. Material und Methoden

2.1 Testorganismus

Nematoden (Fadenwürmer) sind die artenreichsten und häufigsten Metazoa in Sedimenten und Böden (Yeates, 1981) und repräsentieren somit eine äußerst wichtige und weitverbreitete Tierklasse des benthischen Lebensraumes. Die endobenthische Lebensweise der Nematoden lässt das gesamte Risikopotenzial belasteter Sedimente und Böden mithilfe von ökotoxikologischen Biotests erfassen. So wird der ca. 1 mm große, freilebende Nematode *Caenorhabditis elegans* (Maupas, N2 var. Bristol) für die ökotoxikologische Bewertung von Sedimenten und Böden in Biotests eingesetzt (Traunspurger et al., 1997). Mit dem unmittelbar vor der ISO-Normierung (ISO/CD 10872) stehenden Nematodentest wird die chronische Toxizität in festen Substraten (Sediment, Boden) und flüssigen Substraten (Eluat, Extrakt, Porenwasser) bestimmt. Der Schadstoffeinfluss wird durch die Parameter Größenwachstum, Fertilität und Reproduktion erfasst.

Die Generationszeit von *C. elegans* beträgt bei 25 °C drei Tage. Bei seiner Entwicklung zum adulten Tier durchläuft er vier Juvenilstadien (J1 – J4). Drei Tage nach dem Schlüpfen ist er geschlechtsreif und beginnt mit der Ablage von bis zu 300 Eiern. Die gesamte Lebensdauer von *C. elegans* beträgt ca. 21 Tage (Brenner, 1974). Bei *C. elegans* können zwei Geschlechter unterschieden werden: Der Hermaphrodit und die, nur selten auftretenden (< 0,5 %), männlichen Tiere. Die Rekombination des Genoms ist somit gering. Der Hermaphrodit zeichnet sich durch die sogenannte Eutelie aus. Das adulte Tier besteht aus exakt 959 somatischen Zellen und weist, wengleich weniger differenziert, Gewebe und Organe höherer Organismen auf. Er besitzt Muskeln, ein einfaches Nervensystem, Gonaden, einen Gastrointestinaltrakt und eine Epidermis (Jorgensen und Mango, 2002). Die Epidermis scheidet nach außen hin eine Kutikula ab, die auch die Mundhöhle und den muskulären Pharynx auskleidet. Pharynx, Mitteldarm und Enddarm bilden die funktionell unterschiedenen Abschnitte des Verdauungssystems.

C. elegans ist ein sogenannter Filtrierer, der sich vorwiegend von Bakterien und anderen kleinen Partikeln ernährt. Dabei nimmt er Flüssigkeit und darin suspendierte Partikel auf und transportiert diese entlang des pharyngealen Lumens. Im letzten Abschnitt des Pharynx, dem terminalen Bulbus, werden die Partikel durch Mahlzähne aufgebrochen. Während die dabei entstehenden Zellbruchstücke weiter in den Darm transportiert werden, wird der größte Anteil der Flüssigkeit wieder ausgestoßen. Die Anhäufung von Futterpartikeln im Pharynx ist vermutlich für eine effiziente Verdauung und Absorption wichtig (Avery und Shtonda, 2003).

Die kurze Entwicklungsdauer, die leichte Kultivierung und Handhabbarkeit, der erfolgreiche Einsatz in Biotests und das relativ kleine Genom ließen *C. elegans* als einen geeigneten Testorganismus erscheinen. Das seit 1998 komplett sequenzierte Genom umfasst 97 Mio. Basenpaare mit über 19.000 proteinkodierenden Genen (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998). Trotz der vielfach höheren Komplexität des menschlichen Genoms (ca. $3,2 \cdot 10^9$ bp) ist für rund 60 % der krankheitsassoziierten humanen Gene ein entsprechendes homologes Gen in *C. elegans* zu finden. Weiterhin ist die Induktion vieler metallaktivierter Stressproteine zwischen *C. elegans* und höheren Organismen evolutiv stark konserviert.

2.2 Kultivierung von *C. elegans*

Alle Experimente dieser Arbeit wurden mit dem Wildstammtyp des Nematoden *Caenorhabditis elegans* Variation Bristol, Stamm N2, durchgeführt. Um Kontaminationen der Nematodenkulturen vorzubeugen, wurde die Kultivierung von *C. elegans* stets unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

C. elegans wurde in 10-cm-Petrischalen auf NGM-Agar bei 20 °C gezüchtet. Die zuvor auf die Agarplatten geimpften *Escherichia coli* OP50-Bakterien dienten als Futter. *C. elegans* besitzt die Fähigkeit, Zeiträume, in denen Nahrungsmangel herrscht, durch Bildung von Dauerstadien zu überdauern. Ist der Bakterienrasen auf den Agarplatten abgegrast, dienen die sich darauf ausbildenden Dauerlarven als Vorratskulturen für *C. elegans* („Hungerplatten“). Diese Hungerplatten können mindestens zwei Monate aufbewahrt werden. Für die Experimente wurden aus den Hungerplatten jeweils zwei kleine Agarstücke herausgeschnitten und mit der nematoden-bewachsenen Seite auf eine mit frischen Bakterien angeimpfte NGM-Agarplatte überführt. Die Dauerlarven, die aus dem Juvenilstadium 2 hervorgehen, beginnen bereits wenige Stunden, nachdem ihnen frisches Futter zugefügt wird, zu fressen und treten nach einer Häutung in das Juvenilstadium 4 ein. Nach einer Inkubation von 96 h bei 25 °C waren die Testplatten mit vielen Würmern aller Entwicklungsstadien bewachsen.

2.3 Ernte der *C. elegans*-Kultur

Nach einer Inkubationszeit von 96 h wurden die Nematoden geerntet. Um die an den Würmern haftenden Bakterien zu entfernen wurden die Wurmulturen durch eine Saccharosebehandlung gereinigt. Dazu wurde die Kultur mit M9-Medium (4 °C) von den NGM-Platten abgespült, in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und zum Absedimentieren einige Minuten auf Eis gestellt. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 3000 rpm, 4 °C wurde das Pellet in 3 ml gekühltem

Leitungswasser resuspendiert und mit 8 ml einer eisgekühlten 35 % (w/v) Saccharoselösung (in 50 mM NaCl-Lösung) versetzt. Bei einer anschließenden 3-minütigen Zentrifugation bei 4 °C und 3000 rpm flotierte die lebensfähigen Nematoden in die obere Phase. Tote Würmer, Bakterien und andere Verunreinigungen bilden das Pellet. Die Nematoden der oberen Phase wurden vorsichtig mit einer Pasteurpipette in ein neues, gekühltes 50-ml-Zentrifugenröhrchen gegeben. Um den Saccharoseüberschuss zu entfernen, folgten zwei weitere Waschschrte mit gekühltem Leitungswasser.

Die Cadmiuminkubation der gewaschenen Würmer erfolgte wie in Kapitel 2.6 beschrieben. Für die RNA-Isolierung (siehe 2.7) und Bestimmung der Cadmiumgewebekonzentration (siehe 2.10) nach Versuchsende wurde das gewaschene Wurmpellet in ein 1,5-ml-Zentrifugenröhrchen überführt, bei 4 °C und 3600 rpm für 5 min. in der Mikrozentrifuge zentrifugiert und der Überstand abgenommen.

2.4 Bakterien

Als Futterorganismus für die Nematodenkultur wurde der *Escherichia coli* Stamm OP50, eine Uracil-Mangelmulante, verwendet. Dieser Stamm kann nur im Labor gehalten werden und bildet auf NGM-Agar einen dünnen Bakterienrasen, der von den Nematoden abgeweidet werden kann. Die glycerinhaltigen *E. coli*-Stammkulturen (85 % Bakterienkultur mit einer OD bei 600 nm von 0,6 + 15 % Glycerin) wurden bei -20 °C gelagert. Zur Herstellung einer Bakterienflüssigkultur wurden 20 µl einer Stammkultur in 50 ml LB-Medium in einem 250-ml-Erlenmeyerkolben pipettiert und 17 h bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert. Für die Kultivierung der Nematoden wurde 1 ml der Bakterienflüssigkultur auf eine NGM-Agarplatte pipettiert und mit einem Drigalskispatel gleichmäßig über die gesamte Platte ausgestrichen. Zur Verdunstung der überschüssigen Flüssigkeit wurden die Platten mit geöffnetem Deckel unter der Sterilbank getrocknet. Anschließend wurden die Platten wie unter 2.2 beschrieben mit Nematoden beimpft.

2.5 Versuchsaufbau

Die gereinigten Würmer wurden über verschiedene Expositionspfade mit Cadmium inkubiert. Dazu wurden die Wurmpellets von insgesamt fünf Nematodenplatten in 17,5 ml der entsprechenden Cadmiumlösung bzw. für die Kontrollansätze in M9-Medium resuspendiert und in 270-ml-Zellkulturflaschen überführt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2,5 ml Partikelsuspension (Herstellung siehe 2.6.3.1 und 2.6.4.3). Die nominale Metallkonzentration betrug 5, 25, 50 und 75 µM Cadmium bei einer Inkubationszeit von 24 h und 25 und 50 µM bei

einer Inkubation von 6 h. Die Inkubationstemperatur betrug bei allen Experimenten 20 °C. Pro Behandlung wurden drei unabhängige Replikate angesetzt und aus diesen am Testende jeweils eine Stichprobe für die Bestimmung der Endpunkte *cdr-1*-Expression und Bioakkumulation in *C. elegans* entnommen. Die *cdr-1*-Genexpression diente als Biomarker für die Cadmiumbioverfügbarkeit; die Metallgewebekonzentration diente als Indikator für die Cadmiumakkumulation in *C. elegans*. Weiterhin wurden nach der Cadmiuminkubation die Adeninnucleotide bestimmt und ein modifizierter Nematodentest durchgeführt.

Zur Herstellung der Cadmium-Stammlösung wurde analytisch reines $\text{Cd}(\text{NO}_3)_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich) in sterilem, destilliertem und deionisiertem Wasser gelöst. Das Ansetzen der Testlösungen erfolgte durch Verdünnung mit M9-Medium. Die Konzentrationen der Testlösungen wurden durch Messungen mittels Flammen-Atomabsorptionsspektrometrie (F-AAS) überprüft. Abbildung 2.1 zeigt einen schematischen Überblick des Versuchsaufbaus.

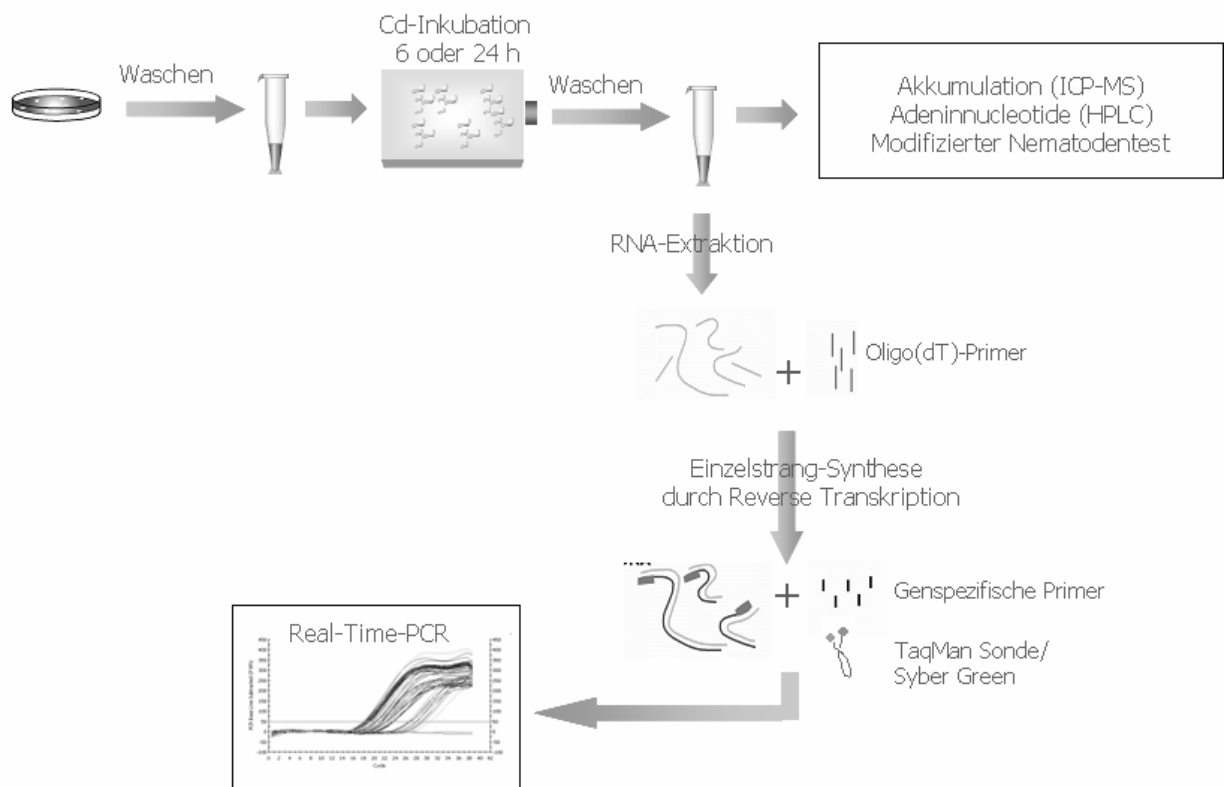


Abb. 2.1 Experimenteller Aufbau

2.6 Expositionspfade

Um die Bedeutung der Exposition für die Bioverfügbarkeit und Bioakkumulation von Cadmium zu untersuchen, wurde *C. elegans* dem Schadstoff über verschiedene Expositionspfade (Flüssigphase und in Flüssigkeit suspendierte Partikel) ausgesetzt.

2.6.1 Cadmium-Exposition über Flüssigphasen

Alle Flüssigphasenexperimente basierten auf einer Exposition über das M9-Medium (ohne Futterpartikel). Neben einer Inkubation über das reine M9-Medium wurde dieses zusätzlich mit dem Effluxinhibitor Verapamil oder einer Lipopolysaccharid-Lösung (siehe 2.6.2) versetzt.

Um die Bedeutung des Effluxes für die Cadmiumdetoxifikation zu untersuchen, wurde dem M9-Medium der P-Glykoprotein-Inhibitor R(+)-Verapamil-Monohydrochlorid-Monohydrat (Sigma-Aldrich) zugefügt. Laut Franks et al. (2001) führen Verapamil-Konzentrationen von $> 100 \mu\text{M}$ zu einer kompletten Hemmung der Aktionspotenziale in der Pharynxmuskulatur. Um das rhythmische Pumpen der Pharynxmuskulatur nicht vollständig zu unterbinden und somit eine Nahrungsaufnahme zu ermöglichen, wurden die Nematoden mit einer Verapamil-Konzentration von $25 \mu\text{M}$ versetzt.

2.6.2 Exposition über Lipopolysaccharide

Lipopolysaccharide (LPS) sind Bestandteile der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien. Sie bestehen aus drei miteinander verbundenen Teilbereichen (Abb. 2.2): Dem hydrophoben Lipid A, dem hydrophilen Kernbereich und den hydrophilen O-spezifischen Polysaccharidseitenketten. Als Zellwandbestandteil von *E. coli* können LPS die Cadmiumverfügbarkeit und -akkumulation beeinflussen. Um die Bedeutung dieses Moleküls als potenziellen Cadmiumvektor zu untersuchen, wurden die Nematoden über zwei verschiedene Wege den LPS von *E. coli* O127:B8 (Sigma-Aldrich) für jeweils 6 h exponiert. Der Einfluss der Cadmium-Oberflächenbindung durch *E. coli* wurde durch die Beschichtung von $1\text{-}\mu\text{m}$ -Mikropartikeln mit LPS untersucht (siehe 2.6.4.2). Die Partikelanzahl wurde entsprechend den 6-h-Experimenten mit *E. coli* 200 FAU gewählt und betrug $0,347 \cdot 10^9$ Mikropartikel pro ml. Des Weiteren wurden die Nematoden über eine $0,3 \text{ mg/l}$ LPS-Lösung exponiert und die Bedeutung von LPS als nährstoffreiches Transportmolekül untersucht. LPS besitzen die Eigenschaft in jeder Lösung Mizellen auszubilden. Diese Gegebenheit ermöglicht einen potenziellen Einschluss von Cadmium in die Mizellen oder eine Bindung an deren Oberflächen.

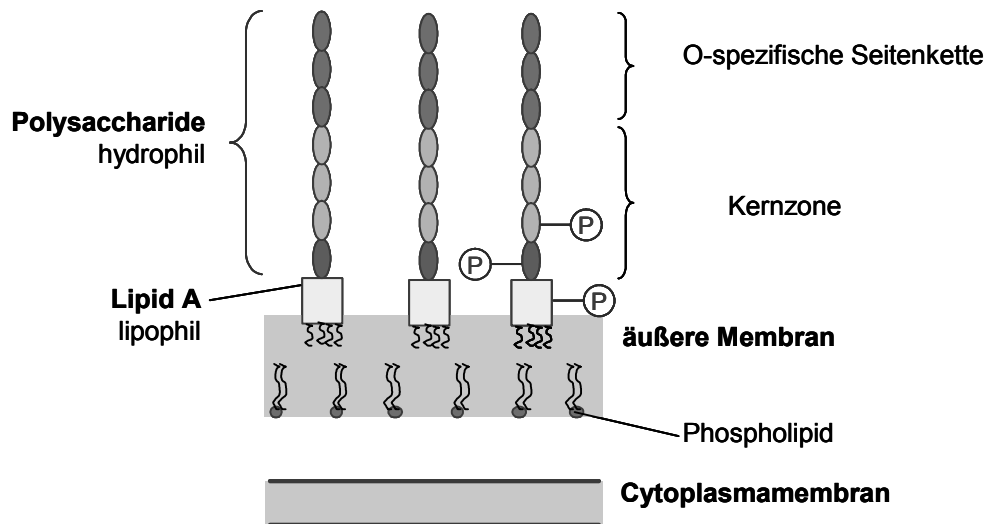


Abb. 2.2 Lipopolysaccharide und die äußere Membran Gram-negativer Bakterien

2.6.3 Bakterien

Die Cadmiumexposition über Futterpartikel wurde anhand von zwei Bakterienarten untersucht: Dem Gram-negativen, stäbchenförmigen Bakterium *Escherichia coli* (OP 50) und *Arthrobacter globiformis*, einem Gram-positiven, coryneformen Bakterium.

E. coli OP 50 ist ein im Labor allgemein viel genutzter Futterorganismus für *C. elegans*. Für die Kultivierung des Futterorganismus wurden 20 µl aus einer Stammkultur in 50 ml LB-Medium pipettiert und für 17 ± 1 h bei 37 °C unter Schütteln (200 rpm) inkubiert. *E. coli* ist ein 0,5 µm breiter und 1,5 µm langer Organismus, der unter Cadmiumstress cadmiumbindende Proteine synthetisiert (Binet et al., 2003, Khazaeli und Mitra, 1981). Um einen, aufgrund der spezifischen Cadmiumbindung, erhöhten Schadstofftransfer auszuschließen, wurde des Weiteren der Einfluss von *A. globiformis* als Vektor für die Cadmiumverfügbarkeit untersucht. *A. globiformis* ist ein im Boden in großer Anzahl verbreitetes Bakterium. Die zur Gattung *Arthrobacter* gehörenden Bakterien sind pleomorph; in jungen Kolonien und Nährlösungen wachsen sie in Form von unregelmäßig gestalteten Langstäbchen. Alte Kulturen hingegen enthalten nur kokkoide Formen (Schlegel, 1992). Um eine morphologische Veränderung des Futterorganismus während eines Experiments auszuschließen, wurden hierzu 72 ± 1 h alte Kulturen mit ausschließlich kokkoiden Formen genutzt. Ihre Größe von 1,5 µm ist vergleichbar mit der von *E. coli*. Die Kultivierung von *A. globiformis* erfolgte in 1/3-DSM-Medium. 1 ml einer Stocklösung wurde in 50 ml Medium gegeben und bei 30 °C und 150 rpm inkubiert.

Neben dem Einfluss der Qualität biotischer Partikel wurde auch der Einfluss der Bakterienquantität auf die Cadmiumbioverfügbarkeit und -bioakkumulation für Nematoden

durch Fütterung verschiedener *E. coli*-Konzentrationen untersucht. In Experimenten mit *E. coli* als Futterpartikel wurden die Nematoden für 6 und 24 h über Bakterienkonzentrationen von 100 FAU, 200 FAU und 335 FAU inkubiert. Die Exposition über *A. globiformis* erfolgte für 6 h mit einer Bakteriendichte von 200 FAU. Die Herstellung der Bakteriensuspensionen erfolgte wie nachfolgend beschrieben.

2.6.3.1 Herstellung der Bakteriensuspensionen

Mithilfe von Trübungsmessungen wurden Bakteriensuspensionen definierter Konzentration hergestellt. Für die Einstellung der Bakteriendichte von 100 FAU ($0,077 \cdot 10^9$ Zellen/ml), 200 FAU ($0,177 \cdot 10^9$ Zellen/ml) oder 335 FAU ($0,347 \cdot 10^9$ Zellen/ml) wurden drei unabhängige Stichproben bei einer Wellenlänge von 600 nm gegen das entsprechende Kulturmedium gemessen. Anschließend folgte eine Zentrifugation der Bakteriensuspension für 20 min bei 10.000 rpm. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in dem gleichen Volumen in M9-Medium resuspendiert. Nach einem weiteren Waschvorgang wurde das Pellet in einem Achtel des ursprünglichen Volumens in M9-Medium gelöst und hiervon 2,5 ml Bakteriensuspension als Futterpartikel in den Experimenten eingesetzt. Durch Zugabe von 17,5 ml Cadmiumlösung bzw. M9-Medium ergab sich die anfänglich eingestellte Bakterienkonzentration.

Für die Bestimmung der Bakterienkonzentration wurde eine Eichung des Photometers vorgenommen und die Bakterienzellzahl mit der sich daraus ergebenden Formel (1) berechnet. Für die Umrechnung der optischen Dichte (OD) in die Einheit FAU wurde in regelmäßigen Abständen eine Kalibrierung gemäß ISO-Norm 7027 (1999) vorgenommen.

$$(1) \quad C \text{ (Zellen/ml)} = \frac{OD - 0,0535}{1 \cdot 10^{-9}}$$

2.6.4 Künstliche Partikel

Um den Einfluss funktioneller Gruppen und deren Bindungsstärke auf die Verfügbarkeit und Akkumulation von Cadmium zu untersuchen, wurden fluoreszierende Polystyrol-Mikropartikel (FluoSpheres[®], Molecular Probes) mit unterschiedlichen funktionellen Oberflächengruppen genutzt. Des Weiteren wurden Experimente mit einem Gemisch aus künstlichen Partikeln und *E. coli*, im Verhältnis 1:1, durchgeführt. Die Gesamtpartikelanzahl pro Testansatz betrug $0,347 \cdot 10^9$ Partikel pro ml.

2.6.4.1 Funktionelle Oberflächengruppen

Carboxylierte FluoSpheres[®] sind anionische Partikel mit einer relativ hydrophilen Oberflächenschicht. Ihre starke Ladung reduziert die Anziehungskraft für Zellen, sodass sie häufig Anwendung in biologischen Systemen finden. Proteine, Nukleinsäuren und andere Biomoleküle können kovalent gebunden werden. Bei den FluoSpheres[®] mit anionischen Sulfatgruppen als funktionelle Oberfläche, handelt es sich um relativ hydrophobe Partikel. Moleküle mit hydrophoben Eigenschaften, wie Proteine, Nukleinsäuren und viele kleine Biomoleküle werden von diesen Partikeln stark passiv gebunden. Die aminierten FluoSpheres[®] sind hydrophile Partikel, die eine positiv geladene Aminogruppe tragen.

2.6.4.2 Beschichtung von Mikropartikeln mit Lipopolysacchariden

Zur Bindung der Lipopolysaccharide (LPS) an die carboxylierten Mikropartikel wurde die FluoSpheres[®]-Stammlösung zunächst für 3 min ins Ultraschallbad gestellt und anschließend gut durchmischt. 5 ml der 2%igen Ausgangslösung wurden zweimal mit Bicarbonatpuffer gewaschen. Dann erfolgte die Zugabe von 50 µg LPS pro ml und die Suspension wurde mit Bicarbonatpuffer auf ein Volumen von 10 ml aufgefüllt. Es folgte eine zweistündige Inkubation unter Überkopfschütteln bei RT mit darauffolgendem Waschen (zweimal mit Bicarbonatpuffer). Um reaktive Oberflächengruppen, die noch nicht durch das Substrat geblockt sind, abzusättigen, wurde die Partikelsuspension mit 5 % (w/v) BSA (bovines Serumalbumin in PBS) erneut auf ein Volumen von 10 ml aufgefüllt und für 1 h auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in 5 % (w/v) BSA wurden die Partikel maximal für 2 Tage bei 4 °C in BSA gelagert. Das BSA wurde vor Versuchsbeginn entfernt und die Partikel in M9-Medium suspendiert.

2.6.4.3 Herstellung der Mikropartikelsuspensionen

Entsprechend der 24-h-Experimente mit *E. coli* 335 FAU wurden Suspensionen mit $0,347 \cdot 10^9$ Mikropartikeln pro ml hergestellt. Die Berechnung der Partikelkonzentration erfolgte nach folgender Formel:

$$(2) \quad \text{Partikelanzahl/ml} = \frac{6C \cdot 10^{12}}{\rho \cdot \pi \cdot \phi^3}$$

Mit:

C = Konzentration der suspendierten Partikel in g/ml
(0,02 g/ml bei einer 2 %igen Suspension)

ϕ = Durchmesser der Mikrokugeln in μM

ρ = Polymerdichte in g/ml (1,05 für Polystyrol)

Um eine homogene Verteilung der künstlichen Partikel in der 2%igen FluoSpheres®-Stammlösung zu erhalten, wurde diese für 3 min ins Ultraschallbad gestellt. Nach anschließendem Durchmischen wurde das benötigte Teilvolumen entnommen und für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Das in der Stammlösung befindliche Azid wurde durch zweimaliges Waschen mit sterilem M9-Medium entfernt und anschließend das Pellet in dem entsprechenden Volumen M9-Medium resuspendiert.

Des Weiteren wurden Experimente mit einem Gemisch aus künstlichen Partikeln und *E. coli*, im Verhältnis 1:1, durchgeführt. Die Gesamtpartikelanzahl pro Testansatz betrug ebenfalls $0,347 \cdot 10^9$ Partikel pro ml.

2.7 Isolierung von RNA mit Trizol

Das Trizol-Reagenz (Invitrogen) ist ein Gemisch aus Phenol, Guanidinisothiocyanat, rotem Farbstoff und anderen Komponenten, die zur Isolierung von Gesamt-RNA dienen. Die Präparation der Gesamt-RNA erfolgte nach den Vorgaben von Invitrogen; lediglich die Inkubation mit Trizol und die Homogenisierung des Gewebes wurden abweichend vom Protokoll durchgeführt.

Nach dem Waschen der Würmer erfolgte direkt die Zugabe von vier Volumen Trizol pro einem Volumen Wurmpellet. Anschließend wurde die Lösung für 15 s durchmischt und mindestens über Nacht bei $-70\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren. Das Protokoll kann hier unterbrochen und die Proben können bei $-70\text{ }^\circ\text{C}$ bis zu einem Jahr gelagert werden. Zur Homogenisierung der Proben wurden diese bei RT aufgetaut und anschließend wieder in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dieser Schritt wurde insgesamt fünfmal wiederholt. Nach dem Auftauen der Proben erfolgte eine Phasentrennung durch Zugabe von 200 μl Chloroform pro 1 ml Trizol. Nach 15 s Schütteln und einer 2-minütigen Inkubation bei RT wurden die Proben für 15 min bei 13.000 rpm und $4\text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert und auf Eis gestellt. Die sich in der oberen, wässrigen Phase befindliche RNA wurde abpipettiert und in ein neues Röhrchen überführt. Durch Mischen mit 500 μl Isopropanol pro 1 ml Trizol kommt es zur Ausfällung der RNA. Die Proben werden für 10 min bei RT inkubiert und dann für 10 min bei 13.000 rpm und $4\text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert. Der Überstand

wurde verworfen und die RNA befindet sich sichtbar am Gefäßrand. Das RNA-Pellet wurde mit 1 ml gekühltem, 80%igem Ethanol (in DEPC-H₂O) pro 1 ml Trizol gewaschen und 10 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstands wurde das Pellet an der Luft getrocknet und anschließend in DEPC-H₂O resuspendiert. Bei Bedarf wurden die Proben zum weiteren Lösen des Pellets für 10 -15 min auf 56 °C erwärmt.

2.8 Reverse Transkription

Da die RNA nicht direkt als Template in einer PCR eingesetzt werden kann, muss sie vorab durch die reverse Transkription in einen komplementären DNA-Strang (cDNA) umgeschrieben werden. Bei der Reversen-Transkriptase-PCR (RT-PCR) wurden als Startermoleküle Oligo(dT)-Primer eingesetzt, die im Bereich des Poly(A)-Schwanzes am 3'-Ende der mRNA hybridisieren. Mithilfe der reversen Transkriptase werden aus der Gesamt-RNA alle mRNA-Moleküle (2 – 4 %) in einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde die cDNA in einer PCR amplifiziert.

Alle für die RT-PCR benötigten Substanzen wurden von Invitrogen bezogen und das Protokoll nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die gesamten Pipettiervorgänge wurden gekühlt auf Eis vorgenommen. Zunächst wurde ein Gemisch aus folgenden Substanzen angesetzt (Volumen pro Reaktion):

Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ -Primer	1 µl
dNTP-Mix (jeweils 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	1 µl
Steriles Milli-Q-H ₂ O	8 µl

Der Mix wurde in ein Reaktionsgefäß mit 2 µl RNA-Template pipettiert, die Proben für 5 min bei 65 °C inkubiert und auf Eis abgekühlt. Danach erfolgte die Zugabe von 7 µl pro Reaktion eines weiteren Gemisches (s.u.) und eine zweiminütige Inkubation bei 42 °C.

(Volumen pro Reaktion)

5 x Erststrang-Puffer	4 µl
DTT (0,1 M)	2 µl
RNase OUT (40 U/µl)	1 µl

Anschließend wurde pro Reaktion 1 µl der Reversen Transkriptase SuperScript™ II hinzugefügt und vorsichtig durch Pipettieren gemischt. Die RT-Reaktion wurde bei 42 °C für 50 min durchgeführt und durch thermische Denaturierung des Enzyms durch eine 15-minütige Inkubation bei 70 °C gestoppt. Die cDNA wurde bis zur Weiterverwendung bei -20 °C gelagert.

2.9 Real-Time-PCR

Die Real-Time-PCR, beruhend auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR¹, ermöglicht die Quantifizierung der Transkriptionshäufigkeit bestimmter Gene. Durch optische Thermocycler wird die Quantität der PCR-Produkte direkt während ihrer Bildung durch Fluoreszenzmessungen bei jedem PCR-Zyklus erfasst (Echtzeit-PCR). Die Messung der Fluoreszenzintensität erfolgt in der exponentiellen Phase der PCR. Dabei ist die Fluoreszenz direkt proportional zur Menge der neu gebildeten PCR-Produkte und somit proportional zu Menge der Ausgangs-DNA. Verwendet werden in der Real-Time-PCR entweder sequenzspezifische Fluoreszenzsonden (z.B. TaqMan^R-Sonden) oder DNA-bindende Fluoreszenzfarbstoffe. Bei den DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffen, wie z.B. SYBER^R Green I, handelt es sich um Farbmoleküle, die sich in die kleine Furche der DNA einlagern. In der vorliegenden Arbeit wurden beide Sondentypen eingesetzt. Um eine kostenintensive Synthese und Markierung der sequenzspezifischen Sonden zu vermeiden, wurde die Quantifizierung der *mvp-1*-Expression mit dem SYBR Green Supermix von Bio-Rad vorgenommen. Sequenzspezifische TaqMan^R-Sonden, markiert mit dem Reporter-Farbstoff FAM am 5'-Ende und dem Quencher-Farbstoff TAMRA am 3'-Ende, dienen der Quantifizierung des *cdr-1*-Gens. Das Prinzip des TaqMan^R-Systems wird in Abb. 2.3 näher erläutert.

¹ Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Vervielfältigung (Amplifikation) geringer Nucleinsäuremengen. Der PCR-Zyklus beginnt mit einer thermischen Denaturierung der doppelsträngigen Template-DNA in eine einzelsträngige DNA. In dem folgenden Annealing-Schritt hybridisieren komplementäre Oligonucleotid-Primer am 5' und 3'-Ende der einzelsträngigen DNA. Die Primer dienen der DNA-Polymerase als Startmolekül für das Kopieren der Einzelstränge. Mithilfe der DNA-Polymerase werden die Primer, durch Anlagerung freier Desoxynucleosid-Triphosphate (dNTPs), verlängert (elongiert) und somit der Bereich des zwischen den Primern liegenden Sequenzabschnittes synthetisiert. Eine zyklische Wiederholung der Reaktionsschritte führt zu einer exponentiellen Amplifikation der Template-DNA.

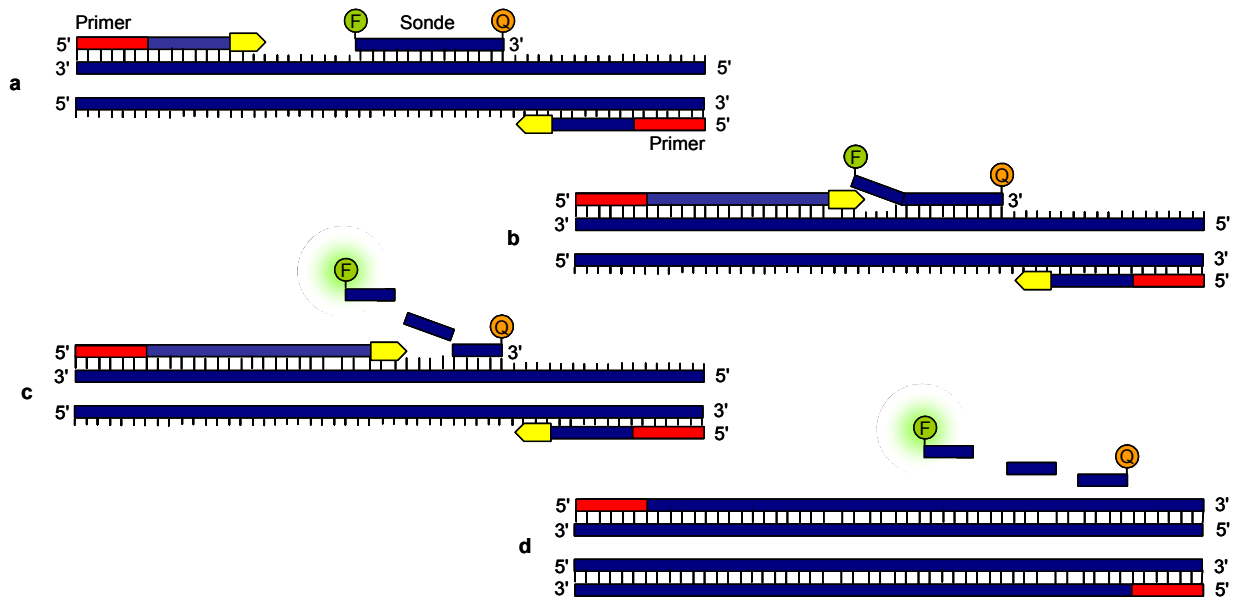


Abb. 2.3 Bei dem TaqMan^R-System binden während des Annealing-Schrittes neben den sequenzspezifischen Primern auch die sequenzspezifischen TaqMan^R-Sonden an die Zielsequenz der ssDNA. Die Sonde ist am 5'-Ende mit einem Fluorophor und am 3'-Ende mit einem Quencher-Molekül markiert, wobei der Quencher die Fluoreszenzemission des Fluorophors während der Annealingphase unterdrückt. Nach der Denaturierung des DNA-Templates und Anlagerung der sequenzspezifischen Primer, werden diese durch die Taq-Polymerase elongiert. Erreicht die Taq-Polymerase die Sonde, wird diese durch die 5'-3'-Exonucleaseaktivität gespalten, Fluorophor und Quencher werden getrennt und durch Anregung wird Licht einer definierten Wellenlänge emittiert. Das bei der Elongation freigesetzte Licht wird bei jedem PCR-Zyklus erfasst.

Die Pipettierschemata bei Verwendung des SureMaster-Mixes (Congen) mit sequenzspezifischen Sonden und des SYBR Green Supermix (Bio-Rad) sowie die entsprechenden Real-Time-PCR-Programme sind in den Tabellen 2.1 und 2.2 dargestellt.

Tab. 2.1 Pipettierschema für Real-Time-PCR bei Verwendung des SureMaster-Mixes mit Taq-Man-Sonden und des SYBER Green Supermix. Volumenangaben pro Reaktion.

Substanz	SureMaster-Mix	SYBR Green Supermix
Milli-Q-H ₂ O	4,5 µl	6 µl
SureMaster-Mix/ SYBER Green Supermix	10 µl	10 µl
Primer 1 (5 pmol/µl)	1,5 µl	1 µl
Primer 2 (5 pmol/µl)	1,5 µl	1 µl
TaqMan ^R -Sonde (5 pmol/µl)	0,5 µl	-
Taq-Polymerase	0,1 µl	-
Template-cDNA	2 µl	2 µl

Tab. 2.2 Real-Time-PCR-Programm bei Verwendung des SureMaster-Mixes mit Taq-Man-Sonden und des SYBER Green PCR Kits

Schritt-Nr.	Bezeichnung	SureMaster-Mix ^{a)}		SYBER Green Supermix ^{b)}	
		Temperatur (°C)	Zeit	Temperatur (°C)	Zeit
1	Initiale Denaturierung	95	5 min	94	3 min
2	Denaturierung	95	15 s	94	30 s
3	Annealing	60	15 s	55	1 min
4	Elongation	65	20 s	72	30 s
5	Abkühlung	40	10 s	-	-
6	Abschließende Elongation	-	-	72	5 min
7	Abkühlung	4	∞	4	∞

^{a)} Wiederholung der Schritte 2 – 5: 40 Mal

^{b)} Wiederholung der Schritte 2 – 6: 40 Mal

Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression des Zielgens mit der eines endogenen Referenzgens, dem sogenannten Housekeeping-Gen (HKG), ins Verhältnis gesetzt und somit normalisiert. Bei dem HKG handelt es sich um ein nicht reguliertes, konstitutiv und ubiquitär exprimiertes Gen, dessen Expression von äußeren Umständen idealerweise unabhängig ist. Die Amplifikation des Ziel- und Referenzgens, aus derselben Probe und der dazugehörigen Kontrolle, erfolgte parallel in zwei Probengefäßen. Die Quantifizierung der DNA-Templates basiert auf der Bestimmung des Fluoreszenz-Schwellenwertes, dem sogenannten C_T-Wert (Threshold Cycle). Der C_T-Wert ist der PCR-Zyklus, bei dem die durch das Reporter-Molekül

freigesetzte Fluoreszenz die Hintergrund-Fluoreszenz signifikant übertrifft und die exponentielle Phase beginnt. Mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode wird der relative Expressionsunterschied zwischen einer behandelten Probe und der Kontrolle, normalisiert zum Referenzgen, berechnet (Gleichungen 3 bis 6). Die Anwendung dieses Berechnungsmodells setzt vergleichbare PCR-Effizienzen für Ziel- und Referenzgen voraus (siehe 2.9.2).

$$(3) \quad \Delta C_T (\text{Behandlung}) = C_T (\text{Zielgen}) - C_T (\text{Referenzgen})$$

$$(4) \quad \Delta C_T (\text{Kontrolle}) = C_T (\text{Zielgen}) - C_T (\text{Referenzgen})$$

$$(5) \quad \Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{Behandlung}) - \Delta C_T (\text{Kontrolle})$$

Die relative Expression des Zielgens normalisiert zum HKG ergibt sich aus:

$$(6) \quad R = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Die Ergebnisse der relativen Expression werden im Folgenden immer als x-fache Genexpression dargestellt, wobei die Expression in der Behandlung im Vergleich zum Kontrollansatz (gleich eins gesetzt) berechnet wurde.

2.9.1 Actin als Housekeeping-Gen

Um die Eignung des Actin-Gens *act-1* als Housekeeping-Gen zu testen wurden die Genexpressionshöhen (C_T -Werte) nach Cadmiuminkubation und Exposition in M9-Medium ohne Cadmium verglichen. Idealerweise soll die Expression des HKG unabhängig von äußeren Umständen sein. Die im Box-Whisker-Diagramm dargestellten Ergebnisse (Abb. 2.4) machen die Eignung des *act-1* als Referenzgen zur Normalisierung des Zielgens deutlich.

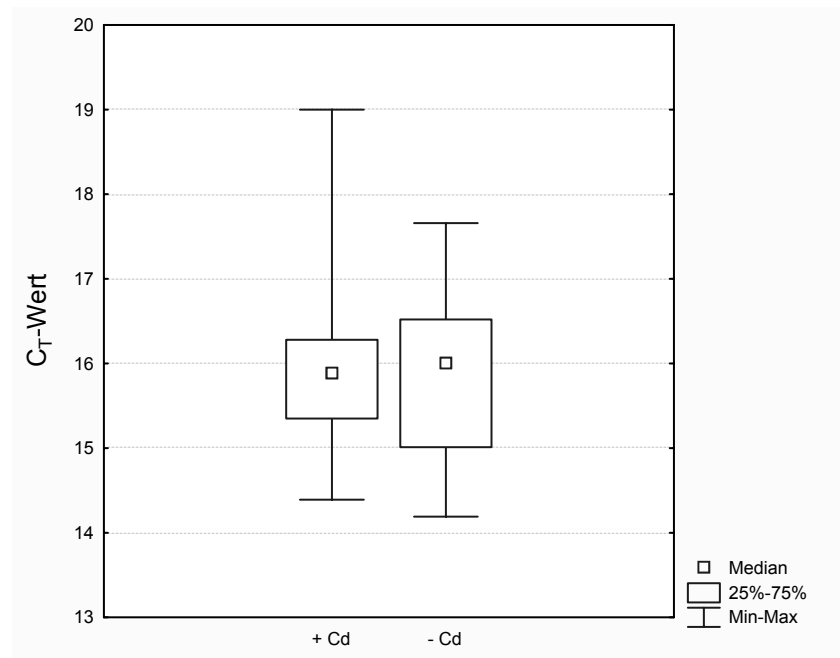


Abb. 2.4 Expressionshöhen des Housekeeping-Gens *act-1* im Gewebe von *C. elegans* nach Cadmiuminkubation und Inkubation in M9-Medium ohne Cadmium. Die Rechtecke repräsentieren die obere und untere Quartile mit dem Median als Quadrat. Die Balken (Whiskers) stellen die Spannweite der Werte dar.

2.9.2 Bestimmung der PCR-Effizienz

Die Berechnung der relativen Expression mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode setzt eine Verdoppelung der DNA-Menge in der exponentiellen Phase in jedem PCR-Zyklus voraus. Zur Bestimmung der PCR-Effizienzen des Ziel- und Referenzgens wurde von der cDNA eine Verdünnungsreihe mit fünf Verdünnungsschritten erstellt und die C_T -Werte ermittelt. Die lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der eingesetzten cDNA-Menge und dem C_T -Wert wurde mit einer Standardkurve (Abb. 2.5) dargestellt und aus dem Anstieg der Regressionsgeraden die PCR-Effizienzen über die Gleichung (7) berechnet:

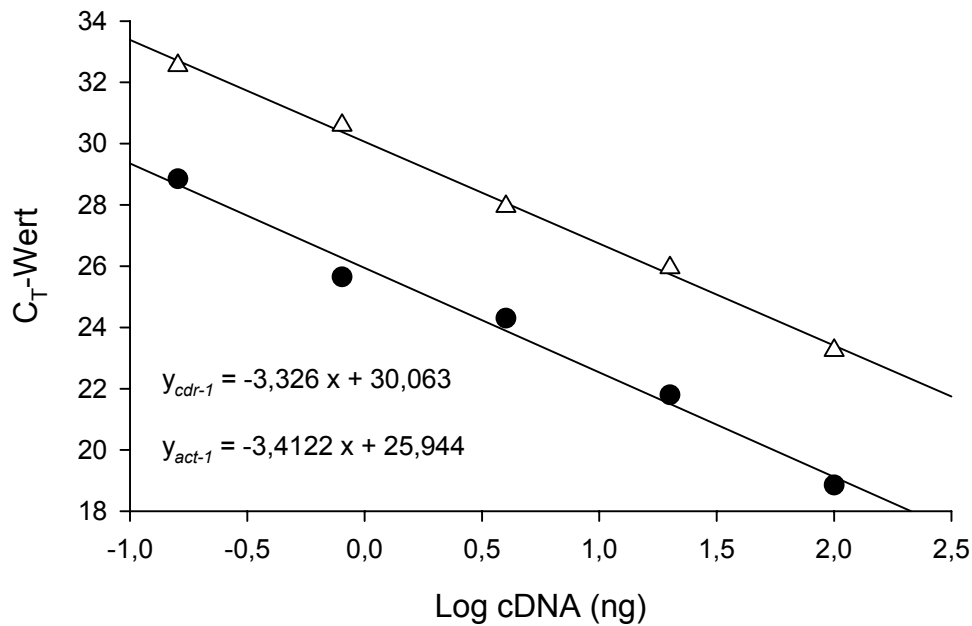


Abb. 2.5 Erstellung einer Standardkurve anhand einer Verdünnungsreihe zur Berechnung der Amplifikations-Effizienzen des Targetgens *cdr-1* und des Referenzgens *act-1*. Die Werte für die Steigungen erfüllen die Validitätskriterien ($m = -3,3$ bis $-3,8$).

$$(7) \quad E = 10^{(-1/m)} - 1$$

Dabei bedeuten:

E = PCR-Effizienz

m = Anstieg der linearen Regressionsgeraden

Daraus ergaben sich folgende Effizienzen für die Amplifikation der Gene *cdr-1* und *act-1*:

$$E_{cdr-1} = 0,9982 (= 99,8 \%)$$

$$E_{act-1} = 0,9637 (= 96,3 \%)$$

2.9.3 Primer und Sondenauswahl für die Real-Time-PCR

Primer (Oligonukleotide) sind aus wenigen Nukleotiden aufgebaute Oligomere, die an eine Nucleinsäure-Matrize hybridisieren und in der PCR als Startermolekül für die DNA-Polymerase dienen. Die Spezifität, Sensitivität, Effizienz und Reproduzierbarkeit der PCR hängen im hohen Maße vom Primerdesign ab. Bei der Primerauswahl und der Konstruktion der TaqMan-Sonden wurden folgende allgemeine Richtlinien beachtet:

Länge: 18 – 30 Nukleotide,

Nukleotidzusammensetzung: GC-Gehalt 40-60 %,
 Annealing-Temperatur: 5 °C unter der Schmelztemperatur,
 Sequenz: kein T am 3'-Ende, Komplementaritäten zwischen den Primerpaaren und innerhalb eines Primers sowie zwischen Primer und Sonden vermeiden, um die Bildung von Primer-Dimeren und Sekundärstrukturen zu verhindern.

Die Nukleotidsequenzen der jeweiligen Zielgene wurden Online-Datenbanken entnommen (<http://www.wormbase.org>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) und aus entsprechenden Teilsequenzen die Primer mithilfe des Computerprogrammes Primer 3 (Rozen und Skaletsky, 2000) entworfen. Um sicherzustellen, dass die Primer nur an den Zielgenen binden, wurden weitere Bindungsmöglichkeiten im Gesamtgenom von *C. elegans* mit Hilfe der Datenbank NCBI Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) überprüft. Die geprüften, genspezifischen Primer und Sonden wurden bei den Firmen Biotez und Biomers bestellt und werden in Tabelle 2.3 dargestellt.

Tab.2.3 Übersicht der Primer und Sonden für das Referenzgen *act-1* und die Zielgene *cdr-1* und *mrp-1*

Gen-Symbol	Gen-Name	Sequenz-Name	Primer-/Sondensequenz (5'→3')		Amplifikationsgröße (bp)
ACT-1	Actin	T04C12.6	Vorwärts:	CTA ACC GTG AAA AGA TGA CCC A	22-mer
			Rückwärts:	AGC GTA GAG GGA GAG GAC AGC	21-mer
			Sonde:	6-FAM-TCG AGA CCT TCA ACA CCC CAG C-TAMRA	22-mer
CDR-1	Cadmium Responsive	F35E8.11	Vorwärts:	CGG ATG CAA CAG TCT TCT CTC A	22-mer
			Rückwärts:	CTT CAT GAC GAA CTC TTT CAC AGT AC	26-mer
			Sonde:	6-FAM-CGA AAT GTG ATT GCG GAA TGG AT-TAMRA	23-mer
MRP-1	Multidrug Resistance Protein	F57C12.5	Vorwärts:	GTT CGT GAAC TGG TGT GTG G	20-mer
			Rückwärts:	CAG GCG TCC GGT GAT ATA GT	

2.9.4 Überprüfung der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese

Die Produktspezifität der Primer wurde durch eine Größenbestimmung der Nukleinsäurefragmente mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese vorgenommen. Hierzu wurde ein 1%iges (w/v) Agarose-Gel eingesetzt. Die Agarose wurde unter Erwärmung in 10 x Tris-Puffer

gelöst, nach Abkühlung auf 50 bis 60 °C mit 1 – 2 µl Ethidiumbromid versetzt, in den Gelträger gegossen und die Taschenschablone eingesetzt. Das auf dem Gelträger festgewordene Gel wurde in die Laufkammer gegeben und mit 1 x Tris-Puffer bedeckt. 20 µl PCR-Proben wurden mit 3 µl 6 x Probenpuffer (Bromphenolblau, Fa. Roth) gemischt und 5 µl des Probenvolumens in die Geltaschen gefüllt. Zur Bestimmung der Fragmentgröße wurde zusätzlich zu den Proben ein Größenstandard (100-1000 kb DNA Ladder, Invitrogen) auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte bei einer Spannung von ca. 90 V. Die Gele wurden mit einem Densitometer 800 (Bio-Rad) dokumentiert und mithilfe des Programms Quantity One (Bio-Rad) bearbeitet und ausgewertet.

2.10 Cadmiumverteilung im Testsystem: Akkumulation in *C. elegans*, Partikelsorption und Konzentration im Überstand

Nach Beendigung der Expositionsexperimente wurde die Cadmiumverteilung im Testsystem Flüssigkeit – Nematoden - Partikel bestimmt. Hierzu wurden die Würmer zunächst durch Zentrifugation bei 3000 rpm für 5 min pelletiert. 3 ml des Überstand wurden entnommen, in ein Plastikröhrchen gefüllt und mit 20 µl 65%iger HNO₃ (Suprapur, Merk) versetzt und die Proben bis zur Analyse im Kühlschrank gelagert. Zur Bestimmung der Cadmium-Bioakkumulation in den Nematoden wurden die Würmer am Ende der Experimente wie unter 2.3 beschrieben mit einer Saccharoselösung gewaschen. Es ist anzunehmen, dass durch diesen Vorgang neben der Entfernung der Partikel von der Nematoden-Kutikula auch die Verdauung und Elimination der im Gastrointestinaltrakt befindlichen Partikel gewährleistet wird. Der Defäkationszyklus von *C. elegans* beträgt etwa 45 Sekunden, wohingegen die Reinigung der Nematoden ca. eine Stunde beansprucht (Avery und Thomas, 1997). Aus jeder Stichprobe und den dazugehörigen Kontrollansätzen wurden, parallel zur Probenentnahme für die Bestimmung der Genexpression, Aliquots zur Cadmiumgewebebestimmung entnommen. Das Aliquot wurde in ein ausgewogenes Zentrifugenröhrchen pipettiert, bei 10.000 rpm für 30 sec zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es folgte eine Cadmiumkonservierung mit 20 µl 65 %iger HNO₃ (Suprapur, Merk). Anschließend wurden die Proben gefriergetrocknet und die Cadmiumgewebekonzentration pro kg Trockengewicht bestimmt.

Die Bestimmung des Cadmiumgehalts, akkumuliert oder sorbiert durch Bakterien (*E. coli*, *A. globiformis*) und künstliche Partikel (Partikel mit COOH, NH₂ und SO₄ als funktionelle Oberflächengruppe), erfolgte in separaten Experimenten. Die Partikel (ohne Nematoden) wurden in 50-ml-Zentrifugenröhrchen mit Cadmium inkubiert, wobei die Testbedingungen denen der

Biotests entsprachen. Am Testende wurden Partikel und Flüssigkeit durch Zentrifugation getrennt und jeweils mit 20 µl 65%iger HNO₃ versetzt.

Die Cadmiumanalyse der Proben erfolgte mittels Atom-Absorptionsspektrometrie (AAS) und ICP-MS. Berechnet wurde der Bioakkumulationsfaktor (BAF) für *C. elegans* und die Bakterien sowie die Partikel-Wasser-Verteilungskonstante (K_p) für die künstlichen Partikel mit den Formeln (8) und (9).

$$(8) \quad \text{BAF} = \frac{C_o}{C_w}$$

$$(9) \quad K_p = \frac{C_s}{C_w}$$

Dabei sind:

C_o = Konzentration im Organismus (mg/kg)

C_s = Konzentration des sorbierten Stoffes (mg/l)

C_w = Konzentration des gelösten Stoffes (mg/l)

2.11 Bestimmung der Adeninnucleotide und der Energieladung

Die Adeninnucleotide ATP, ADP und AMP sind als Energieträger in allen Zellen in relativ konstanter Gesamtmenge enthalten. Als Maß für den energetischen Status der Nematoden wurden die Konzentrationsverhältnisse der Adeninnucleotide nach der Formel von Atkinson (1977) erfasst.

$$(10) \quad \text{Energieladung} = \frac{(ATP + 0,5ADP)}{(ATP + ADP + AMP)}$$

Die Bestimmung der Adeninnucleotide erfolgte nach einer 6- und 24-stündigen Cadmiumexposition über die Flüssigphase und einer *E. coli*-Konzentration von 200 (ausschließlich 6 h) und 335 FAU.

Zur Aufarbeitung wurde den Proben ein definiertes Volumen steriles Milli-Q-Wasser zugefügt und anschließend für 8 s in kurzen Intervallen im Ultraschallbad behandelt. Es folgte eine 15-minütige Erwärmung auf 100 °C im Wasserbad. Bis zur weiteren Aufarbeitung wurden die Proben bei -20 °C gelagert. Die Bestimmung der Adeninnucleotid-Konzentrationen erfolgte mittels HPLC (High Pressure Liquid Chromatography). Hierfür wurden jeweils 500 µL 1 M

HClO₄ pro 150 µl Probe zugefügt und nochmals mit Ultraschall behandelt. Ein Aliquot von 100 µl wurde mit 400 µl Kaliumdihydrogenphosphatpuffer (0,8 M, pH 6) versetzt und für 3 min bei 16.000 g zentrifugiert. 20 µL des Überstands wurden chromatographiert. Die Detektion erfolgte bei 260 nm. Die ATP-, ADP- und AMP-Konzentrationen wurden zum Proteingehalt (siehe 2.12) der jeweiligen Probe normalisiert.

2.12 Proteinbestimmung nach Biuret

Zur Normalisierung der Adeninnucleotide wurde am Ende der Expositionsversuche jeweils ein Aliquot zur Proteinbestimmung entnommen und mit einem definierten Volumen sterilen Milli-Q-Wassers versetzt. Es folgte eine Behandlung im Ultraschallbad für 8 s in kurzen Intervallen. Die Proteinquantifizierung wurde mittels des Roti[®]-Quant-universal-Kits der Firma Roth vorgenommen. Die Methode basiert auf einer Biuret-Reaktion. Die Erstellung einer Standarddeichkurve und die Probenmessung erfolgten laut Herstellerinstruktion.

2.13 Chronische Cadmiumtoxizität auf *C. elegans*

Zur Ermittlung der chronischen Cadmiumtoxizität auf *C. elegans* wurden Wachstum, Fertilität und Reproduktion der Nematoden bestimmt. Um zu überprüfen, ob von akuten Effekten auf die chronische Toxizität geschlossen werden kann, wurde der Nematodentest entsprechend der in der ISO-Normierung (ISO/CD 10872) befindlichen Testvorschrift durchgeführt. Der Test wurde im Flüssigmedium mit Cadmiumkonzentrationen von 5, 15, 25, 50 und 75 µM durchgeführt. Pro Behandlung wurden fünf Replikate angesetzt. Die Inkubation erfolgte unter Zugabe eines Bakteriennährmediums für 96 h bei 20 °C. Im Test wurden alterssynchrone Würmer des J1-Stadiums eingesetzt. Zur Größenfraktionierung wurden die Würmer einer 96 h alten Kulturplatte durch eine Filterkaskade (5 und 10 µm) gefiltert. Aus dem Filtrat wurden jeweils 10 juvenile Würmer entnommen und in ein Testgefäß überführt. Zu jedem Replikat erfolgte die Zugabe einer Bakteriensuspension mit einer endgültigen Bakteriendichte von 200 ± 10 FAU. Nach 96 h wurden die Würmer, zum Sichtbarmachen, mit einer wässrigen Lösung Bengalrosa gefärbt und durch 10-minütige Erwärmung bei 80 °C abgetötet. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Binokulars und Mikroskops. Die Cadmiumwirkung wurde durch einen signifikanten Unterschied von Wachstum, Fertilität und Reproduktion der behandelten Würmer im Vergleich zur Kontrollprobe, ohne Cadmiumbehandlung, ermittelt. Zur Bestimmung des Wachstums wird die Differenz der Körperlänge nach Testende zur Anfangslänge der J1-Stadien berechnet. Trägt

ein Wurm ≥ 1 Ei im Körper, wird er als gravid bezeichnet. Der Parameter Reproduktion gibt die Anzahl der Nachkommen pro Wurm an.

Zusätzlich wurde die Langzeitwirkung einer bereits bestehenden Cadmiumbelastung mit einem modifizierten Nematodentest untersucht. Der Unterschied zu dem oben beschriebenen Test besteht lediglich darin, dass die im Test eingesetzten Würmer zuvor für 6 h unter Gabe von *E. coli* (200 FAU) in Kontroll-Medium und in 25 und 50 μM Cadmium inkubiert und anschließend gewaschen (siehe 2.3) wurden. Aus jeder Zellkulturflasche des Expositionsexperiments wurden drei Stichproben entnommen, sodass pro Behandlung und Kontrolle neun Replikate ausgewertet wurden. Pro Replikat wurden 10 juvenile Würmer (J1-Stadium) in M9-Medium (ohne Cadmium) für 96 h bei 20 °C inkubiert und somit die Auswirkung einer bestehenden Cadmiumbelastung auf Wachstum, Fertilität und Reproduktion bestimmt.

2.14 Zusammenfassung der Expositionsexperimente

Tabelle 2.4 gibt eine Übersicht über die einzelnen Expositionsexperimente mit den dazugehörigen Inkubationskonzentrationen und -zeiten sowie den ermittelten Parametern.

2.15 Statistische Auswertungen

Für Auswertung der Experimente wurden jeweils drei Replikate ($n = 3$) herangezogen. Die Berechnung der Mittelwerte der Parallelen, Standardabweichungen und Regressionsanalysen erfolgte mit Microsoft Office Excel (Redmond, WA, USA). Signifikanzanalysen wurden mit dem Statistikprogramm STATISTICA 6.0 (StatSoft) durchgeführt. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Expositionspfaden wurden anhand eines *t*-Tests für unabhängige Stichproben berechnet. Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen. Die Signifikanzen der Genexpressions-Differenzen wurden anhand der Werte der relativen Genexpression ($\Delta\Delta C_T$ -Wert) berechnet.

Tabelle 2.4 Cadmiuminkubation von *C. elegans* über verschiedene Expositionspfade

Expositionspfad	Cadmium (µM)	<i>cdr-1</i> -Expression	<i>mrp-1</i> -Expression	Akkumulation in <i>C. elegans</i>	Cd-Gehalt Partikel	Energie-ladung	Nematodentest nach Vorinkubation in	Inkubation (h)
<i>Flüssigphase</i>								
Medium	5, 25, 50, 75	x	x _{1,2}	x		x	x ₁	6, 24
Medium + Verapamil	25, 50	x		x				6
LPS, suspendiert	25, 50	x		x				6
<i>Partikel + Medium</i>								
<i>E. coli</i> 100 FAU	5, 25, 50, 75	x		x				24
<i>E. coli</i> 200 FAU	5, 25, 50, 75	x	x _{1,2}	x	x	x ₁	x _{1,2}	6, 24
<i>E. coli</i> 335 FAU	5, 25, 50, 75	x		x	x	x		6, 24
<i>A. globiformis</i> 200 FAU	25, 50	x		x	x			6
LPS-beschichtete Partikel	25, 50	x		x				6
COOH-, NH ₂ - oder SO ₄ -Partikel	5, 25, 50, 75	x		x ₂	x ₂			24
COOH-, NH ₂ - oder SO ₄ -Partikel + <i>E. coli</i>	5, 25, 50, 75	x		x ₂				24

₁ Bestimmung ausschließlich nach 6 h Inkubation

₂ Bestimmung ausschließlich für 25 und 50 µM Cadmium

2.16 Geräte

- Varian CARY 50 UV/VIS Spectrophotometer
- Ultraschallgerät Bandelin Sonoplus UW 2200
- Molecular Imager GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad)
- Biophotometer (Eppendorf)
- Biozentrifuge (Eppendorf)
- Zentrifuge (Hettich)
- Zentrifuge, Contifuge (Heraeus)
- MyiQ Single-Color real time PCR Detection System (Bio-Rad)

2.17 Chemische Substanzen

Die Chemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (Deutschland), Carl Roth (Deutschland), Fisher Scientific (Deutschland) oder Merk (Deutschland) bezogen.

Agarosegel (1%)

Agarose 1 g
 TBE-Puffer (10-fach konzentriert) 10 ml
 mit 90 ml DEPC-H₂O auffüllen

Bicarbonatpuffer

50 mM Na₂CO₃
 50 mM NaHCO₃
 in Aqua. dest.
 mit Na₂CO₃ auf pH 9,6 einstellen

BSA (bovines Serumalbumin) 5 % (w/v)

5 g BSA in 1 x PBS-Puffer

1/3DSM-Medium (pH 7,2 ± 0,2)

Pepton aus Casein	3,33 g/l
Hefe	1,67 g/l
D(+)-Glucose	1,67 g/l
NaCl	1,67 g/l

LB-Medium

Pepton aus Casein	10,0 g/l
Hefeextrakt	5,0 g/l
NaCl	10,0 g/l

M9-Medium

Na ₂ HPO ₄	6 g/l
KH ₂ PO ₄	3 g/l
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,25 g/l
NaCl	5 g/l

NGM-Agar

Pepton aus Casein	2,5 g/l
Agar	17,0 g/l
NaCl	3,0 g/l

Pepton, Agar und NaCl in 975 ml deionisiertem Wasser lösen und autoklavieren. Nach Abkühlung auf ca. 55 °C werden folgende Lösungen steril dazugeben:

1 ml Cholesterinlösung (5 mg/ml 95 % Ethanol)

1 ml CaCl₂-Lösung (1 mol/l)

1 ml MgSO₄-Lösung (1 mol/l)

25 ml KH₂PO₄-Puffer (1 mol/l), mit KOH auf pH 6 einstellen

10 x PBS-Puffer (pH 7,2)

Na₂HPO₄ 10,9 g

NaH₂PO₄ 3,2 g

NaCl 90 g

1000 ml Aqua dest.

für 1 x PBS 1:10-Verdünnung mit Aqua dest.

10 x TBE-Puffer (pH 8,3)

890 mM Tris-Base

890 mM Borsäure

20 mM EDTA

3. Ergebnisse

3.1 *Cdr-1*-Genexpression und Bioakkumulation durch Cadmiumexposition über die Flüssigphase

Zuerst sollte untersucht werden, ob die *cdr-1*-Genexpression von der Cadmiumkonzentration im Testmedium abhängt. Eine 24-stündige Inkubation in M9-Medium gelöstem Cadmium (ohne Futtergabe) zeigte eine konzentrationsabhängige Induktion der *cdr-1*-Transkription (Abb. 3.1). Die Genexpressionshöhe stieg exponentiell von 5 bis 75 μM Cadmium an und weist ein Bestimmtheitsmaß von $r^2=0,9955$ auf. Parallel zur Genexpression wurde die Bioakkumulation bei einer Expositions-konzentration von 25 und 50 μM Cadmium bestimmt. Die Cadmiumbelastung der Nematoden stieg mit Verdoppelung der Schadstoffkonzentration um das 1,8fache an, auf 18,9 mg/kg Trockengewebe.

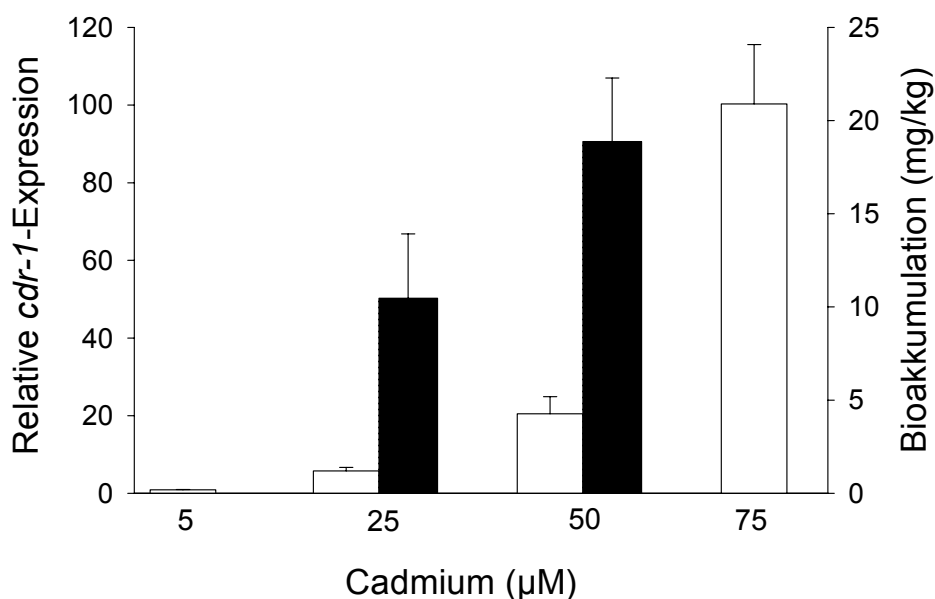


Abb. 3.1 Einfluss der Cadmiumkonzentration auf die Transkription des *cdr-1*-Gens (weiße Säulen) und die Cadmiumakkumulation (schwarze Säulen) in *C. elegans* bei einer Exposition über die Flüssigphase für 24 h. Fehlerbalken bezeichnen die Standardabweichungen der Mittelwerte ($n = 3$).

Um auszuschließen, dass die Nematoden nach 24 h ohne Futterzufuhr durch einen Hungerzustand geschwächt und somit die Cadmiumaufnahme und -detoxifikation beeinträchtigt waren, wurden die gleichen Experimente bei einer 6-stündigen Inkubation mit 25 und 50 μM Cadmium durchgeführt (Abb. 3.2). Auch bei diesen Versuchen zeigte sich ein Anstieg der internen Cadmiumverfügbarkeit und der Metallbelastung mit zunehmender

Konzentration. Waren die Werte beider Parameter im Vergleich zu denen der 24-h-Experimente niedriger, so war der Anstieg der Genexpression und der Akkumulation von 25 auf 50 μM um 30 % stärker. Verfügbarkeit und Anreicherung von Cadmium in Nematoden sind somit abhängig von der Expositionskonzentration und Dauer der Inkubation.

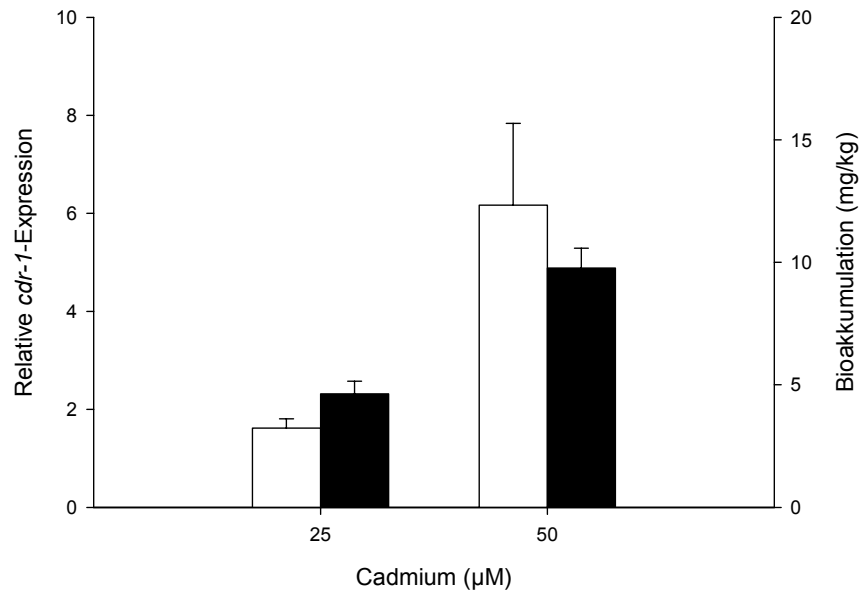


Abb. 3.2 Transkription des *cdr-1*-Gens (weiße Säulen) und die Cadmiumakkumulation (schwarze Säulen) in *C. elegans* bei einer 6-stündigen Exposition über die Flüssigphase. Fehlerbalken bezeichnen die Standardabweichungen der Mittelwerte ($n = 3$).

3.2 *Cdr-1*-Genexpression und Bioakkumulation durch Cadmiumexposition über Bakterien als kontaminierte Nahrungspartikel

Der Einfluss von Nahrungspartikeln auf die spezifische Genexpression und Schadstoffanreicherung der Nematoden wurde durch Zugabe von *E. coli* untersucht. Die Bakterien wurden in M9-Medium suspendiert, sodass eine Gleichgewichtseinstellung der Cadmiumkonzentrationen zwischen Flüssigphase und Nahrungspartikel erfolgte. In Abbildung 3.3 sind die Ergebnisse der Versuchsansätze mit Bakteriengabe im Vergleich zur Exposition allein über die Flüssigphase dargestellt. Stehen den Nematoden Bakterien mit einer Konzentration von 100 FAU als Nahrungsquelle zur Verfügung, steigt die Expression des *cdr-1*-Gens, ausgenommen der niedrigsten Expositionskonzentration, signifikant an. Der Anstieg der Genexpression erfolgte konzentrationsabhängig mit einem Maximum bei 50 μM Cadmium. Bei einer Cadmiumkonzentration von 75 μM war ein leichter Abfall der *cdr-1*-Expression zu messen.

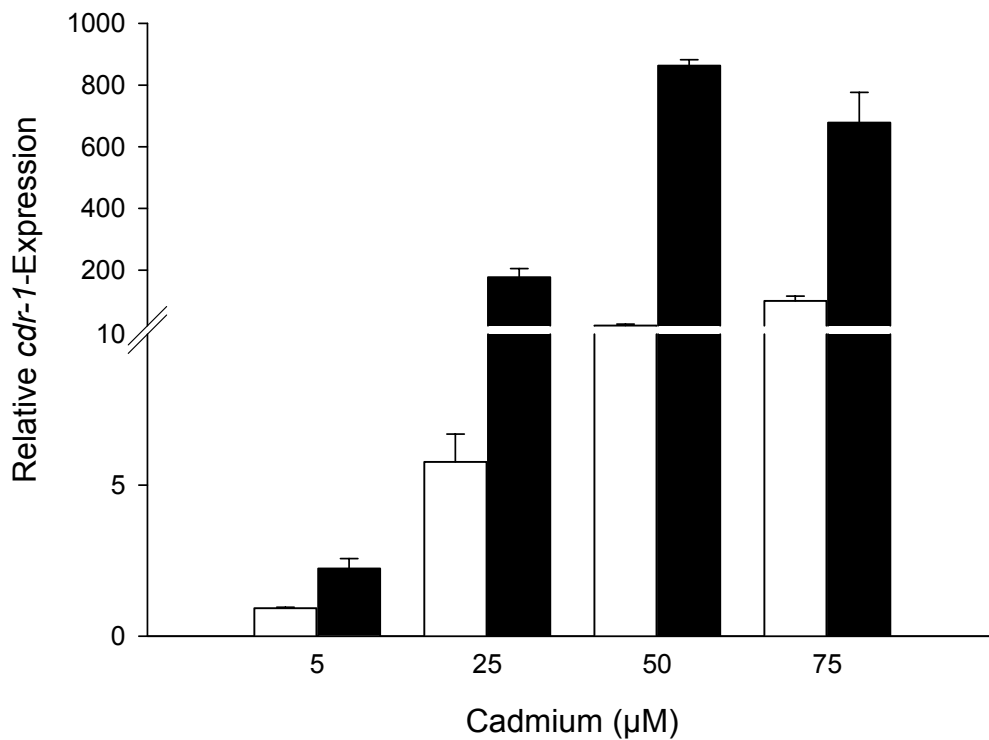


Abb. 3.3 Einflussnahme der Expositionspfade M9-Medium (ohne Bakterien, weiße Säulen) und in M9-Medium gelöste Bakterien (*E. coli* 100 FAU, schwarze Säulen) auf die relative *cdr-1*-Expression und Cadmiumakkumulation in *C. elegans* bei einer 24-stündigen Inkubation in 5 - 75 µM Cadmium. Fehlerbalken bezeichnen die Standardabweichungen der Mittelwerte (n = 3).

Eine Cadmiumexposition über verschiedene Bakterienkonzentrationen sollte deutlich machen, dass nicht ausschließlich das Vorkommen von Bakterien als Cadmiumträger, sondern auch die Bakterienanzahl eine bedeutende Einflussgröße für die Bioverfügbarkeit von Cadmium darstellen kann. Abbildung 3.4 zeigt die Wirkung der Bakteriendichte auf die interne Cadmiumverfügbarkeit bei einer 24-stündigen Inkubation. Eine Verdoppelung der Bakterienanzahl von 100 FAU auf 200 FAU führte zu einer starken Erhöhung der Geninduktion mit einem Maximum bei einer Expositionskonzentration von 75 µM Cadmium. Eine weitere Erhöhung der Bakteriendichte auf 335 FAU bewirkte, im Vergleich zu den beiden anderen Futterkonzentrationen, eine geringere Cadmiumverfügbarkeit. Die höchste Futterdichte führte stets zum niedrigsten *cdr-1*-Signal, ausgenommen ist die höchste Metallkonzentration. Übereinstimmend war bei allen Experimenten mit kombinierter Exposition über Flüssigphase und Futterpartikel eine konzentrationsabhängige Genexpression, die immer über der der Flüssigphasenuntersuchungen ohne Bakterien lag.

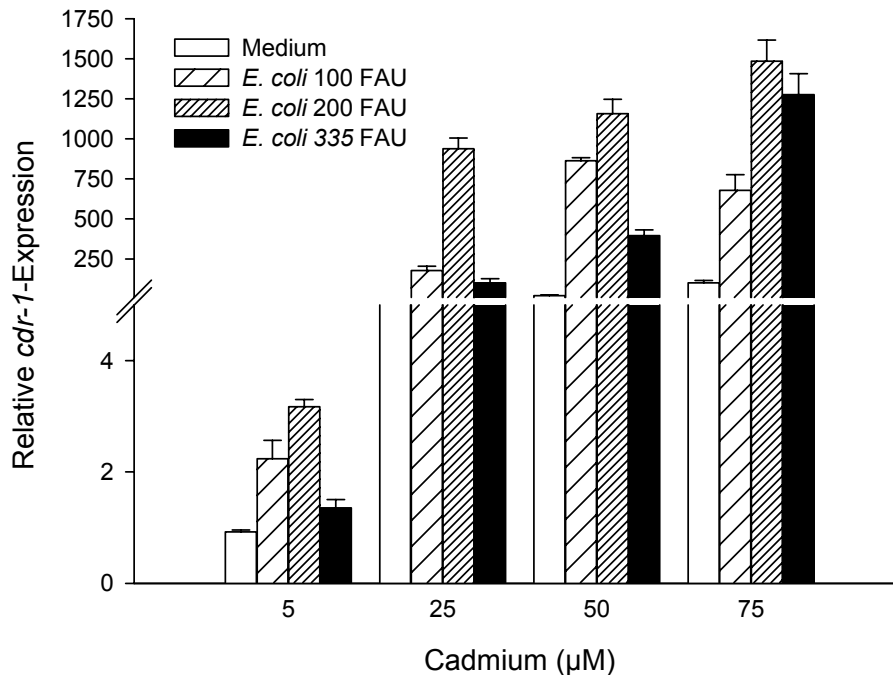


Abb. 3.4 Einfluss der Nahrungspartikelkonzentration auf die Transkription des *cdr-1*-Gens in *C. elegans* bei einer 24-stündigen Exposition über *E. coli* der Dichten 100, 200 und 335 FAU. Die Bakterien wurden in Cadmiumlösungen der Konzentrationen 5 – 75 µM suspendiert. Der Einfluss der Nahrungspartikel ist im Vergleich zur relativen *cdr-1*-Expression über das M9-Medium ohne *E. coli* dargestellt. Fehlerbalken bezeichnen die Standardabweichungen der Mittelwerte (n = 3).

Neben der internen Verfügbarkeit stieg auch die Bioakkumulation durch die Zugabe von *E. coli*. Eine Exposition über Bakterien mit einer Dichte von 200 und 335 FAU für 6 und 24 h zeigte eine signifikante Erhöhung der Akkumulation in *C. elegans* im Vergleich zu den Untersuchungen mit purem Medium ohne Bakterien (Abb. 3.5 a und b). Die Cadmiumgewebekonzentrationen beider Inkubationszeiten entsprachen der Tendenz der entsprechenden Genexpression. Eine hohe Cadmiumverfügbarkeit resultierte in einer erhöhten Bioakkumulation, wobei eine höhere Anreicherung bei einer Bakterienkonzentration von 200 FAU gemessen wurde. Der Effekt verstärkte sich mit zunehmender Inkubationszeit. Obwohl Cadmiumverfügbarkeit und -akkumulation eine relativ hohe Korrelation mit $r_{6h} = 0,92$ und $r_{24h} = 0,69$ zeigten, birgt die *cdr-1*-Expression nicht zwangsläufig einen direkten Zusammenhang zur Schadstoffanreicherung. Gleiche Werte der mRNA-Transkription können dazugehörige Akkumulationen mit völlig unterschiedlichen Werten aufweisen.

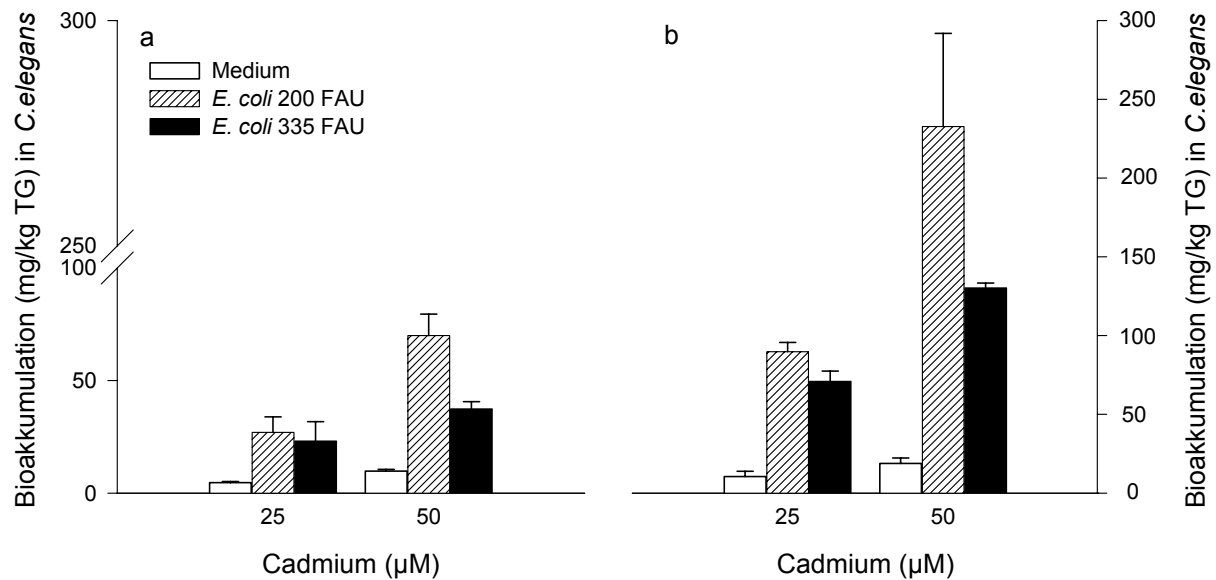


Abb. 3.5 Einfluss der Nahrungspartikelkonzentration auf die Bioakkumulation in *C. elegans*. Die Exposition der Nematoden erfolgte für 6 h (a) und 24 h (b) über *E. coli* der Dichten 200 und 335 FAU, suspendiert in 25 und 50 µM Cadmium. Der Einfluss der Nahrungspartikel ist im Vergleich zur Cadmiumbioakkumulation über das M9-Medium ohne *E. coli* dargestellt. Fehlerbalken bezeichnen die Standardabweichungen der Mittelwerte (n = 3).

3.3 Einfluss der Hemmung von Transportproteinen auf *cdr-1*-Genexpression und Cadmiumanreicherung in Abhängigkeit von dem Expositionspfad

Da *C. elegans* ein bacterivorer Nematode ist, können Flüssigphasentests ohne Partikel eine Stresssituation für ihn darstellen. Ist ein Schadstoff in der Flüssigkeit gelöst, wird die Aufnahme des Stressors durch verschiedene Mechanismen limitiert. So kann das in Flüssigkeit gelöste Cadmium zu einer stressinduzierten Hemmung des Fressens (Jones und Candido, 1999) oder zu einer verstärkten Elimination durch ABC-Transporter führen. ABC-Transporter, wie die P-Glykoproteine (Pgp) und Multidrug resistance-associated Proteine (MRP), dienen der Detoxifikation, indem sie das cytotoxische Cadmium aus der Zelle heraus transportieren.

Um die Bedeutung der Detoxifikation in Abhängigkeit der unterschiedlichen Expositionsarten näher zu betrachten, wurden zwei für den Cadmiumefflux wichtige ABC-Transporter untersucht. Durch Zugabe einer geringen Konzentration von 25 µM Verapamil zum Flüssigphasentest erfolgte eine partielle Hemmung der P-Glykoproteine. Das für die Cadmiumentgiftung wichtige P-Glykoprotein *pgp-1* wird ausschließlich in den intestinalen

Zellen von *C. elegans* exprimiert. Der Einfluss der Hemmung dieses ABC-Transporters auf die *cdr-1*-Expression und Bioakkumulation in den Nematoden ist in Abbildung 3.6 dargestellt. Bei einer sechsständigen Inkubation in 25 μM Cadmium blieb die Geninduktion von *cdr-1* nahezu unverändert. Eine Erhöhung der Cadmiumkonzentration auf 50 μM führte hingegen zu einer Abnahme der Genexpression bei Verapamilgabe. Die Cadmiumakkumulation veränderte sich deutlich durch Hemmung der Effluxtransporter mit Verapamil. Beide Expositionskonzentrationen zeigten eine starke Zunahme der internen Belastung, wobei der Effekt bei 50 μM Cadmium mit einem Anstieg der Akkumulation um 78 % am stärksten war. Der Signifikanzunterschied zu den ungehemmten Proben bei 50 μM Cadmium betrug $p = 0,00076$.

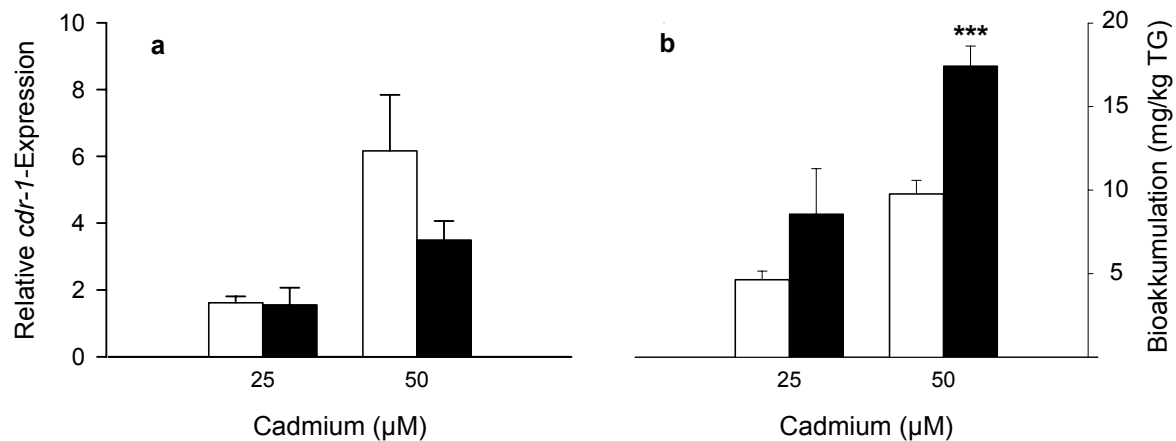


Abb. 3.6 Relative *cdr-1*-Expression und Bioakkumulation in *C. elegans* nach einer 6-stündigen Inkubation in einer 25 und 50 μM Cadmium-Lösung mit dem P-Glykoprotein-Inhibitor Verapamil (schwarze Säulen) und ohne Verapamil (weiße Säulen). Signifikante Unterschiede zwischen der Behandlung mit Verapamil und dem Medium ohne Verapamil wurden markiert durch * (t-Test $p < 0,005$). Fehlerbalken bezeichnen die Standardabweichungen der Mittelwerte ($n = 3$).

3.3.1 Bedeutung des *mrp-1*-Gens für die Cadmiumentgiftung

Die Einflussnahme der unterschiedlichen Expositionen auf die Cadmiumentgiftung wurde zudem durch Bestimmung der Genexpression des ABC-Transporterproteins MRP-1 untersucht. Verglichen wurde die Expressionshöhe bei einer sechsständigen Cadmiuminkubation mit *E. coli* als Nahrungspartikel und in purem Medium ohne *E. coli*. Die Bestimmung der *mrp-1*-Expression erfolgte in denselben Proben, in denen die Expressionen

des *cdr-1*-Gens ermittelt wurden. Abbildung 3.7 zeigt die relative Expression der Gene *mrp-1* und *cdr-1* im Vergleich. Eine Exposition über das Flüssigmedium ohne Bakterien führte zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme der *mrp-1*-Geninduktion. Die Zugabe von Bakterien zum Flüssigmedium führte bei der niedrigsten Cadmiumkonzentration zu keiner Veränderung und bei 50 μM Cadmium zu einer leichten Abnahme der Genexpression. Ein signifikanter Einfluss der Exposition auf die ABC-Transporteraktivität war bei 50 μM Cadmium mit $p = 0,00009$ zu erkennen. Ebenso beträchtlich war der Einfluss von Nahrungspartikeln auf die Induktion des lysosomalen Membranproteins CDR-1 und führte zu einem vielfachen Anstieg der Genexpression. Auch die interne Cadmiumbelastung änderte sich stark in Abhängigkeit vom Aufnahmeweg. Die Akkumulation stieg durch die Zugabe von *E. coli* um das 5,8fach bei 25 μM und das 7,2fache bei 50 μM Cadmium.

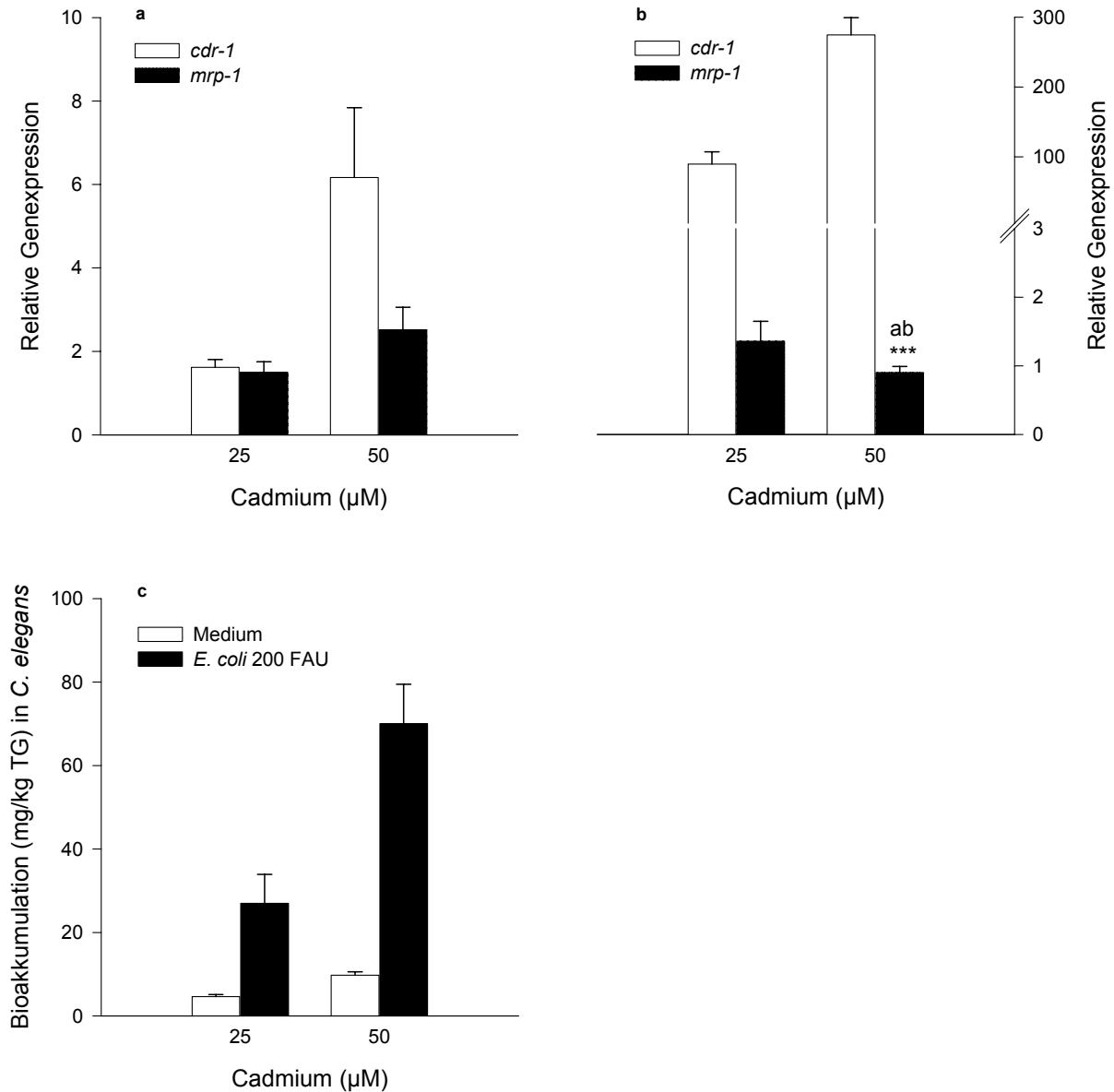


Abb. 3.7 Einflussnahme der Expositionswege Flüssigphase (a) und Nahrungspartikel (b) auf die relative Expression der Gene *cdr-1* und *mrp-1* sowie auf die Cadmiumakkumulation (c) in *C. elegans*. Die Exposition der Nematoden erfolgte für 6 h in einer 25 und 50 μM Cadmiumlösung über M9-Medium ohne Bakterien und über in M9-Medium suspendierte *E. coli* mit einer Dichte von 200 FAU. Der signifikante Unterschiede zwischen den Expositionswegen Flüssigphase und Bakterien (50 μM Cd) wurde markiert durch * (t-Test *** $p < 0,005$). Fehlerbalken bezeichnen die Standardabweichungen der Mittelwerte ($n = 3$).

3.4 Einfluss der Partikelqualität auf die Bioverfügbarkeit und Bioakkumulation von Cadmium

3.4.1 Vergleich von Gram-negativen Bakterien und Gram-positiven Bakterien als Carrier für die Cadmiumexposition

Um zu untersuchen, inwiefern die mit *E. coli* erzielten Ergebnisse für die interne Verfügbarkeit und Anreicherung von Cadmium allgemein für Bakterien gelten oder bakterienspezifisch sind, wurden den Nematoden sowohl Gram-negative Bakterien (*E. coli*) als auch Gram-positive Bakterien (*A. globiformis*) angeboten. Der Einfluss von *A. globiformis* wurde vergleichend zu der höchsten *E. coli*-Effektkonzentration von 200 FAU untersucht. Wie *E. coli* zeigte sich auch *A. globiformis* als ein Cadmiumträger, der zu einer signifikant erhöhten Schadstoffverfügbarkeit im Vergleich zum reinen Medium führte (Abb. 3.8 a). Ließ sich bei geringerer Cadmiumkonzentration (25 µM) ein signifikanter Unterschied ($p = 0,0085$) in der Genexpressionshöhe zwischen den beiden Bakterienarten erkennen, so war bei 50 µM Cadmium die *cdr-1*-Expression durch *A. globiformis* nur noch unwesentlich erhöht ($p = 0,8898$).

Die relativ hohe *cdr-1*-Expression und somit hohe interne Cadmiumverfügbarkeit durch eine Exposition über *A. globiformis* ließe eine erhöhte Schadstoffanreicherung in *C. elegans* erwarten. Entgegen dieser Annahme war die Cadmiumakkumulation durch *A. globiformis* mit $11,1 \pm 3,2$ und $18,8 \pm 2,5$ mg Cd/kg TG bedeutend geringer im Vergleich zur Akkumulation durch *E. coli* (Abb. 3.8 b). Die Akkumulation bei 25 µM Cadmium war so gering, dass mit $p = 0,1236$ kein signifikanter Unterschied zwischen der Anreicherung durch *A. globiformis* und purem Medium ohne Bakterien messbar war.

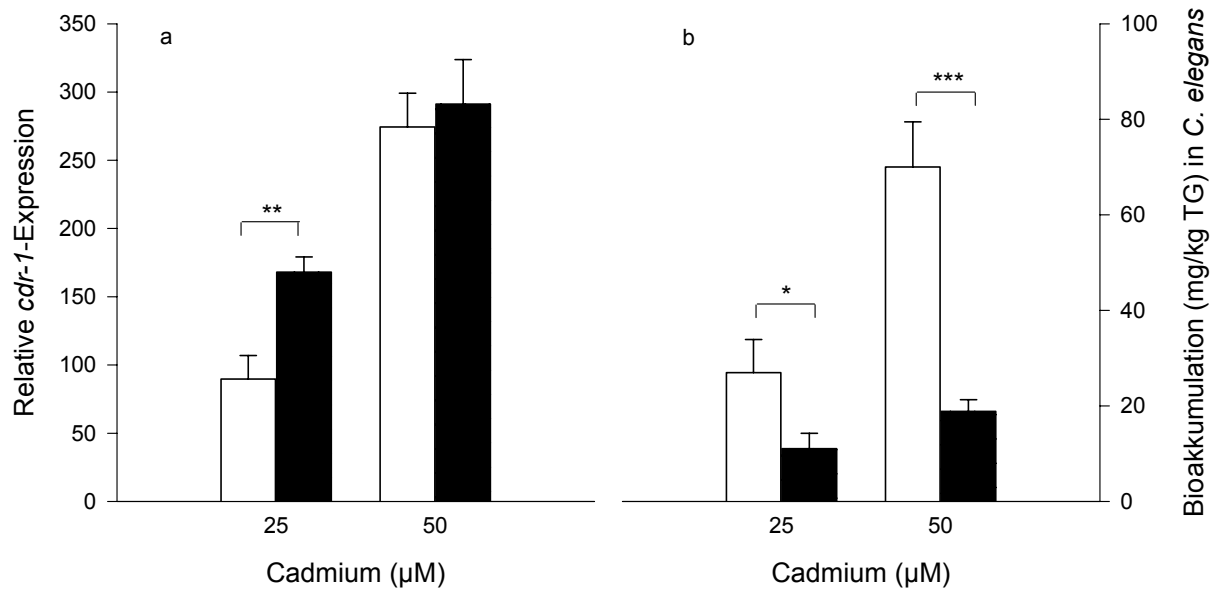


Abb. 3.8 Relative *cdr-1*-Expression (a) und Cadmiumbioakkumulation (b) in *C. elegans* nach einer 6-stündigen Exposition in 25 und 50 µM Cadmium über *E. coli* (weiße Säulen) und *A. globiformis* (schwarze Säulen) bei einer Bakteriendichte von jeweils 200 FAU. Signifikante Unterschiede zwischen der Genexpression und Akkumulation bei einer Exposition über *E. coli* und *A. globiformis* wurden markiert durch * (t-Test * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$). Fehlerbalken bezeichnen die Standardabweichungen der Mittelwerte (n = 3).

3.4.2 Einfluss von anorganischen Partikeln mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen

Der Einfluss funktioneller Gruppen und deren Bindungsstärke auf die interne Verfügbarkeit und Akkumulation von Cadmium sollte anhand künstlicher Partikel untersucht werden. Hierzu wurden Partikel mit einem Durchmesser von 1 µm gewählt, um eine zu *E. coli* vergleichbare und physiologisch problemlose Partikelaufnahme zu gewährleisten. Die künstlichen Partikel sind chemisch modifiziert und tragen jeweils Carboxyl-, Amin- oder Sulfatgruppen als funktionelle Oberflächen. Die Partikel wurden im Medium suspendiert, um den Einfluss funktioneller Gruppen auf die Cadmiumexposition für die Nematoden zu untersuchen. Die Nematoden wurden mit einer Partikelanzahl entsprechend einer Bakteriendichte von 335 FAU für 24 h gefüttert. Alle Partikel (carboxylierte, aminierte und sulfatgruppentragende Partikel) führten zu einer leichten Erhöhung der mRNA-Transkription (Abb. 3.9 a). Die höchsten Werte wurden bei einer Exposition über COOH-Partikel gemessen; sie steigerten die relative Genexpression um das 67fache bei einer Inkubation in 75 µM Cadmium. Wurden den künstlichen Partikeln *E. coli* in einem Verhältnis 1:1 beigemischt,

fürte die gleiche Partikelanzahl zu einer vielfach verstärkten Cadmiumverfügbarkeit und somit *cdr-1*-Expression. Sie stieg bei den NH_2 -, SO_4 - und COOH -Partikeln jeweils um bis zu 2209, 2181 und 1549 % an. Das Gemisch aus carboxylierten Partikeln und *E. coli* ließ die höchste Cadmiumverfügbarkeit messen. Ein Vergleich zu der Exposition über *E. coli* ohne künstliche Partikel (schwarze Säulen in Abb. 3.8 a) zeigte, dass künstliche Partikel, oder ein Gemisch aus abiotischen und biotischen Partikeln, die Bioverfügbarkeit von Cadmium stets herabsetzen. Wider Erwarten zu der niedrigen Cadmiumverfügbarkeit führte die Exposition über die abiotischen Partikel zu einer höheren Cadmiumanreicherung in den Nematoden als die Gabe eines Gemischs aus Kunstpartikeln und *E. coli* (Abb. 3.9 b). Besonders deutlich lässt sich dieses Vorkommen bei einer Cadmiumkonzentration von 50 μM erkennen. Folglich führte ein Gemisch aus künstlichen Partikeln und *E. coli* zwar zu einer erhöhten internen Cadmiumverfügbarkeit, doch wurde das auf diesem Wege aufgenommene Cadmium im Vergleich zu einer homogenen Partikelsuspensionen aus Kunstpartikeln oder Nahrungspartikeln offenbar besser entgiftet und somit nicht so stark akkumuliert.

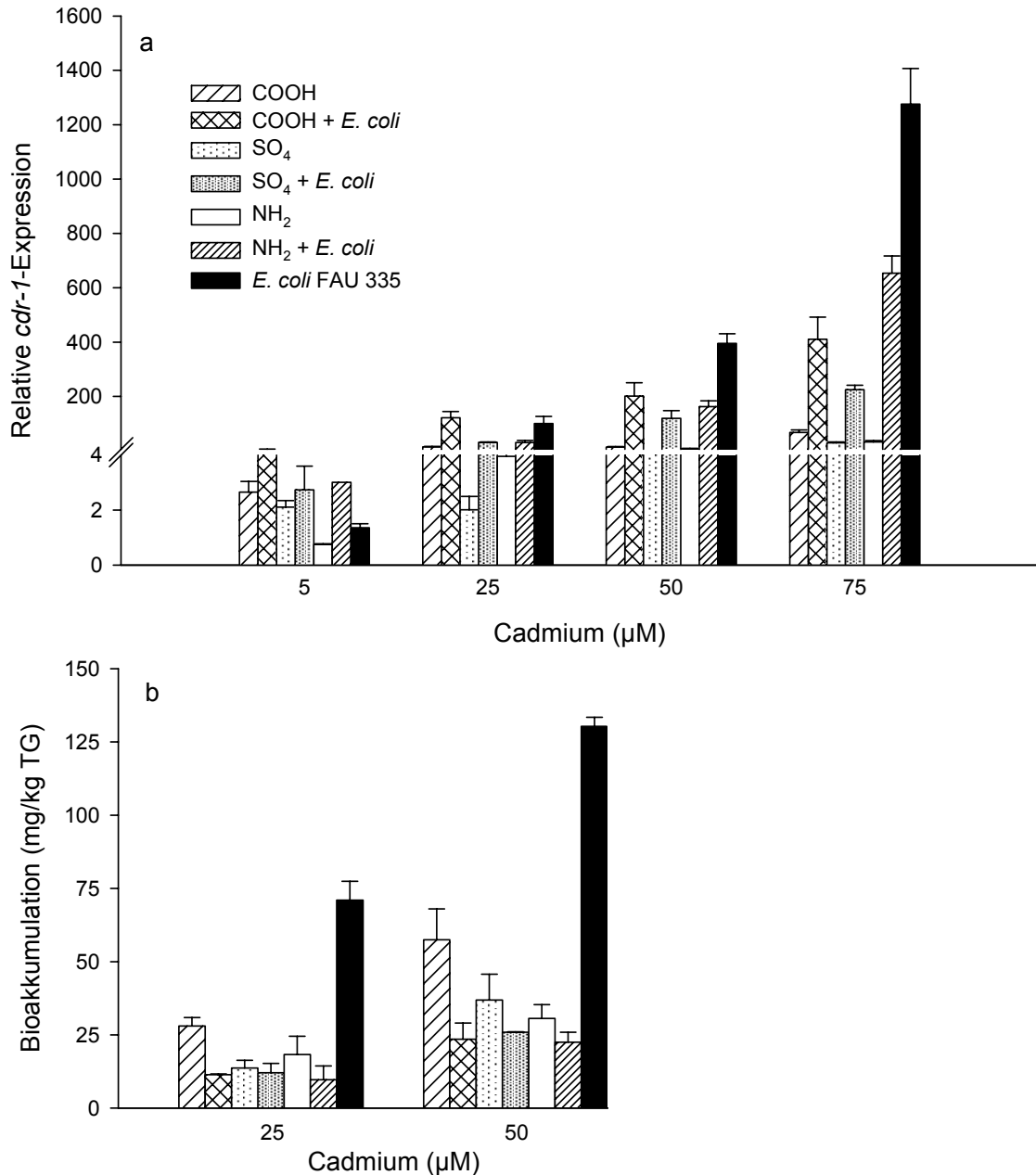


Abb. 3.9 Einfluss einer 24-stündigen Cadmiumexposition über künstliche Partikel mit unterschiedlichen funktionellen Oberflächen (Carboxyl-, Amin- und Sulfatgruppen) und einem Gemisch aus Kunstpartikeln und *E. coli* auf die Transkription des *cdr-1*-Gens (a) und die Bioakkumulation (b) in *C. elegans*. Die Kunstpartikel sowie das Gemisch (im Verhältnis 1:1) aus den einzelnen Kunstpartikeln und *E. coli* wurden in 5 bis 75 μM Cadmiumlösungen suspendiert. Die Schadstoffakkumulation in den Nematoden wurde lediglich für 25 und 50 μM Cadmium bestimmt. Die Gesamtpartikelanzahl betrug in jedem Testansatz $0,347 \cdot 10^9$ Partikel pro ml und entsprach somit einer Trübungsmessung von 335 FAU. Der Einfluss der Kunstpartikel und des Partikelgemischs ist im Vergleich zur Exposition über eine *E. coli*-Dichte von 335 FAU dargestellt. Fehlerbalken bezeichnen die Standardabweichungen der Mittelwerte ($n = 3$).

3.4.3 Einfluss von Lipopolysacchariden als Trägersubstanz

In welcher Hinsicht LPS, als Zellwandbestandteil von *E. coli* sowie nährstoffreiche Matrix, eine Bedeutung für die interne Bioverfügbarkeit und Akkumulation von Cadmium in *C. elegans* haben, wurde durch zwei verschiedene Versuchsansätze untersucht: Zum einen erfolgte eine Exposition über LPS-beschichtete Kunstpartikel, zum anderen über eine LPS-Suspension (Abb. 3.10 a und b). Der Einfluss beider Expositionspfade erwies sich als relativ gering für die interne Cadmiumverfügbarkeit. Gebunden an Partikel führten die LPS zu einer 2fach (25 μM Cadmium) und 4fach (50 μM Cadmium) erhöhten relativen Genexpression, sodass die Bioverfügbarkeit durch diese Substanz vergleichbar mit der über die reine Flüssigphase ist. *E. coli* als natürlicher Futterorganismus und Schadstoffträger für *C. elegans* zeigte eine wesentlich stärkere Vektorfunktion für die interne Cadmiumverfügbarkeit. LPS in gelöster Form, angeordnet als Mizellen, führten bei einer Expositionskonzentration von 50 μM Cadmium zu einer signifikant erhöhten Genexpression im Vergleich zum reinen Flüssigphasentest ohne Zusatz. Nahmen die Nematoden das Cadmium über die LPS auf, in gebundener oder gelöster Form, wurde dieses stärker im Körper angereichert als bei einer Aufnahme über das pure Medium ohne LPS. Die Akkumulation stieg mit zunehmender Cadmiumkonzentration an. Bei einer Aufnahme über die gebundene Form konnte bei 25 μM Cadmium eine höhere Akkumulation gemessen werden als durch die LPS-Suspension. Bei einer Schadstoffkonzentration von 50 μM Cadmium hingegen zeigten beide Expositionswege nahezu keinen Unterschied in der Cadmiumanreicherung.

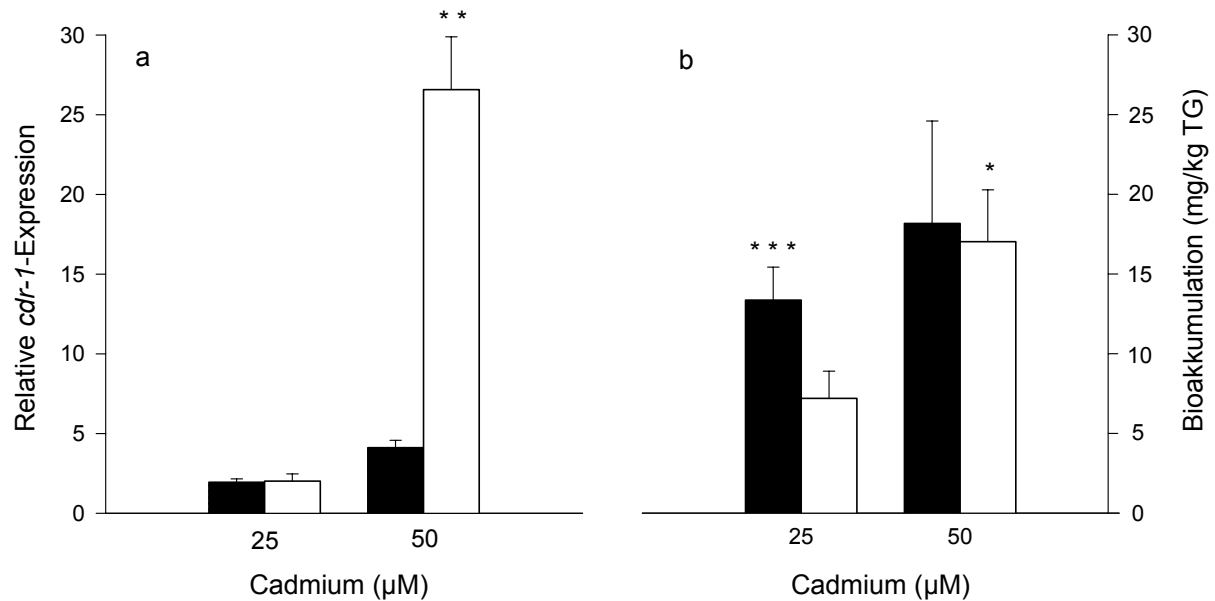


Abb. 3.10 Relative *cdr-1*-Expression (a) und Bioakkumulation (b) in *C. elegans* nach einer 6-stündigen Cadmiumexposition über LPS-beschichtete Kunstpartikel (schwarze Säulen) und in M9-Medium suspendierte LPS (weiße Säulen). Signifikante Unterschiede in der Genexpression und Akkumulation wurden markiert durch * (t-Test * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ *** $p < 0,005$). Fehlerbalken bezeichnen die Standardabweichungen der Mittelwerte ($n = 3$).

3.5 Einfluss der Cadmiumanreicherung auf die *cdr-1*-Expression

Eine Wirkung von Cadmium in *C. elegans* konnte in Abhängigkeit der Umgebungskonzentration mithilfe der *cdr-1*-Genexpression gezeigt werden. Daher erscheint die *cdr-1*-Expression als Biomarker für eine Cadmiumbelastung geeignet zu sein. Inwieweit die Cadmiumakkumulation mit den gemessenen Effekten übereinstimmt, sollte ein entsprechender Vergleich zeigen. Eine Gegenüberstellung der *cdr-1*-Expression und der Gewebeanreicherung von Cadmium in *C. elegans* ist für alle Expositionswege, ausgenommen des mit Verapamil versetzten Mediums, in Abbildung 3.11 dargestellt. Die beiden Parameter korrelieren positiv miteinander und deuten mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,844$ auf eine relative starke Wechselbeziehung hin. Betrachtet man hingegen einzelne Werte, wird deutlich, dass gleiche Werte für die *cdr-1*-Expression aus völlig unterschiedlichen Werten für die Bioakkumulation resultieren können (und vice versa). Die beiden Parameter werden anscheinend unabhängig voneinander vom Expositionsweg beeinflusst. Folglich lässt eine hohe Genexpression tendenziell zwar auf eine hohe Bioakkumulation schließen, wie aber exemplarisch in Tabelle 3.1 dargestellt, wird die *cdr-1*-Expression als Biomarker für die Vorhersage der Cadmiumanreicherung in Nematoden als ungeeignet bewertet.

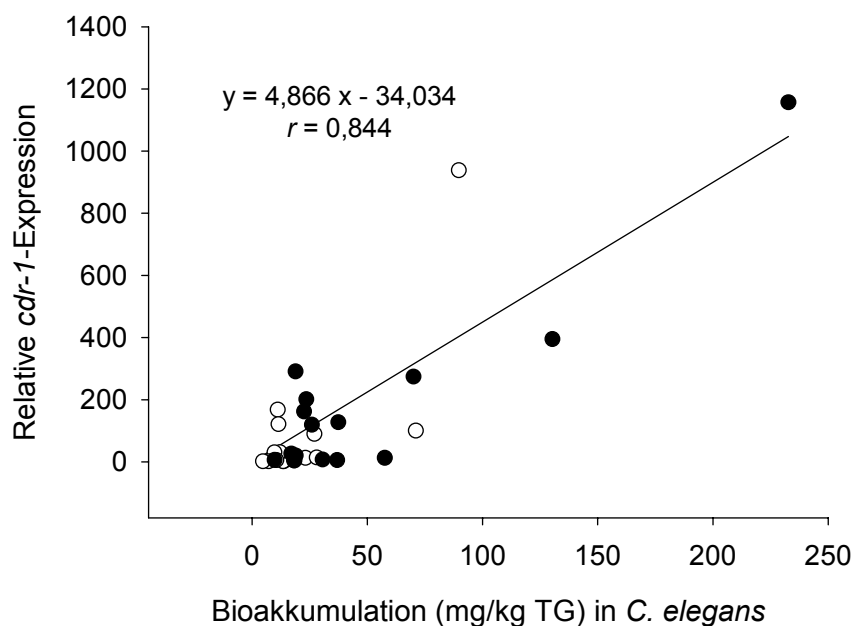


Abb. 3.11 Korrelationsanalyse zwischen der relativen *cdr-1*-Expression und der Bioakkumulation in *C. elegans*. In die Berechnung sind die Ergebnisse aller Expositions-Experimente (ausgenommen Versuche mit Verapamil) bei einer 6- und 24-stündigen Inkubation in 25 µM (○) und 50 µM (●) Cadmium eingegangen.

Tab. 3.1 Exemplarischer Wertevergleich der *cdr-1*-Expression und der Bioakkumulation in *C. elegans*, nach einer Cadmiuminkubation über verschiedene Expositionspfade.

<i>Cdr-1</i> -Expression	Bioakkumulation in <i>C. elegans</i> (mg/kg TG)	Expositionsweg
13,0±2,4	57,5±10,5	COOH-Beads
14,0±1,8	28,0±2,9	COOH-Beads
119,4±28,4	25,9±0,1	SO ₄ -Beads + <i>E. coli</i>
121,5±22,9	11,4±0,3	COOH-Beads + <i>E. coli</i>
274,4±24,9	70,00±9,5	<i>E. coli</i> 200 FAU
291,2±32,6	18,84±2,5	<i>A. globiformis</i>

3.6 Die Bedeutung der Partikel-Schadstoffkonzentration für die interne Verfügbarkeit und Anreicherung von Cadmium in *C. elegans*

In den zuvor erläuterten Ergebnissen wurde deutlich, dass Partikel allgemein, und deren Zusammensetzung im Besonderen, einen starken Einfluss auf die Bioverfügbarkeit und Akkumulation in *C. elegans* haben. Lässt sich dieser Effekt auf die erhöhte

Cadmiumbelastung der Partikel zurückführen? Um diese Frage zu beantworten, wurde neben den Parametern Genexpression und Cadmiumgewebekonzentration, die Schadstoffakkumulation und -sorption der jeweiligen Partikel bestimmt. Weiterhin erfolgte die Bestimmung der Cadmiumkonzentration im Überstand. Sie betrug bei den Expositionskonzentrationen 25 und 50 μM ~ 94 % der nominellen Cadmiumkonzentration. Die Cadmiumbelastungen der Bakterien nach einer 6- und 24-stündigen Schadstoffinkubation sind in Abbildung 3.12 a und b dargestellt. Bei allen Bakterien zeigte sich nach 6 h Inkubation eine Zunahme der Belastung mit steigender Schadstoffkonzentration. Durch eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 24 h verstärkte sich der Effekt der internen Cadmiumverfügbarkeit bei *E. coli* (200 und 335 FAU). Auffällig war hierbei, dass die Cadmiumbelastung bei *E. coli* 200 FAU mit der Zeit stärker zunahm (um das 2,9fache bei 25 μM Cd und 2,5fache bei 50 μM Cd) als bei einer Bakterienanzahl von 335 FAU (Erhöhung um das 1,2 und 1,1fache). Bei beiden Inkubationszeiten zeigte die niedrigere Bakterienkonzentration stets eine höhere Schadstoffbelastung pro kg Trockenmasse. Vergleicht man die Cadmiumakkumulation der beiden Bakterienarten *E. coli* und *A. globiformis* miteinander, so ist die Belastung des Gram-positiven Bakteriums mit $204,3 \pm 10,8$ und $468,7 \pm 24,8$ mg/kg TG ungefähr doppelt so hoch wie bei *E. coli* ($109,3 \pm 8,1$ und $220,0 \pm 15,7$ mg/kg TG) gleicher Zellkonzentration.

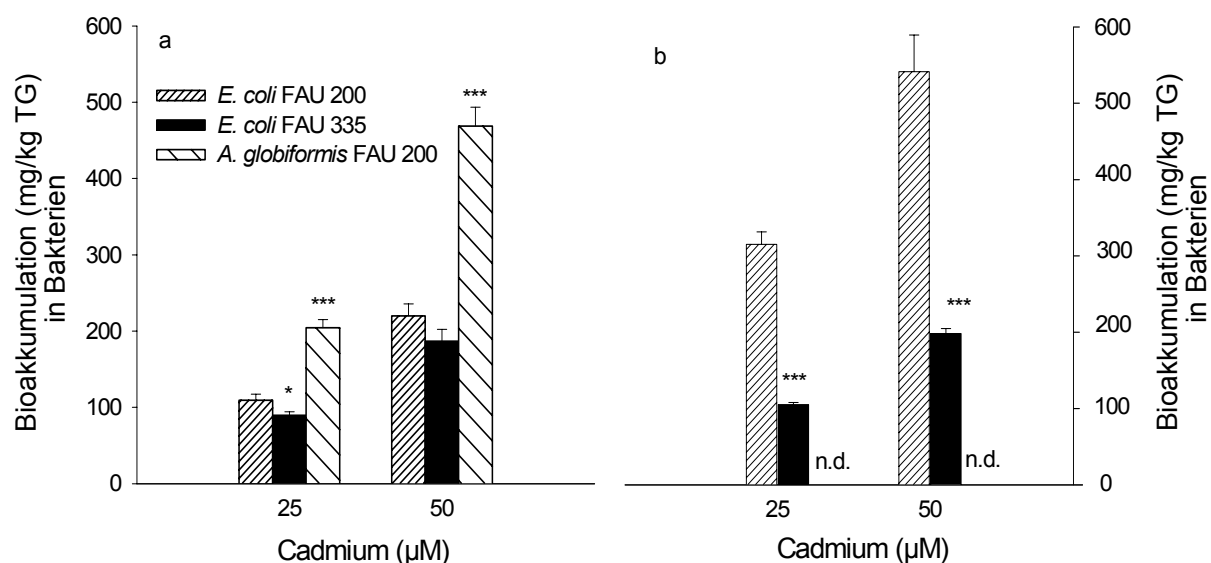


Abb. 3.12 Bioakkumulation in *E. coli* (200 und 335 FAU) und *A. globiformis* (200 FAU) nach einer Inkubation für 6 h (a) und 24 h (b) in 25 und 50 µM Cadmium. Signifikante Unterschiede zwischen der Akkumulation in *E. coli* 200 FAU und *A. globiformis* 200 FAU wurden markiert durch * (t-Test $p < 0,05$, *** $p < 0,005$). Fehlerbalken bezeichnen die Standardabweichungen der Mittelwerte ($n = 3$). Die Cadmiumanreicherung in *A. globiformis* nach 24-stündiger Inkubation wurde nicht bestimmt (n.d.).

Neben der Metallbelastung der Bakterien wurde auch die Cadmiumsorption durch unterschiedliche Oberflächengruppen von Kunstpartikeln bestimmt. Im Vergleich zu den biotischen Nahrungspartikeln, derselben Partikelanzahl, war der Schadstoffgehalt der sulfatgruppentragenden und aminierten Partikel relativ gering (Tab. 3.2). Die Sorption der carboxylierten Partikel indessen war um ein Vielfaches (bis zu 26fach) höher und somit mit der Metallbelastung von *E. coli* 335 FAU vergleichbar.

Tab. 3.2 Cadmiumsorption an Kunstpartikeln mit unterschiedlichen funktionellen Oberflächengruppen nach einer 24-stündigen Inkubation in 25 und 50 µM Cadmium

Kunstpartikelart	25 µM Cadmium	50 µM Cadmium
COOH-Partikel	94,0 ± 4,0 mg/kg	215,0 ± 30,3 mg/kg
SO ₄ -Partikel	4,9 ± 0,0 mg/kg	10,0 ± 0,9 mg/kg
NH ₂ -Partikel	4,3 ± 0,4 mg/kg	8,4 ± 2,0 mg/kg

Weiterhin wurden die BAFs der Nematoden und Bakterien sowie die K_p -Werte der künstlichen Partikel berechnet (Abb. 3.13). Die BAF-Werte für *E. coli* nehmen mit zunehmender Inkubationszeit zu und sind, entsprechend der Werte für die Cadmiumanreicherung in mg pro kg TG, bei einer Bakteriendichte von 200 FAU höher als bei 335 FAU. Entsprechend der Sorptionswerte ergaben sich bei den Kunstpartikel niedrige K_p -Werte für SO_4^- und NH_2 -Partikel und relativ hohe Verteilungskonstanten für COOH -Partikel. Betrachtet man die dazugehörigen BAF für *C. elegans* so lassen sich für die einzelnen Partikelarten jeweils hohe Korrelationen erkennen ($r = 0,797$ für BAF *E. coli* vs. BAF *C. elegans* und $r = 0,959$ für K_p Kunstpartikel vs. BAF *C. elegans*). Eine Korrelationsanalyse unter Einbezug aller Partikel zeigte jedoch, dass die Wechselbeziehung zwischen der Cadmiumbeladung der Partikel und der Akkumulation in den Nematoden mit $r = 0,589$ gering ist (Abb. 3.14). Eine ähnliche Tendenz lässt sich für die Beziehung zwischen der Cadmiumbelastung der Würmer und der Partikelbelastung, gemessen in mg pro kg, erkennen ($p = 0,632$, Abb. 3.15 b). Ein etwas bedeutenderer Zusammenhang lässt sich zwischen der Cadmiumverfügbarkeit, gemessen als *cdr-1*-Expression, und dem Partikelcadmiumgehalt feststellen; sie korrelieren positiv miteinander ($r = 0,795$, Abb. 3.15 a).

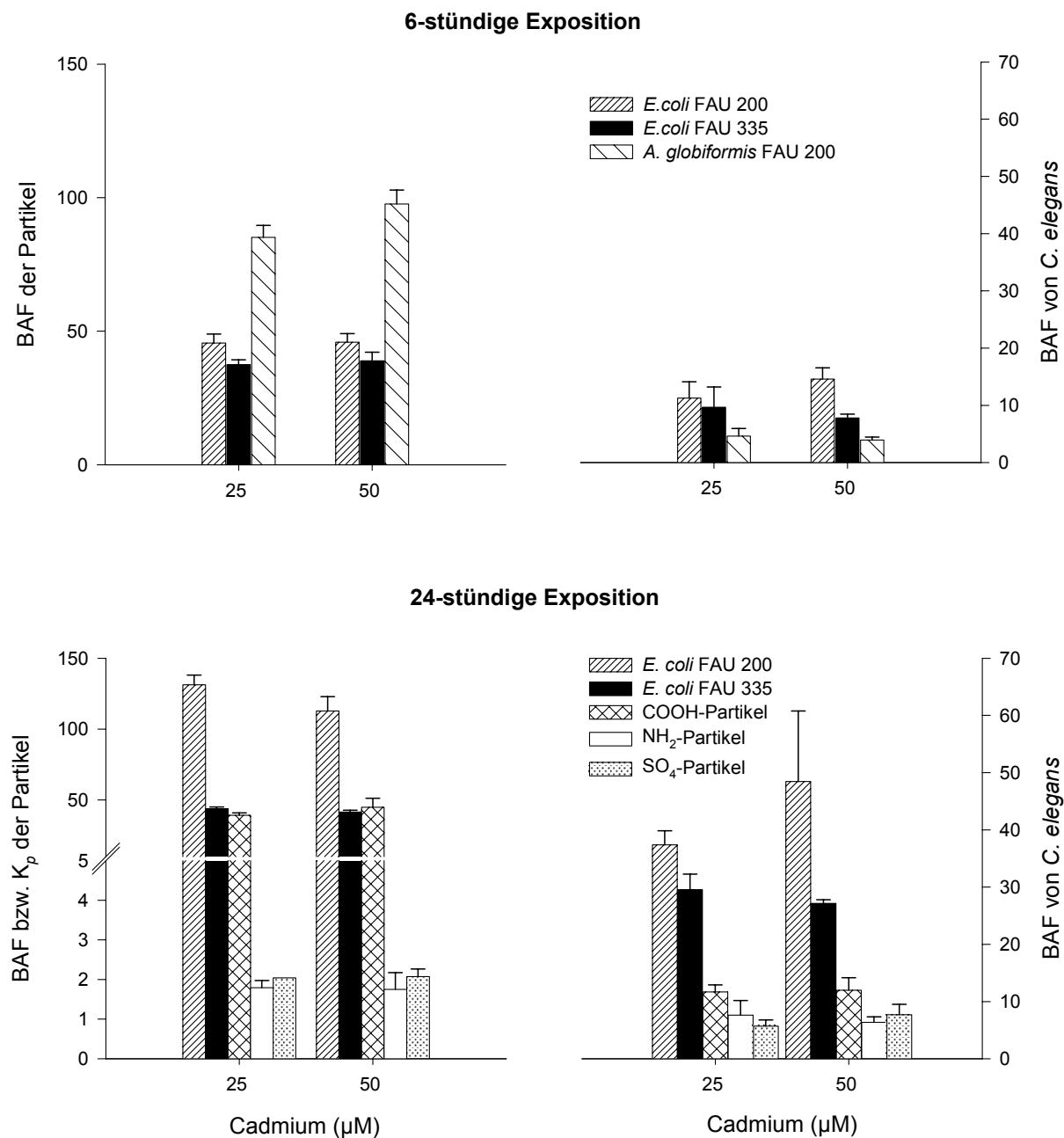


Abb. 3.13 Bioakkumulationsfaktoren (BAF) von *C. elegans*, *E. coli* und *A. globiformis* sowie die Partikel-Wasser-Verteilungskonstanten (K_p) von Kunstpartikeln mit unterschiedlichen funktionellen Oberflächengruppen nach einer 6- und 24-stündigen Inkubation in 25 und 50 μM Cadmium. Fehlerbalken bezeichnen die Standardabweichungen der Mittelwerte ($n = 3$).

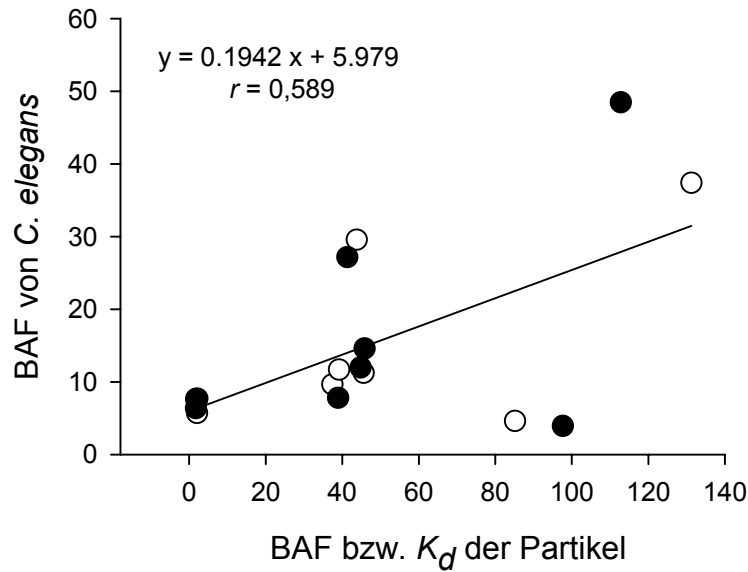


Abb. 3.14 Korrelationsanalyse zwischen den Bioakkumulationsfaktoren (BAF) von *C. elegans* und den Bioakkumulationsfaktoren bzw. Partikel-Wasser-Verteilungskonstanten (K_d) von *E. coli* und *A. globiformis* oder Kunstpartikeln. In die Berechnung sind die Ergebnisse aller Expositions-Experimente (ausgenommen Versuche mit Verapamil) bei einer 6- und 24-stündigen Inkubation in 25 μM (○) und 50 μM (●) Cadmium eingegangen.

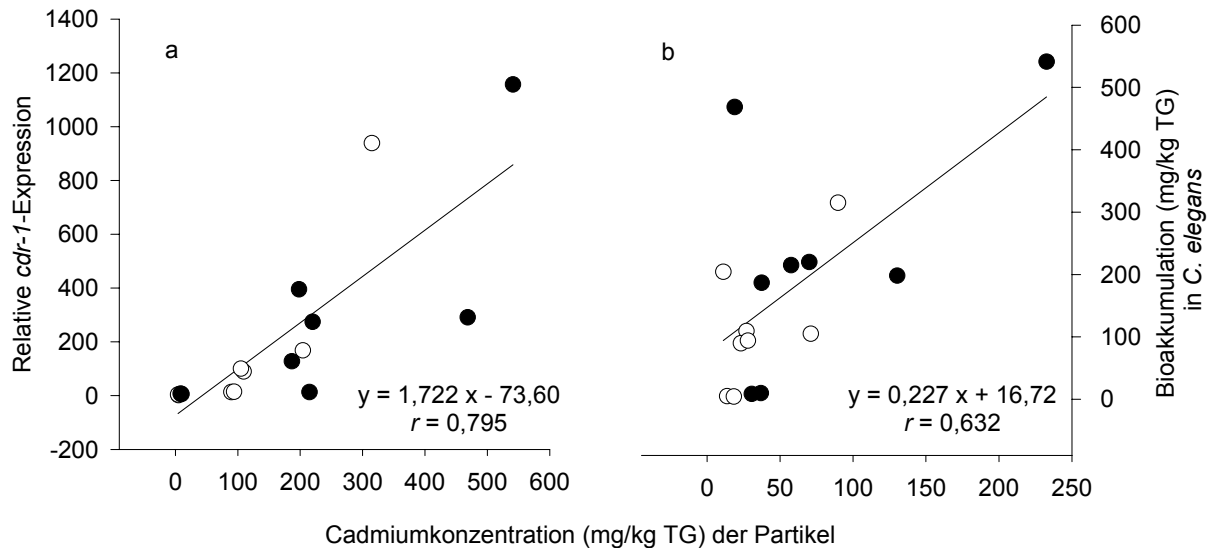


Abb. 3.15 Korrelationsanalyse zwischen *cdr-1*-Expression (a) sowie der Bioakkumulation (b) in *C. elegans* und der Cadmiumkonzentration der Partikel. In die Berechnung sind die Ergebnisse aller Expositions-Experimente (ausgenommen Versuche mit Verapamil) bei einer 6- und 24-stündigen Inkubation in 25 μM (○) und 50 μM (●) Cadmium eingegangen.

3.7 Einfluss der Cadmiumbelastung auf den Energiestatus der Nematoden

Durch Cadmiumaufnahme hervorgerufene Zellschädigungen und die damit verbundene Induktion von Reparaturmechanismen können zu einem erhöhten Energiebedarf der Nematoden führen. Wenn ein erhöhter Energiebedarf eine verstärkte Aufnahme von Partikeln und daran sorbierten oder inkorporiertem Cadmium bedingt, um z.B. essenzielle Aminosäuren zu assimilieren, dann lässt sich ein Zusammenhang zwischen der Energieladung (Energy Charge) der Nematoden und der *cdr-1*-Genexpression und/oder Cadmiumanreicherung erkennen. Der Einfluss unterschiedlicher Expositionspfade auf den Energiestatus der Nematoden ist in Abbildung 3.16 dargestellt. Die in diesen Experimenten erzielten Werte für die Energieladung liegen bei den Kontrollen weit unter denen der laut Literatur zu erwartenden Werten von 0,75 und 0,95. Aufgrund der eingeschränkten Verwertbarkeit der Daten, lässt sich die Zielfragestellung somit nur unzureichend beantworten.

Die Energieladungen der Expositionspfade Medium (ohne Bakterien) und *E. coli* 335 FAU als Nahrungspartikel lassen für beide Inkubationszeiten (6 und 24 h) keine signifikanten Unterschiede zwischen einer Cadmiuminkubation und den Kontrollen ohne Cadmium erkennen. Lediglich eine 6-stündige Exposition über *E. coli* 200 FAU führte zu einem signifikant höheren Energiestatus in den Kontrollansätzen im Vergleich zu einer Inkubation in 25 μM Cadmium. Nach einer 6-stündigen Exposition haben die Würmer in den Kontrollansätzen einen erkennbar höheren Energiestatus als bei einer Exposition über das reine Medium ohne Nahrungspartikel. Weiterhin weisen die Würmer bei einer Inkubation in 50 μM Cadmium bei Fütterung einer *E. coli*-Konzentration von 200 FAU einen signifikant höheren energetischen Zustand auf als die über das Medium oder *E. coli* 335 FAU exponierten Nematoden. Zusätzlich wurde das Verhältnis zwischen den Adeninucleotiden AMP und ATP berechnet (Tab. 3.3). Für die 24-h-Experimente und eine Exposition für 6 h *E. coli* 335 FAU lässt sich ein Anstieg des AMP:ATP-Verhältnisses unter Cadmiumstress erkennen.

Tab. 3.3 AMP:ATP-Verhältnis nach einer 6- und 24-stündigen Inkubation der Nematoden unter unterschiedlichen Expositionsbedingungen in 25 und 50 μM Cadmium sowie im Kontrollansatz ohne Cadmium.

AMP:ATP-Verhältnis	Kontrolle	25 μM Cd	50 μM Cd
6 h Medium (ohne Bakterien)	48,7	44,2	48,0
6 h <i>E. coli</i> 200 FAU	35,4	43,7	31,4
6 h <i>E. coli</i> 335 FAU	40,7	42,0	44,1
24 h Medium (ohne Bakterien)	19,6	21,2	27,3
24 h <i>E. coli</i> 335 FAU	18,2	22,2	23,6

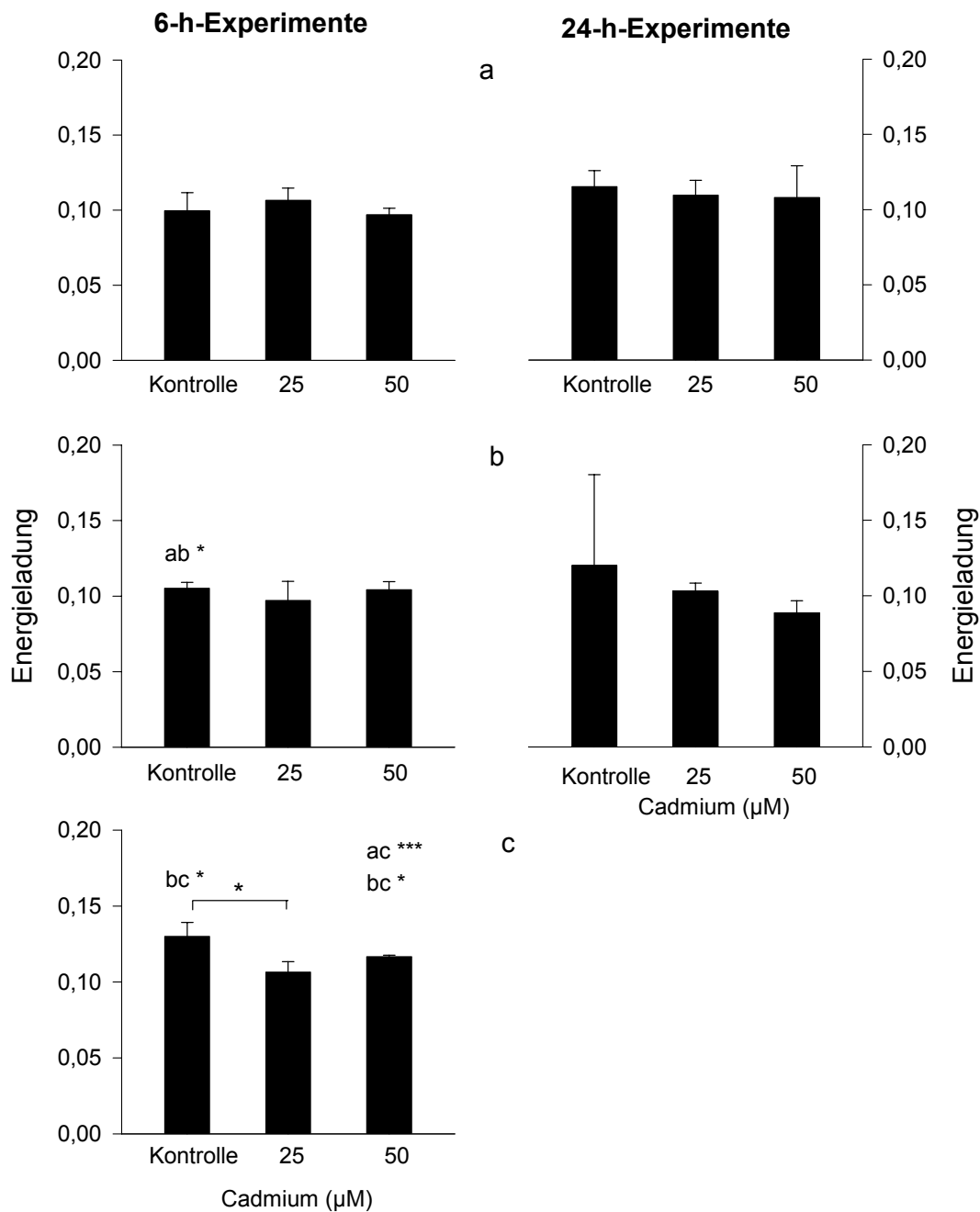


Abbildung 3.16 Einfluss der Expositionspfade Medium (a), *E. coli* 335 FAU (b) und *E. coli* 200 FAU (c) auf die Energieladung der Nematoden nach einer 6- und 24-stündigen Inkubation in 25 und 50 µM Cadmium. Die Energieladungen der jeweiligen Expositionspfade sind im Vergleich zum dazugehörigen Kontrollansatz ohne Cadmiumbehandlung dargestellt. Signifikante Unterschiede in der Energieladung der jeweiligen Expositionspfade wurden markiert durch * und Unterschiede zwischen den Kontrollen und Cadmiumkonzentrationen zwischen den verschiedenen Expositionen wurden mit den entsprechenden Buchstaben und * markiert (t-Test * $p < 0,05$, *** $p < 0,005$). Fehlerbalken bezeichnen die Standardabweichungen der Mittelwerte ($n = 3$).

3.7 Zusammenhang der Wirkung einer direkten Cadmiumexposition und einer internen Cadmiumverfügbarkeit mit chronischen Toxizitätsparametern

Um zu untersuchen, inwiefern eine Cadmiumexposition zu chronischen Schäden bei *C. elegans* führt, wurde ein Nematodentest laut ISO-Vorschrift durchgeführt. Die Schadstoffauswirkungen auf die Parameter Wachstum, Reproduktion und Fertilität wurden nach einer 96-stündigen Inkubation in 5, 25, 50 und 75 μM Cadmiumlösung ermittelt. Abbildung 3.17 a bis c zeigt die Ergebnisse der einzelnen Parameter im Vergleich zum Kontrollmedium ohne Cadmiumbehandlung. Die Ergebnisse zeigen bei allen Cadmiumkonzentrationen einen geringen Einfluss der Behandlung im Vergleich zu den Kontrollwerten. Auch die Darstellung der Werte in Prozent Hemmung bezogen auf die Kontrolle (Abb. 3.17 d) machte deutlich, dass *C. elegans* relativ unempfindlich gegenüber hohen Cadmiumkonzentrationen reagiert. So liegen die Hemmwirkungen von Cadmium, selbst bei der höchsten Konzentration, weit unter den Toxizitätsschwellenwerten von 20 % für Wachstum und Fertilität und 50 % für die Reproduktionsfähigkeit. Mit diesem Hintergrund wurden für die Untersuchungen der akuten Effekte in Abhängigkeit vom Expositionsweg relativ hohe Metallkonzentrationen gewählt.

Eine Korrelation zwischen den Hemmwerten der chronischen Toxizitätsparameter und der *cdr-1*-Expression, nach einer 24-stündigen Inkubation in 5 bis 75 μM Cadmium, lässt mit $r = 0,948$ eine Wechselbeziehung zwischen der Genexpression und dem Nematodenwachstum erkennen (Abb. 3.18). Eine geringe Korrelation hingegen konnte für die Parameter Fertilität und Reproduktion zur Geninduktion beobachtet werden. Des Weiteren wurde für die Korrelationsanalyse die Anzahl der Eier pro Wurm berücksichtigt. Sie korreliert mit $r = 0,997$ am stärksten mit der *cdr-1*-Expression der Nematoden.

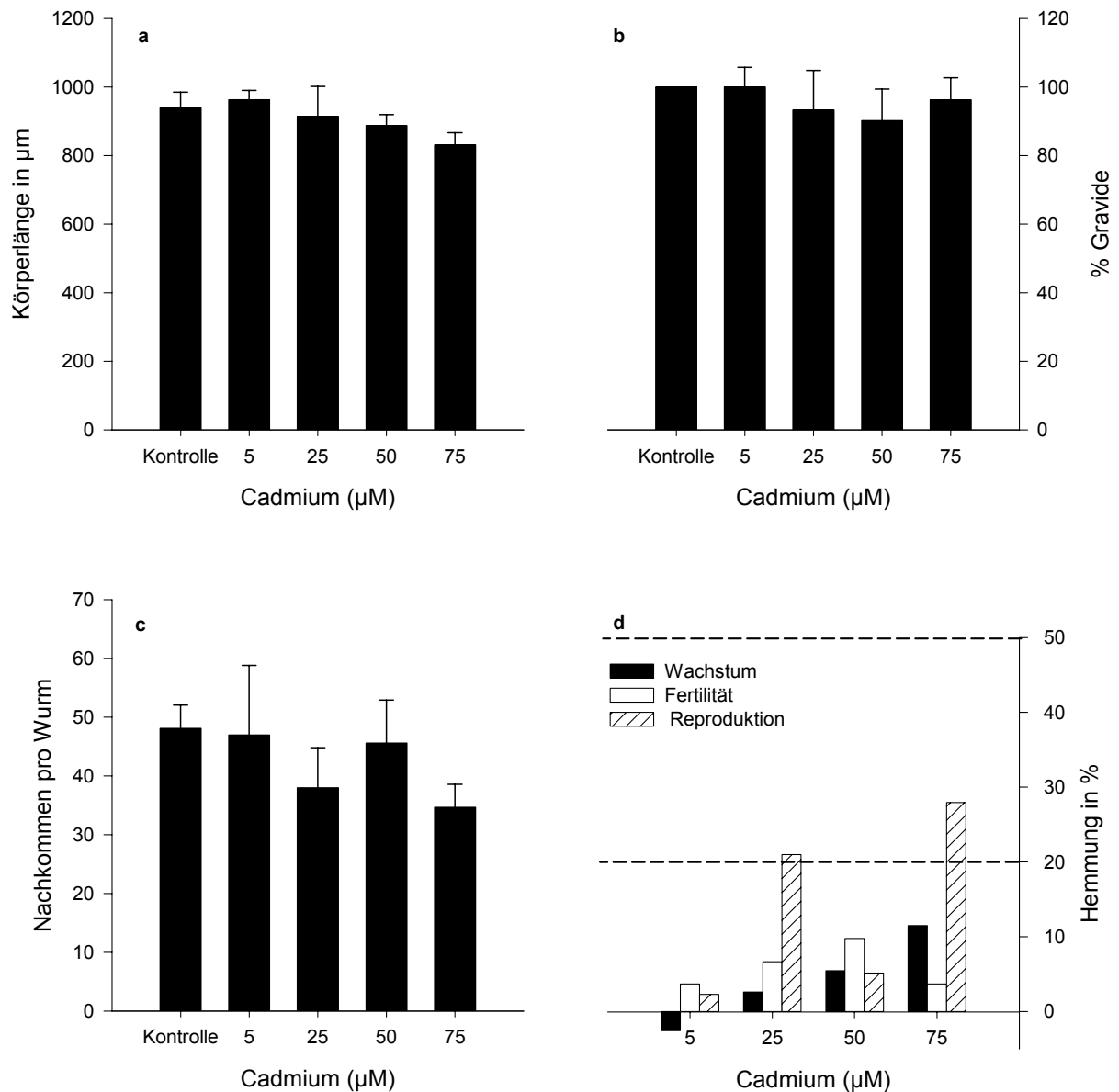


Abb. 3.17 Bestimmung der Effekte einer 96-stündigen Exposition in 5 – 75 μM Cadmiumlösungen auf die Parameter Wachstum (Körperlänge in μm ; a), Fertilität (Anteil gravider Würmer in %; b) und Reproduktion (Nachkommen pro Wurm; c) von *C. elegans*. Die Ergebnisse sind im Vergleich zum dazugehörigen Kontrollansatz ohne Cadmiumbehandlung dargestellt. (d) Relative Hemmdaten (%) der Toxizitätsparameter mit der jeweiligen Kontrolle als Referenzwert. Die Linien markieren die Toxizitätsschwellenwerte für Wachstum und Fertilität (20 % Hemmung) sowie Reproduktion (50 % Hemmung). Fehlerbalken bezeichnen die Standardabweichungen der Mittelwerte ($n = 5$).

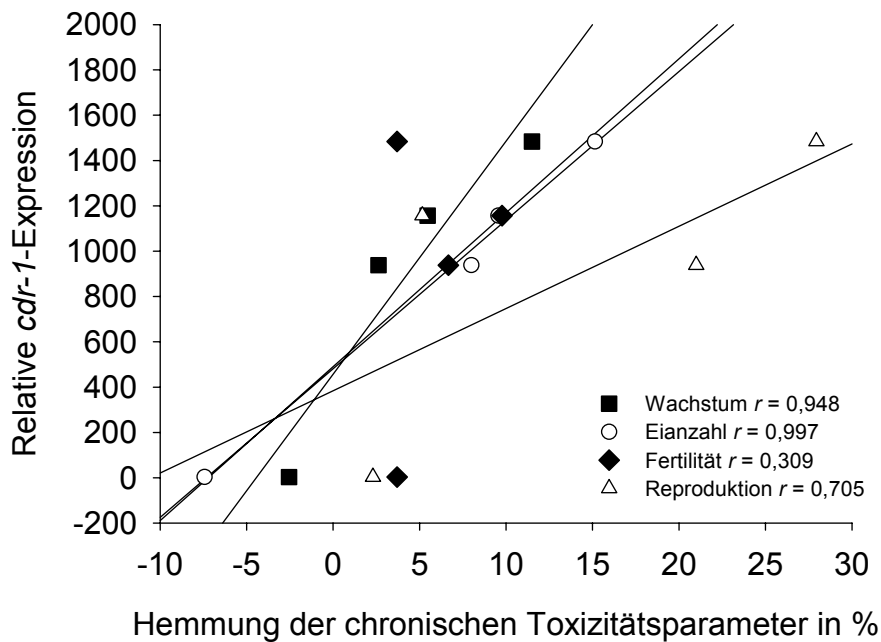


Abbildung 3.18 Korrelation zwischen der *cdr-1*-Expression (nach einer 24-stündigen Cadmiuminkubation über *E. coli* 200 FAU) und der Hemmung der chronischen Toxizitätsparameter Wachstum, Eianzahl pro Wurm, Fertilität und Reproduktion. Dargestellt sind die Mittelwerte ($n = 3$ für die Genexpression und $n = 5$ für die chronischen Parameter) nach einer Inkubation in 5, 25, 50 und 75 μM Cadmium.

Weiterhin wurde untersucht, ob das einmal in den Nematoden akkumulierte Cadmium Langzeiteffekte hervorruft und somit ein Zusammenhang zwischen der akuten Genexpression und den chronischen Parametern Wachstum, Reproduktionsleistung und Fertilität hergestellt werden kann. Hierfür wurde ein modifizierter Nematodentest durchgeführt. Nach einer 6-stündigen Vorinkubation in reinem Medium sowie 25 und 50 μM Cadmium unter Gabe von *E. coli* (200 FAU) wurden jeweils zehn juvenile Würmer des Stadiums L1 entnommen und in reinem Medium (ohne Schadstoffbehandlung) entsprechend der Nematodentestvorschrift unter Zugabe von Bakterien inkubiert. Am Ende dieser 96-stündigen Erholungsphase wurde ermittelt, ob das durch die Vorinkubation akkumulierte Cadmium irreversible Folgeschäden hervorruft oder die Würmer fähig sind, sich von der Schadstoffbelastung zu erholen. Obwohl die Cadmiumbelastung durch die Vorinkubation mit 26,97 (25 μM) und 70,00 (50 μM) mg pro kg TG sehr hoch war, konnte kein signifikanter Einfluss auf Wachstum, Reproduktionsleistung und Fertilität der Nematoden beobachtet werden (Abb. 3.19 a bis c).

Die Hemmung dieser Parameter lag weit unter den Toxizitätsschwellenwerten von 20 und 50 % und waren somit unbeträchtlich (Abb. 3.19 d).

Da eine durch Vorinkubation bestehende Cadmiumbelastung keine signifikanten Effekte auf das Wachstum und die Fortpflanzung zeigt, lässt sich keine direkte Kausalität zwischen der *cdr-1*-Geninduktion und einer chronischen Toxizität schlussfolgern.

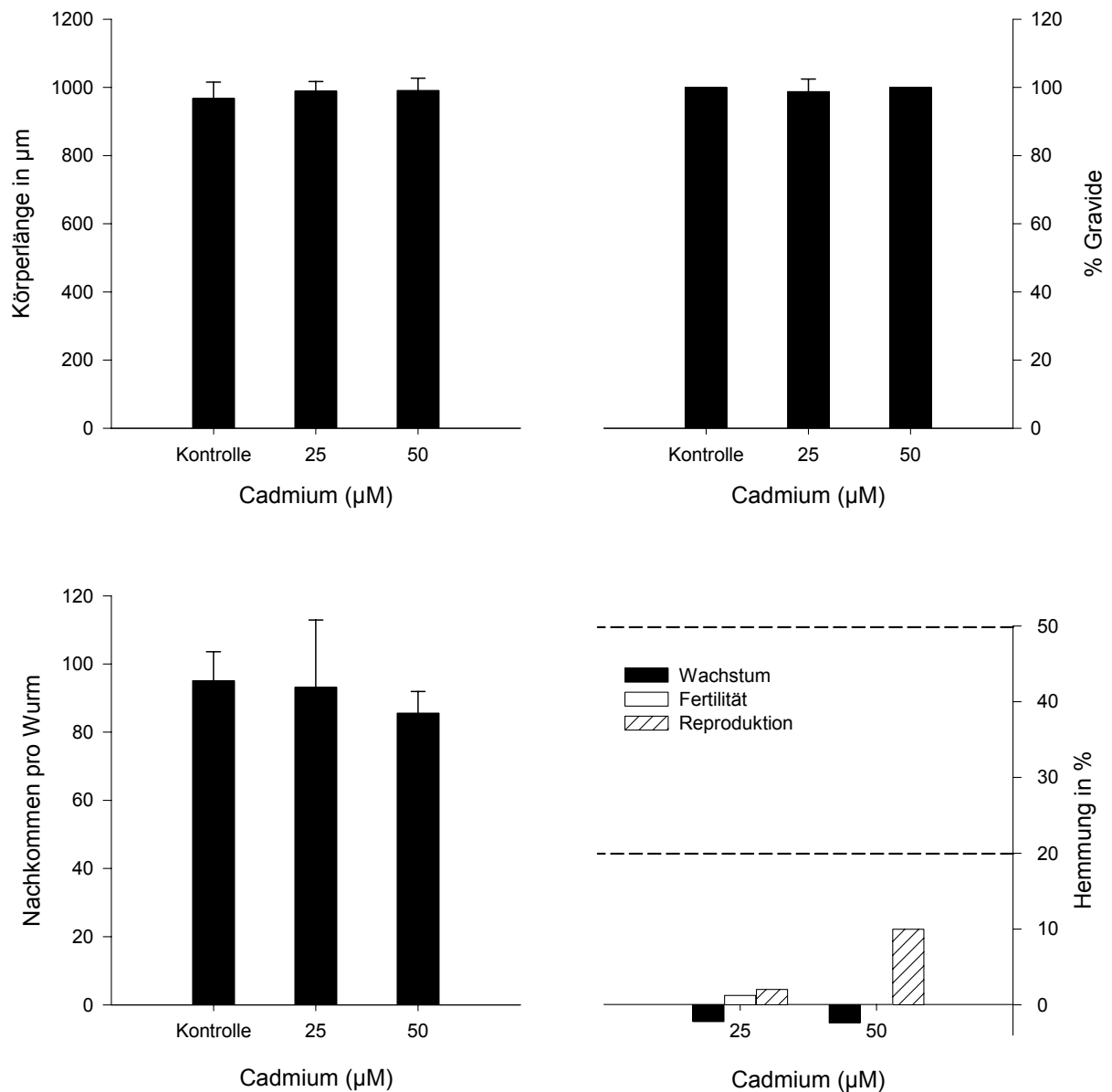


Abb. 3.19 Bestimmung der Parameter Wachstum (Körperlänge in μm ; a), Fertilität (Anteil gravider Würmer in %; b) und Reproduktion (Nachkommen pro Wurm; c) von *C. elegans* nach 96-stündiger Exposition in M9-Medium. Die im Test eingesetzten Nematoden wurden zuvor für 6 h unter Gabe von *E. coli* (200 FAU) in Kontrollmedium und in 25 und 50 μM Cadmium inkubiert. (d) Relative Hemmdaten (%) der Toxizitätsparameter mit der jeweiligen Kontrolle als Referenzwert. Die Linien

Ergebnisse

markieren die Toxizitätsschwellenwerte für Wachstum und Fertilität (20 % Hemmung) sowie Reproduktion (50 % Hemmung). Fehlerbalken bezeichnen die Standardabweichungen der Mittelwerte ($n = 9$).

4. Diskussion

Studien zur biologischen Verfügbarkeit und Akkumulation von partikel-assoziierten Schwermetallen bekräftigen die Relevanz der Partikel ingestion als Aufnahmepfad von Schadstoffen (z.B. Rainbow und Wang, 2001; Wang und Ke, 2002). Die komplexe Heterogenität von Sedimenten und deren Matrices sowie der spezies- und schadstoffspezifische Einfluss auf die interne Verfügbarkeit und Anreicherung von Metallen führen oft zu widersprüchlichen Ergebnissen und erschweren die Aufnahme von Partikeln als Expositionsweg in bereits bestehende Modelle und Richtlinien. Unterschiedliche Testmethoden und Bestimmungsgrößen der Studien hemmen eine Harmonisierung der differierenden Erkenntnisse. Für Untersuchungen partikel-assoziiierter Schadstoffe ist folglich mehr Übereinstimmung in den Testsystemen erforderlich, möglicherweise durch eine Einführung von Standardlabortests. Weiterhin gibt es nur wenige Studien, die die wahrscheinlich umweltrelevanteste Exposition, eine simultane Exposition über Partikel und Flüssigphase, untersucht haben.

4.1 Die relative Bedeutung der Expositionspfade für die biologische Verfügbarkeit, Bioakkumulation und Detoxifikation von Cadmium – Flüssigphase vs. Partikel

Um grundlegende Erkenntnisse über den Einfluss kontaminierter Partikel auf die Schadstoffaufnahme und den zugrunde liegenden Mechanismen für die Anreicherung und Wirkung von Cadmium zu erlangen, wurden *C. elegans* Partikel mit unterschiedlicher Beschaffenheit angeboten. Die Cadmiuminkubation der Nematoden erfolgte über biotische und abiotische Partikel (suspendiert in belastetem Medium) und über die reine Flüssigphase. Die Exposition über verschiedene Aufnahmepfade bestätigte die Bedeutsamkeit von Partikeln für die Verfügbarkeit und Anreicherung von Cadmium in *C. elegans*. Als maßgebender Faktor für die Effekthöhe erwies sich die Qualität der Partikel. Wenngleich die biologische Verfügbarkeit von partikel-assoziiertem Cadmium um ein Vielfaches höher ist als über die reine Flüssigphase, wird auch in Medium gelöstes Cadmium von den Nematoden aufgenommen. Die Bestimmung der *cdx-1*-Genexpression, als Biomarker für die interne Cadmiumverfügbarkeit, zeigte eine konzentrationsabhängige Zunahme der Geninduktion bei einer Exposition über die Flüssigphase. Der Effekt verstärkte sich mit zunehmender Inkubationszeit. Die Beimischung von Nahrungspartikeln zum Flüssigmedium führte zu einer signifikant erhöhten Bioverfügbarkeit des Cadmiums für *C. elegans*. Bereits relativ geringe Bakterienkonzentrationen von 100 FAU ließen die interne Cadmiumverfügbarkeit um bis zum

430fachen ansteigen. Die Aufnahme von Schadstoffen in gelöster und gebundener Form kann stark differieren, wie durch zahlreiche Studien gezeigt werden konnte (z.B. Yan und Wang, 2002) und wird an anderer Stelle ausführlicher diskutiert.

Die Bioverfügbarkeit des Cadmiums kann sowohl durch den Expositionspfad als auch durch das Fressverhalten des Nematoden beeinflusst werden. *C. elegans* ist ein Filtrierer, der in Flüssigkeit gelöste Nahrungspartikel durch ein peristaltisches Pumpen des Pharynx einsaugt. Während die Partikel posteriorwärts ans Ende des Pharynx, dem Bulbus, transportiert und dort konzentriert werden, wird der größte Teil der aufgenommenen Flüssigkeit wieder über den Mund ausgeschieden. Nur eine geringe Menge der Flüssigkeit wird somit in den Darm gepumpt (Avery und Shtonda, 2003). Das pharyngeale Pumpen wird durch Stressoren, wie Schadstoffe und Hitze sowie durch Bakterien, beeinflusst (Avery und Horvitz, 1990; Jones und Candido, 1999). Sowohl ein Hungerzustand als auch das Vorhandensein von Bakterien führen zur Stimulation des Pumpens. Ein Nichtvorhandensein von Bakterien führt hingegen (bei zuvor gut gefütterten Würmern) zu einer Einstellung der Pumpaktivität (Jones und Candido, 1999). Um den Einfluss eines möglichen Hungerzustandes auf Aufnahme- und Detoxifikationsprozesse nach einer 24-stündigen Exposition nahezu auszuschließen, wurde in weiteren Untersuchungen die Expositionsdauer von 24 h auf 6 h reduziert. Auch bei einer 6-stündigen Inkubation führte die Exposition über Bakterien zu einer stärkeren Geninduktion als das über die Flüssigphase aufgenommene Cadmium. Aufgrund des komplexen Fressverhaltens der Nematoden kann die pharyngeale Pumpaktivität nicht einfach als Antwort auf Bakterien oder toxische Substanzen verstanden werden. Jones und Candido (1999) zeigten eine maximale Hemmung der Fressrate durch Cadmium bei 267 μM , wobei das pharyngeale Pumpen nicht vollständig durch Cadmium gehemmt und somit stets fortgesetzt wurde. Bei Fütterung hoher Bakterienkonzentrationen konnte hingegen kein signifikanter Einfluss auf das Fressverhalten bei Cadmiumkonzentrationen bis zu 625 μM gezeigt werden (Boyd et al., 2003). Das Verhalten von *C. elegans* ist somit ein wichtiger und zugleich sensibler Regulator zur Meidung von Umweltstress, der indirekt die Bioverfügbarkeit und Bioakkumulation toxischer Substanzen (wie z.B. Cadmium) beeinflusst.

Durch Fütterung verschiedener *E. coli*-Konzentrationen (24-stündige Exposition: 100, 200 und 335 FAU; 6-stündige Exposition: 200 und 335 FAU) konnte der Einfluss der Partikeldichte auf die interne Verfügbarkeit und Akkumulation von Cadmium deutlich gemacht werden. Auch Selck und Forbes (2004) zeigten, dass die Cadmiumaufnahme im Polychaeten *Capitella* sp. I durch die den Darm passierenden Partikelanzahl beeinflusst wird. Das Darmvolumen des Nematoden *C. elegans* ist sehr begrenzt, sodass die Anhäufung der

Partikel im Pharynx für eine effiziente Verdauung und Absorption der Futterpartikel bedeutend ist (Avery und Shtonda, 2003). Eine Exposition der Nematoden über eine Bakteriendichte von 200 FAU führte in allen Experimenten (6 und 24 h) zur höchsten *cdr-1*-Genexpression. Die höchste Partikelkonzentration (335 FAU) hingegen bewirkte stets die geringste Induktion des *cdr-1*-Gens. Die Ingestion geringer Futtermengen ermöglicht eine längere Verweildauer des Futters und eine effiziente Absorption der Nährstoffe im Darm. Weiterhin wird der Verdünnungseffekt der Verdauungsenzyme durch kleine Futtermengen herabgesetzt (Avery und Shtonda, 2003). Zusammen mit den Nährstoffen steigt somit auch die Cadmiumaufnahme bei *C. elegans* und lässt die relative *cdr-1*-Genexpression infolge der erhöhten internen Verfügbarkeit sowie verstärkten Detoxifikation ansteigen. Die 24-stündige Exposition über die geringste Bakterienkonzentration (100 FAU) ließe somit die höchste interne Cadmiumverfügbarkeit und Genexpression erwarten. Die Ergebnisse zeigten jedoch, dass es sich bei der Schadstoffaufnahme um eine enge Vernetzung der Faktoren Futterkonzentration, Fressverhalten, Verdauung und Schadstoffkonzentration handeln muss. Die *cdr-1*-Expression bei einer Partikeldichte von 100 FAU lag, ausgenommen für 75 μM Cadmium, bei allen Konzentrationen zwischen der von 200 und 335 FAU (siehe Abb. 3.4). Möglicherweise führte die geringe Futtermenge in Kombination mit der Cadmiumexposition zu einer verringerten Pumpaktivität der Nematoden. Eine Expositionskonzentration von 75 μM Cadmium zeigte eine Veränderung im Vergleich zu den geringeren Cadmiumkonzentrationen. Die Exposition über die höchste Bakterienkonzentration (335 FAU) bewirkte im Vergleich zur niedrigsten Futterdichte (100 FAU) einen Anstieg des *cdr-1*-Signals und zugleich eine starke Annäherung an die Signalstärke von 200 FAU. Dieses Verhalten bei der höchsten Expositionskonzentration könnte auf einen Wendepunkt hinweisen. Im Vergleich zu den geringeren Schadstoffkonzentrationen ist hier die Aufnahme von energieliefernden Nährstoffen für Detoxifikations- und Reparaturmechanismen von großer Bedeutung. Die Pumpaktivität wird verstärkt und eine erhöhte Schadstoffaufnahme über die Partikel akzeptiert, um somit essenzielle Nährstoffe assimilieren zu können.

Mit der internen Verfügbarkeit wurde auch die Cadmiumanreicherung in *C. elegans* von der Futterkonzentration und der Expositionsart beeinflusst. Ebenso konnte der Einfluss der Futterzusammensetzung und -menge auf die Schwermetall-Assimilation in Venusmuscheln und Austern beobachtet werden (Decho und Luoma, 1996; Chong und Wang, 2000; Ke und Wang, 2001). Um die Bedeutung der Bakterienkonzentration für *C. elegans* zu untersuchen, wurden die Würmer mit *E. coli*-Dichten von 200 und 335 FAU für 6 und 24 h mit 25 und 50 μM Cadmium inkubiert. Mit der internen Verfügbarkeit stieg auch die Akkumulation des

Cadmiums an, sodass die Exposition über eine Bakterienkonzentration von 200 FAU zu einer höheren Anreicherung im Gewebe führte als eine FAU von 335. Abweichend davon war lediglich die Gewebebelastung bei 25 μM Cadmium (6 h); hier war kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Bakterienkonzentrationen zu beobachten. Dass die Bedeutung der Expositionspfade für die Cadmiumbioakkumulation in Abhängigkeit der Expositionskonzentration differieren kann, konnte bei *Daphnia magna* gezeigt werden (Goulet et al., 2007).

Im Vergleich zur Exposition über die Nahrungspartikel war nur eine geringe Bioakkumulation über die reine Flüssigphase zu beobachten. Der Einfluss des Expositionspades auf die Bioakkumulation konnte auch beim aquatischen Insekt *Chaoborus punctipennis* gezeigt werden. Eine Cadmiumexposition über das Futter war von großer Bedeutung für die Schadstoffbelastung; die Bioakkumulation über die Wasserphase hingegen erwies sich als vernachlässigbar gering (Munger und Hare, 1997). Neben den bereits diskutierten Aspekten der verringerten Cadmium-Ingestion durch Stress (Hunger, Cadmium) und einer unterschiedlichen Bioverfügbarkeit des gelösten im Vergleich zum partikel-assoziierten Cadmium, kann die geringe Akkumulation über die Wasserphase in einer verstärkten Detoxifikation über Effluxtransporter begründet liegen. Um diesen Aspekt näher zu beleuchten, wurden die zu den ABC-Transportern gehörenden P-Glykoproteine durch Verapamil partiell gehemmt. Die Hemmung der Transportproteine zeigte bei einer Exposition über 25 μM Cadmium keinen Einfluss auf die *cdr-1*-Induktion. Da eine Hemmung von Effluxtransportern keine Veränderung in der Cadmiumverfügbarkeit erwarten lässt, lässt sich die Verringerung der *cdr-1*-Expression bei 50 μM Cadmium womöglich durch eine Anpassung der Entgiftungsprozesse (z.B. verstärkte Induktion von metallbindenden Proteinen bei abnehmender *cdr-1*-Induktion) mit steigender Expositionskonzentration erklären. Einhergehend mit dieser Erklärung wäre auch der signifikant erhöhte Anstieg der Cadmiumanreicherung bei 50 μM . Durch Hemmung der P-Glykoproteine ist eine Entgiftung über das Effluxsystem nicht mehr möglich, sodass die Cadmium-Ionen verstärkt durch metallbindende Proteine komplexiert werden. Dieses führt zu einem Anstieg der Cadmiumakkumulation. Die erhöhte Cadmiumbelastung der Nematoden nach Hemmung der Effluxtransporter (bei 25 und 50 μM Cadmium) belegt die hohe Bedeutung der Cadmium-Detoxifikation über P-Glykoproteine bei einer Aufnahme dieses Metalls über die Flüssigphase. Dass neben den P-Glykoproteinen die, ebenfalls zur ABC-Transporterfamilie gehörigen, Multidrug Resistance-Associated Proteine (MRP) für die Cadmium Detoxifikation von großer Bedeutung sind, zeigten Untersuchungen von Broeks et al. (1996). *Pgp-1*- und

mrp-1-Deletionsmutanten von *C. elegans* waren, im Vergleich zum Wildtyp, überempfindlich gegenüber einer Cadmiumexposition.

Um die Beeinflussung der Cadmium-Detoxifikation in Abhängigkeit unterschiedlicher Expositionspfade näher zu untersuchen, wurde in dieser Studie neben der *cdr-1*-Induktion die *mrp-1*-Induktion bestimmt. Die Induktion des *mrp-1*-Gens zeigte eine abnehmende Tendenz durch eine Exposition über Nahrungspartikel im Vergleich zur Flüssigphase. War in den Flüssigphasen-Experimenten bei 25 μM kein Unterschied zwischen der Expression der Gene *cdr-1* und *mrp-1* zu beobachten, stieg die des *cdr-1*-Gens bei 50 μM Cadmium an. Wie bereits zuvor diskutiert, deutet auch dieses Ergebnis auf einen Wendepunkt in der Entgiftung bei einer Cadmiumexposition von 50 μM hin. Bedeutend höher war der Unterschied der beiden Gene bei einer Exposition über *E. coli*. Während die Expression von *cdr-1* mit steigender Cadmiumkonzentration stark zunahm, zeigte die des *mrp-1*-Gens eine leichte Abnahme. Erfolgt die interne Cadmiumaufnahme über Nahrungspartikel, ist anscheinend die Entgiftung des Metalls über eine Akkumulation in den Lysosomen von größerer Relevanz als der Efflux über das ABC-Transporterprotein MRP-1 (Signifikanzunterschiede für 25 und 50 μM : $p = 0,00064$ und $p = 0,00053$). Übereinstimmend damit ließe sich auch die erhöhte Akkumulation des partikel-assoziierten Cadmiums gegenüber dem gelösten Metall erklären. Die unterschiedliche Relevanz der beiden Detoxifikationsprozesse könnte auch aus den Promotoraktivitäten der beiden Gene resultieren. Während das *mrp-1*-Gen sowohl in den Zellen des Pharynx, der pharynx-intestinalen Valva sowie in den anterioren Intestinalzellen, der rektum-intestinalen Valva und den Epithelzellen der Vulva transkribiert wird (Broeks et al., 1996), erfolgt die Transkription des *cdr-1*-Gens ausschließlich in den Intestinalzellen von *C. elegans* (Liao et al., 2002). Nach der Schadstoffaufnahme stellt der Pharynx die erste Entgiftungsmöglichkeit dar. Der Cadmiumefflux im Pharynx über das ABC-Transporterprotein MRP-1 kann somit für die Detoxifikation des in Flüssigkeit gelösten Metalls von größerer Bedeutung sein, als für die Detoxifikation des partikel-assoziierten Cadmiums.

4.2 Bedeutung der Partikelqualität für die biologische Verfügbarkeit und Bioakkumulation von Cadmium

Organismen können Metalle sorbiert oder inkorporiert durch eine Vielzahl von abiotischen oder biotischen Matrices ingestieren. Die biologische Verfügbarkeit und folglich auch die Anreicherung der Metalle kann dabei stark durch die chemische Zusammensetzung der Matrices beeinflusst werden. Für die Seepocke *Balanus trigonus* konnte ein beträchtlicher

Einfluss der Partikelqualität auf die Metall-Assimilation nachgewiesen werden (Wang und Rainbow, 2000). So war die Assimilationseffizienz der Metalle Cd, Cr und Zn durch Fütterung von Diatomeen stets höher als durch Fütterung von Dinoflagellaten oder Prasinophyceen. Wurden die Seepocken mit Copepoden gefüttert, erhöhte sich die Aufnahme von Cd und Zn deutlich im Vergleich zum Phytoplankton. Mehrere Studien zeigten, dass die Assimilation von Metallen von der Verteilung der Schadstoffe im Futterorganismus abhängt (Reinfelder und Fischer, 1991, 1994 a; Chang und Reinfelder, 2000). Die Metallassimilation in Copepoden zeigte eine lineare Beziehung zwischen der Assimilations-Effizienz und der Metallfraktion im Cytoplasma der ingestierten Diatomeen. Um die Bedeutung verschiedener Bakterienarten als Cadmiummatrix für die interne Verfügbarkeit und Anreicherung in *C. elegans* zu untersuchen, wurden die Nematoden sowohl mit dem Gram-negativen Bakterium *E. coli* als auch dem Gram-positiven Bodenbakterium *Arthrobacter globiformis* gefüttert. Cadmium exponierte *E. coli* und *A. globiformis* reichern laut Khazaeli und Mitra (1981) sowie Scott und Palmer (1990) den größten Schadstoffanteil im Cytoplasma an und nur ein geringer Anteil wird außerhalb der Zelle gebunden. Die in der vorliegenden Arbeit bestimmte Schadstoffanreicherung der beiden Bakterienspezies unterschied sich erheblich voneinander. So konnte eine ungefähr doppelt so hohe Cadmiumbelastung bei *A. globiformis* wie bei *E. coli* gleicher Zellkonzentration bestimmt werden (25 μM : $204,3 \pm 10,8$ vs. $109,3 \pm 8,1$ mg/kg TG und 50 μM : $468,7 \pm 24,8$ vs. $220,0 \pm 15,7$ mg/kg TG). Entsprechend des hohen Cadmiumgehalts führte eine Exposition über *A. globiformis* (bei 25 μM Cadmium) zu einer signifikant stärkeren Cadmiumverfügbarkeit und somit Induktion des *cdr-1*-Gens. Bei einer Cadmiumkonzentration von 50 μM hingegen konnte kein signifikanter Unterschied bei den Genexpressionen bestimmt werden. Die konzentrationsabhängige Transkription des *cdr-1*-Gens hat hier möglicherweise ihr Maximum erreicht. Weiterhin zeigt die durch die beiden Bakterienarten induzierte Genexpression, dass nicht die Metallkonzentration der Expositionspartikel, sondern vielmehr die Qualität der Partikel für die interne Cadmiumverteilung von Bedeutung ist. Die Zusammensetzung der Futterpartikel beeinflusst die Darmpassagezeit und dadurch die Aufnahme von Schadstoffen über das Darmepithel (Wang und Wong, 2003). Die unterschiedliche Cadmiumverfügbarkeit durch *E. coli* und *A. globiformis* könnte somit in der Verdauung der verschiedenartigen Zellwandstrukturen Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien begründet liegen.

Die Cadmiumgewebekonzentrationen in *C. elegans* zeigten, dass die Partikelzusammensetzung nicht nur für die biologische Verfügbarkeit, sondern auch für die Schadstoffanreicherung von großer Relevanz ist. Ließ die relativ hohe Schadstoffwirkung bei

einer Exposition über *A. globiformis* eine entsprechend hohe Cadmiumakkumulation in *C. elegans* annehmen, war diese wider Erwarten äußerst gering im Vergleich zur Akkumulation über *E. coli*. Bei einer Cadmiumkonzentration von 25 μM war die Akkumulation sogar vergleichbar mit der über die reine Flüssigphase ohne Bakterien ($p = 0,1236$). Folglich ist auch für die Cadmiumanreicherung die Partikelqualität und nicht die Metallbelastung der Partikel entscheidend. Ursache hierfür können die von den Expositionspartikeln hervorgerufenen unterschiedlichen Akkumulationsmuster in *C. elegans* sein. Rainbow (2002) unterteilt die akkumulierten Metalle der Invertebraten in zwei Gruppen – die metabolisch verfügbaren Metalle und die gespeicherten, detoxifizierten Metalle. Nach der Aufnahme eines Schwermetalls ist dieses solange metabolisch verfügbar, bis es exkretiert oder durch Bindung an bestimmte Moleküle (z.B. Metallothioneine) detoxifiziert wird. In Abbildung 4.1 ist die Akkumulation von Schwermetallen ohne und mit teilweiser Exkretion dargestellt.

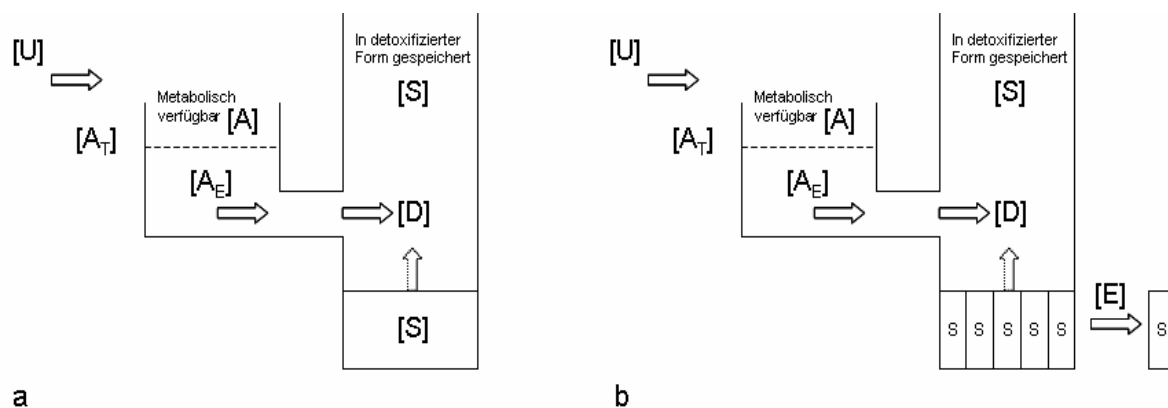


Abb. 4.1 Akkumulationsmuster eines aquatischen Invertebraten nach Aufnahme eines nicht-essenziellen Metalls. (a) zeigt eine Akkumulation ohne Exkretion und (b) mit teilweiser Exkretion des in entgifteter Form akkumulierten Metalls. $[U]$ = Aufnahme, $[A_T]$ = Schwellenwert, $[A_E]$ = Metallüberschuss, $[D]$ = Detoxifikation, $[S]$ = Speicherung, $[E]$ = Exkretion (nach Rainbow, 2002).

Entsprechend dieser Modelle lässt eine Cadmiumaufnahme über *A. globiformis* eine höhere Exkretionsrate als eine Aufnahme über *E. coli* vermuten. Das durch *E. coli* aufgenommene Cadmium wird vermutlich durch Bindung an metallbindende Proteine unschädlich gemacht und akkumuliert.

Die Ingestion von schadstoffbelasteten Partikeln stellt für die Organismen eine potenzielle Gefahr in Form eines Trojanischen Pferdes dar, dessen Effekte sich durch die Verdauungsprozesse im Darm erschließen. Die Partikel werden durch das chemische Darmmilieu aufgelöst, wodurch das zuvor gebundene Metall freigesetzt wird und Darm- oder andere somatische Gewebe schädigen kann. Das Ausmaß der Partikelaufspaltung, und im Zusammenhang damit die biologische Verfügbarkeit der partikel-assoziierten Metalle, hängt dabei von den chemischen Bedingungen im Darm des Organismus (pH-Wert, Redoxpotenzial, Enzyme), der Darmpassagezeit und nicht zuletzt von der Partikelqualität ab. Neben der Aufnahme als gelöste anorganische Ionen, können die Metalle komplexiert mit assimilierbaren organischen Liganden oder sorbiert oder inkorporiert in Partikel in einer Art Mimikry die Darmwand passieren. Zur Assimilation, z.B. essenzieller Aminosäuren, müssen die Organismen eine gewisse Metallkonzentration billigen.

Viele Metalle sind durch Einlagerung in die Kristallgitter oder Adsorption an externe funktionelle Gruppen mit den anorganischen Matrizes der Sedimente assoziiert. Stark unlösliche anorganische Formen wie Sulfide, können dabei die digestive Verfügbarkeit von Metallen herabsetzen (Chen und Mayer, 1999). Sind die Metalle mit organischen Matrizes assoziiert, die einen verdaulichen Anteil des Futters darstellen, ist anzunehmen, dass die Metalle durch eine enzymatische Hydrolyse in Lösung gebracht werden oder zumindest in der Darmflüssigkeit gegenüber Ligandensubstitution exponiert sind (Campbell et al., 2005). Liegen die Metalle erst einmal frei in Lösung vor, können die Metall-Liganden-Komplexe (M-L) ihren Liganden „L“ gegen einen konkurrierenden Liganden „X“ austauschen ($M-L + X \leftrightarrow M-X + L$). Durch den enzymatischen Aufschluss werden neben den Metallen auch niedermolekulare Verbindungen aus der Nahrung freigesetzt. Die hohe Konzentration des gelösten organischen Materials (DOM), insbesondere des proteinhaltigen Materials, mit seinen Carboxyl-, Amino- und S-enthaltenden funktionellen Gruppen, kann eine Komplexierung der Metalle begünstigen. So korreliert die Ablösung von sedimentgebundenem Zink stark mit der Aminosäurekonzentration im Darmsaft von 18 Invertebratenspezies (Mayer et al., 2001). Der Transfer der Metalle an die gelösten organischen Liganden ist somit eine Konkurrenz zwischen den Bindungsstellen der ingestierten Matrix und der DOM des Verdauungssafts, bestimmt durch die Bindungsstärken und Konzentrationen der Liganden. Es ist wahrscheinlich, dass die Absorption der Metalle im Darmepithel durch die Verteilung der Metalle auf die Liganden bestimmt wird (Campbell et al., 2005). Der Verdauungssaft stellt somit ein sehr reaktives Medium, mit völlig anderen Bedingungen, für die partikel-assoziierten Metalle als außerhalb des Organismus, dar.

Die Bedeutung der Trojanischen-Pferd-Metapher für *C. elegans* wurde anhand von Expositionsversuche mit Lipopolysacchariden (LPS) in gelöster und partikel-gebundener Form untersucht. Als Bestandteil der äußeren Membran (~ 30 %) Gram-negativer Bakterien (wie *E. coli*) können LPS sowohl der Cadmium-Oberflächenbindung dienen als auch einen potenziellen Nährstoff für *C. elegans* darstellen. Als nährstoffreiche Bestandteile können das Lipid A (ein Phosphoglycolipid), verschiedene Polysaccharide und Phosphat dienen. In Flüssigkeit gelöste LPS bilden Mizellen aus, die durch Sorption oder Inkorporation das Cadmium komplexieren können.

Der Einfluss der gelösten LPS auf die biologische Cadmiumverfügbarkeit war im Vergleich zur Exposition über Bakterien als Trägersubstanz unbedeutend. Die Genexpression bei 25 μM entsprach der der Flüssigphase ohne LPS (6 h). Auffallend ist, dass diese beiden Expositionspfade ähnliche Expressionsmuster zeigen. Eine Inkubation in 50 μM Cadmium führte zu einem starken Anstieg der Geninduktion, wobei dieser durch die gelösten LPS signifikant höher war als in der Wasserphase ohne LPS ($p = 0,018$). Dieser Anstieg der *cdr-1*-Expression bei 50 μM Cadmium könnte, wie bereits zuvor diskutiert, auf einen Wendepunkt in der Cadmiumdetoxifikation hinweisen. Die energieaufwendigen Reparatur- und Detoxifikationsmechanismen erfordern eine höhere Nährstoffaufnahme, die eine zunehmende Schadstoffaufnahme mit einschließt. Die im Vergleich zu den gebundenen LPS signifikant stärkere Cadmiumverfügbarkeit (bei 50 μM) spricht für eine leichtere Desorption des Cadmiums von den Mizellen gegenüber den Partikeln.

In der äußeren Membran von *E. coli* stellen die Phosphatgruppen der LPS sowie die Phospholipide die bedeutendsten reaktiven Bindestellen für metallische Kationen dar (Strain, 1983; Ferris, 1989; Keung et al., 2008). Partikel-gebundene LPS ließen die Geninduktion nur geringfügig ansteigen. Dieses Ergebnis lässt auf eine geringe Relevanz der Metall-Oberflächenbindung durch *E. coli* für die interne Cadmiumverfügbarkeit in *C. elegans* schließen. Es ist zu vermuten, dass *C. elegans*, ähnlich den Copepoden (Reinfelder und Fischer, 1991), primär das im Cytoplasma der Bakterien akkumulierte Cadmium assimiliert. Die Cadmiumakkumulation durch das nährstoffreiche Transportermolekül LPS ist in gelöster als auch gebundener Form wesentlich geringer als durch *E. coli*. Obwohl die gebundenen LPS gegenüber der löslichen Form zu einer geringeren bzw. ähnlichen Geninduktion führten, führten sie zu einer stärkeren Cadmiumbelastung in *C. elegans*. Die beiden Expositionswege weisen somit unterschiedliche Akkumulationsmuster auf. Möglicherweise wird das in gebundener Form aufgenommene Cadmium weniger exkretiert und somit stärker in detoxifizierter Form gespeichert als der im Medium suspendierte Schadstoff.

Die heterogene Zusammensetzung von Sedimentpartikeln stellt eine große Herausforderung hinsichtlich der Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit sediment-gebundener Schadstoffe dar. Im Wesentlichen bestehen die Partikel aus einer anorganischen oder biologischen Matrix, umgeben von verschiedensten anorganischen oder organischen Komponenten, die der Bindung oder Sorption von Schadstoffen dienen. Aufgrund dieser Interaktionen kann die Bioverfügbarkeit und folglich auch Bioakkumulation von Schadstoffen stark beeinflusst werden.

Um den Einfluss funktioneller Gruppen auf die Cadmiumverfügbarkeit und -anreicherung in *C. elegans* näher zu betrachten, wurden Kunstpartikel mit unterschiedlichen funktionellen Oberflächengruppen als Sedimentanaloga eingesetzt. Untersuchungen von Boyd et al. (2003) und eigene Experimente (Daten nicht aufgeführt) konnten zeigen, dass künstliche Mikropartikel, mit einem Durchmesser von 3,4 µm oder kleiner, von *C. elegans* ingestiert werden und somit die Verwendung als Expositionspartikel als geeignet erwogen werden kann. Obwohl der Einsatz von künstlichen Partikeln die hohe Komplexität natürlicher Sedimente nur stark vereinfacht widerspiegelt, bieten sie die Möglichkeit, grundlegende Mechanismen der Schadstoffaufnahme zu untersuchen. Der Einsatz von Kunstpartikeln mit wohldefinierten Oberflächen als analoge Schadstoffträger von Sedimentpartikeln wurde in der Literatur schon mehrfache als geeignet beschrieben (Davies et al., 1999; Simkiss et al., 2001; Miño et al., 2006; Piol et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung von Carboxyl-, Amino- und Sulfatgruppen tragenden abiotischen Kunstpartikeln untersucht. Die Oberflächen natürlicher Sedimentpartikel sind mit organischen Komponenten beschichtet, die sich vor allem aus den von Mikroorganismen ausgeschiedenen extrazellulären polymeren Stoffen, Zellwänden und Pflanzenprodukten zusammensetzen. Ein großer Anteil des organischen Gehalts besteht dabei aus Huminstoffen, die u. a. Carboxyl- und Aminogruppen als wichtige funktionelle Gruppen tragen. Mit Huminstoffen oder anderen organischen Substanzen beschichtete Kunstpartikel stellen somit die wohl umweltrelevanteste Sedimentanalogie dar. Der Einfluss LPS-beschichteter Partikel als Cadmiumträger, stellvertretend für den organischen Anteil im Sediment, wurde bereits diskutiert.

Die drei unbeschichteten Kunstpartikelarten (COOH, NH₂ und SO₄) führten bei *C. elegans* nur zu einer geringen *cdr-1*-Expression. Die höchste Geninduktion wurde dabei bei einer Cadmiumexposition über COOH-Partikel beobachtet. Da die Grundstruktur dieser drei Partikelarten identisch ist, beruhen die Effekte auf den funktionellen Gruppen und durch sie erzeugte Cadmiumbindungen. Die Höhe der Cadmiumsorption unterschied sich erheblich zwischen den Partikelarten. Wurde nur relativ wenig Cadmium durch die SO₄- und NH₂-

Partikel gebunden (Tab. 3.2), entsprach die Cadmiumbelastung der COOH-Partikel mit $94,0 \pm 4,0$ und $215,0 \pm 30,3$ mg/kg Cd der der entsprechenden *E. coli*-Anzahl (335 FAU, $105,0 \pm 3,0$ und $198,3 \pm 6,4$ mg/kg Cd). Die biologische Verfügbarkeit des an abiotische Partikel assoziierten Cadmiums ist folglich weitaus geringer als die über biotische Nahrungspartikel. Unterschiedlich starke Bindungsstärken zwischen dem Metall und den abiotischen bzw. biotischen Partikeln können die Freisetzung des Cadmiums im Verdauungstrakt beeinflussen und somit zu einer unterschiedlich hohen Cadmiumaufnahme über die Epithelzellen führen. Weiterhin kann der Aufnahmeweg im Darm zwischen den unverdaulichen, abiotischen Kunstpartikeln und den nährstoffliefernden Bakterien differieren; so bieten letztere die Möglichkeit den Schadstoff gebunden an essenzielle Nährstoffe in das Darmgewebe einzuschleusen. Untersuchungen von Reinfelder und Fischer (1994 b) zeigten, dass Metalle gebunden an das chitinöse Exoskelett von Copepoden nahezu gar nicht vom Atlantik-Ährenfisch assimiliert wurden. Die in den Weichteilen der Copepoden akkumulierten Metalle hingegen konnten zu 80 % assimiliert werden. Extrapoliert man diese Ergebnisse auf die Interaktionen anderer Nahrungsketten, ist anzunehmen, dass Metalle, die an die lösliche, organische Fraktion im Futter gebunden sind im Gegensatz zu denen, die gebunden an die mineralische Fraktion bzw. relativ unverdaulichen, inerten Komponenten, assimilierbar sind (Campbell et al., 2005). Die geringe *cdr-1*-Expression über die LPS-beschichteten, ebenfalls nährstoffliefernden Partikel, lässt sich demnach womöglich durch die hohe Bindungsstärke der kovalenten Bindung zwischen COOH-Partikeln und LPS erklären.

Die Bedeutung des organischen Anteils in Sedimenten für *C. elegans* wird dennoch durch ein Gemisch (Verhältnis 1:1) der jeweiligen Kunstpartikel und *E. coli* deutlich. Wurden die Nematoden über ein Partikelgemisch exponiert, gleicher Partikelkonzentration wie die vorangegangenen Experimente, stieg die Induktion des *cdr-1*-Gens signifikant an. Ähnliches beobachteten Wang und Wong (2003) bei der Grünen Miesmuschel *Perna viridis*; ein zunehmender Sedimentanteil im Partikelgemisch aus Sediment und Diatomeen, ließ die Assimilationseffizienz von Cadmium abnehmen.

Interessanterweise ist der Einfluss der verschiedenen Partikelexpositionen auf die Bioakkumulation genau umgekehrt. Eine Exposition über die Kunstpartikel ohne Bakterien führte stets zu einer höheren Cadmiumanreicherung in *C. elegans* als das entsprechende Partikelgemisch. Bei Fütterung der COOH-Partikel (ohne Bakterien) war die Cadmiumbelastung der Würmer am höchsten. Wurden den Kunstpartikeln jedoch Nahrungspartikel hinzugefügt, war das Gemisch mit SO_4 -Partikeln von größerer Bedeutung für die Akkumulation des Metalls ($\text{SO}_4 > \text{COOH} > \text{NH}_2$). Eine Cadmiumexposition über die

womöglich umweltrelevanteste Gegebenheit, einem Gemisch aus abiotischen Partikeln und Nahrungspartikeln, führt demnach, im Vergleich zur Gabe von ausschließlich Kunstpartikeln oder Bakterien, zur geringsten Bioakkumulation und bietet *C. elegans* offensichtlich die besten Bedingungen zur Entgiftung des Schadstoffs.

4.3 Bedeutung des Partikelschadstoffgehalts für die biologische Verfügbarkeit und Bioakkumulation

Die bisher diskutierten Ergebnisse haben gezeigt, dass für die einzelnen Expositionen sowohl die interne Verfügbarkeit als auch die Akkumulation des Cadmiums in *C. elegans* mit zunehmender Inkubationskonzentration und -zeit ansteigt. Durch Untersuchung verschiedener Expositionspfade wurde deutlich, dass die Regulation der internen Cadmiumverteilung und der Schadstoffanreicherung unabhängig voneinander erfolgt und beide Parameter für sich durch den Expositionspfad beeinflusst werden. Zwar beschreibt eine Korrelationsanalyse zwischen diesen beiden Parametern mit $r = 0,844$ einen linearen Zusammenhang, eine genaue Betrachtung der Werte (Tab. 3.1) macht aber deutlich, dass die Höhe der Genexpression nichts über die Höhe der Akkumulation (und umgekehrt) aussagt. Die Induktion des Biomarkers *cdr-1* ist folglich nicht zur Vorhersage der Cadmiumbioakkumulation geeignet, wenn *C. elegans* dem Metall gleichzeitig über variierende Bedingungen (Partikelqualität, Partikelkonzentration), wie es in natürlichen Sedimenten der Fall ist, exponiert wird. Anders verhält es sich bei den einzelnen Expositionswegen. Hier lässt sich im Allgemeinen eine lineare Beziehung zwischen der Genexpression und der Metallanreicherung erkennen. Da die Induktion des lysosomalen Membranproteins CDR-1 selbst einen Teil der verschiedenen Detoxifikationsmöglichkeiten für Cadmium in *C. elegans* darstellt, ist ein direkter Zusammenhang zwischen der *cdr-1*-Expression und der Entgiftung über Speicherung nicht unbedingt zu erwarten. Die Untersuchungen konnten deutlich machen, dass die Transkription des *cdr-1*-Gens durch Cadmiumexposition stets induziert wird, die Höhe der Genexpression aber primär durch die Expositionsart, und weniger durch die Cadmiumkonzentration des umgebenden Mediums, beeinflusst wird. Vor diesem Hintergrund müssen die Bewertungen konzentrationsabhängiger Veränderungen in der Genexpression, wie z.B. die Bestimmung des EC₅₀-Wertes von 2 µM Cadmium für die *cdr-1*-Expression in *C. elegans* (Liao et al., 2002), unter Berücksichtigung der Expositionsbedingungen erfolgen.

Verdauung, Aufnahme über die Epithelzellen, *cdr-1*-Expression und weitere Detoxifikationsmechanismen und folglich die Akkumulation werden wesentlich durch die Art der Partikel bestimmt. Erwies sich das Verhältnis zwischen der Cadmiumakkumulation und

dem Schadstoffgehalt der Partikel bei Betrachtung der gesamten Expositionspfade als proportional, so wird dennoch am Beispiel von *A. globiformis* und den COOH-Partikeln deutlich, dass nicht der Cadmiumgehalt der Partikel, sondern die Trägersubstanz selbst für den Entgiftungsweg und die Akkumulation verantwortlich ist. Ebenso wird die Bedeutung der Partikelqualität bei Betrachtung der BAF und der K_p -Werte deutlich. So blieb bei allen Partikeln das Verhältnis der Cadmiumanreicherung zur Expositionskonzentration für beide Cadmiumkonzentrationen (25 und 50 μM) nahezu gleich und resultierte in nahezu gleichen BAF-Werten bei 25 und 50 μM Cd in *C. elegans*. Für den einzelnen Expositionspfad lässt sich demzufolge ein Zusammenhang zwischen dem Schadstoffgehalt des Partikels und der Schadstoffanreicherung im Nematoden erkennen. Dieses trifft jedoch nicht für die unterschiedlichen Aufnahmewege zu. Die im Vergleich zu *E. coli* wesentlich höheren BAF-Werte von *A. globiformis* führten zu einem wesentlich geringeren BAF-Wert in *C. elegans*. Folglich ist die Cadmiumakkumulation in *C. elegans* abhängig vom Expositionspartikel und macht die eingeschränkte Nutzung des BAF zur Abschätzung des von Schadstoffen ausgehenden Umweltrisikos deutlich.

4.4 Energiestatus und chronische Cadmiumtoxizität

4.4.1 Der Energiestatus als Regulator der Cadmiumaufnahme und Bioakkumulation?

Das vom Organismus absorbierte Metall wird in Abhängigkeit vom Expositionsweg in unterschiedliche Gewebe transportiert und verschiedenartig subzellulär verteilt (Clearwater et al., 2000; Cheung et al., 2006). Die absorbierten Metalle können mit metallbindenden Proteinen oder anderen Liganden Komplexe bilden, in Vesikel (Granulae) gespeichert werden oder als Metallion vorliegen. Erreicht die Metallkonzentration an einem Zielort einen bestimmten Schwellenwert, kann es zu zellulären Schädigungen und biochemischen Veränderungen im Organismus kommen, die sich auf Wachstum, Reproduktion und Mortalität auswirken können (Hook und Fisher, 2001). Die durch die Aufnahme von Metallen induzierten molekularen und zellulären Reparaturmechanismen (z.B. zunehmende Enzymproduktion und gesteigerter Zellumsatz) sowie die Induktion von Schutzmechanismen (z.B. Vesikel-Produktion) erfordern Energie und erhöhen somit die Erhaltungskosten für die Lebensfunktionen. Der erhöhte Energieaufwand, verbunden mit etwaiger Veränderung des Fressverhaltens, führt dazu, dass dem Organismus weniger Energie für die Grundversorgung und Bewegung zur Verfügung steht. Um zu untersuchen, ob sich ein Zusammenhang

zwischen dem Energiehaushalt von *C. elegans* und der Cadmiumverfügbarkeit und/oder Cadmiumanreicherung in Abhängigkeit des Expositionsweges erkennen lässt, wurde die Energieladung der Nematoden bestimmt. Es wurde angenommen, dass ein energetisch schlechter Zustand der Nematoden zu einer erhöhten Cadmiumaufnahme über die energieliefernden Bakterien führt.

Die Energieladung (Energy Charge) beschreibt das Maß der Adeninnucleotide, die dem Organismus als hochenergetische Phosphatverbindungen zur Verfügung stehen. Apfeld et al. (2004) konnten zeigen, dass sich das AMP:ATP-Verhältnis in *C. elegans* durch Umweltstress verändert. Die Messungen der drei Adeninnucleotide in den eigenen Experimenten ergaben keine signifikanten Unterschiede, sodass nur eine eingeschränkte Diskussion möglich ist. Werden die Werte für die Energieladung durch den Energiestoffwechsel zwischen 0,75 und 0,95 (Maximalwert 1,0) gehalten, bewegten sie sich in den eigenen Versuchen zwischen 0,10 und 0,13 für die Kontrollansätze. Grund für die niedrige Energieladung waren niedrige Messwerte des ATPs. Vorversuche ergaben taugliche Messwerte für alle drei Adeninnucleotide AMP, ADP und ATP. Ob ein Fehler bei der Probenaufbereitung und/oder Probenmessung liegt, konnte nicht geklärt werden und muss an dieser Stelle offen bleiben. Weiterhin ist der Variationskoeffizient von 6 % für die Bestimmung des ATPs mittels HPLC wesentlich höher als für die anderen Adeninnucleotide (0,7 % AMP, 2,7 % ADP).

Betrachtet man dennoch die Tendenz der Werte, so lässt sich, wie bei Apfeld et al. (2004), unter Stress ein Anstieg der AMP:ATP-Verhältnisse erkennen. Diese Tendenz zeigte sich insbesondere bei den 24-stündigen Cadmiumexpositionen (Flüssigphase, 335 FAU). Die Energieladungen der Nematoden unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Kontrollansätzen (ohne Cadmium) und einer Cadmiumbehandlung der jeweiligen Expositionswege. Lediglich die 6-stündige Exposition über *E. coli* 200 FAU zeigte einen signifikant erhöhten Energiestatus zwischen den unbehandelten Proben und nach Inkubation in 25 μM Cadmium. Interessanterweise sind für diesen Expositionsweg die Energieladungen der Kontrollen und nach Cadmiuminkubation (50 μM), im Vergleich zur Exposition über die reine Flüssigphase und *E. coli* 335 FAU, signifikant erhöht. Diese Gegebenheit des höheren Energiestatus nach einer *E. coli*-Exposition mit einer FAU von 200, könnte für die bereits anfangs diskutierte erhöhte Nährstoffassimilation bei geringerer Nahrungspartikelkonzentration sprechen. Der Membrantransport vieler Substanzen hängt von einer ATP-Quelle ab. Wider Erwarten der konzentrationsabhängigen Anstiege für die *cdr-1*-Genexpression und Cadmiumakkumulation war der energetische Zustand der Nematoden nach Inkubation in 50 μM Cadmium höher als in 25 μM .

4.4.2 Chronische Toxizität: Bedeutung einer direkten Cadmiumexposition und einer bestehenden Cadmiumbelastung

Die Beurteilung des energetischen Zustandes eines Organismus bietet ein Frühwarnsystem für akute Ereignisse, denn die Reaktionen erfolgen unmittelbar und/oder sind sehr sensibel gegenüber geringen Schadstoffkonzentrationen (Moolman et al., 2007). Veränderungen der Hauptkomponenten des Energiehaushaltes von Organismen können als toxikologische Größe genutzt werden, denn für Wachstum, Reproduktion und Fitness der Organismen ist eine positive Netto-Energiebilanz erforderlich (Smolders et al., 2004). Der Einfluss von Umweltstress auf den Energiehaushalt und dessen Bedeutung auf den Organismus wird durch verschiedene Theorien (SFG, CEA, siehe Einleitung) beschrieben. So bewerteten Álvarez et al. (2005) die Abnahme der Reproduktion bei *C. elegans* bei Cadmiumkonzentrationen von 32,7 bis 65,5 μM als eine Limitation der zur Verfügung stehenden Ressourcen für die Eiproduktion.

Eigene Untersuchungen zur Wirkung der chronischen Cadmiumtoxizität (in 5, 25, 50 und 75 μM Cadmium) auf *C. elegans* zeigten die stärksten Hemmungen für den Parameter Wachstum. Neben der Reproduktion wurden auch das Wachstum und die Fertilität der Nematoden durch Cadmiumstress gehemmt; die Toxizitätsschwellenwerte wurden jedoch bei keinem der Parameter erreicht. Die gegenüber der Kontrolle erhöhte Reproduktion bei der geringsten Cadmiumkonzentration (5 μM) kann als ein hormetischer Effekt beschrieben werden. Hormesis ist eine adaptive Antwort des Organismus gegenüber niedrigen Konzentrationen toxischer Substanzen, die das homöostatische Gleichgewicht beeinflussen und somit eine positive Wirkung hervorrufen (Calabrese, 2008). *C. elegans* zeichnet sich durch eine hohe Toleranz bzw. Resistenz gegenüber Cadmium aus (z.B. Roh et al., 2006). Die hohe Toleranz im Vergleich zu anderen Metallen (wie z.B. Pb, As, Cr) kann laut Roh et al. (2006) für besonders effiziente Schutzmechanismen gegenüber cadmiuminduzierte Schädigungen, wie die Induktion des cadmiumspezifischen *cdr-1*-Gens, sprechen. Insbesondere für eine Cadmiumexposition konnten die Autoren eine Expressionszunahme stressinduzierter Gene beobachten, begleitend mit Beeinträchtigungen auf physiologischer Ebene, wie Wachstum und Reproduktion (hier Anzahl der Eier pro Wurm). Eine Hemmung der *cdr-1*-Expression führt bei cadmiumexponierten Nematoden zu einer Hemmung der Reproduktion, der Entwicklung und einer kürzeren Lebensdauer (Liao et al., 2002). Eine Gegenüberstellung der *cdr-1*-Expression (200 FAU, 24 h) und der chronischen Toxizitätsparameter ergab auch bei den eigenen Untersuchungen mit $r = 0,948$ bzw. $r = 0,997$ eine signifikante Korrelation zwischen der Genexpression und dem Wachstum bzw. der

Anzahl der Eier der Nematoden. Zwischen Reproduktion bzw. Fertilität und der *cdr-1*-Genexpression der Würmer konnte hingegen mit Korrelationskoeffizienten von $r = 0,705$ bzw. $r = 0,309$ keine signifikante Korrelation bestimmt werden. Die Zusammenhänge zwischen bereits validierten Toxizitätsendpunkten (wie z.B. Wachstum und Reproduktion) und metallinduzierten Biomarkern zu erklären, stellt eine große Herausforderung aber auch wichtige Grundlage für die Risikobewertung dar.

Inwiefern eine Bedeutung einer bestehenden Cadmiumbelastung im Gewebe der Nematoden für chronische Toxizität besteht, wurde anhand eines modifizierten Nematodentests untersucht. Hierfür wurden die Würmer zuvor in Kontrollemedium sowie 25 und 50 μM Cadmium für 6 h inkubiert und anschließend der Nematodentest ohne Schadstoffbehandlung und unter Zugabe von *E. coli* (FAU 200) durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass die Würmer fähig sind, sich von einer Cadmiumbelastung von $26,97 \pm 6,93$ und $70,00 \pm 9,48$ mg/kg TG (durch eine Inkubation in 25 und 50 μM Cadmium) zu erholen. So wurden die Fertilität und Reproduktion der Nematoden kaum oder gar nicht gehemmt. Das Wachstum der cadmiumbelasteten Würmer war im Vergleich zu den Kontrollwürmern sogar leicht erhöht. Es waren somit keine signifikanten Effekte einer bestehenden Cadmiumakkumulation auf chronische Parameter zu beobachten. Das in entgifteter Form akkumulierte Metall ist nicht mehr für die Nematoden verfügbar. Folglich sind keine Langzeiteffekte für die Nematodenpopulation zu erwarten.

Ein Zusammenhang zwischen Langzeiteffekten und akuten Effekten (*cdr-1*-Genexpression) konnte daher für eine bestehende interne Belastung nicht beschrieben werden. Ein effizientes Detoxifikationssystem für Metalle und die Versorgung mit energieliefernden Nahrungspartikeln tragen womöglich zur Regeneration der Nematoden von der Cadmiumbelastung bei.

5. Schlussfolgerungen

Organismen aquatischer Ökosysteme werden gegenüber Schadstoffen sowohl über die Wasserphase als auch gebunden an Partikel (über Ingestion und Körperoberfläche) exponiert. Meistens erfolgt die Exposition gleichzeitig über die in Wasser gelösten Metalle und Metalle, die mit verschiedensten Futterquellen und abiotischen Partikeln assoziiert sind. Bisher wurde in den meisten Expositionsstudien die von der Wasserphase oder von Futterpartikeln ausgehende Toxizität separat untersucht. Um die Bedeutung partikel-gebundener Metalle für aquatische Organismen besser verstehen und bewerten zu können, empfehlen sich Untersuchungen mit einer simultanen, und damit umweltrelevanteren, Exposition über die Wasser- und partikuläre Phase.

Zur Abschätzung der von partikel-assoziierten Metallen ausgehenden toxischen Effekte werden in der Literatur eine Vielzahl von Endpunkten beschrieben, wie z.B. Reproduktion, Respiration, Enzymaktivitäten, Veränderungen der Geninduktion. So konnte bei Fischen bei einer Metallexposition über das Futter eine erhöhte Induktion von Metallothioneinen im Darm im Vergleich zur Induktion in den Kiemen nachgewiesen werden (Handy et al., 1999). Die Bestimmung der veränderten Geninduktion dieser Proteine wird häufig als Belastungsindikator (Biomarker) für eine Metallexposition herangezogen. Mit berücksichtigt werden muss bei der Verwendung von Metallothioneinen als Biomarker, dass sie, neben der Metallexposition, auch durch andere Faktoren induziert werden können. Eigene Untersuchungen zur veränderten Genexpression ließen eine Eignung des, ausschließlich durch Cadmium induzierbaren, *cdm-1*-Gens als Biomarker für Expositionsexperimente erkennen. Durch Bestimmung der veränderten Genexpression und der Cadmiumanreicherung infolge unterschiedlicher Expositionsbedingungen konnte die Bedeutung partikel-gebundenen Cadmiums deutlich gemacht werden. Die Aufnahme von Cadmium über Partikel führte zu einer wesentlich höheren biologischen Verfügbarkeit des Schadstoffs im Vergleich zur Exposition über die Flüssigphase. Dabei erwiesen sich die Partikelqualität und die Partikeldichte als entscheidende Einflussgrößen für die interne Cadmiumverfügbarkeit und die Anreicherung im Gewebe der Nematoden. Hingegen war die Bedeutung der Schadstoffkonzentration der Partikel gering. Deutlich wurde, dass sowohl die Bioverfügbarkeit als auch die Bioakkumulation im unterschiedlichen Maße und vor allem unabhängig voneinander durch die verschiedenen Expositionsbedingungen beeinflusst wurden. Die Ergebnisse machen das komplexe Zusammenwirken von physiologischen Prozessen und Verhaltensänderungen beim Organismus sowie der chemischen Speziation des Schadstoffs bei einer Exposition über Partikel deutlich.

Der schädliche Einfluss partikel-gebundener Metalle konnte auch in vielen anderen Studien nachgewiesen werden (Clearwater et al, 2002; Rodgher et al., 2008; Croteau und Luoma, 2008). Dennoch divergieren die Ergebnisse über die relative Bedeutung der Expositionspfade Medium oder (Nahrungs-)Partikel und deren Auswirkungen auf den Organismus. Erklären lassen sich diese Unstimmigkeiten dadurch, dass die Mechanismen, denen die Effekte zugrunde liegen, weitgehend unbekannt sind. Das derzeitige Wissen über die durch Metalle hervorgerufenen Folgen im Verdauungstrakt sowie über die Aufnahme- und Verteilungsprozesse und Toxizität deutet auf vielfältige Möglichkeiten für partikel-gebundene Metalle hin, die Physiologie der Organismen zu beeinträchtigen. Die mit Futterpartikeln ingestierten Metalle stellen eine potenzielle Gefahr in Form eines Trojanischen Pferdes dar; die Effekte des Schadstoffs entfalten sich erst im Darm des Konsumenten. Die Freisetzung des Metalls im chemischen Verdauungsmilieu ermöglicht dem Schadstoff das umliegende Gewebe zu schädigen. Das Ausmaß der Freisetzung variiert in Abhängigkeit der ingestierten Partikel, der Darmpassagezeit und den chemischen Bedingungen im Darm (z.B. pH-Wert, Enzymgehalt). Um gültige Verallgemeinerungen über die relative Bedeutung dieser Vorgänge treffen zu können, bedarf es mehr Forschungsarbeit in diesem Bereich.

Eine bedeutende Einflussgröße für die Toxizität von partikel-gebunden Metallen stellt die Speziation der Metalle dar. Diese wird sowohl durch die Sorption und Akkumulation an die in der Umwelt vorliegenden Liganden als auch durch die in der Darmflüssigkeit des Konsumenten vorliegenden organischen und anorganischen Liganden bestimmt. Verschiedene chemische Formen der Metalle können in verschiedenen Kompartimenten der Organismen gespeichert und/oder durch unterschiedliche Entgiftungsprozesse unschädlich gemacht werden. Weiterhin kann der Wirkort der Metalle in Abhängigkeit von der Exposition über die Wasserphase oder über Partikel variieren. Einige Studien weisen darauf hin, dass auch die Kompartimentierung des Metalls im Futter dazu beiträgt, wie viel des mit der Nahrung assoziierten Metalls für den Konsumenten biologisch verfügbar und toxisch wirksam ist. Sind die Futterorganismen Metallen exponiert, kann es zudem zu einer Abnahme ihres Nährwertes führen und somit den Energieertrag des Konsumenten beeinträchtigen.

In den derzeit bestehenden regulatorischen Richtlinien für metallexponierte aquatische Organismen ist die Exposition über partikel-assoziierte Metalle nicht explizit erfasst. Untersuchungen von Luoma und Fisher (1997) und Wilding und Maltby (2006) sowie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen deutlich, dass die von einer simultanen Exposition über Medium und Partikel ausgehenden Effekte nicht durch einfache Flüssigphasen-Experimente vorhergesagt werden können. Organismen, die gleichzeitig über die Wasserphase und über

Partikel dem Schadstoff ausgesetzt sind, sind folglich nicht ausreichend vor den schadstoffbedingten Beeinträchtigungen geschützt. Laut Borgmann et al. (2005) ist der derzeitige Wissenstand noch nicht weit genug fortgeschritten, um die von partikel-assoziierten Metallen ausgehende Toxizität ausdrücklich in bestehende Rahmenrichtlinien zu inkorporieren. Durch Testung 16 verschiedener Expositionsbedingungen konnte mit der vorliegenden Arbeit die hohe Komplexität der grundlegenden Mechanismen der internen Verfügbarkeit und Akkumulation deutlich gemacht werden. Herausgestellt werden konnte dabei der Einfluss des an Partikel assoziierten Metalls im Vergleich zur Wasserphase sowie der Einfluss der Partikelqualität und der Partikeldichte auf den Nematoden *C. elegans* und macht die Notwendigkeit einer Berücksichtigung partikel-gebundener Metalle in bestehende Richtlinien deutlich.

6. Literaturverzeichnis

- Ahlf W. 1995. Biotests an Sedimenten. In: Steinberg, Bernhardt, Klapper, Eds.. Handbuch Angewandte Limnologie. Ecomed Verlagsgesellschaft, Landsberg.
- Álvarez OA, Jager T, Kooijman SALM, Kammenga JE. 2005. Responses to stress of *Caenorhabditis elegans* populations with different reproductive strategies. *Funct Ecol* 19:656-664.
- Ankley GT, Thomas NA, Di Toro DM, Hansen DJ, Mahony JD, Berry WJ, Swartz RC, Hoke RA, Garrison AW, Allen HE, Zabra CS. 1994. Assessing potential bioavailability of metals in sediments – a proposed approach. *Environ Manag* 18:331-337.
- Apfeld J, O'Connor G, McDonagh T, DiStefano PS, Curtis R. 2004. The AMP-activated protein kinase AAK-2 links energy levels and insulin-like signals to lifespan in *C. elegans*. *Genes Dev* 18:3004-3009.
- Atkinson DE. 1977. Cellular energy metabolism and its regulation. Academic Press, New York.
- Avery L, Horvitz HR. 1990. Effects of starvation and neuroactive drugs on feeding in *Caenorhabditis elegans*. *J Exp Zool* 253:263-270.
- Avery L, Shtonda BB. 2003. Food transport in the *C. elegans* pharynx. *J Exp Biol* 206:2441-2457.
- Avery L, Thomas JH. 1997. Feeding and defecation. In Riddle D, Eds., *The Nematode C. elegans II*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, pp 679-716.
- Batley GE, Apte SC, Stauber JL. 2004. Speciation and bioavailability of trace metals in water, Progress since 1982. *Austral J Chem* 57:903-919.
- Beyersmann D, Block C, Malviya AN. 1994. Effects of cadmium on nuclear protein kinase C. *Environ. Health Perspect* 102(3):177-180.
- Beyersmann D, Hechtenberg S. 1997. Cadmium, gene regulation, and cellular signalling in mammalian cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 144, 247-261.
- Binet MRB, Ma R, McLeod CW, Poole RK. 2003. Detection and characterization of zinc- and cadmium-binding proteins in *Escherichia coli* by gel electrophoresis and laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Anal Biochem* 318:30-38.

- Borgmann U, Janssen CR, Blust RJP, Brix KV, Dwyer RL, Erickson RJ, Hare L, Luoma SN, Paquin PR, Roberts CA, Wang W-X. 2005. Incorporation of dietborne metals exposure into regulatory frameworks. In: Meyer JS, Adams WJ, Brix KV, Luoma SN, Mount DR, Stubblefield WA Wood CM, Eds., *Toxicity of dietborne metals to aquatic organisms*. Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) Press, Pensacola, FL, USA, pp. 153-189.
- Boyd WA, Cole RD, Anderson GL, Williams PL. 2003. The effect of metals and food availability on the behavior of *Caenorhabditis elegans*. *Environ Toxicol Chem* 22 (12):3049-3055.
- Brenner S. 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77:71-94.
- Broeks A, Gerrard B, Allikmets R, Dean M, Plasterk RHA. 1996. Homologues of the human multidrug resistance genes MRP and MDR contribute to heavy metal resistance in the soil nematode *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J* 15:6132-6143.
- Calabrese EJ. 2008. Hormesis: why it is important to toxicology and toxicologists. *Environ Toxicol Chem* 27(7):1451-74.
- Calow P. 1998. Ecological risk assessment: risk for what? How do we decide? *Ecotoxicol Environ Saf* 40:15-18.
- Campbell PGC, Clearwater SJ, Brown PB, Fisher NS, Hogstrand C, Lopez GR, Mayer LM, Meyer JS. 2005. Digestive physiology, chemistry, and nutrition. In: Meyer JS, Adams WJ, Brix KV, Luoma SN, Mount DR, Stubblefield WA Wood CM, Eds., *Toxicity of dietborne metals to aquatic organisms*. Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) Press, Pensacola, FL, USA, pp. 13-57.
- Chang SI, Reinfelder JR. 2000. Bioaccumulation, subcellular distribution, and trophic transfer of copper in a coastal marine diatom. *Environ. Sci. Technol* 34 (23):4931-4935.
- Cheung M-S, Fok EMW, Ng TY-T, Yen Y-F, Wang W-X. 2006. Subcellular cadmium distribution, accumulation, and toxicity in a predatory gastropod, *Thais clavigera*, fed different prey. *Environ Toxicol Chem* 25(1):174-181.
- Chen Z, Mayer LM. 1999. Assessment of sedimentary Cu availability: A comparison of biomimetic and AVS approaches. *Environ Sci Technol* 33(4):650-652.
- Chong K, Wang W-X. 2000. Assimilation of Cd, Cr and Zn by the green mussel *Perna viridis* and the clam *Ruditapes philippinarum*. *Environ Toxicol Chem* 19:1660-1667.
- Clearwater SJ, Baskin SJ, Wood CM, McDonald DG. 2000. Gastrointestinal uptake and distribution of copper in rainbow trout. *J Exp Biol* 203(16):2455-66.

- Clearwater SJ, Farag AM, Meyer JS. 2002. Bioavailability and toxicity of dietborne copper and zinc to fish. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 132:269-313.
- Croteau MN, Luoma SN. 2008. A biodynamic understanding of dietborne metal uptake by a freshwater invertebrate. *Environ Sci Technol* 42:1801-1806.
- Cui Y, McBride SJ, Boyd WA, Alper S, Freedman JH. 2007. Toxicogenomic analysis of *Caenorhabditis elegans* reveals novel genes and pathways involved in the resistance to cadmium toxicity. *Genome Biol* 8(6):R122.
- Dallinger R, Wieser W. 1984. Molecular fractionation of Zn, Cu, Cd and Pb in the midgut gland of *Helix pomatia*. *Comp Biochem Physiol C* 79(1): 125-129.
- Dalton TP, He L, Wang B, Miller ML, Jin L, Stringer KF, Chang X, Baxter CS, Nebert DW. 2005. Identification of mouse SLC39A8 as the transporter responsible for cadmium-induced toxicity in the testis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:3401-3406.
- Davies NA, Edwards PA, Lawrence MAM, Taylor MG, Simkiss K. 1999. Influence of particle surfaces on the bioavailability to different species of 2,4-dichlorophenol and pentachlorophenol. *Environ Sci Technol* 33:2465-2468.
- Decho AW, Luoma SN. 1996. Flexible digestion strategies and trace metal assimilation in marine bivalves. *Limnol Oceanogr* 41:568-572.
- De Coen WM, Janssen CR. 2003. The missing biomarker link: relationships between effects on the cellular energy allocation biomarker of toxicant-stressed *Daphnia magna* and corresponding population characteristics. *Environ Toxicol Chem* 22(7):1632-41.
- Diep PT, Denizeau F, Jumarie C. 2005. Kinetics of the early subcellular distribution of cadmium in rat hepatocytes. *Biometals* 18(3):255-67.
- Di Toro DM, Zarba CS, Hansen DJ, Berry WJ, Schwartz RC, Cowan CE, Pavlou SP, Allen HE, Thomas NA, Paquin PR. 1991. Technical Basis for establishing sediment quality criteria for nonionic organic chemicals using equilibrium partitioning. *Environ Toxicol Chem* 10:1541-1583.
- Dong J, Song MO, Freedman JH. 2005. Identification and characterization of a family of *Caenorhabditis elegans* genes that is homologous to the cadmium-responsive gene *cdr-1*. *Biochim Biophys Acta* 1727:16-26.
- Fent K. 1998. Ökotoxikologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland.
- Ferris FG. 1989. Metallic ion interactions with the outer membrane of Gram-negative bacteria. In: Beveridge TJ, Doyle RJ, Eds., *Metal Ions and Bacteria*. John Wiley & Sons, USA, NY, pp. 295-323.
- Fisher NS, Bjerregaard P, Fowler SW. 1983. Interactions of marine plankton with transuranic elements. 3. Biokinetics of americium in euphausiids. *Mar Biol* 75:261-268.

- Fisher NS, Teyssié J-L, Fowler SW, Wang W-X. 1996. Accumulation and retention of metals in mussels from food and water: a comparison under field and laboratory conditions. *Environ Sci Technol* 30:3232-3242.
- Förstner U. 2009. Sediments and priority substances in river basins - New Directive 2008/105/EC; sediment issues in management plans. *J Soils Sediments* 9:89-93.
- Foulkes EC. 2000. Transport of toxic heavy metals across cell membranes. *Proc Soc Exp Biol Med* 223 (3): 234-240.
- Franks CJ, Pemberton D, Vinogradova I, Cook A, Walker RJ, Holden-Dye L. 2001. Ionic basis of the resting membrane potential and action potential in the pharyngeal muscle of *Caenorhabditis elegans*. *J Neurophysiol* 87:954-961.
- Freedman JH, Slice LW, Fire A, Rubin CS. 1993. The novell methallothionein genes of *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 268(4):2554-2564.
- Galloway TS, Depledge MH. 2001. Immunotoxicity in invertebrates: measurement and ecotoxicological relevance. *Ecotoxicology* 10:5-23.
- Goulet RR, Krack S, Doyle PJ, Hare L, Vigneault B, McGeerd JC. 2007. Dynamic multipathway modeling of Cd bioaccumulation in *Daphnia magna* using waterborne and dietborne exposures. *Aquat Toxicol* 81:117-125.
- Griscom SB, Fisher NS, Luoma SN. 2002. Kinetic modeling of Ag, Cd and Co bioaccumulation in the clam *Macoma balthica*: quantifying dietary and dissolved sources. *Mar Ecol Prog Ser* 240:127-141.
- Handy RD, Sims DW, Giles A, Campbell HA, Musonda MM. 1999. Metabolic trade-off between locomotion and detoxification for maintenance of blood chemistry and growth parameters by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during chronic dietary exposure to copper. *Aquat Toxicol* 47(1):23-41.
- Heschl MFP, Baillie DL. 1990. The HSP70 multigene family of *Caenorhabditis elegans*. *Comp Biochem Physiol B*: 633-637.
- Hook SE, Fisher NS. 2001. Reproductive toxicity of metals in calanoid copepods. *Mar Biol* 138:1131-1140.
- ISO 7027. 1999. Water quality -- Determination of turbidity.
- ISO/DIS 10872. Water quality -- Determination of the toxic effect of sediment and soil samples on growth, fertility and reproduction of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda) (under development).
- Jones D, Candido EPM. 1999. Feeding is inhibited by sublethal concentrations of toxicants and by heat stress in the nematode *Caenorhabditis elegans*: Relationship to the cellular stress response. *J Exp Zool* 284:147-157.

- Jorgensen EM, Mango SE. 2002. The art and design of genetic screens: *Caenorhabditis elegans*. *Nat Rev Genet* 3(5):356-69.
- Ke C, Wang W-X. 2001. Bioaccumulation of Cd, Se, and Zn in an estuarine oyster (*Crassostrea rivularis*) and a coastal oyster (*Saccostrea glomerata*). *Aquat Toxicol* 56:33-51.
- Keung CF, Guo F, Qian P, Wang W-X. 2008. Influences of metal-ligand complexes on the cadmium and zinc biokinetics in the marine bacterium, *Bacillus firmus*. *Environ Toxicol Chem* 27(1): 131-137.
- Khazaeli MB, Mitra RS. 1981. Cadmium-binding component in *Escherichia coli* during accommodation to low levels of this ion. *Appl Environ Microbiol* 41:46-50.
- Klaassen CD, Liu J, Choudhuri S. 1999. Methallothionein: An intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39:267-94.
- Lee B-G, Griscom SB, Lee J-S, Choi HJ, Koh C-H, Luoma SN, Fisher NS. 2000. Influence of dietary uptake and reactive sulfides on metal bioavailability from aquatic sediments. *Science* 287:282-284.
- Liao VH-C, Dong J, Freedman JH. 2002. Molecular characterization of a novel, cadmium-inducible gene from the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 277:42049-42059.
- Luoma SN, Fisher NS. 1997. Uncertainties in assessing contaminant exposure from sediments. In Ingersoll CG, Dillon T, Biddinger GR, Eds., *Ecological Risk Assessment of Contaminated Sediments*. Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Pensacola, FL, USA, pp 211-237.
- Luoma SN, Johns C, Fisher NS, Steinberg NA, Oremland RS, Reinfelder JR. 1992. Determination of selenium bioavailability to a benthic bivalve from particulate and solute pathways. *Environ Sci Technol* 26:485-491.
- Macek KJ, Petrocelli SR, Sleight BH. 1979. Considerations in assessing the potential for, and significance of, biomagnification of chemical residues in aquatic food chains In: Marking LL, Kimerle RA, Eds. *Aquatic Toxicology*. Philadelphia (PA): American Society for Testing and Materials (ASTM). STP 667. p 251-268.
- Maltby L, Naylor C, Calow P. 1990 a. Effect of stress on a freshwater benthic detritivore: scope for growth in *Gammarus pulex*. *Ecotoxicol Environ Saf* 19(3):285-291.
- Maltby L, Naylor C, Calow P. 1990 b. Field deployment of a scope for growth assay involving *Gammarus pulex*, a freshwater benthic invertebrate. *Ecotoxicol Environ Saf* 19(3):292-300.
- Marigómez JA, Cajaraville MP, Angulo E. 1990. Cellular cadmium distribution in the common winkle, *Littorina littorea* (L.) determined by X-ray microprobe analysis and histochemistry. *Histochemistry* 94(2):191-199.

- Mayer LM, Weston DP, Bock MJ. 2001. Benzo[a]pyrene and zinc solubilization by digestive fluids of benthic invertebrates – A cross phyletic study. *Environ Toxicol Chem* 20:1890-1900.
- Miño LA, Folco S, de D'Ángelo AMP, Guerrero NRV. 2006. Modeling lead bioavailability and bioaccumulation by *Lumbriculus variegatus* using artificial particles. Potential use in chemical remediation processes. *Chemosphere* 63:261-268.
- Moolman L, Van Vuren JHJ, Wepener V. 2007. Comparative studies on the uptake and effects of cadmium and zinc on the cellular energy allocation of two freshwater gastropods. *Ecotoxicol Environ Saf* 68: 443-450.
- Munger C, Hare L. 1997. Relative importance of water and food as cadmium sources to an aquatic insect (*Chaoborus punctipennis*): implications for predicting Cd bioaccumulation in Nature. *Enviro Sci Technol* 31:891-895.
- Pagenkopf GK. 1983. Gill surface interaction model for trace-metal toxicity to fishes: role of complexation, pH, and water hardness. *Enviro Sci Technol* 17 (6):342-347.
- Posthuma L, Van Straalen NM. 1993. Heavy metal adaptation in terrestrial invertebrates: a review of occurrence, genetics, physiology and ecological consequences. *Comp Biochem Physiol C* 106:11-38.
- Pioli MN, Lopez AG, Mino LA, Afonso MDS, Guerrero NRV. 2006. The impact of particle-bound cadmium on bioavailability and bioaccumulation: A pragmatic approach. *Environ Sci Technol* 40:6341-6347.
- Rainbow PS, Wang W-X. 2001. Comparative assimilation of Cd, Cr, Se, and Zn by the barnacle *Elminius modestus* from phytoplankton and zooplankton diets. *Mar Ecol Prog Ser* 218: 239-248.
- Rainbow PS. 2002. Trace metal concentration in aquatic invertebrates: Why and so what? *Environ Pollut* 120:497-507.
- Reinfelder JR, Fisher NS. 1991. The assimilation of elements ingested by marine copepods. *Science* 251:794-796.
- Reinfelder JR, Fisher NS. 1994 a. The assimilation of elements ingested by marine planktonic bivalve larvae. *Limnol Oceanogr* 39(8): 12-20.
- Reinfelder JR, Fisher NS. 1994 b. Retention of elements absorbed by juvenile fish (*Menidia menidia*, *Menidia beryllina*) from zooplankton prey. *Limnol Oceanogr* 39(8):1783-1789.
- Rodgher S, Luiz Gaeta Espíndola E. 2008. Effects of interactions between algal densities and cadmium concentrations on *Ceriodaphnia dubia* fecundity and survival. *Ecotoxicol Environ Saf* 71:765-773.
- Roh JY, Lee J, Choi J. 2006. Assessment of stress-related gene expression in the heavy metal-exposed nematode *Caenorhabditis elegans*: A potential biomarker for metal-induced

- toxicity monitoring and environmental risk assessment. *Environ Toxicol Chem* 25:2946-2956.
- Rozen S, Skaletsky HJ. 2000. Primer 3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S, Eds.. *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ. p 365-386.
- Schlegel HG. 1992. Allgemeine Mikrobiologie. 7. überarbeitete Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Scott JA, Palmer SJ. 1990. Sites of cadmium uptake in bacteria used for biosorption. *Appl Microbiol Biotechnol* 33:221-225.
- Selck H, Forbes VE, Forbes TL. 1998. Toxicity and toxicokinetics of cadmium in *Capitella* sp. I: Relative importance of water and sediment as route of cadmium uptake. *Mar Ecol Prog Ser* 164:167-178.
- Selck H, Forbes VE. 2004. The relative importance of water and diet for uptake and subcellular distribution of cadmium in the deposit-feeding polychaete, *Capitella* sp. I. *Mar Environ Res* 57:261-279.
- Simkiss K, Davies NA, Edwards PA, Lawrence MAM, Taylor MG. 2001. The use of sediment analogues to study the uptake of pollutants by chironomid larvae. *Environ Pollut* 115:89-96.
- Smolders R, Bervoets L, De Coen W, Blust R. 2004. Cellular energy allocation in zebra mussels exposed along a pollution gradient: linking cellular effects to higher levels of biological organization. *Environ Pollut* 129:99-112.
- Strain SM, Fesik SW, Armitage IM. 1983. Structure and metal-binding properties of lipopolysaccharides from heptoseless mutants of *Escherichia coli* studied by ^{13}C and ^{31}P nuclear magnetic resonance. *J Biol Chem* 258(22):13466-13477.
- Stringham EG, Jones D, Candido EPM. 1992. Expression of the polyubiquitin-encoding gene (ubq-1) in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 113:165-173.
- Taub J, Lau JF, Ma C, Hahn JH, Hoque R, Rothblatt J, Chalfie M. 1999. A cytosolic catalase is needed to extend adult lifespan in *C. elegans* *daf-C* and *clk-1* mutants. *Nature* 399:162-166.
- Tawe WN, Eschbach ML, Walter RD, Henkle-Duhrsen K. 1998. Identification of stress-responsive genes in *Caenorhabditis elegans* using RT-PCR differential display. *Nucl Acids Res* 26:1621-1627.
- The *C. elegans* Sequencing Consortium. 1998. Genome sequence of the nematode *Caenorhabditis elegans*. A platform for investigating biology. *Science* 282:2012-2018.
- Traunspurger W, Haitzer M, Höss S, Beier S, Ahlf W, Steinberg CEW. 1997. Ecotoxicological assessment of aquatic sediments with *Caenorhabditis elegans*

- (Nematoda) - A method for testing liquid medium and whole-sediment samples. *Environ Toxicol Chem* 16(2):245-250.
- Waalkes MP, Poirier LA. 1985. Interactions of cadmium with interstitial tissue of the rat testes. Uptake of cadmium by isolated interstitial cells. *Biochem Pharmacol*, 34(14): 2513-2518.
- Waalkes MP. 2003. Cadmium carcinogenesis. *Mutat Res* 533(1-2):107-120.
- Wang W-X, Fisher NS, Luoma SN. 1996. Kinetic determinations of trace element bioaccumulation in the mussel *Mytilus edulis*. *Mar Ecol Prog Ser* 140:91-113.
- Wang W-X, Stupakoff I, Fisher NS. 1999. Bioavailability of dissolved and sediment-bound metals to a marine deposit-feeding polychaete. *Mar Ecol Prog Ser* 178:281-293.
- Wang W-X, Rainbow PS. 2000. Dietary uptake of Cd, Cr, and Zn by the barnacle *Balanus trigonus*: Influence of diet composition. *Mar Ecol Prog Ser* 204:159-168.
- Wang W-X, Ke C. 2002. Dominance of dietary intake of cadmium and zinc by two marine predatory gastropods. *Aquat Toxicol* 56(3):153-165.
- Wang W-X, Wong RCK. 2003. Combined effects of food quantity and quality on Cd, Cr, and Zn assimilation to the green mussel, *Perna viridis*. *J Exp Mar Bio Ecol* 290:49-69.
- Wilding J, Maltby L. 2006. Relative toxicological importance of aqueous and dietary metal exposure to a freshwater crustacean: Implications for risk assessment. *Environ Toxicol Chem* 25:1795-1801.
- Yanagiya T, Imura N, Enomoto S, Kondo Y, Himeno S. 2000. Suppression of a high-affinity transport system for manganese in cadmium-resistance metallothioneins-null cells. *J Pharmacol Exp Ther* 292:1080-1086.
- Yan Q-L, Wang W-X. 2002. Metal exposure and bioavailability to a marine deposit-feeding sipuncula *Sipunculus nudus*. *Environ Sci Technol* 36:40-47.
- Yeates GW. 1981. Nematode populations in relation to soil environmental factors: a review. *Pedobiologia* 22:312-338.
- Zalups RK, Ahmad S. 2003. Molecular handling of cadmium in transporting epithelia. *Toxicol Appl Pharmacol* 186(3):163-188.

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig durchgeführt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Kirsten Offermann

Hamburg, 11.06.2009

Veröffentlichungen

- Offermann K**, Matthäi A, Ahlf W. 2009. Assessing the importance of dietborne cadmium and particle characteristics on bioavailability and bioaccumulation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environ Toxicol Chem* 28(6):1149-1158.
- Ahlf W, Matthäi A, **Offermann K**. 2009. Bedeutung der Expositionswege auf Bioakkumulation und Wirkung in *C. elegans*. *Umweltwissensch Schadst Forsch* DOI 10.1007/s12302-009-0056-2.
- Neddermann K**, Heise S, Peters C, Ahlf W. 2003. Ecotoxicological investigations in different areas of the Baltic coast. SETAC Europe Annual Meeting Hamburg. Proceedings p. 200.
- Neddermann K**, Ahlf W: 2004. *Cdr-1* als Biomarker für den Schadstofftransfer in den Nematoden *Caenorhabditis elegans*. Jahrestagung SETAC-GLB Aachen. Tagungsband S. 88
- Neddermann K**, Ahlf W: 2005. What are the important vectors for the transfer of cadmium to the nematode *Caenorhabditis elegans*? SETAC Europe Annual Meeting, Lille. Proceedings p. 18.
- Neddermann K**, Ahlf W: 2005. The use of real-time PCR to determine the uptake route of cadmium by the nematode *Caenorhabditis elegans*. SETAC Europe Annual Meeting Lille. Proceedings p. 231.
- Neddermann K**, Ahlf W: 2006. Toxicokinetics of Cadmium in the Nematode *Caenorhabditis elegans*: Uptake Routes and Bioavailability of Particle-bound Cadmium SETAC Europe Annual Meeting The Hague. Proceedings p. 256.
- Neddermann K**, Matthäi A, Ahlf W. 2006. Bioverfügbarkeit und Bioakkumulation von partikel-gebundenen Schadstoffen. Jahrestagung SETAC GLB Landau. Tagungsband S. 191.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Kirsten Offermann, geb. Neddermann
Anschrift: Rellinger Straße 11
20257 Hamburg
E-Mail: kirsten.offermann@tu-harburg.de
Geburtstag: 02.05.1977
Geburtsort: Bremen
Beruf: Diplom-Biologin

Berufliche Praxis

08/2002 – 09/2006 Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der
Technische Universität Hamburg-Harburg
Institut für Umweltechnik und Energiewirtschaft
Arbeitsgruppe: Ökotoxikologie
Bearbeitung der Projekte:

- „Ökotoxikologische Untersuchungen in drei Gebieten der deutschen Ostseeküste“
- „Entwicklung einer Testapparatur zur Bestimmung der Wirkung von Bodenproben auf die Reproduktion von *Caenorhabditis elegans* (Nematoda)“

Studium

10/1996 – 09/1998 Universität Göttingen
Studium der Biologie
Grundstudium, Abschluss: Vordiplom

10/1998 – 08/2002 Universität Rostock
Studium der Biologie
Hauptstudium, Abschluss: Diplom

Studienfächer: Meeresbiologie, Mikrobiologie, Tierphysiologie,
Ozeanographie

Diplomarbeit am Institut für Ostseeforschung Warnemünde (IOW)
Diplomarbeitsthema: „Untersuchungen zur Saisonalität bakterieller
alkalischer Phosphataseaktivität (APA) durch organische und
anorganische Stickstoffverbindungen“

Schulischer Werdegang

1983 – 1987 Grundschule in Bexhövede

1987 – 1993 Orientierungsstufe und Realschule in Loxstedt

1993 – 1996 Berufsbildende Schulen Schiffdorf
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Praktika

03/2000 Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung Bremerhaven
Sektion: Marine Mikrobiologie

09/1997 Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung Bremerhaven
Sektion: Zooplankton