

Störfaktoren ökotoxikologischer Testverfahren mit *Daphnia magna*: Immobilisationstest, heat shock proteins und Metallothionein

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Timo Haap
aus Tübingen

Tübingen
2015

Tag der mündlichen Prüfung: 30.09.2015

Dekan: Prof. Dr. W. Rosenstiel

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H.-R. Köhler

2. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Triebkorn

Inhalt

Zusammenfassung.....	1
1. Promotionsthema	1
2. Einleitung	1
Grundlagen	1
3. Material und Methoden.....	11
Experimenteller Aufbau	11
Akute Immobilisationstests	13
Hsp-Bestimmung	14
Metallothionein-Bestimmung	14
Reproduktion	15
4. Ergebnisse und Diskussion	16
5. Synthese	26
6. Literatur.....	28
Eigenanteil an den durchgeführten Arbeiten bei den in die vorliegende Dissertation integrierten Publikationen.....	43
Kapitel 1: Acute effects of diclofenac and DMSO to <i>Daphnia magna</i> : immobilisation and hsp70 induction.....	44
Kapitel 2: Cadmium tolerance in seven <i>Daphnia magna</i> clones is associated with reduced hsp70 baseline levels and induction.....	65
Kapitel 3: Hsp70 and metallothionein trade-off against one another in <i>Daphnia magna</i> cross-tolerance to cadmium and heat stress	86
Danksagung.....	112
Publikationsliste.....	114

Zusammenfassung

1. Promotionsthema

Störfaktoren ökotoxikologischer Testverfahren mit *Daphnia magna*: Immobilisationstest, heat shock proteins und Metallothionein

2. Einleitung

Grundlagen

Das multidisziplinäre Fachgebiet der Ökotoxikologie untersucht die Schadwirkungen von Chemikalien auf allen biologischen Ebenen, vom Molekül über Zellen bis hin zum Ökosystem. Diese Umweltwissenschaft vernetzt dabei Konzepte aus Umweltchemie, Toxikologie, Biochemie und Ökologie. Ziel der ökotoxikologischen Forschung ist das Verständnis von Auswirkungen anthropogener Chemikalien auf die belebte Umwelt, auch im Kontext von abiotischen Belastungsfaktoren, wie der Klimaerwärmung, um die damit verbundenen Gefahren zu erkennen und abzuwenden.

Obwohl Chemikalien in der Umwelt alle biologischen Ebenen beeinflussen, ist die Erfassung toxikologischer Wirkungen von Umweltchemikalien auf der Ebene von Individuen zentral. Grundgedanke der ökotoxikologischen Bewertung ist das Stellvertreterprinzip. Dies bedeutet, dass für Biotests wenige typische Vertreter (Bioindikatoren) für die Organismen eines Ökosystems stellvertretend untersucht werden. Sie besitzen eine hohe Sensitivität und sind unter Testbedingungen leicht kultivierbar. Damit soll die Reproduzierbarkeit der Testergebnisse gewährleistet werden (Fent, 2013). Daphnien nehmen eine solche repräsentative Rolle für das Zooplankton aquatischer Ökosysteme ein und erfüllen auch die letztgenannten Bedingungen. Daphnien gehören weltweit zu einer der wichtigsten Gruppen von Zooplanktern in pelagischen Ökosystemen, von ihnen sind bisher über 200 Arten bekannt (Colbourne und Hebert, 1996). *Daphnia magna* ist der größte Vertreter herbivorer Cladoceren in der Nordhemisphäre und kann 5-6 mm groß werden. Wegen ihrer Größe wird sie leicht Beute von Fischen und fehlt daher meist in großen, stehenden Gewässern wie Seen (Fent, 2013). Ihre typischen Lebensräume sind stehende, eutrophierte Kleingewässer wie Tümpel und

Teiche mit veränderlichen Umweltbedingungen und saisonal variablem Nahrungsangebot. Sie kommt dort in den Sommermonaten in außerordentlich großer Individuenzahl vor und kann eine große Rolle bei der Gewässerreinigung und der Bildung von Klarwasserstadien spielen (Lampert et al., 1986). Durch die effiziente Filtrieraktivität können Daphnien einerseits einen erheblichen Fraßdruck besonders auf Phytoplankton und Protozoen ausüben (Lampert und Grey, 2003), andererseits sind sie eine wichtige Nahrungsgrundlage hauptsächlich für planktivore Fische (Ringelberg et al., 1991; Lemke et al., 2003). *D. magna* gilt seit langem als Modellorganismus in der aquatischen Ökologie (Lampert und Sommer, 1993).

Eines der Hauptargumente, Daphnien in Toxizitätsstudien einzusetzen, ist die parthenogenetische, klonale Reproduktion, die hochgradig reproduzierbare Ergebnisse erlauben sollte (Adema, 1978). Der Daphnientest ist deshalb eines der am häufigsten angewandten Biotestverfahren in der Ökotoxikologie, z.B. bei der Bestimmung giftiger Wirkungen von Abwässern und generell bei der Ermessung der Toxizität von Chemikalien. Der in dieser Arbeit durchgeführte Immobilisationstest mit *D. magna* zur Bestimmung der akuten Toxizität von Chemikalien wurde in der „Guideline for testing of chemicals 202“ standardisiert (OECD, 2004). Die Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD) hat seit 1981 eine Reihe derartiger Richtlinien ausgearbeitet, welche die Testorganismen, die Testausführung, sowie die Bedingungen und Auswertung von Biotests beschreiben und laufend ergänzt werden. Auch das Deutsche Chemikaliengesetz stützt sich auf diese Richtlinien (Kommission der europäischen Gemeinschaften, 2001). Einige weitere Institutionen bieten ebenfalls solche Richtlinien, wie z.B. das Deutsche Institut für Normung (DIN 38 412, 1989) oder die International Organisation for Standardisation (ISO, 1996). Diese standardisierten Daphnientests kommen zur Klassifizierung und Einstufung von Chemikalien in Wassergefährdungsklassen zum Einsatz und sind für die Gefährlichkeits- und Umweltrisikoprüfung von außerordentlicher Wichtigkeit (Persoone und Janssen, 1993). Zur Charakterisierung der Wirkungsstärke von Substanzen in akuten Toxizitätstests wird diejenige Testkonzentration verwendet, die eine halbmaximale Wirkung erzeugt, die „mittlere Effektkonzentration“ (EC_{50}). Im akuten Immobilisationstest mit *D. magna* gibt dieser EC_{50} -Wert diejenige Testkonzentration an, bei der 50 % der Daphnien nach einem festgelegten Zeitraum schwimmunfähig (immobil) sind. Zahlreiche vergleichende Studien haben gezeigt, dass Daphnien zu den sensitivsten

Organismen sowohl in Lang- als auch in Kurzzeittoxizitätstests zählen. *D. magna* reagiert auch sehr sensitiv auf Schwermetalle wie Cadmium (Barata et al., 2000).

In den Richtlinien zum Chemikalienrecht der Europäischen Union wird gefordert, die akute Toxizität aller neuer Industriechemikalien gegenüber Daphnien zu testen. Zukünftig werden nach der neuen Chemikalienpolitik der EU zusätzlich auch die wichtigsten Altstoffe getestet (Fent, 2013). Obwohl man nicht von akuten Toxizitätsdaten, die an nur einem repräsentativen Organismus ermittelt wurden, auf chronische Wirkungen in ganzen Ökosystemen schließen kann, stellen solche akuten Standardtests die Grundlage und den ersten Schritt bei der Toxizitätsbewertung von Chemikalien dar.

Trotz langjähriger Standardisierung des Daphnientests und seiner sehr weit verbreiteten Anwendung treten jedoch häufig ernst zu nehmende Variationen in Testergebnissen auf, wenn die Ergebnisse unterschiedlicher Labors verglichen werden (Messiaen et al., 2012; De Coninck et al., 2013). Dieser Umstand wurde schon vor Jahrzehnten bekannt und gab bereits häufig Anlass zur Debatte (Baird et al., 1989; Soares et al., 1992; Stuhlbacher et al., 1993; Baird und Barata, 1998; Barata et al., 2000). Die vorliegende Arbeit behandelt zwei der bedeutendsten Störfaktoren, die zu Variationen der Ergebnisse in Toxizitätsstudien mit *D. magna* führen. Im ersten Kapitel wird der häufig und sehr oft unumgängliche Einsatz von Lösungsmitteln von Testsubstanzen behandelt, im 2. und 3. Kapitel die genetische Variation zwischen verschiedenen Daphnienstämmen (Klone), die Toleranz gegenüber Schadstoffen sowie die biochemischen Hintergründe hierfür betreffend.

Literaturdaten zur aquatischen Toxizität, z.B. EC₅₀-Werte, sind besonders häufig bei der Untersuchung von Substanzen widersprüchlich, deren Wasserlöslichkeit geringer als 100 mg/L ist. Bei Toxizitätstests mit wenig wasserlöslichen Stoffen können sich Probleme und Unsicherheiten ergeben, da eine homogene Verteilung der Substanzen im Testansatz eine Voraussetzung für reproduzierbare Ergebnisse ist (OECD, 2000). Einige Literaturangaben zu Effektkonzentrationen übersteigen nach Steinhäuser (1995) die Löslichkeit der betreffenden Substanz um ein Vielfaches. Die ökotoxikologische Prüfung einer Substanz oberhalb ihrer Löslichkeitsgrenze ist nur dann sinnvoll, wenn im Bereich der Wasserlöslichkeit keine toxischen Effekte aufgetreten sind (ISO, 1996; OECD, 2000). Um solche Stoffe in Lösung zu bringen, wird häufig empfohlen, physikalische anstelle von chemischen Methoden einzusetzen - dies wären beispielsweise Rühren, Erwärmen, Ultraschallbehandlungen etc. (Calleja und Persoone, 1993). Da sich jedoch viele umweltrelevante Chemikalien auch mit diesen Methoden in Wasser nicht oder nur

unzureichend lösen, kann es unumgänglich sein, Lösungsmittel (z.B. Dimethylsulfoxid, DMSO) in Toxizitätstests einzusetzen. Aufgrund seiner Eigenschaft, verschiedenste Substanzen in Lösung zu bringen, und da es im Gegensatz zu vielen anderen Lösungsmitteln nur als gering toxisch gilt, wird DMSO in ökotoxikologischen Versuchen relativ häufig eingesetzt. Es ist das Lösungsmittel der Wahl in vielen Bioassay-Systemen, der 48-h EC₅₀ für *D. magna* liegt bei 24,6 g/L (Brayton, 1986; Barbosa et al., 2003)

Die Art des Lösungsmittels beziehungsweise die Konzentration, in der es angewendet wird, kann jedoch die Reaktionen von Organismen auf Chemikalien in Toxizitätsstudien stark beeinflussen und somit zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen führen. Hierbei können zwischen der Testsubstanz und dem Lösungsmittel additive, antagonistische oder synergistische Interaktionen auftreten (Calleja und Persoone, 1993).

Verschiedene Autoren und Richtlinien geben generelle Hinweise darauf, wie schwerlösliche Substanzen hinsichtlich der Wahl eines geeigneten Lösungsmittels zu behandeln sind, so z.B. Stratton et al. (1985), ECETOC (1996), OECD (2000), Ma und Chen (2005) sowie Hutchinson et al. (2006). Doch muss für jede derartige Testsubstanz und jeden Testorganismus individuell ein Lösungsmittel und dessen Art und Weise der Applikation gefunden werden, welches den geringsten Einfluss auf die Testergebnisse ausübt. In dieser Arbeit wird der Einfluss des Lösungsmittels DMSO auf die Testsubstanz Diclofenac in verschiedenen Kombinationen betrachtet. Diclofenac zählt zu den bisher am häufigsten nachgewiesenen Spurenstoffen in limnischen Gewässern (Heberer et al., 2002). Der Entzündungshemmer aus der Gruppe der nichtsteroidalen, antiinflammatorischen Arzneimittel findet aufgrund seiner schmerzlindernden und antirheumatischen Wirkung weithin Verwendung. Eintragspfade in Gewässer stellen kommunale Abwässer aus Haushalten und Krankenhäusern oder Abwasser aus der Produktion, die über Kläranlagen in natürliche Gewässer eingeleitet werden, dar. Für Rückstände von Humanpharmaka sind solche kontaminierte Abwässer der hauptsächliche Eintragspfad in die Umwelt. Daneben führen Wege von falsch entsorgten Restbeständen und Verbandsmaterial über Sickerwasser aus Deponien in die Gewässer. Von Klärschlamm und Veterinärpharmaka in Gülle und Dung sind Boden- und Grundwasserbelastungen zu erwarten, wenn diese auf landwirtschaftliche Flächen aufgebracht werden. Diclofenac wird unter natürlichen Bedingungen in Fließgewässern fast nur photochemisch abgebaut (Poiger et al., 2001), ein biologischer Abbau erfolgt nur in minimaler Weise und die Elimination in Klärwerken kann sehr gering sein (Ternes, 1998; Heberer, 2002; Tauxe-Wuersch et al., 2005). Das häufige Vorkommen von

Diclofenac in Umweltproben bedarf deshalb umfassender Studien zu ökotoxikologischen Auswirkungen.

Neben der Weiterentwicklung und Standardisierung bewährter Testverfahren wird in der aktuellen ökotoxikologischen Forschung angestrebt, unterschiedliche Biomarker für die biologischen Effekte einer Schadstoffexposition zu etablieren und weiterzuentwickeln. Biomarker sind messbare molekulare, zelluläre oder physiologische Parameter, deren strukturelle oder funktionelle Veränderung dazu geeignet ist, Umwelteinflüsse im allgemeinen und Schadstoffwirkungen im besonderen anzuzeigen (Markert und Oehlmann, 1995). Solche Indikatoren erlauben den Nachweis und die Beurteilung von Belastungen und Schädigungen von Organismen durch Umweltchemikalien. Wie bei akuten Toxizitätstests fällt zuweilen auch für die Früherkennung ökotoxikologischer Effekte durch Biomarker die Wahl des Testorganismus auf Monitororganismen wie *D. magna*, welche sehr sensitiv auf Umweltbelastungen reagieren. Als geeigneter biochemischer Effektmarker hat sich bei diversen Organismen die Induktion von Stressproteinen oder *heat shock proteins* (Hsp) erwiesen (z.B. Lewis et al., 1999). Hsps ermöglichen eine Abschätzung der Gesamtbelastung eines Organismus anhand der proteinschädigenden Wirkungen verschiedener Stressoren (Sanders, 1993).

Biomarkerstudien sind besonders zur Ergänzung von bereits etablierten Testverfahren wichtig, da aus ihnen wichtige Erkenntnisse zur Wirkung von Schadstoffen auf organismischer und molekularer Ebene zu erwarten sind. Bei der Wahl der Biomarker im Rahmen der vorliegenden Arbeit standen biochemische Untersuchungen zum Hsp70-Level bei *D. magna* an erster Stelle. Hsps werden vermutlich bei allen Organismen (außer Eisfischen) exprimiert und sind evolutiv stark konserviert. Sie werden in Größenklassen eingeteilt, von denen die Klasse „Hsp70“ am besten untersucht ist (Feder und Hofman, 1999) und am häufigsten als Biomarker in der Ökotoxikologie eingesetzt wird (Köhler et al., 1992, 2001; Hallare et al., 2004). Hsp70 ist ein anerkannter Biomarker für Proteintoxizität (Iwama et al., 1998), welche von der Gesamtheit aller auf den Organismus wirkenden Faktoren verursacht wird (Köhler et al., 2001). *D. magna* wurde trotz seines Status als Modellorganismus und seiner häufigen Verwendung in ökotoxikologischen Studien bislang nur spärlich bezüglich seiner Stressproteinantwort auf Chemikalienexposition untersucht. In Studien von Bond und Bradley (1995; 1997) und Bradley und Ward (1989) wurden Hsp70 und Hsp90 sowohl konstitutiv als auch nach Hitzestress bei *D. magna* detektiert. Bond et al. (1993) erfassten altersabhängige Unterschiede bei der Induktion von Stressproteinen durch Hitze bei *D. magna*. Lediglich

Bradley (1993) induzierte eine Hsp70-Antwort bei *D. magna* durch Exposition gegenüber Silberchlorid und SDS.

Im 1. Kapitel dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Veränderungen des Gehalts an Hsp70 als Biomarker bei *D. magna* eingesetzt werden können. Dies ist insbesondere für die Nutzung als Biomarker in ökotoxikologischen Untersuchungen von Bedeutung. In den weiteren Kapiteln wurde angestrebt, den Einsatz von Stressproteinen als Biomarker bei *D. magna* zu erweitern und zu verbessern.

Trotz großer Bemühungen zur Standardisierung des Immobilisationstests mit *D. magna* können die Ergebnisse von Ringtests, welche in verschiedenen Laboratorien nach definierten Protokollen z.B. mit Cadmium als Referenzchemikalie durchgeführt werden, erheblich variieren. Ursache dieser Variabilität sind neben laborspezifischen Kultur- und Testbedingungen hauptsächlich genetische Unterschiede zwischen den verwendeten Klonen (Baird et al., 1990; Soares et al., 1992). Als Beispiel variierte der LC₅₀-Wert für Cadmiumchlorid in einem akuten Daphnientest zwischen verschiedenen Klonen zwischen 0,8 und 25,8 µg/L (Baird et al., 1989). Aufgrund des Wechsels zwischen parthenogenetischer und zweigeschlechtlicher Fortpflanzung besteht eine natürliche Daphnienpopulation aus vielen solcher verschiedener Klone. Durch eine chronische Belastung der aquatischen Umwelt mit Schadstoffen können jedoch tolerante Phänotypen begünstigt und selektiert werden. So sind viele Schwermetalle in der Umwelt dauernd präsent (persistent) und wirken als kontinuierlicher Selektionsdruck auf alle Organismen. Dadurch können diese einerseits phänotypische Toleranzen gegenüber solchen Schadstoffen entwickeln, andererseits kann sich die genetische Zusammensetzung der Population verändern (Klerks und Weis, 1987; Posthuma und Van Straalen, 1993; Postma und Davids, 1995; De Coninck et al., 2013).

Bei genetischen Anpassungen handelt es sich um durch Mutationen, Rekombinationen und Selektion bedingte mikroevolutive Prozesse, die innerhalb eines relativ kurzen Zeitraumes morphologische oder physiologische Veränderungen auf dem Niveau der biologischen Art verursachen. Ein bekanntes Beispiel für die mikroevolutive Anpassung an Umweltchemikalien ist der Industriemelanismus beim Birkenspanner in Kohlebergbaugebieten (Fent, 2013). Toleranzen und genetische Anpassungen (Adaptationen) lassen sich durch den Vergleich natürlicher Populationen von belasteten und unbelasteten Standorten beobachten. Derartige Studien wurden hinsichtlich Modifikationen von Stressreaktionen z.B. mit Asseln, Fruchtfliegen, Tausendfüßern, Bachflohkrebsen und Nematoden aus dem Freiland durchgeführt (Köhler et al., 2000;

Sørensen et al., 2001; Arts et al., 2004; Schill et al., 2004). Über mikroevolutive Prozesse können sich Populationen an veränderte Umweltbedingungen längerfristig anpassen, meist jedoch auf Kosten der allgemeinen Fitness (Barber et al., 1990). So gehen damit häufig Verluste in der genetischen Diversität der Populationen einher (Guttman, 1994). Genetische Diversität innerhalb einer Population ist aber ausschlaggebend für ihre Fähigkeit zu überleben, wenn sich Umweltfaktoren ändern. Generationenübergreifende Studien sind also zur Evaluierung von Langzeit-Effekten von Umweltschadstoffen außerordentlich wichtig (Dietrich et al., 2010). Im 2. Kapitel dieser Arbeit wurde die Variabilität der Reaktionen im Daphnientest von mehreren Klonen von *D. magna* unterschiedlicher geographischer Herkunft auf das Schwermetall Cd untersucht.

Genetische Adaptationen machen sich in der Natur meist erst nach vielen Generationsfolgen phänotypisch bemerkbar. Daphnien besitzen darüberhinaus auch ein weites Spektrum an phänotypischen Variationen, die vom selben Genotyp exprimiert werden können. Darunter fällt auch die Cyclomorphose, eine Reihe morphologischer Anpassungen innerhalb einer Art über den Jahresverlauf. Veränderliche Merkmale sind z.B. die Form des Kopfes, die Größe des Carapax, Augengröße und die Länge der Antennen und des Schwanzstachels. Doughty und Reznick (2004) bieten eine Übersicht zur phänotypischen Plastizität bei Tieren. Einige solcher Anpassungen lassen sich im Labor z.B. durch Kairomone induzieren, andere durch toxische Cyanobakterien (Gustafsson und Hansson, 2004). In diesen Kontext fällt auch die kurzfristige Steigerung der Toleranz gegenüber bestimmten Chemikalien durch Akklimation. Studien zur Toleranzentwicklung gegenüber Chemikalien bei Daphnien reichen von einfacher Vorexposition (Canli, 2006), auch „hardening“ genannt (Loeschcke und Sørensen, 2005), über die Bestimmung maternaler Effekte (LaMontagne und McCauley, 2001; Tsui und Wang, 2004), bis hin zu mehrere Generationen übergreifenden Experimenten. Hauptsächlich wurde dieser Themenbereich bei Daphnien bisher bezüglich verschiedener Schwermetalle untersucht (Muysen und Janssen, 2001; 2002; Bossuyt und Janssen, 2003; 2004; Tsui und Wang, 2005 a, b; Messiaen et al., 2012; De Coninck et al., 2013). Für diese Studien wurden entweder bereits differenzierte Klone aus unterschiedlich belasteten Gewässern entnommen (z.B. Ward und Robinson, 2005) oder kurzfristige Toleranzen an Laborstämmen untersucht. So existieren zur Toleranzentwicklung gegenüber Cd bereits grundlegende Daten (Bodar, et al., 1990; Stuhlbacher, et al., 1992; Muysen und Janssen, 2004; Guan und Wang, 2006).

Im 3. Kapitel der vorliegenden Arbeit wurde die Toleranz zweier Klone von *D. magna* durch Akklimatisation an eine sublethale Konzentration von Cd als Umweltschadstoff über 4 Generationen hinweg mittels streng standardisierten Kulturen im Labor gesteigert. Des Weiteren sollten die für Toleranzen grundlegenden molekularen Mechanismen, wie die Induktion von Hsp70 und Metallothionein (Mt) untersucht werden. Ein Verständnis der Hintergründe und Ursachen der Klon-spezifischen Variation der Sensitivität gegenüber Chemikalien ist bedeutsam für eine realistische Risikobewertung umweltbelastender Stoffe (De Coninck et al., 2013) und trägt auch dazu bei, deren weitreichenden Folgen auf der Ebene von Populationen genetisch unterschiedlicher Organismen zu charakterisieren (Guan und Wang, 2006).

Stressproteine spielen generell eine wichtige Rolle bei der Adaptation von Organismen (z.B. Lindquist, 1986; Sanders et al., 1991). In einigen Publikationen wird vermutet, dass Stressproteine besonders bei der Selektion von Toleranzen gegenüber Stressfaktoren wie Hitze oder Chemikalienexposition bei verschiedenen Organismen beteiligt sind (Sanders et al., 1991; Veldhuizen-Tsoerkan et al., 1991; Eckwert und Köhler, 1997; Köhler et al., 1999). Aufgrund von Befunden bei verschiedenen wirbellosen Tieren wurde die Hypothese formuliert, dass Toleranzen gegenüber Schadstoffen nicht ursächlich mit gesteigerten Level an Stressproteinen einhergehen (Köhler et al., 2000; Lansing et al., 2000). In einer Freilandstudie von Köhler et al. (2000) konnte beobachtet werden, dass verschiedene Bodenarthropoden in seit langer Zeit stark mit Schwermetallen belasteten Standorten niedrigere Hsp70-Level aufwiesen als solche in unbelasteten Lebensräumen. Unempfindlichkeit gegenüber Schwermetallen ging mit geringen Hsp70-Leveln einher. Auch Bettencourt et al. (1999) und Sørensen et al. (1999; 2001) konnten Korrelationen von niedrigen Hsp-Leveln und Toleranzen gegenüber verschiedenen Faktoren bei der Fruchtfliege *Drosophila* feststellen.

Die Hypothese, dass ein Selektionsdruck durch Schwermetalle auch bei Daphnien in einer höheren Frequenz von Phänotypen mit niedrigem Hsp-Level resultiert, wurde im 2. und 3. Kapitel dieser Arbeit experimentell überprüft. Da die langfristige Aufrechterhaltung hoher Level an Stressproteinen als Schutz- und Reparaturmechanismus auch erhebliche Energiekosten sowie weitere Nachteile wie verlängerte Entwicklungsdauer, höhere Sterblichkeit oder verringerte Reproduktion bei *Drosophila* bedingt (Krebs und Loeschcke, 1994; Krebs et al., 1998), könnten andere protektiv wirkende Mechanismen, z.B. die Induktion von Metallothioneinen (Mts) als spezifisch metallbindende Proteine, evolutiv bevorzugt werden (Köhler et al., 2000; Amiard et al., 2006).

Für *D. magna* existieren trotz des häufigen und weitreichenden Gebrauchs dieses Indikatororganismus in der Ökotoxikologie nur wenige Daten zum Schadstoffmetabolismus, besonders bezüglich Schwermetallen (Frayse et al., 2006). Erkenntnisse über das subzelluläre Verhalten von Metallen in Organismen ist eine Voraussetzung dafür, generationenübergreifende toxikologische Auswirkungen zu verstehen (Campbell et al., 2005). Toleranz gegenüber Schwermetallbelastung ist bei Invertebraten zumindest teilweise auf eine Bindung an zelluläre Liganden wie Mts zurückzuführen (Wallace et al., 2003). Auch der Entgiftungsprozess des nicht essentiellen Spurenelements Cd beruht auf einer Komplexierung durch Mts und anschließender Ausscheidung oder Anreicherung (Klaassen et al., 1999). In Studien von Guan und Wang (2004; 2006) sowie Fraysse et al. (2006) wurden Mts bei *D. magna* durch eine Exposition gegenüber Cd induziert.

Die Induktion von Mt wurde bereits mehrfach als Biomarker für Metallexposition vorgeschlagen (Amiard et al., 2006). Hierbei ergaben sich bisher jedoch Schwierigkeiten und Einschränkungen, weshalb auf diesem Gebiet noch viel Forschungsbedarf besteht (Frayse et al., 2006). Mts wurden bei Daphnien anhand verschiedener Kriterien charakterisiert, auch deren Induzierbarkeit durch Cd (Bodar et al., 1990; Stuhlbacher et al., 1992; Barata et al., 2002; Fraysse et al., 2006; Guan und Wang, 2006). Die Toxizität von Cd beruht vor allem auf der Freisetzung reaktiver Sauerstoffradikale, welche physiologische Prozesse stören, und bei ansteigenden Konzentrationen die Nahrungsaufnahme, das Wachstum und die Reproduktion von Daphnien verhindern. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass die Genotyp-spezifischen Unterschiede in der Toleranz von Daphnien gegenüber Cd vor allem bei auftretender Mortalität verstärkt sichtbar werden, sich jedoch bezüglich subletalen Wirkungen verminderten (Baird et al., 1990; Baird und Barata, 1998; Barata et al., 2000).

Cadmiumionen induzieren sowohl Hsps als auch Mts, wobei Unklarheiten zur Abhängigkeit der beiden Systeme bestehen (Baumann und Klaassen, 1993). Aus einer Studie von Sures und Zimmermann (2005) gibt es jedoch Hinweise auf einen tendenziellen Ersatz des Reparaturmechanismus der Stressproteine durch Mts während langfristiger Exposition der Muschel *Dreissena polymorpha* gegenüber verschiedenen Schwermetallen. In der im 3. Kapitel beschriebenen Studie sollten somit neue Erkenntnisse zur mikroevolutiven Entwicklung und einem eventuellen Trade-off zwischen dem Stressprotein- und Metallothioneinsystem gewonnen werden. Anhand dieser Ergebnisse sollte die Induktion von Hsp70 und Mt als mögliche Biomarker zur

umfassenden Beurteilung der Wirkung von Schadstoffen kritisch betrachtet und miteinander abgeglichen werden.

Neben der Belastung natürlicher Lebensräume aquatischer Organismen durch Chemikalien meist anthropogenen Ursprungs sind z.B. Daphnien auch physikalischen Stressfaktoren ausgesetzt. *D. magna* lebt in stehenden, kleinen, flachen, oft nur temporalen Gewässern, welche großen Temperaturschwankungen ausgesetzt sind. Verstärkt wird dieser Effekt durch die Klimaerwärmung (zusammengefasst in Sokolova und Lannig, 2008). In diesem Zusammenhang ist die Induktion von Hsp70 von fundamentaler Bedeutung da diese Proteinfamilie maßgeblich am Überleben von akutem Hitzestress beteiligt ist (Parsell und Lindquist, 1993). Demnach wäre von Organismen, welche an Schwermetalle angepasst sind und, damit einhergehend, niedrige Hsp70-Level aufweisen, eine niedrigere Toleranz gegenüber anderen Stressoren, wie Hitzestress, zu erwarten, was oft als „*cost of tolerance*“ bezeichnet wird (Medina et al., 2007). Die Erforschung der Rolle genetischer (inter-klonaler) Variation bei interaktiven Effekten von Chemikalien und natürlichen Stressoren ist in der Literatur recht gering vertreten (Holmstrup et al., 2010; Messiaen et al., 2012; De Coninck et al., 2013). Um die bereits erwähnte intraspezifische Variation von Hsp70-Leveln weiter zu verstehen, wurden 2 Klone von *D. magna* auf ihre „*cross-tolerance*“ gegenüber Hitzestress im generationsübergreifenden Testdesign des 3. Kapitels getestet. Adaptive Prozesse wie die Produktion von Hsp oder Mt sind energieaufwendig und können deshalb auch negative Fitness-konsequenzen mit sich bringen (Knops et al., 2001). So wurde auch für Daphnien eine verringerte Anzahl an Nachkommen verzeichnet, während sie einer chronischen Belastung mit Cd in geringer Konzentration ausgesetzt waren (De Coen und Janssen, 1997; Muysen et al., 2010). Hier können sich demnach ebenso Trade-offs ergeben. Im 3. Kapitel wurde somit ebenfalls untersucht, ob Cd-Toleranz bei *D. magna* auf Kosten der Reproduktion geht, und ob sich dies nach Akklimation gegenüber Cd ändert.

3. Material und Methoden

Experimenteller Aufbau

Die Haltung, Zucht und Exposition der Daphnien erfolgte für die Experimente mit Diclofenac und DMSO in Bechergläsern (Kapitel 1), und für diejenigen mit Cd in Aquarien aus Kunststoff (Kapitel 2 und 3). Das Zuchtwasser wurde 2 mal wöchentlich erneuert und dabei die Jungtiere von den Adulti getrennt. Hierzu wurde die Bechergläser über ein Gazesieb in jeweils ein anderes entleert und die Adulti in frisches Wasser überführt. Anschließend wurden die nun isolierten Jungtiere auf dieselbe Weise über ein Sieb mit feinerer Maschenweite vom alten Zuchtwasser getrennt und zur Weiterzucht bzw. Expositionsversuchen verwendet. Sämtliche Tests und Expositionsversuche, sowie die Haltung der Tiere und der Futteralgen erfolgte strikt synchronisiert in einer Klimakammer unter diffusem Licht von handelsüblichen Leuchtstoffröhren mit einem 16 h Tag und 8 h Nacht Zyklus. Die Temperatur wurde konstant auf 20 °C gehalten. Die Tiere wurden täglich mit der Grünalge *Scenedesmus subspicatus* ad libitum (Kapitel 1) bzw. entsprechend ihrem Alter gefüttert (Kapitel 2 und 3): 3×10^6 , 5×10^6 , und 6×10^6 Zellen/Tag pro Tier für die jeweiligen Altersstufen 0-7 Tage, 8-15 Tage, bzw. > 15 Tage. Die Algenkultur erfolgte in vollsynthetischem und sterilisiertem Kulturmedium unter konstanten Bedingungen. Zur Fütterung wurde das Medium abzentrifugiert und mit Daphnien-Kulturmedium resuspendiert. Die Ermittlung der Dichte an Algenzellen erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Für die in Kapitel 1 beschriebenen Experimente wurden die Daphnien durchweg in Kunstwasser gehalten, das in der ISO-Richtlinie 6341 (ISO, 1996) und in der OECD Guideline 202 (OECD, 2004) für Toxizitätstests mit *D. magna* empfohlen wird. Dieses Wasser diente auch als Testmedium und für alle Stammlösungen in sämtlichen Versuchen. Das fertige Kunstwasser wurde über Nacht (mindestens 12 Stunden) belüftet, bis es mit Sauerstoff abgesättigt war. Der pH-Wert lag dann bei 7,8 und die Gesamthärte bei 250 mg/L (als CaCO_3). Für die in Kapitel 2 und 3 beschriebenen Experimente wurde durchweg gefiltertes Leitungswasser verwendet, welches 4 Tage lang durch Belüftung in 50 L Kunststoff Fässern entchlort und welchem 1 µg/L Selen zugegeben wurde. Die folgenden Parameter wurden über die gesamte Studie eingehalten: pH 7.7, Gesamthärte (als CaCO_3) 250 mg/L. Für diese Experimente wurde eine Stammlösung mit 1g/L Cd mit CdCl_2 hergestellt, angesäuert (0.2

% HNO₃), ohne Veränderungen des pH Werts in den Testmedien. Allen Kontrollen wurde entsprechende Mengen angesäuertes Wasser (0.2 % HNO₃) zugegeben. Die Cd-Konzentrationen in den Testmedien wurden mittels Flammen-Atomabsorptionsspektralphotometrie (F-AAS, Perkin-Elmer M1100, Waltham, Massachusetts, USA) verifiziert. Die gemessenen Konzentrationen wichen nicht mehr als 10 % von den nominalen ab. In den Proben der Kontrollen waren die Cd-Konzentrationen unter dem Detektionslimit.

Im 1. Kapitel wurden die Auswirkungen unterschiedlicher Ansätze und Kombinationen des Lösungsmittels DMSO mit Diclofenac auf die Ergebnisse von Toxizitätstests sowie Hsp70-Level untersucht. Folgende Versuchsabläufe wurden evaluiert:

Ansatz D: Zunächst wurde Diclofenac ohne Lösungsmittel getestet und direkt in Kunstwasser gelöst.

Des Weiteren wurden Verschiedene Variationen der Kombination von Diclofenac mit dem Lösungsmittel DMSO getestet.

Diese methodisch unterschiedlichen Versuchsansätze werden im Folgenden mit den Kürzeln DD1, DD2, und DD3 bezeichnet.

Ansatz DD1: Diclofenac wurde in DMSO vorgelöst, in Kunstwasser pipettiert und aus dieser Stammlösung heraus die Testlösungen hergestellt. Diese Testlösungen wurden anschließend alle auf dieselbe Konzentration an DMSO gebracht.

Ansatz DD2: Diclofenac wurde in Kombination mit DMSO getestet, ohne es in DMSO vorgelöst zu haben. Die Testlösungen enthielten dieselbe Konzentration an DMSO.

Ansatz DD3: Des Weiteren wurde Diclofenac in Kombination mit DMSO getestet, wobei nicht, wie für DD1 beschrieben, alle unterschiedlichen Testkonzentrationen dieselbe Konzentration von DMSO enthielten, sondern die einzelnen Testlösungen auf dieselbe Weise hergestellt, aber nicht mit DMSO supplementiert wurden. Daraus ergab sich eine spezifische DMSO Konzentration für jede Testlösung entsprechend der Menge an enthaltenem Diclofenac, das in DMSO vorgelöst worden war.

Im 2. Kapitel dieser Arbeit wurde die Variabilität der Reaktionen im Daphnientest von mehreren Klonen von *D. magna* unterschiedlicher geographischer Herkunft auf das Schwermetall Cd (als Cd²⁺) untersucht. Fünf Klone, die aus Tümpeln bei Oxford, England; Moskau, Russland; Tvärminne, Finnland; Leuven, Belgien und München, Deutschland, stammten, wurden von der Ludwig-Maximilians-Universität, München, bezogen. Ein weiterer Klon wurde vom Umweltbundesamt, Dessau, bezogen, ein anderer stammte aus einem Tümpel bei Stuttgart. Jede klonale Kultur entstammte einem

parthenogenetischen weiblichen Tier und wurde an die hiesigen Kulturbedingungen über 5 Monate akklimatisiert. Anschließend wurden die 7 Klone hinsichtlich ihrer Cd-Toleranz mittels akuter Toxizitätstests sowie Hsp70-Level und deren Induktion durch Cd charakterisiert. Des Weiteren wurde die Aufnahme und Akkumulation an Cd gemessen.

Im 3. Kapitel dieser Arbeit wurden aus der vorherigen Studie diejenigen zwei *D. magna* Klone gewählt, welche sich am stärksten in ihrer Toleranz gegenüber Cd und Hsp70-Leveln unterschieden. Sie wurden entsprechend "Tolerant" (T) und "Sensitive" (S) genannt und synchronisiert sowie unter gleichen Bedingungen wie oben beschrieben im Labor über 4 Generationen an eine sublethale Konzentration von 5 µg/L Cd (als CdCl₂) akklimatisiert. Für beide Klone wurden Kontrollkulturen ohne CdCl₂ etabliert und unter ansonsten denselben Bedingungen gehalten. Während und am Ende der Akklimatisationszeit wurden akute Toxizitätstests durchgeführt, sowie die Hsp70-Level, die Mt-Expression und die Reproduktionsrate bestimmt.

Akute Immobilisationstests

Die Bestimmung der EC₅₀-Werte erfolgte standardisiert nach Richtlinie 202 der OECD (2004). Hierfür wurden 1 bis 24 h alte Daphnien verwendet, die man durch zweimaliges Absieben der Zuchtgefäße innerhalb von 24 h erhielt. Beim ersten Absieben des Inhalts eines Becherglases blieben die älteren Tiere auf dem Sieb zurück. Sie wurden in ein Becherglas mit Zuchtwasser überführt und nach 24 h zum zweiten Mal abgeseibt, wobei nur die inzwischen geschlüpften Tiere das Sieb passieren konnten. Von diesen bis zu 24 h alten Tieren wurden nach 1 h nur einwandfrei Vitale zum Test verwendet und geschädigte oder schwache Tiere entfernt. Als Testgefäße dienten Bechergläser mit einem Nennvolumen von 50 ml. Pro Testkonzentration und Kontrolle wurden 20 Tiere eingesetzt, verteilt auf 4 solcher Gefäße mit jeweils 5 Daphnien. Nach 48 h erfolgte die Bestimmung der Anzahl immobilisierter Tiere. Für die Bestimmung der LT₅₀-Werte wurde gleich verfahren, die Bechergläser wurden in Wasserbädern auf der entsprechenden Temperatur (20, 26, 28, 30 und 32 °C) gehalten.

Hsp-Bestimmung

Nach Exposition wurden wegen der geringen Körpergröße von Daphnien ca 8 Tiere gepoolt in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zur weiteren Untersuchung wurden die Proben unter Zusatz eines Extraktionspuffers homogenisiert und anschließend zentrifugiert. Aus dem Überstand konnte der Gesamtproteingehalt nach Bradford (1976) bestimmt werden. Daraufhin wurden jeweils aus dem Überstand gleiche Proteinmengen (30 µg) mit Hilfe einer Minigel-SDS-PAGE analysiert. Mittels Elektrotransfer wurden die Proteine auf Nitrozellulosemembranen übertragen, mit Antikörpern inkubiert und anschließend durch eine Peroxidasefärbereaktion immunochemisch detektiert (1. Antikörper: *mouse anti-human hsp70* IgG; 2. Antikörper: *goat anti-mouse* IgG, Peroxidase-Konjugat). Abschließend erfolgte eine densitometrische Quantifizierung der Proteinbanden.

Metallothionein-Bestimmung

Gesamt-RNA wurde mit der Trizol-Extraktionsmethode (Invitrogen) isoliert. Diese beinhaltete einen DNA-Verdau, um eine Verunreinigung mit genomischer DNA auszuschließen. Anschließend wurde cDNA mit oligo-dT oder *random hexamer primers* mittels HMinus Reverse Transcriptase (Fermentas) synthetisiert. Die Mt- und die 18S-rRNA qPCR Primersequenzen (*access numbers* DV437826 bzw. AF070104) wurden von Poynton et al. (2008) übernommen. Die PCR Reaktionen wurden in 3 technischen Replikaten pro biologischem Replikat durchgeführt. Die Amplifikation der cDNA fand unter Gebrauch von PerfeCta SYBR Green Super Mix (Quanta Biosciences) in einem Bio-Rad CFX384 Real Time PCR System (Bio-Rad) mit folgendem Programm statt: 95 °C für 2 min, 40 Zyklen mit 95 °C für jeweils 15 s, und 60 °C für 1 min. Die Expressionlevel für Mt wurden gegenüber denen des 18s-rRNA *housekeeping* Genes normalisiert. Die Quantifizierung der relativen Genexpressionslevel erfolgte mit CFX Manager Software (Bio-Rad).

Reproduktion

Die Reproduktionsrate wurde gemäß der OECD Guideline 211 (OECD, 2008) erfasst. 10 Replikate mit 1 Individuum (<24h alt) wurden jeweils in 50-ml Bechergläsern gehalten. Das Testmedium wurde in allen Ansätzen und Kontrollen alle 2 Tage erneuert. Die Mortalität der Elterntiere und die Anzahl lebender Nachkommen wurden täglich erfasst. Letztere wurden täglich entfernt und die Reproduktionsrate der Daphnien wurde als Nachkommen per adultem Tier über 21 Tage ermittelt.

4. Ergebnisse und Diskussion

Kapitel 1: Haap, T., Triebskorn, R., Köhler, H.-R., 2008. Acute effects of diclofenac and DMSO to *Daphnia magna*: immobilisation and hsp70 induction. *Chemosphere* 73, 353-359.

Das erste Kapitel widmet sich dem weitläufigen Problem des oftmals unumgänglichen Einsatzes von Lösungsmitteln in ansonsten ausgefeilt standardisierten Toxizitätstestsystemen. Hierfür verbindet diese Studie die Durchführung akuter Toxizitätstests nach der OECD Richtlinie 202 mit biochemischen Untersuchungen zum Hsp70-Level bei *D. magna*. Des Weiteren wurden im akuten Toxizitätstest das Antirheumatikum Diclofenac in mehreren Versuchsansätzen auf unterschiedliche Weise mit dem Lösungsmittel DMSO kombiniert.

Diclofenac erwies sich als singuläre Testsubstanz geringfügig toxischer als in Kombination mit DMSO. Insgesamt ergaben sich die höchsten EC₅₀-Werte für diejenigen Versuchsansätze, in denen Diclofenac in DMSO vorgelöst wurde. Die EC₅₀-Werte für die verschiedenen Versuchsansätze mit Diclofenac und DMSO unterschieden sich jedoch weitaus weniger voneinander als publizierte EC₅₀-Werte aus verschiedenen Literaturangaben mit Diclofenac als singulärer Substanz (vgl. Tab. 1). DMSO übte demnach eine schwach antagonistische Wechselwirkung mit Diclofenac gegenüber *D. magna* im akuten Toxizitätstest aus. Über die chemischen und molekularen Hintergründe hierfür kann an dieser Stelle nur spekuliert werden. Denkbar wäre eine Art therapeutischer Effekt des DMSO bei hohen Konzentrationen an Diclofenac durch eine unbekannte Beeinflussung der Wirkungsweise (*mode of action*), des allgemeinen Stoffwechsels oder von Entgiftungsenzymen. Eine andere Erklärung könnte die Beeinflussung der Diclofenac-Aufnahme und -Bioverfügbarkeit, sowie der Menge und der Form des gelösten Diclofenac im Testmedium oder dessen Verteilung, beziehungsweise die Adhäsion an den Testgefäßen betreffen. Viele Umweltchemikalien und die meisten NSAIDs zeichnen sich durch einen unspezifischen, narkotischen Wirkungsmechanismus (auch *baseline toxicity* genannt) infolge einer Beeinträchtigung von Plasmamembranen aus, so auch Diclofenac (Cleuvers, 2003; Escher et al., 2005). Hierbei steht die Wirkungsstärke einer Substanz oder Mixtur in direkter Relation zu ihrer Lipophilität (KOW) (Van Leeuwen et al., 1992; Verhaar et al., 1992). Der genaue Wirkungsmechanismus ist nicht geklärt, doch spielen die Störung der

Phospholipiddoppelschicht, Veränderungen der Membranfluidität, die Störung von Membranproteinen und Wechselwirkungen zwischen Membrankomponenten eine Rolle (Fent, 2013).

DMSO besitzt membranstabilisierende Eigenschaften (Plotnikov et al., 1990; Smith et al., 1998), deren genaue Hintergründe ebenfalls nicht vollständig geklärt sind (Ali, 2001). Denkbar wäre aber demzufolge eine protektive Wirkung von DMSO gegenüber Diclofenac bezogen auf die Zellmembranen in *D. magna*. Mit der strukturellen Desorganisation von Membranen ist auch oft das Entstehen freier Radikale verbunden. Sie entstehen bei zahlreichen physiologischen Prozessen und bei der Biotransformation vieler Fremdstoffe und schädigen zelluläre Moleküle aufgrund ihrer hohen Reaktivität, was als oxidativer Stress bezeichnet wird. Viele pharmakologische Wirkungen von DMSO können auf seine Eigenschaft als Radikalfänger zurückgeführt werden: DMSO kann freie Hydroxylradikale und sein Metabolit Dimethylsulfid freie Sauerstoff-Radikale abfangen (Carpenter et al., 1994). Obwohl Diclofenac nicht zu den Substanzen zählt, deren Toxizität bekanntermaßen hauptsächlich auf oxidativer Schädigung beruht, ist eine Begründung der schwachen antagonistischen Wechselwirkung von DMSO mit Diclofenac gegenüber *D. magna* im akuten Toxizitätstest auch auf diese Weise denkbar. Trotz einer weltweiten Anwendung von Diclofenac sowie DMSO wurden bisher relativ wenige Studien zur ökotoxikologischen Bewertung dieser Substanzen mit Biomarkern durchgeführt. Gleichmaßen wurde *D. magna* trotz seines Status als Modellorganismus und seiner häufigen Verwendung in ökotoxikologischen Studien wie erwähnt bislang nur spärlich bezüglich seiner Fähigkeit zur Induktion von Stressproteinen untersucht. So wurde in der vorliegenden Studie erstmals die Proteotoxizität von Diclofenac gegenüber *D. magna* untersucht. Es ergaben sich statistisch signifikante Erhöhungen der Hsp70-Level ab einer Expositionskonzentration von 40 mg/L Diclofenac als Einzelsubstanz, bzw. ab 30 mg/L Diclofenac mit 0,6 ml/L DMSO. Trotz dieser leicht unterschiedlichen LOECs (*Lowest Observed Effect Concentration*) zeigte DMSO im Vergleich der Toxikokinetik für Diclofenac alleine bzw. in Kombination mit DMSO kaum Auswirkungen und verhielt sich in den verwendeten Konzentrationen im Wesentlichen neutral. Die mit Hilfe von Regressionskurven bestimmten Werte für die EC₅₀ der maximalen Hsp70-Stressantwort lagen ungefähr im selben Größenbereich wie die EC₅₀-Werte der akuten Toxizitätstests. Zusammenfassend hatte DMSO für die Proteotoxizität von Diclofenac kaum Auswirkungen und verhielt sich in den verwendeten Konzentrationen als Lösungsmittel neutral. Von Hallare et al. (2004; 2006) wurde die

Proteotoxizität von DMSO gegenüber Embryonen des Zebrafisches *Danio rerio* anhand der Bestimmung von Hsp70-Leveln untersucht. Die Autoren konnten das Lösungsmittel auf Grund ihrer Befunde nur bis zu Konzentrationen von 0,1 ml/L für Versuche zur Proteotoxizität bei *D. rerio* Embryonen empfehlen. Dies konnte für *D. magna* anhand der eingesetzten Konzentration von 0,6 ml/L nicht bestätigt werden. Somit kann DMSO als Lösungsmittel generell für Studien mit *D. magna* empfohlen werden, mit der Einschränkung, dass mit anderen Substanzen als Diclofenac völlig andere Wechselwirkungen auftreten können. Es existiert jedoch kein universell einsetzbares Lösungsmittel, sondern es muss für jeden Testorganismus und jede Testsubstanz individuell ein Lösungsmittel und dessen Art und Weise der Applikation gefunden werden, welches den geringsten Einfluss auf die Testergebnisse ausübt (Calleja und Persoone, 1993).

Die in der vorliegenden Arbeit im akuten Toxizitätstest ermittelten EC₅₀-Werte für Diclofenac (mit und ohne DMSO) liegen im Bereich von 39,9 bis 69,8 mg/L und sind mit den Angaben in anderen Arbeiten vergleichbar. Aus den Untersuchungen zum Hsp70-Level ergaben sich die LOECs von 30 und 40 mg/L für Diclofenac mit bzw. ohne DMSO. Die hieraus ableitbare PNEC (*Predicted No Effect Concentration*: Geschätzte Konzentration einer Umweltchemikalie, welche aufgrund von Toxizitätstests keine toxischen Wirkungen erzeugt) läge selbst unter Berücksichtigung der höchsten Sicherheitsfaktoren (1000 nach OECD und EU, 200 nach ECETOC (Fent, 2013)), welche in die Berechnung der PNEC eingehen, noch deutlich über der PEC (*Predicted Environmental Concentration*) der EU (2001). Im Gegensatz zu akuten Labortests werden häufig mit spezifischen, nicht standardisierten und meist chronischen Tests, welche differenziertere Endpunkte beinhalten, genauere Ergebnisse mit ökologischer Relevanz erzielt (Henschel et al., 1997). Eine LOEC für Diclofenac im umweltrelevanten Konzentrationsbereich von 1 µg/L ermittelten Triebskorn et al. (2004) und Schwaiger et al. (2004) aufgrund von ultrastrukturellen Veränderungen in den Nieren adulter Regenbogenforellen. Eine Beschränkung der Untersuchungen auf akute Standardtests zur ökotoxikologischen Risikoabschätzung hätte diesen Vergleichen von Toxizitätsdaten zufolge zu einer Unterschätzung des Gefährdungspotentials von Diclofenac für aquatische Organismen geführt. Weitere Untersuchungen sollten also auf die Erfassung der chronischen Toxizität zielen, hierbei wäre die Entwicklung spezifischer Testverfahren erstrebenswert. Dieser Ansatz wird unter anderem in den folgenden Kapiteln aufgegriffen.

Kapitel 2: Haap, T., Köhler, H.-R., 2009. Cadmium tolerance in seven *Daphnia magna* clones is associated with reduced hsp70 baseline levels and induction. *Aquatic Toxicology* 94, 131-137.

In der zweiten Studie dieser Arbeit konnte eine relative Toleranz von *D. magna* gegenüber Cd mit niedrigen Hsp70-Leveln in Zusammenhang gebracht werden. Hierzu wurden sieben Klone ursprünglich unterschiedlicher geographischer Herkunft mit dem nach OECD standardisierten akuten Toxizitätstest (OECD, 2004) hinsichtlich ihrer Toleranz gegenüber Cd charakterisiert. Das Maß hierfür, die jeweiligen EC₅₀-Werte, wurden für jeden Klon mit seinen konstitutiven Hsp70-Leveln sowie den induzierten Leveln nach Exposition gegenüber einem Cd Konzentrationsgradienten korreliert. Zum Verständnis der Hintergründe für die Unterschiede zwischen den *D. magna* Klonen wurde die jeweilige Cd-Aufnahme der verschiedenen Klone ebenfalls untersucht.

Da die Tiere jedes Klons 5 mal über 2 Generationen hinweg getestet wurden und sich die jeweilige Toleranz konsistent zeigte, kann von genetischer Fixierung dieser Eigenschaft ausgegangen werden (Baird und Barata, 1998). Zusätzlich konnten durch die lange Akklimationszeit von 4 Monaten vor dem Beginn der Experimente maternale Effekte und physiologische Akklimation ausgeschlossen werden (vgl. Lam, 1999; Lopes et al., 2004; 2006).

Bei sich zyklisch parthenogenetisch vermehrenden *Daphnia* Arten kann eine rasche mikroevolutiv bedingte Veränderung ökologisch relevanter Eigenschaften angenommen werden (Spitze, 1991; Weber und Declerck, 1997; Declerck et al., 2001). Dies wiederum lässt ein großes Potential bei diesen Organismen vermuten, sich an Schadstoffe in der Umwelt anzupassen (Hairston et al., 1999; Barata et al., 2002). Im Zuge der Anpassung natürlicher Populationen an lokale Gegebenheiten betrifft die Selektion bei interklonaler Variation zuallererst die Stärke der Ausprägung gewisser Merkmale (Lynch und Gabriel, 1983). Dies trifft auch auf die Regulation der evolutiv stark konservierten Gene für Stressproteine zu (Ketola et al., 2004; Pauwels et al., 2005; 2007). So kann in Populationen, die seit langem unter Selektionsdruck stehen, wie z.B. in Schwermetall-belasteten Habitaten, die Intensität der Expression von Hsps evolutiv verändert werden (Knigge und Köhler, 2000; Morgan et al., 2007).

Vor dem Hintergrund der vielfältigen und essentiellen Schutz- und Reparaturfunktionen, welche von Hsps in diesem Zusammenhang erfüllt werden, wäre zu erwarten, dass im

Zuge der mikroevolutiven Anpassung, z.B. an Schwermetall-belastete Standorte, erhöhte Level von Hsps durch die natürliche Selektion bevorzugt werden (Parsell und Lindquist, 1993; Krebs und Loeschcke, 1994; Bond und Bradley, 1995; Feder und Hofmann, 1999; Sanders und Martin, 1993). So verzeichnen tatsächlich die meisten Feldstudien eine veränderte Expression von Hsps in Populationen von Organismen, welche einem lang andauernden Selektionsdruck ausgesetzt waren, so z.B. in historisch mit Metallen verschmutzten Habitaten (Eckwert und Köhler, 1997; Knigge und Köhler, 2000), oder aus klimatisch extremen Umgebungen (Dietz und Somero, 1994; Sørensen et al., 2005). Allerdings scheint die Richtung solcher evolutionärer Anpassungen von Hsp-Leveln zu divergieren. Neben vereinzelt Berichten über erhöhte Hsp-Level in Populationen unter solchen Langzeitstress-Bedingungen wurde jedoch wesentlich öfter das Gegenteil beobachtet: In vielen Studien, welche Stressantworten von Populationen mit deren jeweiligen Vorgeschichten an Stressfaktoren abglichen, schienen Phänotypen mit niedrigeren Hsp-Leveln evolutionär bevorzugt zu sein (Sørensen et al., 2003). Beispiele aus der Literatur betreffen baltische Muscheln, welche an extrem niedrige Salinität angepasst sind, mit auffallend niedrigen Hsp-Leveln im Vergleich zu Tieren derselben Art aus der Nordsee (Brown et al., 1995; Tedengren et al., 1999). In Selektionsexperimenten mit *Drosophila* war die Expression von Hsp70 niedriger in Stämmen, welche über eine Vielzahl an Generationen einer stressreichen Umgebung ausgesetzt waren (Bettencourt et al., 1999, Sørensen et al., 1999; Lansing et al., 2000). Auch natürliche Populationen von *Drosophila*, welche aus klimatischen Extremen stammten, konnten mit niedrigen Hsp70-Leveln charakterisiert werden (Sørensen et al., 2001; Zatsepina et al., 2001). Bezüglich Stressantworten gegenüber Umweltschadstoffen konnte dasselbe Phänomen bei saprophagen Bodenarthropoden (Collembola, Isopoda und Diplopoda) und Springschrecken (Tetrix) beobachtet werden (Köhler et al., 1999; Köhler et al., 2000; Arts et al., 2004; Warchalowska-Sliwa et al., 2005), welche allesamt chronisch gegenüber Schwermetallen in historisch verschmutzten Gebieten exponiert waren.

Diese Befunde konnten in der vorliegenden Arbeit auch für *D. magna* Klone unterschiedlicher geographischer Herkunft bestätigt werden. Diese zeigten die Assoziation von Toleranz gegenüber Cd mit niedrigen Hsp-Leveln. Die Gründe für diesen auf den ersten Blick paradoxen Zusammenhang könnten in den negativen Folgen für die Fitness zu suchen sein, welche langfristig erhöhte Hsp-Level den entsprechenden Organismen bzw. Populationen aufbürden (Krebs und Loeschcke, 1994; Kristensen et al.,

2008). Wenn die proteotoxische Wirkung eines Schadstoffs verhindert werden kann und eine Induktion von Hsps nicht zwingend notwendig ist, um starker akuter Proteotoxizität entgegenzuwirken, sind energetisch bezogene Trade-offs zwischen erhöhter Synthese von Hsps und alternativen Mechanismen zur Anpassung an die jeweiligen Umweltbedingungen wahrscheinlich (Sørensen et al., 1999; Lewis et al., 2001; Sørensen und Loeschcke, 2002).

Für die toleranteren Klone, besonders Klon K, ist somit ein weiteres Schutzsystem anzunehmen, welches den Anteil an ungebundenem Cd reduziert (*spillover*), welches überhaupt erst proteotoxisch wirksam werden kann. Auf diese Weise könnte die Schwelle der Induktion für Hsp70 verschoben werden, und diese Stressproteinfamilie erst exprimiert werden, wenn diese erste Linie einer möglichen Metallentgiftung überschritten würde (Arts et al., 2004). Metallothioneine (Mts) stellen in diesem Zusammenhang wohl den wahrscheinlichsten derartigen Schutzmechanismus bei Daphnien dar (Amiard et al., 2006; Fraysse et al., 2006) und sind Gegenstand des Kapitels 3 dieser Arbeit. Die Akkumulation von Cd in Daphnien zeigte jedoch keine Korrelation mit der Immobilität oder Hsp70-Leveln. Es kann deshalb angenommen werden, dass die Gesamtmenge an resorbiertem Cd weniger relevant ist als die Menge, welche bioreaktiv verfügbar ist und ihre proteotoxische Wirkung in den sensitiveren Klonen entfalten konnte.

In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, dass Bioassays mit Daphnien, in welchen unterschiedliche Klone eingesetzt werden, auch unterschiedliche Ergebnisse erbringen, obwohl sie unter streng eingehaltenen und identischen Bedingungen sowie simultan durchgeführt wurden. Der Parameter „Identität des Klons“ stellt somit ein wichtiger und nicht zu vernachlässigender Störfaktor in der Anwendung solcher Testsysteme dar, welcher die Reproduzierbarkeit und die Interpretation der Ergebnisse stark erschweren kann (Barata et al., 2002; Picado et al., 2007). Auch in Bezug auf die Verwendung von Hsp70 als Biomarker sind die vorliegenden Ergebnisse relevant, da die beobachteten Toleranzunterschiede innerhalb der Art *D. magna*, welche vermutlich mikroevolutiver Anpassung entspringen, negativ mit den gemessenen Hsp70-Leveln als Marker für Proteintoxizität korrelieren.

Kapitel 3: Haap, T., Schwarz, S., Köhler, H.-R., 2015. Hsp70 and metallothionein trade-off against one another in *Daphnia magna* cross-tolerance to cadmium and heat stress. Aquatic Toxicology, submitted.

Die dritte Studie sucht den im vorigen Kapitel beschriebenen Zusammenhang zwischen Stresstoleranz und niedrigen Hsp70-Leveln bei *D. magna* weiter zu erklären. Zu diesem Zweck wurden aus den 7 Klonen der Studie des vorherigen Kapitels zwei Klone ausgewählt, die sich am stärksten hinsichtlich ihrer Toleranz gegenüber Cd im akuten Toxizitätstest nach OECD und ihrer Hsp70-Level unterschieden. Es konnte mit einem mehrere Generationen umspannenden Akklimations-Experiment im Labor die Toleranz der Tiere beider Klone gegenüber Cd, aber nicht gegenüber Hitze leicht angehoben werden. Die beiden Klone unterschieden sich in ihrer Toleranz, aber auch hinsichtlich ihrer Hsp70-Level, der Expression von Mt sowie ihrer Reproduktionsrate in einer charakteristisch gegensätzlichen Weise: Die Individuen von Klon T wiesen eine hohe Toleranz gegenüber Cd und Hitzestress auf. Des Weiteren waren sie durch niedrige Hsp70-Level und Anzahl an Nachkommen, andererseits aber eine höhere Mt-Expression charakterisiert. Das Gegenteil traf auf Klon S für alle diese Parameter zu. Es ließen sich daraus zwei abgrenzbare Strategien im Hinblick auf die Hsp70-Level und die Mt-Expression zum Umgang mit der Cadmiumbelastung erkennen: Zum einen das Abfangen der Cd Ionen und somit die unmittelbare Bekämpfung des Stressors durch Mt, zum anderen die Reparatur und Eindämmung der Schäden an Proteinen durch Hsp70. Es ließ sich hierin eine Trade-off Beziehung zwischen Hsp70 und Mt erkennen. Dieses Muster zeigte sich auch in den unterschiedlichen Fortpflanzungsstrategien der beiden Klone: Die Individuen von Klon T zeichnet im Allgemeinen und unabhängig von Akklimation eine geringere Anzahl von Nachkommen aus. Dies weist, zusammen mit der höheren Cd Toleranz der Tiere, auf eine Verlagerung der Energieinvestition von der Fortpflanzung eher hin zu Entgiftungsmechanismen und somit Langlebigkeit im Zuge einer Anpassung in der mikroevolutiven Vorgeschichte hin, was sich in der höheren Mt-Expression widerspiegelt. Derartige Fitness Trade-offs sind bei chronischer Umweltbelastung nicht unwahrscheinlich, zahlreiche Studien haben gezeigt, dass Anpassung an Schadstoffe mit erhöhten Fitnesskosten verbunden ist (Xie und Klerks, 2004; Kwok et al., 2009). Dasselbe trifft auch auf Stressproteine zu, deren Synthese und Aufrechterhaltung erhöhter Level energieaufwendig ist und durchaus negative Fitnesskonsequenzen mit sich bringen kann (Roberts und Feder, 2000; Silbermann und Tatar, 2000), besonders in Populationen

unter konstantem Stress in belasteten Habitaten (Sørensen et al., 2003; Barua et al., 2008; Sokolova et al., 2012).

Die Cd-Konzentration von 5 µg/L wurde gewählt, weil sie in der Umwelt regelmäßig in belasteten Gewässern vorgefunden wird (Bervoets und Blust, 2003; Lopes et al., 2006; Messiaen et al., 2010). Die Konzentration erwies sich dennoch als ausreichend, nach 4 Generationen der Akklimation alle gemessenen Parameter bei beiden *D. magna*-Klonen zu beeinflussen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit früheren Untersuchungen ähnlicher Art, welche die Auswirkungen von Akklimation von *D. magna* an sublethale Cd-Belastung über mehrere Generationen erfassten. Muysen und Janssen (2004) konnten beispielsweise einen Anstieg der Toleranz im akuten Toxizitätstest (48-h EC₅₀) mit einem Faktor von 7.2 beobachten, nachdem *D. magna* für einige Generationen einer geringen Cd Konzentration ausgesetzt wurden. Andere generationenübergreifende Studien mit Daphnien dokumentierten ebenfalls einen Anstieg der akuten Cd Toleranz durch physiologische Akklimation. Dies jedoch in geringerem Ausmaß, so auch in der vorliegenden Studie (LeBlanc 1982; Guan and Wang, 2006; Muysen et al., 2010). Die leicht erhöhte Reproduktionsrate der Tiere beider Klone nach der Akklimationsphase kann als Hormesis erklärt werden, welcher als stimulativer Effekt, ausgelöst durch sublethale Konzentrationen eines Schadstoffs, definiert wird. Hormesis wurde bei der Reproduktion von Daphnien in Akklimations-Experimenten des Öfteren beobachtet (Bodar et al., 1988; Elnabarawy et al., 1986; Muysen und Janssen, 2004; Guan und Wang, 2006).

Im Großen und Ganzen betrachtet führte die Vorexposition in beiden Klonen zu einer stärkeren Hochregulation von Hsp70 und Mt als Reaktion auf die niedrigen Cd-Konzentrationen im Konzentrationsgradienten. Hier ist anzumerken, dass die erniedrigten maximalen Induktionslevel der akklimatisierten Daphnien von Klon S als Reaktion auf die höchsten Cd-Konzentrationen sowie gleichermaßen die höchsten Temperaturen einen wohl bereits "geschwächten" Zustand, verursacht durch die Vorexposition, widerspiegelt. Dies ist besonders am Rückgang der Hsp70-Level bei akuter Einwirkung von hoher Temperatur (33°C) und Cd-Konzentration (300 µg/L) und auch an der geringeren Mt-Expression bei diesen Tieren zu erkennen.

Erklären lässt sich dieses Phänomen durch die charakteristische Reaktionskinetik der Stressprotein-Antwort, welche einer Optimumskurve entspricht. Ansteigender proteintoxischer Stress führt demnach zu erhöhten Hsp70-Werten; eine Überlastung des Systems und zu starke zelluläre Schädigungen führen jedoch zu niedrigeren Werten.

Extrem starke oder sich addierende Belastungen (wie bei dem ohnehin Cd-sensitiven Klon S) können demnach auch zu niedrigen Hsp-Leveln führen (Hofmann und Somero, 1996; Schill et al., 2003; Hofmann, 2005). Die Beeinträchtigung biochemischer Prozesse können hierbei vielfältig sein, z.B. der negative Effekt von Cd auf die zelluläre Kapazität zur Biosynthese, Transkription oder Translation (Pytharopoulou et al., 2006) oder der Mangel an Energie zur Synthese und Funktion von Hsp70/Mt (Lannig et al., 2006; 2008; Sokolova und Lannig, 2008; Ivanina et al., 2009).

Es wird regelmäßig von verschiedenen Autoren von genetischen Unterschieden sowohl unter Populationen von *D. magna* im Labor als auch im Freiland berichtet, welche zu unterschiedlichen Ergebnissen in Toxizitätstests und Biomarkeranwendungen führen, so wie auch in der vorliegenden Studie (Barata et al., 2002; Bossuyt and Janssen, 2005; Oda et al., 2007). Obwohl die genetische Variation in der Toleranz gegenüber einem einzelnen Stressor häufig beschrieben wird, wurde die genetische Variation bei interaktiven Effekten zweier Stressoren fast nicht untersucht (Muysen et al., 2010; De Coninck et al., 2013). So ist nach Sokolova und Lannig (2008) die langfristige Akklimation ein wichtiger aber wenig studierter Aspekt der Interaktion zwischen Umweltbelastung und Temperaturstress, eben auch im Zusammenhang der Klimaerwärmung. In der vorliegenden Studie wurde die *cross-tolerance* gegenüber akutem Hitzestress nach Cd-Akklimation über 4 Generationen bei den beiden *D. magna* Klonen getestet, welche sich bedeutend in ihrer Cd-Toleranz und ihrem Hsp70-Level unterschieden.

Hierbei könnte man annehmen, dass die generell bei Klon S höheren Hsp70-Level, welche induziert wurden, um dem einen Stressor (Cd) entgegen zu wirken, auch gegen einen anderen (Hitze) schützen (Feder und Hofmann, 1999; Paul et al., 2004). Hallare et al. (2005) konnten beispielsweise beobachten, dass Zebrafischembryonen bei erhöhten Temperaturen weniger sensibel gegenüber Cd reagierten, was auf die höhere Expression von Hsp70 zurückgeführt wurde. In dieser Studie bedingten die hohen Hsp70-Level, welche den Cd-sensitiven Klon S charakterisierten, keine *cross-tolerance* in Bezug auf Hitzestress. Es kann nur über die Gründe für die Hitzetoleranz von Klon T spekuliert werden, z.B. hinsichtlich unterschiedlicher Hsp70 Isoformen oder in Bezug auf Faktoren, welche die Aktivität von Hsp70 modulieren (Favatier et al., 1997; Kabani und Martineau, 2008). Die Cd-Akklimatisation erbrachte keine signifikante Veränderung der Hitzetoleranz; im Höchstmaß zeigten sich die Cd-akklimatisierten Daphnien von Klon S geringfügig schwächer hitzetolerant als die Kontrollen.

Obwohl das umweltrelevante Schwermetall Cd zu den bestuntersuchten Umweltchemikalien gehört, sind alle biochemischen Wirkmechanismen bei Invertebraten nicht vollständig geklärt (Soetaert et al., 2007). Es lässt sich allerdings festhalten, dass Mt bei Daphnien einen der bedeutendsten Toleranzmechanismen darstellt (Guan und Wang, 2004; Fraysse et al., 2006; Poynton et al., 2007; Tsui und Wang, 2007). Die Exposition gegenüber Cd bewirkte bei beiden Klonen demnach eine verstärkte Expression von Mt, wie auch schon in früheren Studien beschrieben wurde (Shaw et al., 2007; Poynton et al., 2008). Im vorliegenden Kapitel lässt sich neben der vergleichsweise großen Resistenz von Klon T im Vergleich zu Klon S auch die leicht erhöhte Toleranz beider Klone nach der Akklimation auf die erhöhte und schon bei niedrigen Konzentrationen erkennbare Expression von Mt zurückführen. Diese Ergebnisse decken sich mit denen früherer Studien physiologischer Akklimation von *D. magna* gegenüber Cd (Amiard et al., 2006; Guan und Wang, 2006).

Die Aufnahme und Akkumulation von Cd in Individuen der beiden Klone wurde bereits im 2. Kapitel dieser Arbeit untersucht und verglichen. Hierbei konnten keine Unterschiede festgestellt werden, welche die charakteristischen Unterschiede in Toleranz, Hsp70-Leveln oder Mt-Expression hätten erklären können (Haap und Köhler, 2009). Auch für diesen Umstand gibt es Übereinstimmungen mit früheren Studien (Klerks und Weis, 1987). Folglich scheint die Fähigkeit, Cd binden und transportieren zu können, verantwortlich für die Resistenz von Klon T zu sein, unabhängig vom absoluten Gehalt an Cd in den Organismen. Dieser Klon scheint Cd „entgiften“ zu können, offensichtlich durch Mt, im Gegensatz zum Cd-sensiblen Klon S, dessen Individuen viel eher auf durch Cd verursachte intrazelluläre Proteinschädigung mit erhöhten Hsp70-Leveln reagieren müssen. Dieser Trade-off zwischen Mt und Hsp70 konnte im vorliegenden Kapitel zum ersten mal bei *D. magna* als Modellorganismus beschrieben werden.

5. Synthese

Toxizitätstests mit *Daphnia magna* sind Grundpfeiler der ökotoxikologischen Bewertung von Chemikalien. Sie sind standardisiert; dennoch weisen die betrachteten Zielparameter, wie der EC₅₀ (OECD Richtlinie 202) und die Reproduktionsrate (OECD Richtlinie 211), teils erhebliche Unterschiede im Vergleich mehrerer Labors auf. Verschiedene Störfaktoren können hierfür verantwortlich sein (Abb. 1).

(1) Art der Chemikalienapplikation: Zahlreiche Chemikalien sind schwer wasserlöslich und bedürfen Lösungsvermittlern zur Exposition im Toxizitätstest und in Biomarkerstudien. In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Methoden und Kombinationen der Lösungsmittelapplikation untersucht. Die exemplarisch ausgewählten Substanzen Diclofenac und DMSO (Lösungsmittel) zeigten eine leicht antagonistische Wirkung im akuten Daphnientest (EC₅₀). Für einen anderen Endpunkt (Hsp70-Level) konnte kein Effekt von DMSO auf die Proteotoxizität von Diclofenac beobachtet werden.

(2) Genetische Disposition: In der vorliegenden Arbeit konnten genetische Unterschiede zwischen 7 Klonen von *D. magna* unterschiedlicher geographischer Herkunft bezüglich der Cd-Toleranz (EC₅₀) und der Hsp70-Stressantwort auf Cd-Exposition festgestellt werden. Auf diese Weise zeigte sich eine Korrelation von Cd-Toleranz mit niedrigen Hsp70-Leveln, welche nicht durch entsprechende Unterschiede in der Akkumulation von Cd bei den untersuchten Klonen zu erklären war.

(3) Mikroevolutive Prädisposition: An Zweien dieser Klone konnte gezeigt werden, dass eine 4 Generationen dauernde Akklimation gegenüber einer sublethalen Cd-Konzentration deren Cd-Toleranz geringfügig erhöhen konnte, nicht aber deren Hitzetoleranz. Des Weiteren zeigte sich bei den beiden Klonen ein Trade-off zwischen der Sequestrierung von Cd²⁺-Ionen und somit der unmittelbaren Bekämpfung des Stressors dienenden Induktion von Metallothionein und der Eindämmung möglicher Proteinschädigung dienender Induktion von Hsp70 im Umgang mit der Cd-Belastung. Die vorliegenden Ergebnisse verdeutlichen, dass sich unterschiedliche mikroevolutive Vorgeschichten einzelner Daphnienklone einerseits in den Resultaten akuter und chronischer ökotoxikologischer Tests niederschlagen können, sowie andererseits auch bei der Interpretation von Hsp70 und Metallothionein als Biomarker beachtet werden müssen.

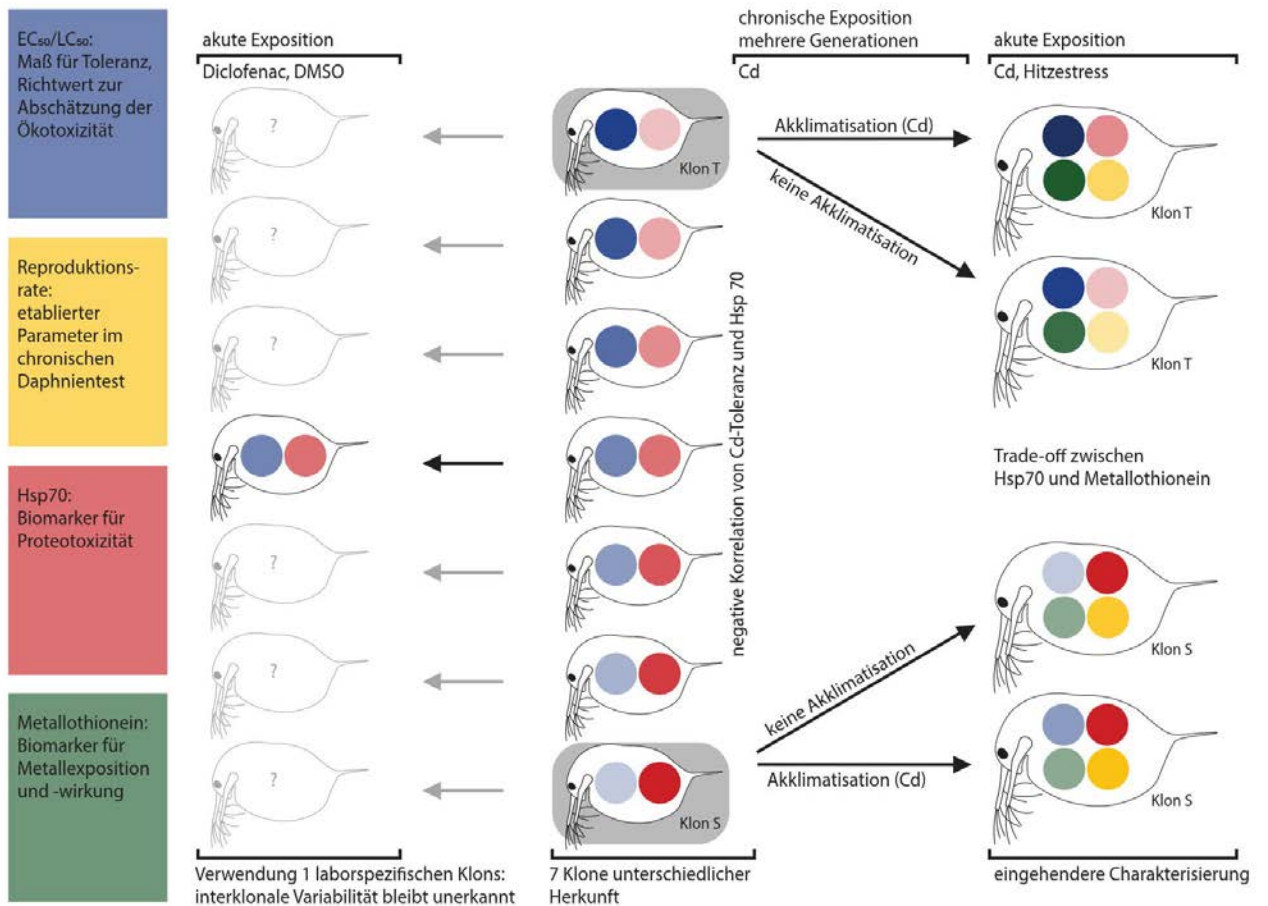


Abb. 1. Schematische Darstellung der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente und deren wichtigsten Ergebnisse. Erklärung im Text.

6. Literatur

- Adema, D.M.M., 1978. *Daphnia magna* as a test animal in acute and chronic toxicity tests. *Hydrobiologia* 59, 125-134.
- Ali, B.H., 2001. Dimethyl Sulfoxide: recent pharmacological and toxicological research. *Vet. Human Toxicol.* 43, 228-231.
- Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow, P.S., 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 76, 160-202.
- Arts, M.-J.S.J., Schill, R.O., Knigge, T., Eckwert, H., Kammenga, J.E., Köhler, H.-R., 2004. Stress proteins (hsp70, hsp60) induced in isopods and nematodes by field exposure to metals in a gradient near Avonmouth, UK. *Ecotoxicology* 13, 739-755.
- Baird, D.J., Barata, C., 1998. Genetic variation in the response of *Daphnia* to toxic substances: Implications for Risk Assessment, in: Forbes, V.E., (Ed.), *Genetics and Ecotoxicology*. Taylor and Francis, Ann Arbor, pp. 207-221.
- Baird, D.J., Barber, I., Bradley, M., Soares, A.M.V.M., Calow, P., 1991. A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Straus. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 21, 257-265.
- Baird, D.J., Barber, I., Calow, P., 1990. Clonal variation in general responses of *Daphnia magna* Straus to toxic stress: I. Chronic life history effects. *Funct. Ecol.* 4, 399-407.
- Baird, D.J., Soares, A.M.V.M., Girling, A., Barber, M.C., Calow, P., 1989. The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicity tests: problems and prospects. In: Lokke, H., Tyle, H., Bro-Rasmussen, F. (Eds.), *Proceedings of the First European Conference on Ecotoxicology*. Lyngby, Denmark, pp. 144-148.
- Barata, C., Baird, D.J., Minarro, A., Soares, A.M.V.M., 2000. Do genotype responses always converge from lethal to nonlethal toxicant exposure levels? A hypothesis tested using laboratory *Daphnia magna* Straus clones. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 2314-2322.
- Barata, C., Baird, D.J., Mitchell, S.E., Soares, A.M.V.M., 2002. Among and within population variability in tolerance to cadmium stress in natural populations of *Daphnia magna*: implications for ecological risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1058-1064.
- Barber, I., Baird, D.J., Calow, P., 1990. Clonal variation in general responses of *Daphnia magna* Straus to toxic stress. II Physiological effects. *Funct. Ecol.* 4, 409-414.

- Barbosa, I.R., Martins, R.M., Sá e Melo, M.L., Soares, A.M.V.M., 2003. Acute and chronic toxicity of dimethylsulfoxide to *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 70, 1264-1268.
- Barua, D., Heckathorn, S.A., Coleman, J.S., 2008. Variation in heat-shock proteins and photosynthetic thermotolerance among natural populations of *Chenopodium album* L. from contrasting thermal environments: implications for plant responses to global warming. J. Integr. Plant Biol. 50(11), 1440-1451.
- Baumann, J.W., Liu, J., Klaassen, C.D., 1993. Production of metallothionein and heatshock proteins in response to metals. Fund. Appl. Toxicol. 21,15-22.
- Bervoets, L., Blust, R., 2003. Metal concentrations in water, sediment and gudgeon (*Gobio gobio*) from a pollution gradient: relationship with fish condition factor. Environ. Pollut. 126(1), 9-19.
- Bettencourt, B.R., Feder, F.E., Cavicchi, S., 1999. Experimental evolution of Hsp70 expression and thermotolerance in *Drosophila melanogaster*. Evolution 53, 1796-1801.
- Bodar, C.W.M., van Der Sluis, I., Voogt, P.A., Zandee, D.I., 1988. Effects of cadmium on consumption, assimilation and biochemical parameters on *Daphnia magna*: possible implications for reproduction. Comp. Biochem. Physiol. Comp. Pharmacol. 90(2), 341-346.
- Bodar, C.W.M., van der Sluis, I., Voogt, P.A., Zandee, D.I., 1990. Cadmium resistance in *Daphnia magna*. Aquat. Toxicol. 16, 33-40.
- Bond, J.A., Bradley, B.P., 1995. Heat shock reduces the toxicity of malathion in *Daphnia magna*. Mar. Environ. Res. 39, 209-212.
- Bond, J.A., Bradley, B.P., 1997. Resistance to malathion in heatshocked *Daphnia magna*. Envir. Toxicol. Chem. 16, 705-712.
- Bond, J.A., Gonzalez, C.R.M., Bradley, P.B., 1993. Agedependent expression of proteins in the cladoceran *Daphnia magna* under normal and heat-stress conditions. Comp. Biochem. Physiol. 106, 913-917.
- Bossuyt, B.A.T., Janssen, C., 2005. Copper toxicity to different field-collected cladoceran species: intra- and inter-species sensitivity. Environ. Pollut. 136, 145-154.
- Bossuyt, B.T.A., Janssen, C.R., 2003. Acclimation of *Daphnia magna* to environmentally realistic copper concentrations. Comp. Biochem. Physiol. 136, 253-264.
- Bossuyt, B.T.A., Janssen, C.R., 2004. Influence of multigeneration acclimation to copper on tolerance, energy reserves, and homeostasis of *Daphnia magna* Straus. Environ. Toxicol. Chem. 23, 2029-2037.

- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein, utilising the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Bradley, B.P., 1993. Are the stress proteins indicators of exposure or effect? *Mar. envir. Res.* 35, 85-88.
- Bradley, B.P., Ward, J.B., 1989. Detection of a major stress protein using a peptide antibody. *Mar. envir. Res.* 28, 471-475.
- Brayton, C.F., 1986. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. *Cornell Vet* 76 (1), 61-90.
- Carpenter, R.J., Angel, M.F., Morgan, R.F., 1994. Dimethyl sulfoxide increases the survival of primarily ischemic island skin flaps. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 110, 228-231.
- Brown, D.C., Bradley, B.P., Tedengren, M., 1995. Genetic and environmental regulation of hsp70 expression. *Mar. Environ. Res.* 39, 181-184.
- Calleja, M.C., Persoone, G., 1993. The influence of solvents on the acute toxicity of some lipophilic chemicals to aquatic invertebrates. *Chemosphere* 26 (11), 2007-2022.
- Campbell, P.G.C., Giguère, A., Bonneris, E., Hare, L., 2005. Cadmium-handling strategies in two chronically exposed indigenous freshwater organisms -the yellow perch (*Perca flavescens*) and the floater mollusc (*Pyganodon grandis*). *Aquat. Toxicol.* 72, 83-97.
- Campbell, P.G.C., Giguère, A., Bonneris, E., Hare, L., 2005. Cadmium-handling strategies in two chronically exposed indigenous freshwater organisms -the yellow perch (*Perca flavescens*) and the floater mollusc (*Pyganodon grandis*). *Aquat. Toxicol.* 72, 83-97.
- Canli, M., 2006. Effects of copper pre-exposure routes on the energy reserves and subsequent copper toxicity in *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol.* 21(5), 521-527.
- Carpenter, R.J., Angel, M.F., Morgan, R.F., 1994. Dimethyl sulfoxide increases the survival of primarily ischemic island skin flaps. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 110, 228-231.
- Chiappa, A., Makuuchi, M., Zbar, A.P., Biella, F., Bellomi, M., Biffi, R., Bertani, E., Vezzoni, A., Crosta, C., Andreoni, B., 2003. Effects of the free radical scavenger dimethyl sulphoxide on experimental normothermic ischaemia of the liver. *Dig. Surg.* 20, 238-245.
- Cleuvers, M., 2003. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicol. Lett.* 142, 185-194.

- Colbourne J.K., Hebert P.D.N., 1996. The systematics of North American *Daphnia* (Crustacea: Anomopoda): a molecular phylogenetic approach. Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B. 351, 349-360.
- De Coen, W.M., Janssen, C.R., 1997. The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. IV. Cellular energy allocation: a new methodology to assess the energy budget of toxicant-stressed *Daphnia* populations. J. Aquat. Ecosystem Stress Recovery 6, 4-55.
- De Coninck, D, Janssen, C, De Schampelaere, K., 2013. An investigation of the inter-clonal variation of the interactive effects of cadmium and *Microcystis aeruginosa* on the reproductive performance of *Daphnia magna*. Aquat. Toxicol. 140-141:425-431.
- Declerck, S., Cousyn, C., De Meester, L., 2001. Evidence for local adaptation in neighbouring *Daphnia* populations: a laboratory transplant experiment. Freshwater Biol. 46, 187-198.
- Dietrich, S., Ploessl, F., Bracher, F., Laforsch, C., 2010. Single and combined toxicity of pharmaceuticals at environmentally relevant concentrations in *Daphnia magna* - A multigenerational study. Chemosphere 79, 60-6.
- Dietz, T.J., Somero, G.N., 1994. Species and tissue-specific synthesis patterns for heat-shock proteins HSP70 and HSP90 in several marine teleost fishes. Physiol. Zool. 66, 863-880.
- DIN 38 412, 1989. Bestimmung der nicht akut giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Daphnien über Verdünnungsstufen (L30)
- Doughty, P., Reznick, D.N., 2004. Patterns and analysis of adaptive phenotypic plasticity in animals. In: Phenotypic Plasticity - Functional and Conceptual Approaches (T. J. Dewitt, S. M. Scheiner, Hrsg.), 126-150. Oxford University Press, Oxford.
- ECETOC (European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals), 1996. Aquatic Toxicity Testing of Sparingly Soluble, Volatile and Unstable Substances. Monograph. No. 26.
- Eckwert, H., Köhler, H.-R., 1997. The indicative value of the hsp70 stress response as a marker for metal effects in *Oniscus asellus* (Isopoda) field populations: variability between populations from metal-polluted and uncontaminated sites. Appl. Soil Ecol. 6, 275-282.
- Elnabarawy, M.T., Welter, A.N., Robideau, R.R., 1986. Relative sensitivity of three daphnid species to selected organic and inorganic chemicals. Environ. Toxicol. Chem. 5, 393-398.

- Escher, B.I., Bramaz, N., Eggen, R.I.L., Richter, M., 2005. In vitro assessment of modes of toxic action of pharmaceutical in aquatic life. *Environ. Sci. Technol.* 39, 3090-3100.
- EU, 2001. CPMPPaperRAssessHumPharm 12062001. Draft discussion paper on Environmental Risk Assessment of Medical Products for Human Use, expressed at the 24th CSTEEN Plenary Meeting, 12 June, 2001.
- Favatier, F., Bornman, L., Hightower, L.E., Gunter, E., Polla, S., 1997. Variation in hsp gene expression and Hsp polymorphism: do they contribute to differential disease susceptibility and stress tolerance? *Cell. Stress. Chap.* 2, 141-155.
- Feder, M.E., Hofmann, G.E., 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 61, 243-282.
- Fent K., 2013, *Ökotoxikologie*. 4. überarbeitete Auflage, Georg Thieme Stuttgart.
- Fent, K., Weston, A.A., Caminada, D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* 76, 122-159.
- Fraysse, B., Geffard, O., Berthet, B., Quéau, H., Biagianti-Risbourg, S., Geffard, A., 2006. Importance of metallothioneins in the cadmium detoxification process in *Daphnia magna*. *Comp. Biochem. Physiol.* 144, 286-293.
- Guan, R., Wang W.-X., 2006. Comparison between two clones of *Daphnia magna*: Effects of multigenerational cadmium exposure on toxicity, individual fitness, and biokinetics. *Aquat. Toxicol.* 76, 217-229.
- Guan, R., Wang, W.-X., 2004. Cd and Zn uptake kinetics in *Daphnia magna* in relation to Cd-exposure history. *Environ. Sci. Technol.* 38, 6051-6058.
- Gustafsson, S., Hansson, L.A., 2004. Development of tolerance against toxic cyanobacteria in *Daphnia*. *Aquat. Ecol.* 38(1), 37-44.
- Guttman, S.I., 1994. Population genetic structure and ecotoxicology. *Environ. Health Perspect.* 102(12), 97-100.
- Haap, T., Köhler, H.R., 2009. Cadmium tolerance in seven *Daphnia magna* clones is associated with reduced hsp70 baseline levels and induction. *Aquat. Toxicol.* 94, 131-137.
- Haap, T., Triebkorn, R., Köhler, H.-R., 2008. Acute effects of diclofenac and DMSO to *Daphnia magna*: immobilisation and hsp70 induction. *Chemosphere* 73, 353-359.
- Hairston Jr., N.G., Lampert, W., Cáceres, C.E., Holtmeier, C.L., Weider, L.J., Gaedke, U., Fischer, J.M., Fox, J.A., Prost, D.M., 1999. Rapid evolution revealed by dormant eggs. *Nature* 401, 446.

- Hallare, A.V., Köhler, H.-R., Triebkorn, R., 2004. Developmental toxicity and stress protein responses in zebrafish embryos after exposure to diclofenac and its solvent, DMSO. *Chemosphere* 56, 659-666.
- Hallare, A.V., Nagel, K., Köhler, H.-R., Triebkorn, R., 2006. Comparative embryotoxicity of three carrier solvents to zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 63, 378-388.
- Hallare, A.V., Schirling, M., Luckenbach, T., Köhler, H.-R., Triebkorn, R., 2005. Combined effects of temperature and cadmium on developmental parameters and biomarker responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *J. Therm. Biol.* 30, 7-17.
- Heberer, T., 2002. Occurrence, fate, and removal of pharmaoeetical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicol. Lett.* 131 (1/2), 5-17.
- Heberer, T., Reddersen, K., Mechlinski, A., 2002. From municipal sewage to drinking Water: fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment in urban areas. *Wat. Science Technol.* 46(3), 81-88.
- Henschel, K.P., Wenzel, A., Diedrich, M., Flieder, A., 1997. Environmental hazard assessment of pharmaceuticals. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 25, 220-225.
- Hofmann, G.E., 2005. Patterns of hsp gene expression in ectothermic marine organisms on small to large biogeographic scales. *Integr. Comp. Biol.* 45, 247-255.
- Hofmann, G.E., Somero, G.N., 1996. Interspecific variation in thermal denaturation of proteins in the congeneric mussels *Mytilus trossulus* and *M. galloprovincialis*: evidence from the heat-shock response and protein ubiquitination. *Mar. Biol.* 126, 65-75.
- Holmstrup, M., Bindesbøl, A.M., Oostingh, G.J., Duschl, A., Scheil, V., Köhler, H.-R., Loureiro, S., Soares, A.M.V.M., Ferreira, A.L.G., Kienle, C., Gerhardt, A., Laskowski, R., Kramarz, P.E., Bayley, M., Svendsen, C., Spurgeon, D.J., 2010. Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: A review. *Sci. Total. Environ.* 408, 3746-3762.
- Hutchinson, T.H., Shillabeer, N., Winter, M.J., Pickford, D.B., 2006. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: a critical review. *Aquat. Toxicol.* 76, 69-92.
- ISO (International Organization for Standardization), 1996. 6341 Water quality - Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) -Acute toxicity test. Third edition, 1996.

- Ivanina, A.V., Taylor, C., Sokolova, I.M., 2009. Effects of elevated temperature and cadmium exposure on stress protein response in eastern oysters *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Aquat. Toxicol.* 91, 245-254.
- Iwama, G.K., Thomas, P.T., Forsyth, R.B., Vijayan, M.M., 1998. Heat shock protein expression in fish. *Rev. Fish. Biol. Fish.* 8, 35-56.
- Kabani, M., Martineau, C.N., 2008. Multiple hsp70 isoforms in the eukaryotic cytosol: mere redundancy or functional specificity? *Curr. Genomics.* 9 (5) 338.
- Ketola, T., Laakso, J., Kaitala, V., Airaksinen, S., 2004. Evolution of Hsp90 expression in *Tetrahymena thermophila* (Protozoa, Ciliata) populations exposed to thermally variable environments. *Evolution* 58, 741-748.
- Klaassen, C.D., Liu, J., Choudhuri, S., 1999. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 267-294.
- Klerks, P.L., Weis, J.S., 1987. Genetic adaptation to heavy metals in aquatic organisms: a review. *Environ. Pollut.* 45, 173-205.
- Knigge, T., Köhler, H.-R., 2000. Lead impact on nutrition, energy reserves, respiration and stress protein (hsp70) level in *Porcellio scaber* (Isopoda) populations differently preconditioned in their habitats. *Environ. Pollut.* 108, 209-217.
- Knops, M., Altenburger, R., Segner, H., 2001. Alterations of physiological energetics, growth and reproduction of *Daphnia magna* under toxicant stress. *Aquat. Toxicol.*, 53, 79-90.
- Köhler, H.-R., Bartussek, C., Eckwert, H., Farian, K., Gränzer, S., Knigge, T., Kunz, N., 2001. The hepatic stress protein (hsp70) response to interacting abiotic parameters in fish exposed to various levels of pollution. *J. Aquat. Ecosyst. Stress Recov.* 8, 261-279.
- Köhler, H.-R., Eckwert, H., Triebkorn, R., Bengtsson, G., 1999. Interaction between tolerance and 70 kD stress protein (hsp70) induction in collembolan populations exposed to long-term metal pollution. *Appl. Soil Ecol.* 11, 43-52.
- Köhler, H.-R., Triebkorn, R., Stöcker, W., Kloetzel, P.-M., Alberti, G., 1992. The 70 kD heat shock protein (hsp70) in soil invertebrates: a possible tool for monitoring environmental toxicants. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 22, 334-338.
- Köhler, H.-R., Zanger, M., Eckwert, H., Einfeldt, I., 2000. Selection favours low hsp70 levels in chronically metal-stressed soil arthropods. *J. Evol. Biol.* 13, 569-582.
- Kommission Der Europäischen Gemeinschaften, 2001. Weissbuch. Strategie für eine zukünftige Chemikalienpolitik KOM (2001): 88 endgültig <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/PDF/?uri=CELEX:52001DC0088&qid=1436188331007&from=DE>

- Krebs, R.A., Feder, M.E., Lee, J., 1998. Heritability of expression of the 70KD heat-shock protein in *Drosophila melanogaster* and its relevance to the evolution of thermotolerance. *Evolution*, 52, 841-847.
- Krebs, R.A., Loeschcke, V., 1994. Costs and benefits of activation of the heat-shock response in *Drosophila melanogaster*. *Funct. Ecol.* 8, 730-737.
- Kristensen, T.N., Hoffmann, A.A., Overgaard, J., Sørensen, J.G., Hallas, R., Loeschcke, V., 2008. Costs and benefits of cold acclimation in field released *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 216-221.
- Kwok, K.W.H., Grist, E.P.M., Leung, K.M.Y., 2009. Acclimation effect and fitness cost of copper resistance in the marine copepod *Tigriopus japonicus*. *Ecotox. Environ. Safe.* 72, 358-64.
- Lam, P.K.S., 1999. Methods for distinguishing genetic and environmental variance in stress tolerance. *Ecol. Appl.* 9, 445-449.
- LaMontagne, J.M., McCauley E., 2001. Maternal effects in *Daphnia*: what mothers are telling their offspring and do they listen? *Ecol. Lett.* 4, 64-71.
- Lampert, W., Fleckner, W., Rai, H., Taylor, B.E., 1986. Phytoplankton control by grazing zooplankton: a study on the clear water phase. *Limnol. Oceanogr.* 31, 478-490.
- Lampert, W., Sommer, U., 1993. *Limnoökologie* Thieme Verlag, Stuttgart, 440.
- Lannig, G., Cherkasov, A.S., Portner, H.-O., Bock, C., Sokolova, I.M., 2008. Cadmium dependent oxygen limitation affects temperature tolerance in eastern oysters (*Crassostrea virginica* (Gmelin)). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 294, 1338-1346.
- Lannig, G., Flores, J.F., Sokolova, I.M., 2006. Temperature-dependent stress response in oysters, *Crassostrea virginica*: pollution reduces temperature tolerance in oysters. *Aquat. Toxicol.* 79, 278-287.
- Lansing, E., Justesen, J., Loeschcke, V., 2000. Variation in the expression of Hsp70, the major heat-shock protein, and thermotolerance in larval and adult selection lines of *Drosophila melanogaster*. *J. Therm. Biol.* 25, 443-450.
- LeBlanc, G.A., 1982. Laboratory investigation into the development of resistance of *Daphnia magna* (Straus) to environmental pollutants. *Environ. Pollut.* 27 309-322
- Lemke, A.M., Stoeckel, J.A., Pegg, M.A., 2003. Utilization of the exotic Cladoceran *Daphnia lumholtzi* by juvenile fishes in an Illinois River floodplain lake. *J. Fish Biol.* 62, 938-954.

- Lewis, S., Donkin, M.E., Depledge, M.H., 2001. Hsp70 expression in *Enteromorpha intestinalis* (Chlorophyta) exposed to environmental stressors. *Aquat. Toxicol.* 51, 277-291.
- Lewis, S., Handy, R.D., Cordi, B., Billingham, Z., Depledge, M.H., 1999. Stress proteins (HSP's): Methods of detection and their use as an environmental biomarker. *Ecotoxicology* 8, 351-368.
- Loeschcke, V., Sørensen, J.G., 2005. Acclimation, heat shock and hardening- a response from evolutionary biology. *J. Therm. Biol.* 30, 255-257.
- Lopes, I., Baird, D.J., Ribeiro, R., 2004. Genetic determination of tolerance to lethal and sublethal copper concentrations in field populations of *Daphnia longispina*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 46 (1), 43-51.
- Lopes, I., Baird, D.J., Ribeiro, R., 2006. Genetic adaptation to metal stress by natural populations of *Daphnia longispina*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 63 (2), 275-285.
- Lynch, M., Gabriel, W., 1983. Phenotypic evolution and parthenogenesis. *Am. Nat.* 122, 745-764.
- Ma, J., Chen, J., 2005. How to accurately assay the algal toxicity of pesticides with low water solubility. *Environmental Pollution* 136, 267-273.
- Markert, B., Oehlmann, J., 1995. "Thesenpapier zur Standort- und Begriffsbestimmung in der Bioindikation", in Arndt, U., Fomin, A., Lorenz, S. (Hrsg.): *Bio-Indikation-Neue Entwicklungen-Nomenklatur-Synökologische Aspekte*. Günther Heimbach-Verlag Ostfildern, 1996, 281-286.
- Medina, M.H., Correa, J.A., Barata, C., 2007. Micro-evolution due to pollution: possible consequences for ecosystem responses to toxic stress. *Chemosphere* 67(11), 2105-2114.
- Messiaen, M., De Schampelaere, K.A.C., Muysen, B.T.A., Janssen, C.R., 2010. The microevolutionary potential of *Daphnia magna* population exposed to temperature and cadmium stress. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 73, 1114-1122.
- Messiaen, M., Janssen, C.R., Thas, O., De Schampelaere, K.A.C., 2012. The potential for adaptation in a natural *Daphnia magna* population: broad and narrow- sense heritability of net reproductive rate under Cd stress at two temperatures. *Ecotoxicology* 21, 1899-1910.
- Morgan, A.J., Kille, P., Stürzenbaum, S., 2007. Microevolution and ecotoxicology of metals in invertebrates. *Environ. Sci. Technol.* 41, 1085-1096.

- Muyssen, B.T.A., Janssen, C.R., 2001. Multi-generation zinc acclimation and tolerance in *Daphnia magna*: implications for water quality guidelines and ecological risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 2053-2060.
- Muyssen, B.T.A., Janssen, C.R., 2002. Tolerance and acclimation to zinc of *Ceriodaphnia dubia*. *Environ. Pollut.* 117, 301-306.
- Muyssen, B.T.A., Janssen, C.R., 2004. Multi-generation cadmium acclimation and tolerance in *Daphnia magna*. *Environ. Pollut.* 130, 309-316.
- Muyssen, B.T.A., Messiaen, M., Janssen, C.R., 2010. Combined cadmium and temperature acclimation in *Daphnia magna*: Physiological and sub-cellular effects. *Ecotox. Environ. Safe.* 73, 735-742.
- Oda, S., Tatarazako, N., Dorgerloh, M., Johnson, R.D., Kusk, K.O., Leverett, D., Marchini, S., Nakari, T., Williams, T., Iguchi, T., 2007. Strain difference insensitivity to 3,4-dichloroaniline and insect growth regulator, fenoxycarb, in *Daphnia magna*. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 67, 399-405.
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), 2000. Series on Testing and Assessment, OECD Environmental Health and Safety Publications Number 23, Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environment Directorate OECD, Paris.
- OECD, 2004. Guideline for Testing of Chemicals, Test No. 202, *Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test. Environment Directorate OECD, Paris.
- OECD, 2008. Guideline for Testing of Chemicals, Test No. 211: *Daphnia magna* Reproduction Test. Section 2: Effects on Biotic Systems. Organization of Economic Cooperation and Development, Paris.
- Parsell, D.A., Lindquist, S., 1993. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu. Rev. Genet.* 27, 437-496.
- Paul, R.J., Lamkemeyer, T., Maurer, J., Pinkhaus, O., Pirow, R., Seidl, M., Zeis, B., 2004. Thermal acclimation in the microcrustacean *Daphnia*: a survey of behavioural, physiological and biochemical mechanisms. *J. Therm. Biol.* 29, 655-662.
- Pauwels, K., Stoks, R., De Meester, L., 2005. Coping with predator stress: interclonal differences in induction of heat-shock proteins in the water flea *Daphnia magna*. *J. Evol. Biol.* 18, 867-872.
- Pauwels, K., Stoks, R., Decaestecker, E., De Meester, L., 2007. Evolution of heat shock protein expression in a natural population of *Daphnia magna*. *Am. Nat.* 170, 800-805.

- Persoone, G., Janssen, C.R., 1993. Freshwater invertebrate toxicity tests, in: Calow, P. (Hrsg.). *Handbook of ecotoxicology*. 51-66.
- Picado, A., Chankova, S., Fernandes, A., Simões, F., Leverett, D., Johnson, I., Hernan, R., Pires, A.M., Matos, J., 2007. Genetic variability in *Daphnia magna* and ecotoxicological evaluation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 67 (3), 406-410.
- Plotnikov, M.B., Avdoshin, A.D., Chernysheva, G.A., Saratikov, A.S., 1990. Dimethyl sulfoxide as a corrector of disturbances of the cerebral circulation and oxygen and carbohydrate metabolism and of lipid peroxidation soon after intracerebral hemorrhage. *B Exp. Biol. Med.* 109, 466-468.
- Poiger, T., Busser, H.-R., Müller, M.D., 2001. Photodegradation of the pharmaceutical drug Diclofenac in a lake: Pathway, field measurements and mathematical modelling. *Environ. Toxicol. Chem.* 20(2), 256-262.
- Posthuma, L., N. M. Van Straalen., 1993. Heavy-metal adaptation in terrestrial invertebrates: a review of occurrence, genetics, physiology and ecological consequences. *Comp. Biochem. Physiol.* 106, 11-38.
- Postma, J. F., Davids, C., 1995. Tolerance induction and life-cycle changes in cadmium exposed *Chironomus riparius* (Diptera) during consecutive generations. *Ecotox. Environ. Safety*, 30, 195-202.
- Poynton, H.C., Loguinov, A.V., Varshavsky, J.R., Chan, S., Perkins, E.J., Vulpe, C.D., 2008. Gene expression profiling in *Daphnia magna* part I: concentration-dependent provide support for the no observed transcriptional effect level. *Environ. Sci. Technol.* 42, 6250-6256.
- Poynton, H.C., Varshavsky, J.R., Chang, B., Cavigliolo, G., Chan, S., Holman, P.S., Loguinov, A.V., Bauer, D.J., Komachi, K., Theil, E.C., Perkins, E.J., Hughes, O., Vulpe, C.D., 2007. *Daphnia magna* ecotoxicogenomics provides mechanistic insights into metal toxicity. *Environ. Sci. Technol.* 41, 1044-1050.
- Pytharopoulou, S., Kouvela, E.C., Sazakli, E., Leotsinidis, M., Kalpaxis, D.L., 2006. Evaluation of the global protein synthesis in *Mytilus galloprovincialis* in marine pollution monitoring: Seasonal variability and correlations with other biomarkers. *Aqua. Toxicol.* 80(1), 33-41.
- Sanders, B.M., 1993. Stress proteins in aquatic organisms: An environmental perspective. *Crit. Rev. Toxicol.* 23, 49-75.

- Sanders, B.M., Hope, C., Pascoe, V.M., Martin, L.S., 1991. Characterization of the stress protein response in two species of *Collisella* limpets with different temperature tolerances. *Physiol. Zool.* 64, 1471-1489.
- Sanders, B.M., Martin, L.S., 1993. Stress proteins as biomarkers of contaminant exposure in archived environmental samples. *Sci. Total Environ.* 139, 459-470.
- Schill, R.O., Görlitz, H., Köhler, H.-R., 2003. Laboratory simulation of a mining accident: acute toxicity, hsc/hsp70 response, and recovery from stress in *Gammarus fossarum* (Crustacea, Amphipoda) exposed to a pulse of cadmium. *Biometals*, 16, 391-401.
- Schill, R.O., Köhler, H.-R., 2004. Does the actual environment or the source of the population define stress status and energy supply in the freshwater amphipod, *Gammarus fossarum*, in differently polluted field sites? *Ecotoxicology* 13, 683-695.
- Schwaiger, J., Ferling, H., Mallow, U., Wintermayr, H., Negele, R.D., 2004. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part I. Histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquat. Toxicol.* 68, 141-150.
- Shaw, J.R., Colbourne, J.K., Davey, J.C., Glaholt, S.P., Hampton, T.H., Chen, C.Y., Folt, C.L., Hamilton, J.W., 2007. Gene response profiles for *Daphnia pulex* exposed to the environmental stressor cadmium reveals novel crustacean metallothioneins. *BMC Genomics* 8, 477.
- Silbermann R., Tatar, M., 2000. Reproductive costs of heat shock protein in transgenic *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 54, 2038-2045.
- Smith, D.J., Schulte, M., Bischof, J.C., 1998. The effect of dimethyl sulfoxide on the water transport response of rat hepatocytes during freezing. *J. Biomech. Eng.* 120, 549-558.
- Soares, A.M.V.M., Baird, D.J., Calow, P., 1992. Interclonal variation in the performance of *Daphnia magna* Straus in chronic bioassays. *Environ. Toxicol. Chem.* 11(10), 1477-1483.
- Soetaert, A., Vandenbrouck, T., van der Ven, K., Maras, M., van Remortel, P., Blust, R., De Coen, W. M., 2007. Molecular responses during cadmium-induced stress in *Daphnia magna*: Integration of differential gene expression with higher-level effects. *Aquat. Toxicol.* 83(3), 212-222.
- Sokolova, I.M., Frederich, M., Bagwe, R., Lannig, G., Sukhotin, A.A., 2012. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Marine Environmental Research*, 79, 1-15.

- Sokolova, I.M., Lannig, G., 2008. Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: implications of global climate change. *Clim. Res.* 37, 181-201.
- Sørensen, J.G., Dahlgaard, J., Loeschcke, V., 2001. Genetic variation in thermal tolerance among natural populations of *Drosophila buzzatii*: down regulation of hsp70 expression and variation in heat stress resistance traits. *Funct. Ecol.* 15, 289-296.
- Sørensen, J.G., Kristensen, T.N., Loeschcke, V., 2003. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecol. Lett.* 6, 1025-1037.
- Sørensen, J.G., Loeschcke, V., 2002. Natural adaptation to environmental stress via physiological clock-regulation of stress resistance in *Drosophila*. *Ecol. Lett.* 5, 16-19.
- Sørensen, J.G., Michalak, P., Justesen, J., Loeschcke, V., 1999. Expression of the heat shock protein HSP70 in *Drosophila buzzatii* lines selected for thermal resistance. *Hereditas* 131, 155-164.
- Sørensen, J.G., Norry, F.M., Scannapieco, A.C., Loeschcke, V., 2005. Altitudinal variation for stress resistant traits and thermal adaptation in adult *Drosophila buzzatii* from the New World. *J. Evol. Biol.* 18, 829-837.
- Spitze, K., 1991. Chaoborus predation and life-history evolution in *Daphnia pulex*: temporal pattern of population diversity, fitness, and mean life history. *Evolution* 45, 82-92.
- Steinhäuser, K.G., 1995. Kritische Analyse bisher vorliegender Daten von schwerlöslichen Substanzen und Produkten. Beitrag zum Workshop „Abbau und ökotoxikologische Eigenschaften schwerlöslicher Substanzen und Produkte — Erfassung und Bewertung“ der GDCh in Schmallenberg am 02./03. November 1995.
- Stratton, G.W., 1985. The influence of solvent type on solvent-pesticide interactions in bioassays. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 14, 651-658.
- Stuhlbacher, A., Bradley, M.C., Naylor, C., Calow, P., 1992. Induction of cadmium tolerance in two clones of *Daphnia magna* Straus. *Comp. Biochem. Physiol.* 101C, 571-577.
- Stuhlbacher, A., Bradley, M.C., Naylor, C., Calow, P., 1993. Variation in the development of cadmium resistance in *Daphnia magna* Straus: effect of temperature, nutrition, age and genotype. *Environ. Pollut.* 80, 153-158.
- Sures, B., Zimmermann, S., 2005. Untersuchungen zur Toxizität der Platingruppenelemente Pt, Pd und Rh. Programm Lebensgrundlage Umwelt und ihre Sicherung (BWPLUS) <http://bwplus.fzk.de/berichte/SBer/BWR22012SBer.pdf>

- Tauxe-Wuersch, A., De Alencastro, L.F., Grandjean, D., Tarradellas, J., 2005. Occurrence of several acidic drugs in sewage treatment plants in Switzerland and risk assessment. *Water Res.* 39, 1761-1772.
- Tedengren, M., Olsson, B., Bradley, B.P., Zhou, L., 1999a. Heavy metal uptake, physiological response and survival of the blue mussel (*Mytilus edulis*) from marine and brackish waters in relation to the induction of heat-shock protein 70. *Hydrobiologia* 393, 261-269.
- Ternes, T., 1998. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Wat. Res.* 32, 3245-3260.
- Triebkorn, R., Casper, H., Heyd, A., Eikemper, R., Köhler, H.-R., Schwaiger, J., 2004. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac Part II. Cytological effects in liver, kidney, gills and intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 68, 151-166.
- Tsui, M.T.K., Wang, W.-X., 2004. Uptake and elimination routes of inorganic mercury and methylmercury in *Daphnia magna*. *Environ. Sci. Technol.* 38, 808-816.
- Tsui, M.T.K., Wang, W.-X., 2005a. Influence of maternal exposure on the tolerance and physiological performance of *Daphnia magna* under mercury stress. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 1228-1234.
- Tsui, M.T.K., Wang, W.-X., 2005b. Multigenerational acclimation of *Daphnia magna* to mercury: relationships between biokinetics and toxicity. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 2927-2933.
- Tsui, M.T.K., Wang, W.X., 2007. Biokinetics and tolerance development of toxic metals in *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 26 (5), 1023-1032.
- Van Leeuwen, C.J., Van Der Zandt, P.T.J., Aldenberg, T., Verhaar, H.J.M., Hermens, J.L.M., 1992. Application of QSARS, extrapolation and equilibrium partitioning in aquatic assessment. 1. Narcotic industrial pollutants. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 267-282.
- Veldhuizen-Tsoerkan, M.B., Holwerda, D.A., de Bont, A.M.T., Smaal, A.C., Zandee, D.I., 1991. A field study on stress indices in the sea mussel, *Mytilus edulis*: application of the stress approach in biomonitoring. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 21, 497-504.
- Veldhuizen-Tsoerkan, M.B., Holwerda, D.A., van der Maast, C.A., Zandee, D.I., 1990. Effects of cadmium exposure and heat shock on protein synthesis in gill tissue of the sea mussel *Mytilus edulis* L. *Comp. Biochem. Physiol.* 96C, 419-426.

- Verhaar, H.J.M., Van Leeuwen, C.J., Hermens, J.L.M., 1992. Classifying environmental pollutants. 1. Structure-activity relationships for prediction of aquatic toxicology. *Chemosphere* 25, 471-491.
- Wallace, W.G., Lee, B.G., Luoma, S.N., 2003. Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. I. Significance of metal-sensitive fractions (MSF) and biologically detoxified metal (BDM). *Mar. Ecol., Prog. Ser.* 249, 183-197.
- Warchalowska-Sliwa, E., Niklinska, M., Gorlich, A., Michailova, P., Pyza, E., 2005. Heavy metal accumulation, heat shock protein expression and cytogenetic changes in *Tetrix tenuicornis* (L.) (Tetrigidae, Orthoptera) from polluted areas. *Environ. Pollut.* 133, 373-381.
- Ward, T.J., Robinson, E.R., 2005. Evolution of cadmium resistance in *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 24(9), 2341-2349.
- Weber, A., Declerck, S., 1997. Phenotypic plasticity of *Daphnia* life history traits in response to predator kairomones: genetic variability and evolutionary potential. *Hydrobiologia* 360, 89-99.
- Xie, L., Klerks, P.L., 2004. Fitness cost of resistance to cadmium in the least killifish *Heterandria formosa*. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 1499-1503.
- Zatsepina, O.G., Velikodvorskaia, V.V., Molodtsov, V., Bettencourt, B.R., Lerman, D.N., Feder, M.E., Evgenev, M.B., 2001. A *Drosophila melanogaster* strain from sub-equatorial Africa has exceptional thermotolerance but decreased Hsp70 expression. *J. Exp. Biol.* 204, 1869-1881.

Eigenanteil an den durchgeführten Arbeiten bei den in die vorliegende Dissertation integrierten Publikationen

Kapitel 1:

Haap, T., Triebskorn, R., Köhler, H.-R., 2008. Acute effects of diclofenac and DMSO to *Daphnia magna*: immobilisation and hsp70 induction. Chemosphere 73, 353-359.

Vollständiger Eigenanteil an der Versuchsplanung, Durchführung und Auswertung. Die fachliche Betreuung erfolgte durch Prof. Dr. Heinz-R. Köhler (Universität Tübingen) und Prof. Dr. Rita Triebskorn (Universität Tübingen).

Kapitel 2:

Haap, T., Köhler, H.-R., 2009. Cadmium tolerance in seven *Daphnia magna* clones is associated with reduced hsp70 baseline levels and induction. Aquatic Toxicology 94, 131-137.

Vollständiger Eigenanteil an der Versuchsplanung, Durchführung und Auswertung. Die fachliche Betreuung erfolgte durch Prof. Dr. Heinz-R. Köhler (Universität Tübingen). Die analytischen Messungen wurden unter Mithilfe von Andre Velescu (Universität Tübingen) durchgeführt.

Kapitel 3:

Haap, T., Schwarz, S., Köhler, H.-R., 2015. Hsp70 and metallothionein trade-off against one another in *Daphnia magna* cross-tolerance to cadmium and heat stress. Chemosphere, submitted.

Vollständiger Eigenanteil an der Versuchsplanung, Durchführung und Auswertung. Die fachliche Betreuung erfolgte durch Prof. Dr. Heinz-R. Köhler (Universität Tübingen). Die analytischen Messungen wurden unter Mithilfe von Andre Velescu (Universität Tübingen) durchgeführt. Die molekularbiologischen Untersuchungen (rtPCR) wurden von mir in der Arbeitsgruppe von Dr. Christina Chaban (Universität Tübingen, ZMBP) durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit Simon Schwarz (Universität Tübingen).

Kapitel 1: Acute effects of diclofenac and DMSO to *Daphnia magna*: immobilisation and hsp70 induction

Timo Haap, Rita Triebkorn ^{a,b}, Heinz-R. Köhler ^a

^a Animal Physiological Ecology Department, University of Tübingen, Konrad-Adenauer-Str. 20, 72072 Tübingen, Germany

^b Transfer Center for Ecotoxicology and Ecophysiology, Blumenstrasse 13, 72108 Rottenburg, Germany

Published in: Chemosphere, 2008, 73: 353-359

Abstract

To determine the toxicity of the anti-rheumatic drug diclofenac to *Daphnia magna*, acute toxicity tests according to the OECD guideline 202 were combined with biochemical investigations of the hsp70 level as a biomarker for proteotoxicity. Particular attention was paid to the impact of the solvent DMSO as a confounding factor to diclofenac toxicity by means of testing different variations of producing stock solutions.

In the acute immobilisation tests, diclofenac was most toxic as a singular test substance, with indication of a slight antagonistic interaction between the two substances. The highest EC₅₀ values were obtained in those approaches using diclofenac pre-dissolved in DMSO. Thus, the observed antagonism seems to be intensified by pre-dissolution.

Hsp70 levels of 12- to 19-days-old *D. magna* were determined after 48 h exposure using a highly reproducible immunological protocol. Hsp70 induction occurred at a LOEC of 30 mg l⁻¹ diclofenac plus 0.6 ml l⁻¹ DMSO, and at a LOEC of 40 mg l⁻¹ for diclofenac alone. In summary, DMSO showed only slight confounding effects on diclofenac action in the applied range of concentrations.

Keywords: Pharmaceutical; NSAID; Solvent toxicity; Proteotoxicity; Stress proteins
Chemosphere 73, 353-359.

1. Introduction

There has been steadily growing concern among ecotoxicologists about the regular and worldwide detection of pharmaceutical residues in the aquatic environment (Fent et al., 2006), but not until recent years have pharmaceuticals also gained attention as truly toxic substances in ecosystems. Their environmental fate and ecotoxicological effects on non-target organisms are only poorly understood (Halling-Sørensen et al., 1998 and Jones et al., 2001). The first widely public case of a pharmaceutical causing major ecological damage was the accumulation of diclofenac in the food chain of vultures, threatening them with extinction (Oaks et al., 2004). Diclofenac is a non-steroidal, anti-inflammatory drug (NSAID) with large production volumes that is widely used in humans and for veterinary purposes. Regardless of the form of application, dermal or oral, the final sink after its usage is the freshwater environment, because it is only partially eliminated in sewage treatment plants (Fent et al., 2006). The recent European Union Draft Guideline III/5504/94 (EU, 2001) announces a 'predicted environmental concentration' (PEC) for German surface waters of $0.54 \mu\text{g l}^{-1}$.

One possibility to assess diclofenac toxicity is the acute immobilisation test with *Daphnia magna*, a highly standardized and frequently used protocol to determine the EC_{50} of chemicals (OECD, 2004). Here, organic carrier solvents are often needed to accomplish the solution of hydrophobic substances in preparing the test media. DMSO is often used for this purpose because of its ability to solubilise a wide range of compounds. In spite of the potential of solvents to create toxicity artifacts by own toxic action or e.g., changing the bioavailability of the test substance, their use often remains unavoidable and their influence on the results have to be taken into account. Additive, synergistic or antagonistic interactions may occur between solvent and test substance (Rufli et al., 1998, Kahl et al., 1999 and Hutchinson et al., 2006). In many ecotoxicological studies using different organisms, e.g., algae (El Jay, 1996), fungi (Stratton, 1985) as well as many other bioassay systems, DMSO appeared to be a suitable solvent (Bowman et al., 1981 and Brayton, 1986).

In this context, little attention has been paid to the different ways solvents can be applied in experimental design. Generally there are two possibilities regarding the composition of the test treatments: The concentration of the solvent can be equal across all treatments or the different treatments can contain the minimum amount of solvent that is needed to

solubilise the corresponding amount of the test chemical for the respective stock solution. The prior is the more common procedure and recommended by OECD guidelines for aquatic toxicity testing (OECD, 2000). In either case, there is a consensus that the concentration of the solvent control is to be the same as the concentration of the solvent in the highest treatment. In the first part of the present study, acute toxicity tests were conducted employing these two test designs to investigate how different applications of the solvent DMSO and ways of preparing the test media influence the results.

The second part addresses an alternative possibility of toxicity assessment, the induction of stress proteins (heat-shock proteins, hsps) as a potential biomarker for toxicant exposure in *D. magna*. Hsps are phylogenetically highly conserved proteins grouped according to their molecular weight. Especially the induction of the predominant and best-characterized family of hsp70 has been regarded a suitable biomarker for proteotoxicity caused by the collectivity of stressors on various organisms (e.g., Triebkorn et al., 1997, Feder and Hofmann, 1999 and Sørensen et al., 2003). The term proteotoxicity is used to describe the serious impairments such as misfoldings, degradation and synthesis of aberrant proteins in cells exposed to a wide range of stressors. Organisms respond with the expression of hsps which repair and protect such damaged proteins (Hightower, 1991 and Sanders and Martin, 1993). Aiming at the evaluation of hsp70 as a biomarker in *D. magna* as well as gaining some insight into the mechanism of toxic action, the proteotoxic potential of diclofenac and confounding effects of DMSO was determined.

2. Materials and methods

2.1. Maintenance of cultures

D. magna cultures, obtained from the Federal Environment Agency, Germany, were maintained in 2 l glass beakers and daily fed a mixture of *Selenastrum capricornutum* and *Scenedesmus subspicatus*. Reconstituted hard water with the following parameters was used throughout the study: pH 7.8 ± 0.2 hardness as CaCO_3 $250 \text{ mg l}^{-1} \pm 25 \text{ mg l}^{-1}$ and a dissolved oxygen concentration above 7 mg l^{-1} (OECD, 2004). The culture medium was renewed twice a week. Cultures and all experiments were run in an environmental chamber at temperatures of $20 \text{ }^\circ\text{C}$ and a photoperiod of 16:8 h light:dark. Before and after

exposures, the parameters pH, dissolved oxygen and temperature were measured. During exposure, daphnids were not fed and the medium was not renewed.

2.2. Acute immobilisation test

The 48-h acute toxicity tests using *D. magna* were conducted using the OECD standard operating procedure 202 (OECD, 2004).

Twenty daphnids younger than 24 h were used for the controls and each treatment was subdivided into four replicates containing five daphnids each. Test volume was 50 ml. The criterion for a valid bioassay was a rate of less than 10% immobilized individuals in the control group. A reference substance was tested for EC₅₀ as a means of assuring that the test conditions were reliable. Potassium dichromate was used for this purpose and resulting EC₅₀s were compared with standards from international ring-tests (ISO, 1996). Each test was carried out in duplicate. Treatments were: control, one solvent control always containing 0.6 ml l⁻¹ DMSO (Dimethyl sulfoxide, Merck Germany, p.a.) parallel to all assays containing DMSO plus 10, 20, 30, 40, 50, 60, 75, 100, 125 and 150 mg l⁻¹ diclofenac, always nominal concentrations. Range-finding tests were carried out for each exposure regime in advance of the two definite test runs.

Sodium salt of diclofenac (2-[(2,6-Dichlorophenyl)amino]benzene acetic acid sodium salt, Sigma-Aldrich, Germany) was used as diclofenac source. All diclofenac concentrations (including those from literature, as far as herein specified) refer to this salt of diclofenac. All stock solutions and test media were based on reconstituted water (OECD, 2004).

Different approaches to stock solution preparation and solvent application were employed, and are referred to as:

- D: Diclofenac tested as a singular substance, test media prepared by dilution from an aqueous stock solution of diclofenac-Na (150 mg l⁻¹).
- DD1: Diclofenac tested in combination with DMSO, whereby it was first pre-dissolved in DMSO (150 mg in 0.6 ml DMSO), then filled up with water to 1 l. Test media were made by dilution from this stock solution and supplemented to the same concentration of DMSO (0.6 ml l⁻¹).
- DD2: Diclofenac tested in combination with DMSO without the pre-dissolving procedure. After preparing the test media according to method D, equal amounts of DMSO were added to each test solution, resulting in a concentration of 0.6 ml l⁻¹ DMSO.

•DD3: Diclofenac tested in combination with DMSO, whereby it was pre-dissolved in DMSO (150 mg in 0.6 ml DMSO and filled up with water to 1 l) according to the method DD1, but without supplementing all test solutions to the same concentration of DMSO. Hence the test media only contained the amount of DMSO that was required to pre-dissolve the respective amount of diclofenac-Na, for 10 mg l⁻¹ diclofenac: 0.04 ml l⁻¹ of DMSO, for 20 mg l⁻¹: 0.08 ml l⁻¹, 30:0.12, 40:0.16, 50:0.2, 75:0.3, 100:0.4 and 150:0.6. EC₅₀s and corresponding 95% confidence limits were calculated by nonlinear regression (Andersen et al., 1998) using a Microsoft Excel spreadsheet obtained from K.O. Kusk, Technical University of Denmark, Lyngby. EC₅₀s were compared pairwise for statistical difference with the method described by Sprague and Fogels (1977).

2.3. Hsp70 induction

Twelve to nineteen days-old adult daphnids were exposed in glass beakers containing 2 l of medium. Exposure time was 48 h. A control as well as a solvent control (0.6 ml l⁻¹ DMSO) was run in addition to treatments with the concentrations of 5, 10, 20, 30, 40 and 50 mg l⁻¹ of diclofenac as a singular test substance. Concurrently the same concentrations were tested in combination with DMSO, whereby diclofenac-Na was pre-dissolved in DMSO, supplementing all test solutions to the same concentration of DMSO (0.6 ml l⁻¹), according to the method DD1 described for the acute immobilisation test.

After exposure, daphnids were pipetted onto a mesh, superfluous water being removed with absorbent paper, then transferred to Eppendorff cups and flash-frozen in liquid nitrogen. The samples were stored at -20 °C for subsequent analysis. The frozen animals (8-10 animals pooled for one sample) were homogenized by ultrasonication for 15 s in 17 µl of extraction buffer (80 mM potassium acetate, 4 mM magnesium acetate, 20 mM Hepes, pH 7.5), then centrifuged (12 min at 20 000 g and 4 °C). The total protein concentration in each supernatant was determined according to the method described by Bradford (1976). 30 µg of total protein for each sample was loaded on a minigel SDS-PAGE (12% acrylamide: 0.12% bisacrylamide (w/v), 20 min at 80 V, 80 min at 120 V). Protein was transferred to nitrocellulose by semidry blotting, and the filter was blocked for 2 h in 50% horse serum in tris(hydroxymethyl) amino methane (Tris)-buffered saline (TBS) (50 mM Tris, pH 5.7, 150 mM NaCl). After washing in TBS, monoclonal antibody (mouse antihuman hsp 70; Dianova, Germany; dilution 1:5000 in 10% horse serum/TBS) was added, and the sample was then incubated at room temperature overnight. After a

second washing step in TBS for 5 min, the nitrocellulose filter was incubated with the second antibody (goat anti mouse IgG (H + L) coupled to peroxidase (Dianova; dilution 1:1000 in 10% horse serum/TBS)) for 2 h at room temperature. The nitrocellulose filter was then washed again in TBS for 5 min and the antibody complex was detected by 4-chloro(1)naphthol and 0.015% H₂O₂ in 30 mM Tris, pH 8.5, containing 6% methanol. The optical volume of the bands in the immunoblots was quantified by densitometric image analysis (Herolab E.A.S.Y., Germany) and related to an internal standard.

The statistical analysis was carried out using JMP 4.0 (SAS Systems) except for Friedmann ANOVA (Statistika 5.0, StatSoft). Data sets were tested for normality using the Shapiro-Wilk *W* test. Statistical differences between the data-sets were tested by Friedmann ANOVA. If parameter assumptions of normal distribution and homogeneity of variance were met, ANOVA was followed by Dunnett's test to compare the treatment means with respective controls. Where the assumptions were not met, data were analyzed using the nonparametric Wilcoxon's rank test.

3. Results

3.1. Immobilisation tests

In the reference tests, the 24 h EC₅₀ for potassium dichromate was 0.85 mg l⁻¹ and 0.93 mg l⁻¹ in a replicate test four months later. Both results did not differ significantly from the reference interval (0.6-1.7 mg l⁻¹), established as a validity criterion by the ISO (1996). For the diclofenac and DMSO experiments, Fig. 1 gives a representation of the obtained EC₅₀ values with corresponding upper 95% confidence limits. Only the two test runs of the approach DD3 differed with statistical significance. Lowest EC₅₀ values were obtained from approach D, in which diclofenac was tested as a single substance. In combination with DMSO, diclofenac toxicity was decreased to a maximum EC₅₀ of 69.8 mg l⁻¹. Highest EC₅₀s were observed in the experiments DD1 and DD3, both including the pre-dissolving procedure.

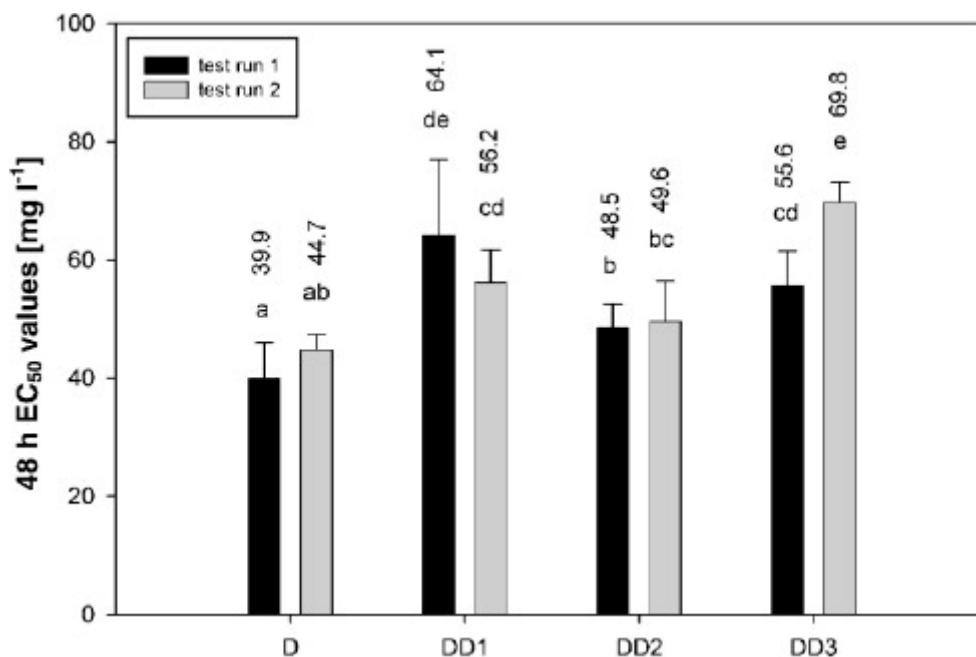


Fig. 1. Fortyeight hours EC₅₀ values and corresponding 95% upper confidence limits from acute toxicity tests of different combinations of diclofenac and DMSO. (D: diclofenac without solvent; DD1: diclofenac pre-dissolved in DMSO [0.6 ml l⁻¹ in all treatments]; DD2: diclofenac solved in water, DMSO added later on [0.6 ml l⁻¹]; DD3: diclofenac pre-dissolved in DMSO, DMSO concentration according to stock solution). Different letters indicate significant differences at $p \leq 0.05$.

3.2. Hsp70-induction

Hsp70 levels of *D. magna* exposed to diclofenac plus DMSO did not differ with any statistical difference from those exposed to the respective diclofenac concentrations alone (Fig. 2). For concentrations above 10 mg l⁻¹ diclofenac, a slight tendency towards more elevated levels of hsp70 could be observed for animals exposed to the mixture of both chemicals compared to those solely exposed to diclofenac. Diclofenac caused dose-dependent over-expression of hsp70 in *D. magna*, independently of the presence of DMSO.

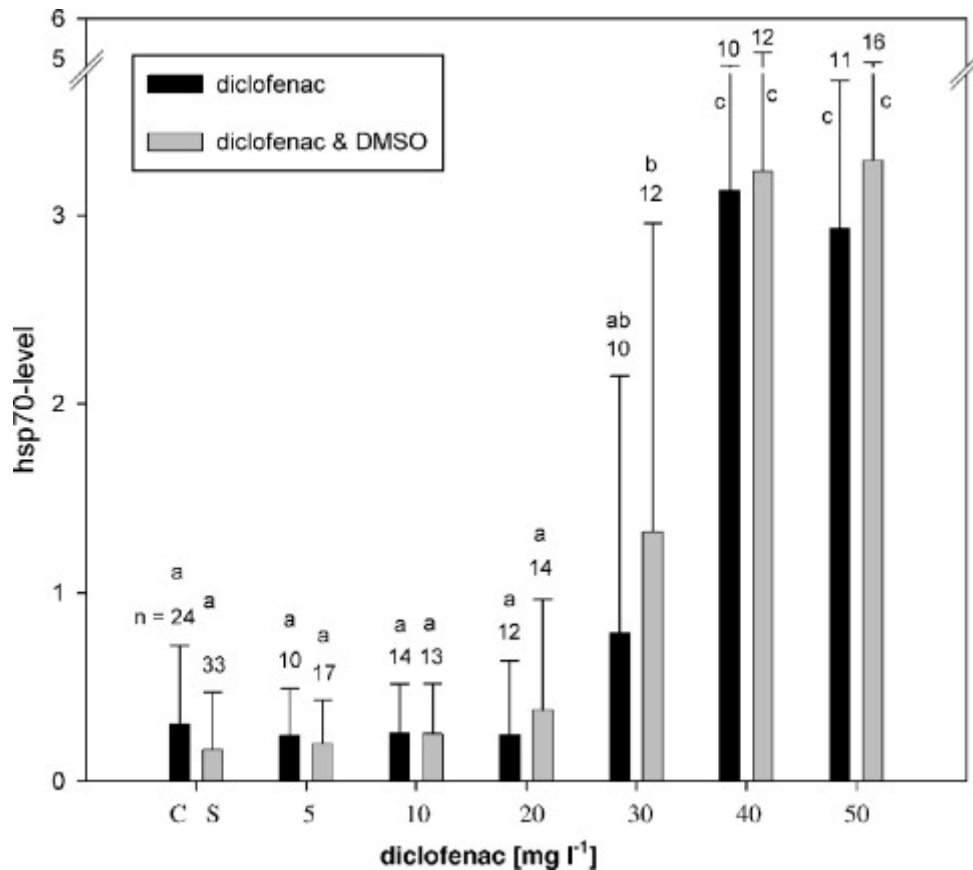


Fig. 2. Relative hsp70-levels after exposure to diclofenac and a combination of diclofenac and DMSO. Combined treatments and solvent control contained DMSO at 0.6 ml l⁻¹. C = control, S = solvent control, *n* = number of replicates per dataset. Different letters indicate significant differences at $p \leq 0.05$, error bars correspond to standard deviation.

Hsp70 levels of daphnids exposed to rather low concentrations of diclofenac (5, 10 and 20 mg l⁻¹) with or without DMSO, did neither differ significantly from one another nor from the control or the solvent control.

The hsp70 levels rose continuously with increasing exposure concentrations. The first statistically significant increase ($p \leq 0.05$) in hsp70 levels of animals exposed to diclofenac in combination with 0.6 ml l⁻¹ DMSO compared to the controls appeared at a concentration of 30 mg l⁻¹ diclofenac, resulting in a LOEC (lowest observed effect concentration) of 30 mg l⁻¹ and a NOEC (no observed effect concentration) of 20 mg l⁻¹ diclofenac. Concerning the corresponding set of concentrations without DMSO, hsp70 levels of *D. magna* did not differ from the control until a concentration of 40 mg l⁻¹ diclofenac. However, statistical significance was high in this case ($p \leq 0.001$) and lower concentrations showed at least a trend towards an increase of hsp70 levels. A LOEC of 40 mg l⁻¹ and a NOEC of 30 mg l⁻¹ can thus be specified for diclofenac as a singular

substance. At the highest concentrations of diclofenac, 40 mg l⁻¹ and 50 mg l⁻¹, mortality rates of about 30% and 40%, respectively, occurred among the exposed animals, independently of the presence or absence of DMSO.

4. Discussion

4.1. Acute toxicity test

Acute and chronic toxicity of DMSO to *D. magna* has been determined by Barbosa et al. (2003): the 48 h EC₅₀ was 24.6 g l⁻¹ and sublethal treatments showed no effect on growth and reproduction. Comparing the present results on confounding effects of DMSO to diclofenac toxicity, it has to be mentioned that the applied concentrations (max. 0.66 g l⁻¹, which was needed to produce the stock solution) are obviously far below the level which exerts toxicity but still above maximum concentrations recommended by most guidelines for toxicity testing (OECD, 2000 and Hutchinson et al., 2006). Lowest EC₅₀s were obtained with diclofenac as singular test substance (Fig. 1, approach D). All other approaches (DD1, DD2 and DD3) contained DMSO in different applications and resulted in higher EC₅₀s. These observations indicate a slightly antagonistic interaction between the two substances. It can only be speculated about underlying causes: DMSO may have an influence on the bioavailability of the drug, its mode of action, or the modification of detoxification enzyme activity.

A large variety of characteristics, often contradictory, are reported for DMSO, some of them possibly accounting for the antagonism. DMSO has membrane stabilizing properties (Kolb et al., 1967, Plotnikov et al., 1990 and Smith et al., 1998). Thus, DMSO could play a protective role in the narcotic mode of action that is assumed for diclofenac, as for most NSAIDs (Clevers, 2003 and Escher et al., 2005). The molecular mechanisms of narcosis, also called baseline toxicity, are unclear, but existing theories agree on the disturbance of membranes in various ways by the hydrophobicity of the pollutant (Clevers, 2005). Furthermore, diclofenac is known to act cytotoxic by the permeabilization of membranes (Tomisato et al., 2004). DMSO could act directly by lowering hydrophobicity and consequently effecting narcosis of diclofenac as well as by an overall stabilization of membranes.

In addition, diclofenac may generate oxidative stress causing lipid peroxidation which again affects membrane integrity (Hickey et al., 2001, Amin and Hamza, 2005 and Kaneko et al., 2007). In turn, many pharmacological advantages of DMSO are based on its ability to scavenge free radicals (Salim, 1992, Carpenter et al., 1994 and Chiappa et al., 2003), offering an explanation for the observed antagonism. Another aspect is the possible influence of DMSO on the distribution of diclofenac in the test media and the adhesion to the test vessels. Those approaches using diclofenac pre-dissolved in DMSO, which is common practice in solvent use, yielded highest EC₅₀s. Thus, the observed antagonism seems to be intensified by pre-dissolution, which may lead to structural changes of the molecules. Analytical methods may prove themselves elucidating in this respect.

4.2. Hsp70-induction

Acute proteotoxic effects of medicinal substances are expected to be low, since those would diminish their pharmaceutical benefit. But pharmaceuticals are designed for specific receptor structures of mammals and other target organisms and can have very different effects on non-target organisms, which are hardly understood (Seiler, 2002). The presence of several functional groups often results in multiple modes of action (Escher and Hermens, 2002). The induction of heat-shock proteins by pharmaceuticals has not yet been studied in invertebrates. Concerning vertebrates, Hallare et al., 2004 and Hallare et al., 2006 did not find significant effects on hsp70 levels in larvae of *Danio rerio* after exposure to 2 mg l⁻¹ diclofenac in combination with 0,4 ml l⁻¹ (0.04% v/v) DMSO for 96 h. These results correspond well with the neutral combination effects of diclofenac and DMSO on hsp70 expression in *D. magna* in the present study. However, in *Danio rerio* larvae, DMSO alone enhanced hsp70 levels even at low concentrations (Hallare et al., 2006). These authors conclude that DMSO is only to be used in concentrations of upto 0.1 ml l⁻¹ (0.01% v/v) as a solvent in experiments examining stress proteins. This cannot be confirmed for *D. magna* from the present observations, with hardly any effects of 0.6 ml l⁻¹ DMSO on hsp70 levels. From several other studies however, DMSO is known to induce stress proteins in many cell types and under various conditions (Yufu et al., 1990, Itoh and Tashima, 1991, Luckenbach et al., 2003, Nazir et al., 2003, Hallare et al., 2004 and Hallare et al., 2006). In contrast to many other common solvents, test organisms tolerate it at rather high doses due to its low acute toxicity (Ali, 2001). Yanaka et al.

(2007) found that another non-toxic hsp70 inducer, geranylgeranylacetone protects the human gastric mucosa from diclofenac-induced injury via the induction of hsp70. The antagonism observed in the immobilisation tests could be explained in the same way, although there is no direct evidence from our hsp70 experiments.

Hsps are present in small amounts in non-stressed cells on a constitutive basis (as shown for the controls in Fig. 2), where they have important functions in normal cellular processes and protein housekeeping, for instance as chaperones (Kammenga et al., 2000 and Sørensen et al., 2003). The high standard deviation in some treatments indicates variation between individuals, a phenomenon often observed in the induction of stress proteins (Werner and Nagel, 1997). Nevertheless, with rising concentrations of diclofenac its proteotoxicity becomes apparent as hsp70 levels increase with hardly any influence of DMSO at the applied concentrations. The indicated proteotoxicity, which may be predominantly derived from a pathological state of the animals considering the high mortality rates at the highest concentrations, raises the question about the corresponding mode(s) of action.

Diclofenac is known to exert its toxicity by damaging renal and gastrointestinal tissue across several vertebrate taxa (Oaks et al., 2004, Triebkorn et al., 2004 and Hoeger et al., 2005). Most toxic side effects, e.g., nephropathy, are due to inhibition of prostaglandin biosynthesis, the basic therapeutic action (Sanchez et al., 2002). However, alternative mechanisms of toxicity have been suggested in the literature, hints can be obtained from about the pathways by which diclofenac could act on protein integrity: The already mentioned generation of reactive oxygen species by diclofenac could account for the protein damage. Another putative mechanism can be derived from the formation of protein adducts, which have been described for diclofenac (Hargus et al., 1995, Atchison et al., 2000 and Jones et al., 2003), such as diclofenac-modified proteins on canalicular membranes of liver sections from treated rats (Seitz et al., 1998).

Comparing the obtained results with those of other studies which aimed at evaluating ecotoxicology of diclofenac, differences in the sensitivity of the different assays are striking. Reported acute and chronic effective concentrations for various endpoints range between $1 \mu\text{g l}^{-1}$ and 80 mg l^{-1} (Table 1). In this study, hsp70 responses largely resembled the sensitivity of the immobility responses. In most of the listed cases these effective concentrations are far higher than those detected in environmental samples. However, considering the situation in the field with mostly very low concentrations, but a continuous entry of pharmaceuticals due to the year-round use of medication, general

chronic effects of diclofenac are certainly more likely to occur. However, it remains still unclear whether this also refers to the induction of hsps, and more research is needed to evaluate long-term ecological implications of the daphnids hsp system in response to pollutants.

Table 1. Toxicity data of diclofenac for aquatic organisms

Organism	Species	Exposure duration	Endpoint	Effect concentration	Reference
Eubacteria	<i>Vibrio fischeri</i>	10 min	Luminescence	EC ₅₀ 13.5 mg l ⁻¹	Farré et al. (2001)
		30 min	Luminescence	EC ₅₀ 11.4 mg l ⁻¹	Ferrari et al. (2004)
River biofilm communities (Bacteria, Protozoa, Micrometazoa)		8 weeks	Biomass, thickness, community structure	10 µg l ⁻¹ and 100 µg l ⁻¹	Lawrence et al. (2007)
Cyanobacteria	<i>Synechococcus leopolensis</i>	96 h	Growth	EC ₅₀ 14.5 mg l ⁻¹ NOEC 10 mg l ⁻¹	Ferrari et al. (2004)
Chlorophyta	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	96 h	Growth	EC ₅₀ 16.3 mg l ⁻¹ NOEC 10 mg l ⁻¹	Ferrari et al. (2004)
	<i>Desmodesmus subspicatus</i>	96 h	Growth	EC ₅₀ 71.9 mg l ⁻¹	Cleuvers (2004)
Diatomea	<i>Cyclotella meneghiniana</i>	96 h	Growth	EC ₅₀ 19.2 mg l ⁻¹ NOEC 10 mg l ⁻¹	Ferrari et al. (2004)
Angiospermae	<i>Lemna minor</i>	7 d	Growth	EC ₅₀ 7.5 mg l ⁻¹	Cleuvers (2003)
Rotatoria	<i>Brachionus calyciflorus</i>	48 h	Reproduction	NOEC 12.5 mg l ⁻¹	Ferrari et al. (2004)
Crustacea	<i>Daphnia magna</i>	48 h	Mortality	EC ₅₀ 22.4 mg l ⁻¹	Ferrari et al. (2004)
		48 h	Mortality	EC ₅₀ 39.9 and 44.7 mg l ⁻¹	this study
		24 h	Mortality	EC ₅₀ 56 mg l ⁻¹	LUA (2002)
		24 h	Mortality	EC ₅₀ 74.27 mg l ⁻¹	LfW (2003)
		48 h	Mortality	EC ₅₀ 68 mg l ⁻¹	Cleuvers (2003)
		21 d	Reproduction	NOEC 200 µg l ⁻¹ LOEC 1 mg l ⁻¹	LfW (2003)
		48 h	Mortality	EC ₅₀ 80.1 mg l ⁻¹	Han et al. (2006)
48 h	Hsp70-level	NOEC 30 mg l ⁻¹	this study		

Kapitel 1

Organism	Species	Exposure duration	Endpoint	Effect concentration	Reference
Pisces	<i>Thamnocephalus platyurus</i>	1 h	Food uptake	LOEC 40 mg l ⁻¹ EC ₅₀ 46 mg l ⁻¹	Nalecz-Jawecki and Persoone (2006)
		24 h	Mortality	EC ₅₀ 41 mg l ⁻¹	
	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	48 h	Mortality	EC ₅₀ 22.7 mg l ⁻¹	Ferrari et al. (2004)
		7 d	Reproduction	NOEC 1 mg l ⁻¹	
	<i>Danio rerio</i> Embryo	96 h	Hatching time	NOEC 500 µg l ⁻¹ LOEC 1 mg l ⁻¹	Hallare et al. (2004)
		96 h	Hsp70	LOEC 2 mg l ⁻¹	
	<i>Danio rerio</i>	10 d	Mortality, hatching	NOEC 4 mg l ⁻¹ LOEC 8 mg l ⁻¹	Ferrari et al. (2003)
		96 h	Mortality	480 ± 50 µg l ⁻¹	Dietrich and Prietz (1999)
	<i>Salmo trutta</i> Embryo		Teratogenicity	EC ₅₀ 90 ± 20 µg l ⁻¹	
		96 h	Mortality	EC ₅₀ 214 mg l ⁻¹	LUA (2002)
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	90 d	Hatching time	NOEC 1 mg l ⁻¹ LOEC 2 mg l ⁻¹	Bach (2004)
		2 Months	Mortality, hatching, development, teratogenicity	NOEC 500 µg l ⁻¹	LfW (2004)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	28 d	Hsp70 in liver, kidney	NOEC 500 µg l ⁻¹	Eikemper (2003)	
	28 d	Histopathology	NOEC 1 µg l ⁻¹ LOEC 5 µg l ⁻¹	Schwaiger et al. (2004)	
	28 d	Ultra structure, liver glycogen, kidney protein	NOEC <1 µg l ⁻¹ LOEC 1 µg l ⁻¹	Triebskorn et al. (2004)	

Acknowledgements

Thanks are due to K.O. Kusk for sending his ExcelStat spreadsheet and C. Harvey for the language pre-review as well as two anonymous reviewers.

References

- Ali, B.H., 2001. Dimethyl Sulfoxide: recent pharmacological and toxicological research. *Vet. Human Toxicol.* 43, 228-231.
- Amin, A., Hamza, A.A., 2005. Oxidative stress mediates drug-induced hepatotoxicity in rats: A possible role of DNA fragmentation. *Toxicology* 208, 367-375.
- Andersen, J.S., Holst, H., Spliid, H., Andersen, H., Baun, A., Nyholm, N., 1998. Continuous ecotoxicological data evaluated relative to a control response. *J. Agri. Biol. Environ. Stat.* 3, 405-420.
- Atchison, C.R., West, A.B., Balakumaran, A., Hargus, S.J., Pohl, L.R., Daiker, D.H., Aronson, J.F., Hoffmann, W.E., Shipp, B.K., Treinen-Moslen, M., 2000. Drug enterocyte adducts: possible causal factor for diclofenac enteropathy in rats. *Gastroenterology* 119, 1537-1547.
- Bach, S., 2004. Effekte von Diclofenac und komplexen Belastungen im Freiland auf die Entwicklung der Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*). Diploma thesis, Universität Tübingen, Germany.
- Barbosa, I.R., Martins, R.M., Sá e Melo, M.L., Soares, A.M.V.M., 2003. Acute and chronic toxicity of dimethylsulfoxide to *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 70, 1264-1268.
- Bowman, M.C., Oller, W.L., Cairns, T., 1981. Stressed bioassay systems for rapid screening of pesticide residues. Part I: evaluation of bioassay systems. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 10, 9-24.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein, utilising the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brayton, C.F., 1986. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. *Cornell. Vet.* 76, 61-90.
- Carpenter, R.J., Angel, M.F., Morgan, R.F., 1994. Dimethyl sulfoxide increases the

- survival of primarily ischemic island skin flaps. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 110, 228-231.
- Chiappa, A., Makuuchi, M., Zbar, A.P., Biella, F., Bellomi, M., Biffi, R., Bertani, E., Vezzoni, A., Crosta, C., Andreoni, B., 2003. Effects of the free radical scavenger dimethyl sulphoxide on experimental normothermic ischaemia of the liver. *Dig. Surg.* 20, 238-245.
- Cleuvers, M., 2003. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicol. Lett.* 142, 185-194.
- Cleuvers, M., 2004. Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 59, 309-315.
- Cleuvers, M., 2005. Initial risk assessment for three b-blockers found in the aquatic environment. *Chemosphere* 59, 199-205.
- Dietrich, D.R., Prietz, A., 1999. Fish embryotoxicity and teratogenicity of pharmaceuticals, detergents and pesticides regularly detected in sewage treatment plant effluents and surface waters. *Toxicologist* 48, 151.
- Eikemper, R., 2003. Die Wirkung von Diclofenac auf zelluläre und biochemische Parameter bei der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*). Graduate thesis, Universität Tübingen, Germany.
- El Jay, A., 1996. Toxic effects of organic solvents on the growth of *Chlorella vulgaris* and *Selenastrum capricornutum*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 57, 191-198.
- Escher, B.I., Hermens, J.L.M., 2002. Modes of action in ecotoxicology: their role in body burdens, species sensitivity, QSARs, and mixture effects. *Environ. Sci. Technol.* 36, 4201-4217.
- Escher, B.I., Bramaz, N., Eggen, R.I.L., Richter, M., 2005. In vitro assessment of modes of toxic action of pharmaceutical in aquatic life. *Environ. Sci. Technol.* 39, 3090-3100.
- EU, 2001. CPMPpaperRAssessHumPharm 12062001. Draft discussion paper on Environmental Risk Assessment of Medical Products for Human Use, expressed at the 24th CSTE Plenary Meeting, 12 June, 2001.
- Farré, M., Ferrer, B., Ginebreda, A., Figueras, M., Olivella, L., Tirapu, L., Vilanova, M., Barcelo, D., 2001. Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid chromatography-mass spectrometry: methods and preliminary results including toxicity studies with *Vibrio fischeri*. *J. Chromatogr. A* 938, 187-197.
- Feder, M.E., Hofmann, G.E., 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. *Ann. Rev. Physiol.* 61, 243-282.

- Fent, K., Weston, A.A., Caminada, D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* 76, 122-159.
- Ferrari, B., Paxéus, N., Lo Giudice, R., Pollio, A., Garric, J., 2003. Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibrac acid, and diclofenac. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 55, 359-370.
- Ferrari, B., Mons, R., Vollat, B., Fraysse, B., Paxéus, N., Lo Giudice, R., Pollio, A., Garric, J., 2004. Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: Are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment? *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 1344-1354.
- Hallare, A.V., Köhler, H.-R., Triebkorn, R., 2004. Developmental toxicity and stress protein responses in zebrafish embryos after exposure to diclofenac and its solvent, DMSO. *Chemosphere* 56, 659-666.
- Hallare, A.V., Nagel, K., Köhler, H.-R., Triebkorn, R., 2006. Comparative embryotoxicity of three carrier solvents to zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 63, 378-388.
- Halling-Sørensen, B., Nielsen, S.N., Lanzky, P.F., Ingerslev, F., Holten Lützhof, H.C., Jørgensen, S.E., 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment-a review. *Chemosphere* 36, 357-393.
- Han, G.H., Hur, H.G., Kim, S.D., 2006. Ecotoxicological risk of pharmaceuticals from wastewater treatment plants in Korea: occurrence and toxicity to *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 265-271.
- Hargus, S.J., Martin, B.M., George, J.W., Pohl, L.R., 1995. Covalent modification of rat liver dipeptidyl peptidase IV (CD26) by the nonsteroidal anti-inflammatory drug diclofenac. *Chem. Res. Toxicol.* 8, 993-996.
- Hickey, E.J., Raje, R.R., Reid, V.E., Gross, S.M., Ray, S.D., 2001. Diclofenac induced in vivo nephrotoxicity may involve oxidative stress-mediated massive genomic DNA fragmentation and apoptotic cell death. *Free Radical Biol. Med.* 31, 139-152.
- Hightower, L., 1991. Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. *Cell* 66, 191-197.
- Hoeger, B., Köllner, B., Dietrich, D.R., Hitzfeld, B., 2005. Water-borne diclofenac affects kidney and gill integrity and selected immune parameters in brown trout (*Salmo trutta f. fario*). *Aquat. Toxicol.* 75, 53-64.

- Hutchinson, T.H., Shillabeer, N., Winter, M.J., Pickford, D.B., 2006. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: a critical review. *Aquat. Toxicol.* 76, 69-92.
- ISO (International Organization for Standardization), 1996. 6341 Water quality - Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) -Acute toxicity test. Third edition, 1996.
- Itoh, H., Tashima, Y., 1991. The stress (heat shock) proteins. *Int. J. Biochem.* 23, 1185-1191.
- Jones, O., Voulvoulis, N., Lester, J., 2001. Human pharmaceuticals in the aquatic environment a review. *Environ. Technol.* 22, 1383-1394.
- Jones, J.A., Kaphalia, L., Treinen-Moslen, M., Liebler, D.C., 2003. Proteomic Characterization of metabolites, protein adducts and biliary proteins in rats exposed to 1,1-dichloroethylene and diclofenac. *Chem. Res. Toxicol.* 16, 1306-1317.
- Kahl, M.D., Russom, C.L., DeFoe, D.L., Hammermeister, D.E., 1999. Saturation units for use in aquatic bioassays. *Chemosphere* 39, 539-551.
- Kammenga, J.E., Dallinger, R., Donker, M.H., Köhler, H.-R., Simonsen, V., Triebkorn, R., Weeks, J.M., 2000. Biomarkers in terrestrial invertebrates for ecotoxicological soil risk assessment. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 164, 93-147.
- Kaneko, T., Matsui, H., Shimokawa, O., Nakahara, A., Hyodo, I., 2007. Cellular membrane fluidity measurement by fluorescence polarization in indomethacin-induced gastric cellular injury in vitro. *J. Gastroenterol.* 42, 939-946.
- Kolb, K.H., Jaenicke, G., Kramer, M., Schulze, P.E., 1967. Absorption, distribution and elimination of labeled dimethyl sulfoxide in man and animals. *Ann. NY Acad. Sci.* 141, 85-95.
- Lawrence, J.R., Swerhone, G.D., Topp, E., Korber, D.R., Neu, T.R., Wassenaar, L.I., 2007. Structural and functional responses of river biofilm communities to the nonsteroidal anti-inflammatory diclofenac. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 573-582.
- LfW, 2003. Arzneimittel in der Umwelt. Abschlussbericht des Bayerischen Landesamtes für Wasserwirtschaft zum Forschungs-und Entwicklungsvorhaben 2000-2003.
- LfW, 2004. Ökotoxikologische Auswirkungen von Arzneimitteln. Langzeitwirkungen bei Fischen. Abschlussbericht des Bayerischen Landesamtes für Wasserwirtschaft zum Forschungs-und Entwicklungsvorhaben 2001-2003.

LUA (Landesumweltamt Brandenburg), 2002. Ökotoxikologische Bewertung von Humanarzneimitteln in aquatischen Ökosystemen. Studien und Tagungsberichte, Band 39.

Luckenbach, T., Ferling, H., Gernhöfer, M., Köhler, H.-R., Negele, R.-D., Pfefferle, E., Triebkorn, R., 2003. Developmental and subcellular effects of chronic exposure to sub-lethal concentrations of ammonia, PAH and PCP mixtures in brown trout (*Salmo trutta f. fario* L.) early life stages. *Aquat. Toxicol.* 65, 39-54.

Nalecz-Jawecki, G., Persoone, G., 2006. Toxicity of Selected Pharmaceuticals to the Anostracan Crustacean *Thamnocephalus platyurus*: comparison of Sublethal and Lethal Effect Levels with the 1 h Rapidtoxkit and the 24 h Thamnotoxkit Microbiotests. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 13, 22-27.

Nazir, A., Mukhopadhyay, I., Saxena, D., Kar Chowdhuri, D., 2003. Evaluation of the no observed adverse effect level of solvent dimethyl sulfoxide in *Drosophila melanogaster*. *Toxicol. Mech. Methods* 13, 147-152.

Oaks, J.L., Gilbert, M., Virani, M.Z., Watson, R.T., Meteyer, C.U., Rideout, B.A., Shivaprasad, H.L., Ahmed, S., Chaudry, M.J.I., Arshad, M., Mahmood, S., Ali, A., Khan, A.A., 2004. Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *Nature* 427, 630-633.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), 2000. Series on Testing and Assessment, OECD Environmental Health and Safety Publications Number 23, Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environment Directorate OECD, Paris.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), 2004. Guideline for Testing of Chemicals, 202, *Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test. Environment Directorate OECD, Paris.

Plotnikov, M.B., Avdoshin, A.D., Chernysheva, G.A., Saratikov, A.S., 1990. Dimethyl sulfoxide as a corrector of disturbances of the cerebral circulation and oxygen and carbohydrate metabolism and of lipid peroxidation soon after intracerebral hemorrhage. *B. Exp. Biol. Med.* 109, 466-468.

Rufli, H., Fisk, P.R., Girling, A.E., King, J.M.H., Länge, R., Lejeune, X., Stelter, N., Stevens, C., Suteau, P., Tapp, J.F., Thus, J., Versteeg, D.J., Niessen, H.J., 1998. Aquatic toxicity testing of sparingly soluble, volatile and unstable substances and interpretation and use of data. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 39, 72-77.

- Salim, A.S., 1992. Role of oxygen-derived free radical scavengers in the management of recurrent attacks of ulcerative colitis: a new approach. *J. Lab. Clin. Med.* 119, 710-717.
- Sanchez, S., Alarcon de la Lastra, C., Ortiz, P., Motilva, V., Martin, M.J., 2002. Gastrointestinal tolerability of metamizol, acetaminophen, and diclofenac in subchronic treatment in rats. *Dig. Dis. Sci.* 47, 2791-2798.
- Sanders, B.M., Martin, L.S., 1993. Stress proteins as biomarkers of contaminant exposure in archived environmental samples. *Sci. Total Environ.* 139, 459-470.
- Schwaiger, J., Ferling, H., Mallow, U., Wintermayr, H., Negele, R.D., 2004. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part I. Histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquat. Toxicol.* 68, 141-150.
- Seiler, J.P., 2002. Pharmacodynamic activity of drugs and ecotoxicology -can the two be connected? *Toxicol. Lett.* 131, 105-115.
- Seitz, S., Kretz-Rommel, A., Oude Elferink, R.P.J., Boelsterli, U.A., 1998. Selective Protein Adduct Formation of Diclofenac Glucuronide Is Critically Dependent on the Rat Canalicular Conjugate Export Pump (Mrp2). *Chem. Res. Toxicol.* 11, 513-519.
- Smith, D.J., Schulte, M., Bischof, J.C., 1998. The effect of dimethyl sulfoxide on the water transport response of rat hepatocytes during freezing. *J. Biomech. Eng.* 120, 549-558.
- Sørensen, J.G., Kristensen, T.N., Loeschke, V., 2003. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecol. Lett.* 6, 1025-1037.
- Sprague, J.B., Fogels, A., 1977. Watch the y in bioassay. Proceedings, Third Aquatic Toxicity Workshop in Halifax, N.S. Environmental Protection Service Technical Report EPS-5-AR-77-1. Sprague, Fogels, Halifax, NS, Canada, pp. 107-118.
- Stratton, G.W., 1985. The influence of solvent type on solvent-pesticide interactions in bioassays. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 14, 651-658.
- Tomisato, W., Tanaka, K., Katsu, T., Kakuta, H., Sasaki, K., Tsutsumi, S., Hoshino, T., Aburaya, M., Li, D., Tsuchiya, T., Suzuki, K., Yokomizo, K., Mizushima, T., 2004. Membrane permeabilization by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 323, 1032-1039.
- Triebkorn, R., Köhler, H.-R., Honnen, W., Schramm, M., Adams, S.M., Müller, E.F., 1997. Induction of heat shock proteins, changes in liver ultrastructure, and alterations of fish behaviour: are these biomarkers related and are they useful to reflect the state of pollution in the field? *J. Aquat. Ecosyst. Stress. Recov.* 6, 57-73.

Triebskorn, R., Casper, H., Heyd, A., Eikemper, R., Köhler, H.-R., Schwaiger, J., 2004. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac Part II. Cytological effects in liver, kidney, gills and intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 68, 151-166.

Werner, I., Nagel, R., 1997. Stress proteins Hsp60 and Hsp70 in three species of amphipods exposed to cadmium, diazinon, dieldrin and fluoranthene. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 2393-2403.

Yanaka, A., Zhang, S., Sato, D., Tauchi, M., Suzuki, H., Shibahara, T., Matsui, H., Nakahara, A., Hyodo, I., 2007. Geranylgeranylacetone protects the human gastric mucosa from diclofenac-induced injury via induction of heat shock protein 70. *Digestion* 75, 148-155.

Yufu, Y., Nishimura, J., Ideguchi, H., Nawata, H., 1990. Enhanced synthesis of heat shock proteins and augmented thermotolerance after induction in HL-60 human leukemia cells. *FEBS Lett.* 268, 173-176.

Kapitel 2: Cadmium tolerance in seven *Daphnia magna* clones is associated with reduced hsp70 baseline levels and induction

Timo Haap, Heinz-R. Köhler ^a

^a Animal Physiological Ecology Department, University of Tübingen, Konrad-Adenauer-Str.
20, 72072 Tübingen, Germany

Published in: Aquatic Toxicology, 2009, 94: 131-137

Abstract

The stress protein hsp70 is part of the intracellular alarm and repair system which enables organisms to counteract negative effects of toxicants on protein integrity. Under long-term selection pressure exerted by environmental pollution, in particular heavy metals, this system may be expected to play a major role in the course of local, microevolutionary events leading to the acquisition of toxicant resistance. Seven clones of *Daphnia magna* from different geographical regions were characterized regarding their sensitivity to Cd, their hsp70 expression, and Cd accumulation. In an acute immobilisation assay, the tested clones showed remarkable differences in their sensitivity to Cd. The highest EC₅₀ values by far were obtained for the clone displaying lowest hsp70 expression. In general, hsp70 levels reflected the order of sensitivity to Cd among the seven clones reciprocally. Clonal variations in sensitivity and hsp70 expression could not be related to differential accumulation of Cd, though. In summary, the association of stress insensitivity with low hsp70 induction which has been exemplarily reported for populations of different invertebrates under strong selection pressure could be affirmed for a largely parthenogenetic species for the first time. Furthermore, our observation has serious consequences for the interpretation of toxicological assays using a single *D. magna* clone solely.

Keywords: Adaptation; Resistance; Heavy metals; Microevolution; Heat shock proteins

1. Introduction

It is known that adaptation of organisms to environmental stress involves genetically fixed traits in natural populations (Posthuma et al., 1993 and Morgan et al., 2007). Selection for resistance in e.g. metal-contaminated environments may lead to locally adapted ecotypes displaying an elevated tolerance to metal toxicity (Sørensen et al., 2003). The issue is of crucial importance in ecotoxicology, because different genotypes of a given species of test animals can thus react differently both in laboratory tests and in field monitoring. *Daphnia magna* is widely used as a standard test organism in aquatic toxicology, and compared to other organisms its clonal method of reproduction (ameiotic parthenogenesis) allows most reproducible results, exclusive of different culture and test conditions. However, *D. magna* toxicity tests have revealed substantial variability in the sensitivity of different clones to metals (Baird et al., 1989, Baird et al., 1991, Soares et al., 1992 and Barata et al., 2002). Such clonal differences are an issue of concern when test results are compared among different laboratories using different clones of *Daphnia*. In this context, existing literature on metal toxicity indicates particularly Cd to result in considerable interclonal differences in sensitivity (Baird et al., 1991, Barata et al., 1998 and Ward and Robinson, 2005).

The far-reaching implications for toxicity testing and environmental monitoring call for the investigation of these clone-specific variations (Baird and Barata, 1998). Many biochemical and physiological processes may be responsible for differences in metal tolerance and, generally, the effects of heavy metal toxicity at the cellular level are not adequately recognized yet (e.g. Warchalowska-Sliwa et al., 2005). The asexual reproduction of *Daphnia* offers the possibility of studying such physiological processes for distinct clones without interference by intra-clonal genetic variability (Barata et al., 2002 and Antunes et al., 2003).

Heat shock proteins (hsps, stress proteins) are considered to play a major role in the development of stress resistance and adaptation to the environment (reviewed by Sørensen et al., 2003). Hsps are phylogenetically highly conserved proteins which are abundant in all organisms and grouped according to their molecular weight (Lindquist, 1986). The most intensively studied stress protein family, hsp70, is induced by a wide variety of adverse effects on intracellular protein integrity including heavy metals (Sanders, 1993). They function as molecular chaperones (Sanders and Martin, 1993) counteracting intracellular proteotoxic action during or after stress (Lindquist, 1986 and

Feder and Hofmann, 1999). Due to its rapid inducibility by overall proteotoxic toxicant stress at mostly sublethal levels, hsp70 has been regarded a suitable biomarker for proteotoxicity in various organisms (Köhler et al., 1992, Triebkorn et al., 1997, Feder and Hofmann, 1999 and Sørensen et al., 2003). It has further been used to indicate whether organisms originated from metal polluted sites (Köhler et al., 1992, Sanders, 1993, Köhler and Eckwert, 1997 and Köhler et al., 1998). In this context, however, local adaptation and selection for other kinds of adaptive traits may be encountered as a problem to the ecotoxicological interpretation of the results (Sørensen et al., 2003 and Morgan et al., 2007). The issue attracted attention, since in natural populations of *Drosophila* from different climates (Sørensen et al., 2001), three species of isopods and diplopods (Köhler et al., 2000) and in grasshoppers (Warchalowska-Sliwa et al., 2005) chronically exposed to heavy metals in contaminated environments, lower levels of hsp70 were found in individuals from stressful habitats than in those of the reference areas. The association of genetically fixed stressor insensitivity with low hsp70 levels found in these field surveys was further investigated in the present study.

We examined the role of hsp70 in the acquisition of resistance to Cd by evaluating seven clones of *D. magna* randomly chosen from different regions across Europe. For each clone, baseline and induced hsp70 levels after exposure to a Cd concentration gradient were correlated to sensitivity in acute immobilisation tests. For further understanding of differences in hsp70 responses and sensitivity between these clones, Cd accumulation was measured for each clone additionally.

2. Materials and methods

2.1. Maintenance and testing

Five *D. magna* strains, originating from ponds near Oxford, England; Moscow, Russia; Tvärminne, Finland; Leuven, Belgium and Munich, Germany and named E,R,F,B and K, respectively, were obtained from the Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany. Clone O was obtained from the Federal Environment Agency, Germany. Clone X originated from a pond near Stuttgart, Germany. Each clonal culture was started from one parthenogenetic female and was acclimated to the same laboratory conditions for more than 5 months. Both for culture and testing, only offspring from the third to sixth brood were used. Daphnids were maintained in 5 l plastic aquaria and daily fed *Scenedesmus*

subspicatus according to the animals age: 3×10^6 , 5×10^6 , and 6×10^6 cells/day per individual aged 0-7 days, 8-15 days, and older than 15 days, respectively. Tap water aged and dechlorinated for 4 days in 50 l aerated plastic tanks and $1 \mu\text{g l}^{-1}$ Selenium added, with the following regularly surveyed parameters was used throughout the study: pH 7.7, hardness as CaCO_3 25 mmol l^{-1} . The culture medium was renewed twice a week, all cultures were strictly synchronized. To exclude artefacts due to inevitable slight differences over time in culture and testing, exposures in all experiments were carried out simultaneously for the seven clones. Cultures and all experiments were run in an environmental chamber at temperatures of 20 C and a photoperiod of 16:8 h light:dark. Before and after exposures, the parameters pH, dissolved oxygen and temperature were measured.

2.2. Chemicals and measurements

A stock solution of 1 g l^{-1} Cd was prepared using CdCl_2 and acidified (0.2%, HNO_3), with no pH variations in test media. In all controls, respective amounts of acidified water (0.2%) were added. Materials in contact with the culture and test media were soaked for 24 h in 5% HNO_3 and rinsed with deionized water. All Cd concentrations in test media and digested daphnid samples were measured and verified by flame atom absorption spectrophotometry (F-AAS, Perkin-Elmer M1100, Waltham, Massachusetts, USA) using a Tritisol Cd standard (1 g l^{-1} , Merck Darmstadt, Germany). Water samples of 9 ml were acidified with 1 ml concentrated HNO_3 . Calibration standards and a reagent blank were analysed with every 10 samples. Measured concentrations never differed more than 10% from the nominal values.

2.3. Acute immobilisation test

The 48 h acute toxicity tests using *D. magna* were conducted using the OECD standard operating procedure 202 (OECD, 2004).

Twenty daphnids younger than 24 h were used for the controls and each treatment was subdivided into four replicates containing five daphnids each. Test volume was 50 ml. Each test was carried out five times, integrating over two generations. Treatments were: control, 200, 400, 500, 600 and $800 \mu\text{g l}^{-1}$ Cd, always nominal concentrations. During exposure, daphnids were not fed and the medium was not renewed.

2.4. Hsp70 induction

Five-days-old daphnids were exposed in plastic aquaria containing 2 l of medium. Exposure time was 24 h. A control was run in addition to treatments with the concentrations of 5, 20, 50, 100 and 300 $\mu\text{g l}^{-1}$. T₀ animals were sampled with the onset of the test. Exposure concentrations and conditions were chosen from pre-experiments to sufficiently affect the hsp70 levels without the occurrence of mortality.

After exposure, daphnids were pipetted onto a mesh, superfluous water being removed with absorbent paper, then transferred to Eppendorff tubes and flash-frozen in liquid nitrogen. Frozen animals (8-10 animals pooled for one sample, 9-11 replicate pools per treatment and clone) were homogenized mechanically in extraction buffer (80 mM potassium acetate, 4 mM magnesium acetate, 20 mM Hepes, pH 7.5), then centrifuged (12 min at 20.000 $\times g$ and 4 °C). The total protein concentration in each supernatant was determined according to the method described by Bradford (1976). Further analysis was carried out as described for *Daphnia* by Haap et al. (2008). Thirty micrograms of total protein for each sample were loaded on a minigel SDS-PAGE (12% acrylamide: 0.12% bisacrylamide (w/v)). After semi-dry blotting to nitrocellulose, the filter was blocked in horse serum. After washing in TBS, monoclonal antibody (mouse anti-human hsp70; Dianova, Germany; dilution 1:5000 in 10% horse serum/TBS) was added, and the sample was then incubated at room temperature overnight. After washing in TBS, the nitrocellulose filter was incubated with the second antibody (goat anti-mouse IgG (H + L) coupled to peroxidase; Dianova; dilution 1:1000 in 10% horse serum/TBS) for 2 h at room temperature. The nitrocellulose filter was then washed again in TBS for 5 min and the antibody complex was detected by 4-chloro(1)naphthol and 0.015% H₂O₂ in 30 mM Tris, pH 8.5, containing 6% methanol. The optical volume of the bands in the immunoblots was quantified by densitometric image analysis (Herolab E.A.S.Y., Germany) and related to an internal standard.

2.5. Cadmium accumulation

5-days-old daphnids were exposed to control medium or 300 $\mu\text{g l}^{-1}$ Cd under the same conditions as in the hsp70 experiment. For each clone and condition, four replicates containing approx. 50 animals each were rinsed for 10 s in deionised water, superfluous

water being removed with absorbent paper and dried at 50 °C for 3 days, weighed and digested by adding 1 ml of 67% HNO₃ and heating in a microwave. Samples were diluted with 3 ml of deionised (miliQ) water for subsequent analysis by F-AAS (see above).

2.6. Statistics

EC₅₀s and corresponding 95% confidence limits were calculated by probit analysis using a Microsoft Excel spreadsheet. The statistical analysis was carried out using JMP 4.0 (SAS Systems) except for Friedmann ANOVA (Statistica 7.0, StatSoft). Datasets were tested for normality using the Shapiro-Wilk *W* test. Statistical differences between the datasets were tested by Friedmann ANOVA. If parameter assumptions of normal distribution and homogeneity of variance were met, ANOVA was followed by Dunnett's test (for EC₅₀ values). Where the assumptions were not met, data were analyzed using the nonparametric Wilcoxon's rank test (for hsp70 levels, body burdens).

3. Results

3.1. Immobilisation tests

Fig. 1 displays the variability in the obtained EC₅₀ values from the five test runs with mean values for each clone. A clear hierarchy in the sensitivity of the seven clones towards Cd exposure could be documented, with the of clone K ranging on the very top of each test run. Lowest EC₅₀ values were obtained for clone O. Furthermore, the immobilisation tests spanned over 2 generations revealed a consistence of relative tolerance to Cd between the seven clones.

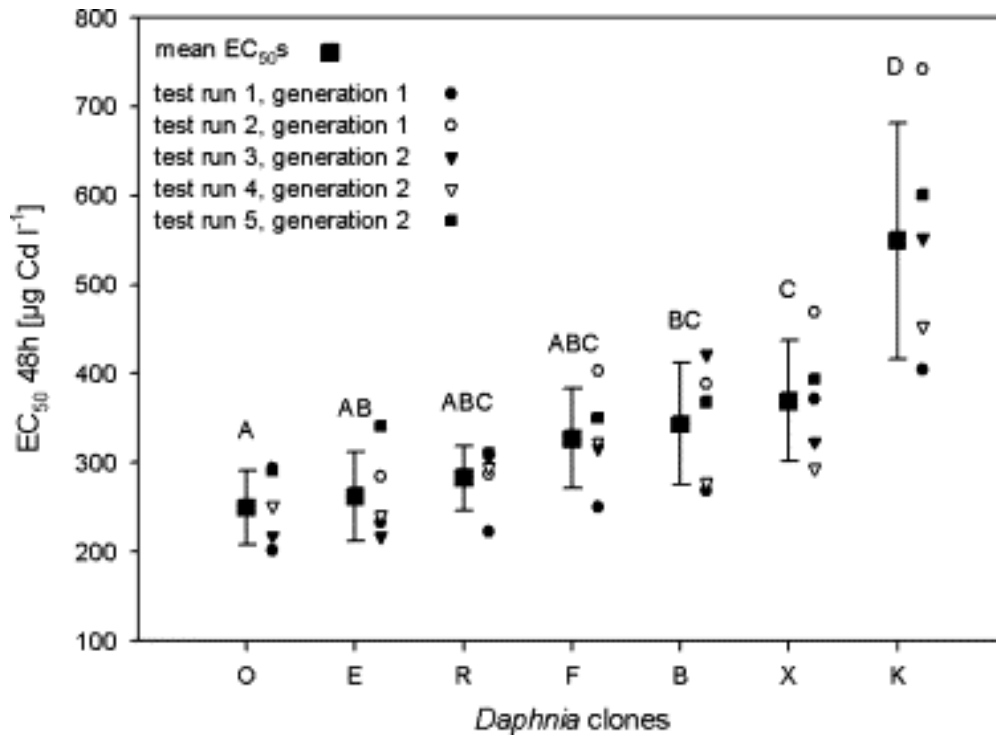


Fig. 1. 48 h EC_{50} values from acute immobilisation tests with Cd. Mean values with standard deviation (error bars), alongside single EC_{50} s of the five test runs, respectively. Different letters indicate significant differences at $p \leq 0.05$.

3.2. Hsp70 induction

Fig. 2 displays hsp70 levels obtained after simultaneous exposure of the seven *D. magna* clones. Cd caused induction of hsp70 in all clones which is indicated by the calculated regressions. The graphs for the different clones are arranged in the same order as those for immobilisation in Fig. 1 (O, E, R, F, B, X, K). A correlation between sensitive clones and high hsp70 levels becomes evident. Particularly K, the least sensitive clone in the immobilisation tests, displayed the overall lowest hsp70 levels, both baseline and induced. Fig. 3 exemplifies the inverse relationship between hsp70 induction and sensitivity. The level of significance for the relationship between the slope of the hsp70 induction in the different *Daphnia* clones and their corresponding EC_{50} s displayed in Fig. 3a ($p \leq 0.06$) indicated a trend; the relationship between the hsp70 levels at $50 \mu\text{g Cd l}^{-1}$ vs. the EC_{50} s [$\mu\text{g l}^{-1}$] measured for the different clones (Fig. 3b) was significant at $p \leq 0.05$. A similar significant relationship was obtained for $100 \mu\text{g l}^{-1}$ vs. EC_{50} s, data not shown.

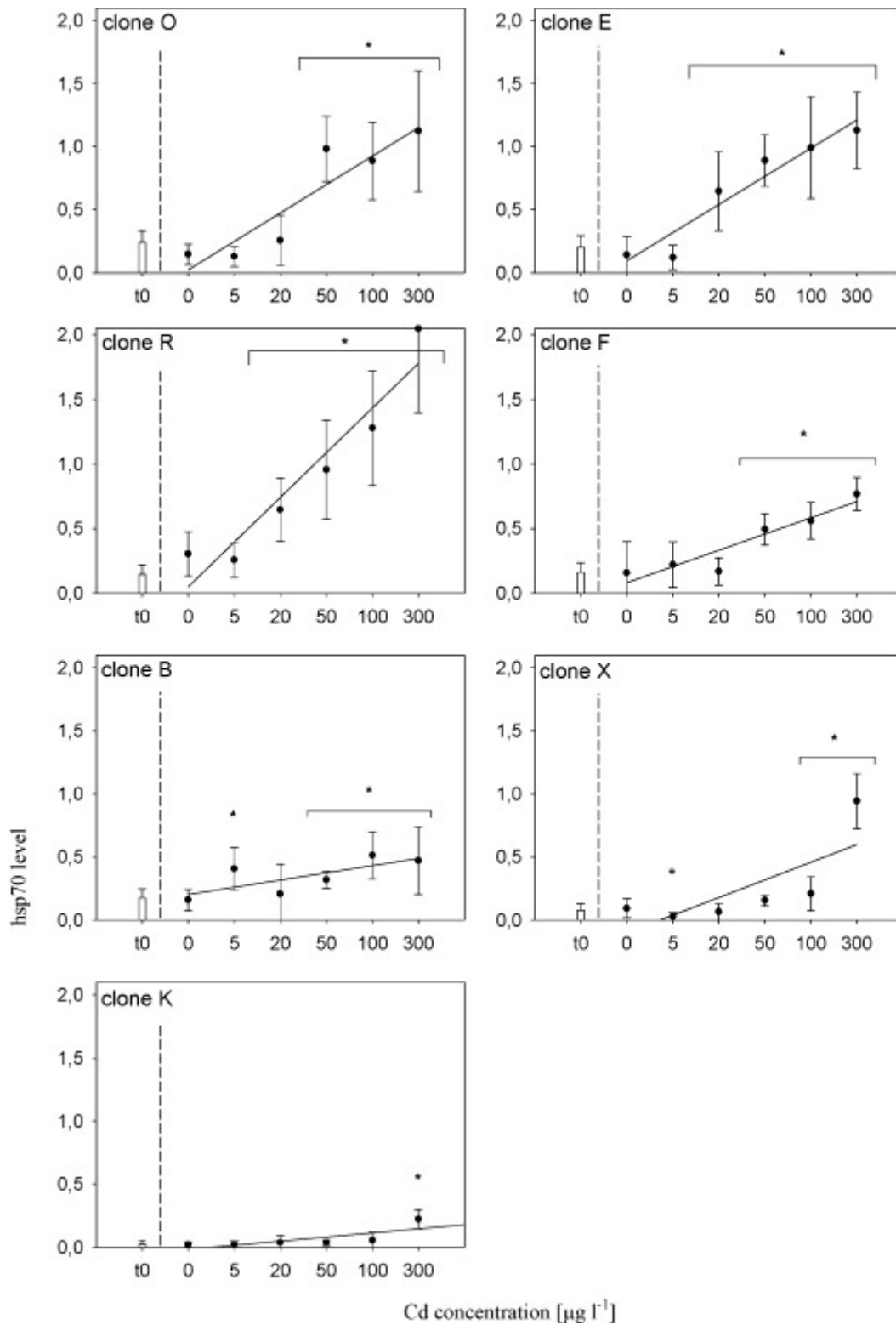


Fig. 2. Hsp70 levels relative to a standard after exposure of the seven clones to a Cd concentration gradient. t_0 columns = levels at the start of the assay, 0 = control, replicates per dataset were between 9 and 11. Error bars correspond to standard deviation. * = significantly ($p \leq 0.05$) different from $0 \mu\text{g l}^{-1}$ (control). Among different clones, significance at the level $p \leq 0.05$ was obtained for t_0 : K,X vs. O,E,R,F,B; K vs. X; R vs. O. $0 \mu\text{g l}^{-1}$ Cd: K vs. O,E,R,F,B,X; X vs. R; R vs. E,O. $5 \mu\text{g l}^{-1}$ Cd: K vs. O,E,R,F,B;

X vs. O,R,F,B; R,E vs. O,B; F vs. B. 20 $\mu\text{g l}^{-1}$ Cd: K,X vs. O,E,R,F; O,F,B vs. E,R. 50 $\mu\text{g l}^{-1}$ Cd: K,X vs. O,E,F,B; X vs. K; B vs. F,R,E,O; F vs. O,E,R. 100 $\mu\text{g l}^{-1}$ Cd: K,X vs. O,E,R,F,B; K vs. X; F,B vs. O,E,R; O vs. R. 300 $\mu\text{g l}^{-1}$ Cd: K,B vs. O,E,R,F,X; F vs. E; R vs. O,E,F,B,X,K.

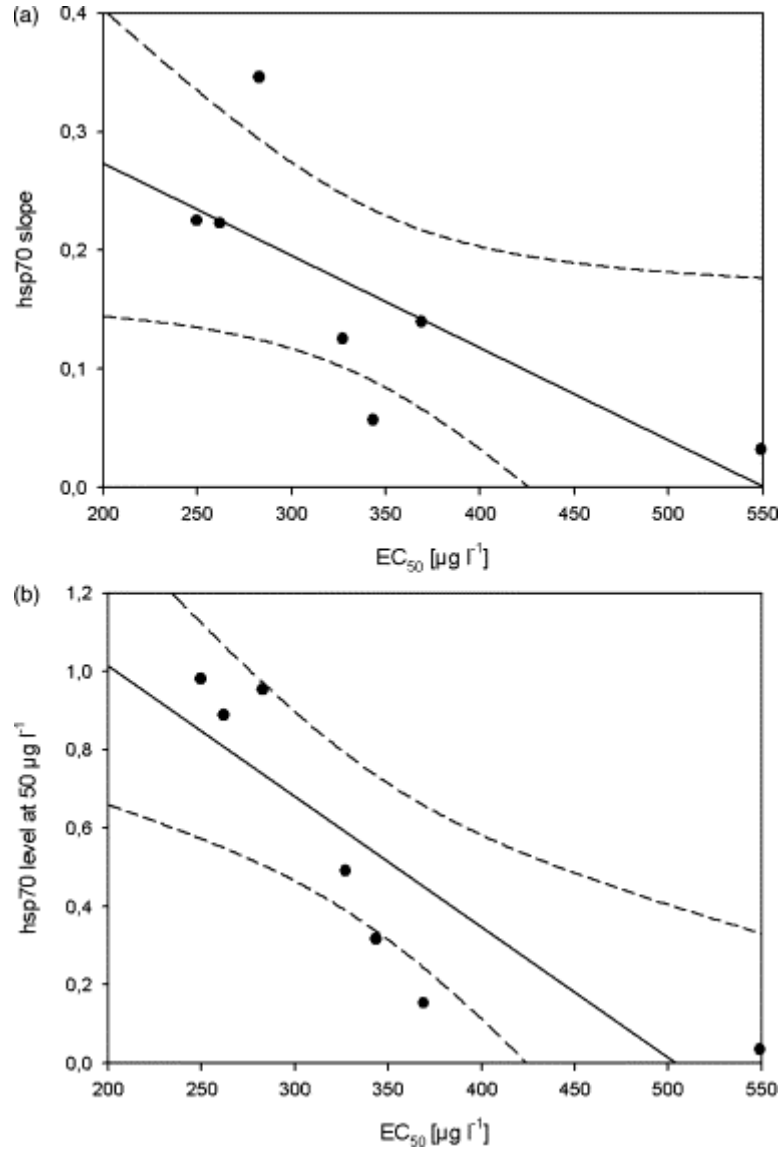


Fig. 3. Relationship between the slopes of the hsp70 response regression lines in Fig. 2 for the seven clones (a) or the hsp70-level at exposure to 50 $\mu\text{g Cd l}^{-1}$ (b) vs. the corresponding mean EC_{50} s. Linear regression and 95% confidence limits, $r^2 = 0.534$ (a) and 0.734 (b).

3.3. Cadmium accumulation

We found some variability in Cd accumulation in the seven clones of *D. magna*. However, clonal variation in neither the immobilisation tests nor the hsp70 response to Cd could be related to differences in Cd accumulation (Fig. 4a and b). The amount of Cd in the control samples was below the detection limit.

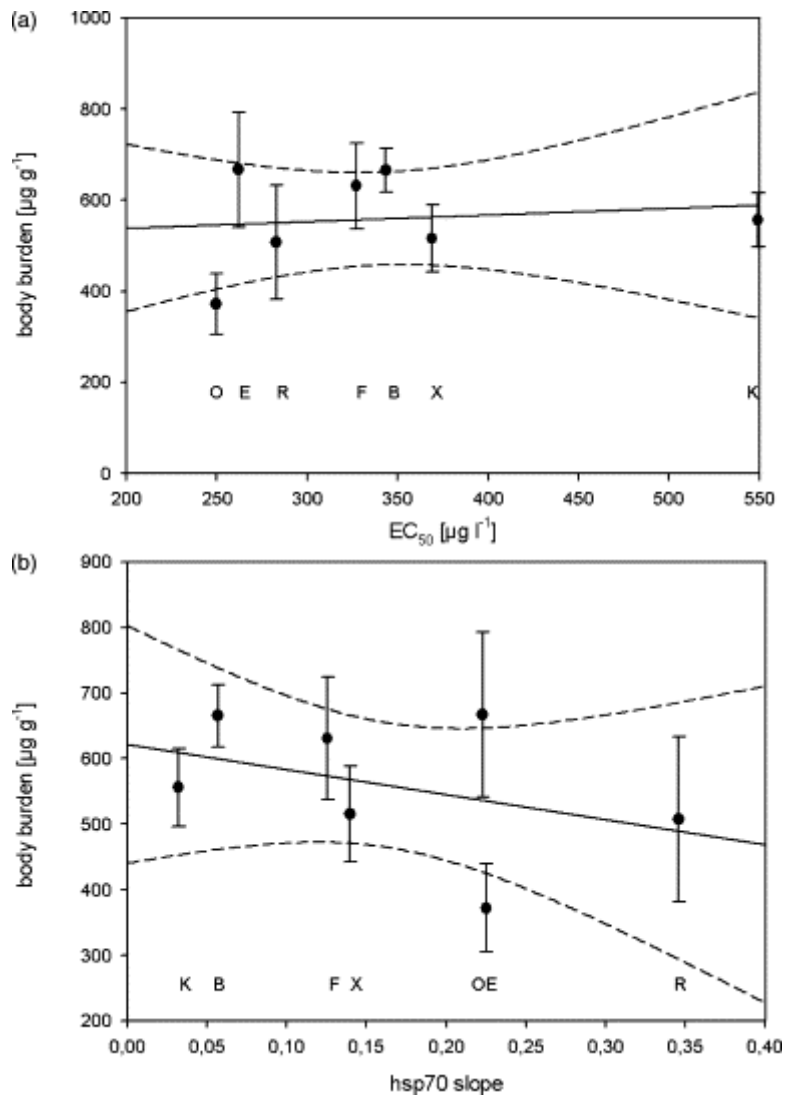


Fig. 4. Relationship between body burdens ($n = 4$) vs. the corresponding mean EC_{50} s (a) or the slopes of the hsp70 response regression lines in Fig. 2 for the seven clones (b). Error bars correspond to standard deviation. Linear regression and 95% confidence limits, $r^2 = 0.018$ (a) and 0.153 (b).

4. Discussion

Metal tolerance can be based either on physiological acclimation, obtained during a relatively short exposure time within a single generation, or on genotypic adaptation as a result of the selection pressure exerted by a trans-generational exposure history of natural populations (Klerks and Weis, 1987, Stuhlbacher et al., 1992, Stuhlbacher et al., 1993 and Bijlsma and Loeschcke, 2005). Consistency of responses between the two tested generations, respectively, points towards heritable rather than environmental determination of the observed tolerance differences (Baird and Barata, 1998). Due to the long period of acclimation of our *Daphnia* to laboratory conditions (more than 4 months), physiological acclimation and maternal effects can be excluded (Lam, 1999, Lopes et al., 2004 and Lopes et al., 2006), and, instead, evolutionary adaptation is most likely to be responsible for the clonal variation in response to Cd in the present study.

The microevolution of ecologically relevant traits is expected to take place rapidly in cyclically parthenogenetic *Daphnia* species (Spitze, 1991, Weber and Declerck, 1997, Declerck et al., 2001), indicating a strong potential to adapt to environmental pollutants (Hairston et al., 1999 and Barata et al., 2002). Especially in quantitative traits, interclonal genetic variation may be selected on efficiently, allowing natural populations to adapt to local conditions (Lynch and Gabriel, 1983). Although the genes for hsp70 are among the most ancient and highly conserved known, several studies provide evidence of the strong microevolutionary potential of hsp70 in quantitative terms (Ketola et al., 2004, Pauwels and Stoks, 2005 and Pauwels et al., 2007). For hsp70 expression and activity, the genetic targets of such natural selection were indicated to be located rather in *cis* and *trans* regulators than in the coding sequence itself (Bettencourt et al., 2002). Given a long-term selection pressure in the wild, populations are driven to adapt their expression of hsp70 to these environmental conditions, such as in metal polluted habitats (Knigge and Köhler, 2000 and Morgan et al., 2007).

Hsp70 is present in small amounts in non-stressed cells on a constitutive basis with important functions in normal cellular processes and protein housekeeping, for instance as chaperones (Kammenga et al., 2000 and Sørensen et al., 2003). Adaptation of hsp70 reflecting past exposure histories can result in both changes in constitutive levels, and in the inducible response, as found for the seven clones tested in our study which showed an inverse relationship between Cd sensitivity and hsp70 levels. As with clone K, a very low constitutional hsp70 expression may also represent a trade-off in terms of reduced fitness

for “normal” cellular functions and, thus, may confer sensitivity to other stressors disrupting cellular homeostasis.

In many laboratory studies on the effects of environmental pollutants on a wide variety of organisms, elevated levels of hsps have been proven to protect against the negative impact of all kinds of stressors on protein integrity, including heavy metals (e.g. Köhler et al., 1992). Furthermore, elevated levels of hsps have been extensively proven to enhance tolerance to all kinds of stress (Lindquist, 1986, Parsell and Lindquist, 1993, Krebs and Loeschcke, 1994, Bond and Bradley, 1995 and Feder and Hofmann, 1999). From this background, and given the effective and essential protection and repair mechanism of hsp, one might expect natural selection to favour elevated levels of hsp in the course of microevolutionary adaptation (e.g. Sanders and Martin, 1993).

Indeed, most field studies on populations subjugated to a long-term selection pressure revealed alterations in their hsp expression, for example from historically metal polluted habitats (Eckwert and Köhler, 1997 and Knigge and Köhler, 2000), or from organisms originating from climatically extreme habitats (Dietz and Somero, 1994 and Sørensen et al., 2005). However, the direction of evolutionary adaptation of hsp levels seems to be divergent. Apart from reports on an upregulation of stress protein expression, e.g. hsp70, in response to long-term environmental stress (Sanders et al., 1991), quite often the opposite has been encountered: In quite a number of studies comparing stress responses of populations with their different stress histories, phenotypes displaying low hsp levels appear to be evolutionarily favoured. Reported examples include Baltic mussels adapted to low salinity close to their physiological tolerance limit which exhibited lower hsp70 levels than North Sea mussels (Brown et al., 1995 and Tedengren et al., 1999a). In selection experiments with different species of *Drosophila*, expression of hsp70 was lower in lines which have been exposed to stressful conditions for many generations before (Bettencourt et al., 1999, Sørensen et al., 1999 and Lansing et al., 2000). Also natural populations of *Drosophila* originating from climatic extremes were characterized by low levels of hsp70 (Sørensen et al., 2001 and Zatsepina et al., 2001). Concerning stress responses to pollutants, the same phenomenon has been observed in saprophagous soil arthropods (*Collembola*, *Isopoda* and *Diplopoda*) (Köhler et al., 1999, Köhler et al., 2000 and Arts et al., 2004) and in grasshopper, *Tetrix* (Warchalowska-Sliwa et al., 2005), which were all chronically exposed to heavy metals in historically polluted areas.

These findings are confirmed by the present results, which provide a profound snapshot survey over seven randomly chosen *D. magna* clones, indicating the association of metal

tolerance and diminished hsp70 levels to be evolutionary advantageous. The reason for this, at first glance, paradoxical outcome is probably to be found in the negative fitness consequences that constantly elevated levels of stress proteins have been proven to infer on organisms and populations (Krebs and Loeschcke, 1994 and Kristensen et al., 2008).

From an evolutionary perspective, energetically driven trade-offs between stress protein induction and other mechanisms of adaptation are likely to occur under such constant stressful environmental conditions, if proteotoxic action of a toxicant can be avoided and hsp70 induction is not necessary to counteract protein denaturation (Sørensen et al., 1999, Lewis et al., 2001 and Sørensen and Loeschcke, 2002).

Potential protection of the more tolerant clones, in particular clone K, by some other defence system reducing the amount of Cd that can interact with proteins could be able to shift the induction threshold for hsp70. Here, hsp70 only may become active when the first line of metal detoxification has been exceeded and Cd reacts with non-target proteins, as shown for woodlice (Arts et al., 2004). Although pre-experiments on the temporal pattern of hsp70 induction by Cd, including the most tolerant clone K, resulted in a maximal induction after 24 h, a scenario in which a reduced inducibility of hsp70 in the more tolerant clones at lower concentrations and shorter exposure times allows for enhanced hsp70 response at higher concentrations in conjunction with longer exposure times cannot be completely ruled out.

The best known biochemical mechanism in invertebrates to cope with heavy metal toxicity involves an intercellular sequestration of metal ions by cysteine-rich proteins such as metallothioneins (MTs) (Klaassen et al., 1999, Amiard et al., 2006 and Guan and Wang, 2006). In *Daphnia*, the induction of MTs has been documented or proposed to be the major tolerance mechanism to Cd (Frayse et al., 2006, Poynton et al., 2007 and Tsui and Wang, 2007). For example, Guan and Wang (2006) explain differences in Cd tolerances between two clones of *D. magna* with corresponding MT levels. In this context, possible trade-offs between metal detoxification mechanisms and hsps, which particularly may occur under chronic exposure, remain to be elucidated. Apart from MTs, there are alternative possible metal adaptations such as excretory or shedding mechanisms or efflux pumps similar to multidrug resistance p-glycoproteins, many of them reducing body metal burdens (Morgan et al., 2007 and references cited therein).

In the present study, no clear relationship between Cd accumulation and hsp levels or sensitivity of the clones, which eventually could have necessitated hsp induction in consequence of a higher Cd uptake could be discovered. The body burden of Cd seems to

be less relevant than the amount in bio reactive states, which exerts most proteotoxicity in the more sensitive clones as reflected in the high hsp levels of those animals. It is noticeable, however, that the most sensitive clone O with at the same time high hsp70 levels, features the lowest Cd body burden. This finding is not consistent with the significant relationships between heavy metal accumulation and increased levels of hsp70 found in other studies (Veldhuizen-Tsoerkan et al., 1990, Sanders and Martin, 1993 and Radlowska and Pempkowiak, 2002), although there are exceptions from this pattern (Tedengren et al., 1999b). In contrast to MT levels, elevated hsp70 levels of *Carcinus maenas* did not correlate with metal concentrations in a Cu and Zn exposure gradient (Pedersen et al., 1997).

As reported by others, bioassays using different clones of *D. magna* may produce different responses, although tested under identical conditions and, like in the present study, were carried out simultaneously. This adds to the various confounding factors exacerbating the repeatability and interpretation of the results (Barata et al., 2002 and Picado et al., 2007). The hsp70 level as a biomarker of effect integrates overall proteotoxic effects of general stress a cell or individual undergoes (Hightower, 1991). The exerted proteotoxicity reflected by the hsp70 levels of adapted phenotypes such as the clone K, obviously is significantly smaller than in rather sensitive conspecifics with other microevolutionary histories such as the clones O or E in the present study. These implications of intraspecific tolerance differences presumably arising from adaptation have to be taken into account in any effect assessment study independent from the character of the driving forces which have led to the selection of insensitive phenotypes.

Acknowledgements

We thank M. Kredler and C. Laforsch, LMU Munich, Germany and H. Fischer for the provision of the *Daphnia* clones and P. Kühn and A. Velescu from the group of T. Scholten, University of Tübingen for performing the F-AAS measurements. T.H. received a scholarship from the Fazit Stiftung, Frankfurt/Main, Germany.

References

- Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow, P.S., 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 76, 160-202.
- Antunes, S.C., Castro, B.B., Goncalves, F., 2003. Chronic response of different clones of *Daphnia longispina* (field and ehippia) to different food levels. *Acta Oecol.* 24 (1), 325-332.
- Arts, M.-J.S.J., Schill, R.O., Knigge, T., Eckwert, H., Kammenga, J.E., Köhler, H.-R., 2004. Stress proteins (hsp70, hsp60) induced in isopods and nematodes by field exposure to metals in a gradient near Avonmouth, UK. *Ecotoxicology* 13, 739-755.
- Baird, D.J., Barata, C., 1998. Genetic variation in the response of *Daphnia* to toxic substances: implications for risk assessment. In: Forbes, V.E. (Ed.), *Genetics and Ecotoxicology*. Taylor and Francis, Ann Arbor, pp. 207-221.
- Baird, D.J., Barber, I., Bradley, M., Soares, A.M.V.M., Calow, P., 1991. A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Straus. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 21, 257-265.
- Baird, D.J., Soares, A.M.V.M., Girling, A., Barber, M.C., Calow, P., 1989. The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicity tests: problems and prospects. In: Lokke, H., Tyle, H., Bro-Rasmussen, F. (Eds.), *Proceedings of the First European Conference on Ecotoxicology*. Lyngby, Denmark, pp. 144-148.
- Barata, C., Baird, D.J., Mitchell, S.E., Soares, A.M.V.M., 2002. Among and within population variability in tolerance to cadmium stress in natural populations of *Daphnia magna*: implications for ecological risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1058-1064.
- Barata, C., Markich, S.J., Baird, D.J., 1998. Influence of genetic and environmental factors on the tolerance of *Daphnia magna* Straus to essential and non-essential metals. *Aquat. Toxicol.* 42, 115-137.
- Bettencourt, B.R., Feder, F.E., Cavicchi, S., 1999. Experimental evolution of Hsp70 expression and thermotolerance in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 53, 1796-1801.
- Bettencourt, B.R., Kim, I.Y., Hoffmann, A.A., Feder, M.E., 2002. Response to natural and laboratory selection at the *Drosophila* hsp70 genes. *Evolution* 56, 1796-1801.
- Bijlsma, R., Loeschcke, V., 2005. Environmental stress, adaptation and evolution: an overview. *J. Evol. Biol.* 18, 744-749.

- Bond, J.A., Bradley, B.P., 1995. Heat shock reduces the toxicity of malathion in *Daphnia magna*. Mar. Environ. Res. 39, 209-212.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein, utilising the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.
- Brown, D.C., Bradley, B.P., Tedengren, M., 1995. Genetic and environmental regulation of hsp70 expression. Mar. Environ. Res. 39, 181-184.
- Declerck, S., Cousyn, C., De Meester, L., 2001. Evidence for local adaptation in neighbouring *Daphnia* populations: a laboratory transplant experiment. Freshwater Biol. 46, 187-198.
- Dietz, T.J., Somero, G.N., 1994. Species and tissue-specific synthesis patterns for heat-shock proteins HSP70 and HSP90 in several marine teleost fishes. Physiol. Zool. 66, 863-880.
- Eckwert, H., Köhler, H.-R., 1997. The indicative value of the hsp70 stress response as a marker for metal effects in *Oniscus asellus* (Isopoda) field populations: variability between populations from metal-polluted and uncontaminated sites. Appl. Soil Ecol. 6, 275-282.
- Feder, M.E., Hofmann, G.E., 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. Annu. Rev. Physiol. 61, 243-282.
- Fraysse, B., Geffard, O., Berthet, B., Quéau, H., Biagianti-Risbourg, S., Geffard, A., 2006. Importance of metallothioneins in the cadmium detoxification process in *Daphnia magna*. Comp. Biochem. Physiol. 144C, 286-293.
- Guan, R., Wang, W.-X., 2006. Comparison between two clones of *Daphnia magna*: Effects of multigenerational cadmium exposure on toxicity, individual fitness, and biokinetics. Aquat. Toxicol. 76, 217-229.
- Haap, T., Triebkorn, R., Köhler, H.-R., 2008. Acute effects of diclofenac and DMSO to *Daphnia magna*: immobilisation and hsp70 induction. Chemosphere 73, 353-359.
- Hairton Jr., N.G., Lampert, W., Cáceres, C.E., Holtmeier, C.L., Weider, L.J., Gaedke, U., Fischer, J.M., Fox, J.A., Prost, D.M., 1999. Rapid evolution revealed by dormant eggs. Nature 401, 446.
- Hightower, L., 1991. Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. Cell 66, 191-197.

- Kammenga, J.E., Dallinger, R., Donker, M.H., Köhler, H.-R., Simonsen, V., Triebkorn, R., Weeks, J.M., 2000. Biomarkers in terrestrial invertebrates for ecotoxicological soil risk assessment. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 164, 93-147.
- Ketola, T., Laakso, J., Kaitala, V., Airaksinen, S., 2004. Evolution of Hsp90 expression in *Tetrahymena thermophila* (Protozoa, Ciliata) populations exposed to thermally variable environments. *Evolution* 58, 741-748.
- Klaassen, C.D., Liu, J., Choudhuri, S., 1999. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 267-294.
- Klerks, P.L., Weis, J.S., 1987. Genetic adaptation to heavy metals in aquatic organisms: a review. *Environ. Pollut.* 45, 173-205.
- Knigge, T., Köhler, H.-R., 2000. Lead impact on nutrition, energy reserves, respiration and stress protein (hsp70) level in *Porcellio scaber* (Isopoda) populations differently preconditioned in their habitats. *Environ. Pollut.* 108, 209-217.
- Köhler, H.-R., Belitz, B., Eckwert, H., Adam, R., Rahman, B., Trontelj, P., 1998. Validation of hsp70 stress gene expression as a marker of metal effects in *Deroceras reticulatum* (Pulmonata): correlation with demographic parameters. *Environ. Toxicol. Chem.* 17 (11), 2246-2253.
- Köhler, H.-R., Eckwert, H., 1997. The induction of stress proteins (hsp) in *Oniscus asellus* (Isopoda) as a molecular marker of multiple heavy metal exposure. 2. Joint toxicity and transfer to field situations. *Ecotoxicology* 6, 263-274.
- Köhler, H.-R., Eckwert, H., Triebkorn, R., Bengtsson, G., 1999. Interaction between tolerance and 70 kD stress protein (hsp70) induction in collembolan populations exposed to long-term metal pollution. *Appl. Soil Ecol.* 11, 43-52.
- Köhler, H.-R., Triebkorn, R., Stöcker, W., Kloetzel, P.-M., Alberti, G., 1992. The 70 kD heat shock protein (hsp70) in soil invertebrates: a possible tool for monitoring environmental toxicants. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 22, 334-338.
- Köhler, H.-R., Zanger, M., Eckwert, H., Einfeldt, I., 2000. Selection favours low Hsp70 levels in chronically metal-stressed soil arthropods. *J. Evol. Biol.* 13, 569-582.
- Krebs, R.A., Loeschke, V., 1994. Costs and benefits of activation of the heat-shock response in *Drosophila melanogaster*. *Funct. Ecol.* 8, 730-737.
- Kristensen, T.N., Hoffmann, A.A., Overgaard, J., Sørensen, J.G., Hallas, R., Loeschke, V., 2008. Costs and benefits of cold acclimation in field released *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 216-221.

- Lam, P.K.S., 1999. Methods for distinguishing genetic and environmental variance in stress tolerance. *Ecol. Appl.* 9, 445-449.
- Lansing, E., Justesen, J., Loeschke, V., 2000. Variation in the expression of Hsp70, the major heat-shock protein, and thermotolerance in larval and adult selection lines of *Drosophila melanogaster*. *J. Therm. Biol.* 25, 443-450.
- Lewis, S., Donkin, M.E., Depledge, M.H., 2001. Hsp70 expression in *Enteromorpha intestinalis* (Chlorophyta) exposed to environmental stressors. *Aquat. Toxicol.* 51, 277-291.
- Lindquist, S., 1986. The heat shock response. *Ann. Rev. Biochem.* 55, 1151-1191.
- Lopes, I., Baird, D.J., Ribeiro, R., 2006. Genetic adaptation to metal stress by natural populations of *Daphnia longispina*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 63 (2), 275-285.
- Lopes, I., Baird, D.J., Ribeiro, R., 2004. Genetic determination of tolerance to lethal and sublethal copper concentrations in field populations of *Daphnia longispina*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 46 (1), 43-51.
- Lynch, M., Gabriel, W., 1983. Phenotypic evolution and parthenogenesis. *Am. Nat.* 122, 745-764.
- Morgan, A.J., Kille, P., Stürzenbaum, S., 2007. Microevolution and ecotoxicology of metals in invertebrates. *Environ. Sci. Technol.* 41, 1085-1096.
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), 2004. Guideline for Testing of Chemicals, 202, *Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test. Environment Directorate OECD, Paris.
- Parsell, D.A., Lindquist, S., 1993. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu. Rev. Genet.* 27, 437-496.
- Pauwels, K., Stoks, R., De Meester, L., 2005. Coping with predator stress: interclonal differences in induction of heat-shock proteins in the water flea *Daphnia magna*. *J. Evol. Biol.* 18, 867-872.
- Pauwels, K., Stoks, R., Decaestecker, E., De Meester, L., 2007. Evolution of heat shock protein expression in a natural population of *Daphnia magna*. *Am. Nat.* 170, 800-805.
- Pedersen, S.N., Lundebye, A.-K., Depledge, M.H., 1997. Field application of metallothionein and stress protein biomarkers in the shore crab (*Carcinus maenas*) exposed to trace metals. *Aquat. Toxicol.* 37, 183-200.
- Picado, A., Chankova, S., Fernandes, A., Simões, F., Leverett, D., Johnson, I., Hernan, R., Pires, A.M., Matos, J., 2007. Genetic variability in *Daphnia magna* and ecotoxicological evaluation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 67 (3), 406-410.

- Posthuma, L., Hogervorst, R.F., Joosse, E.N.G., Van Straalen, N.M., 1993. Genetic variation and covariation for characteristics associated with cadmium tolerance in natural populations of the springtail *Orchesella cincta*. *Evolution* 47, 619-631.
- Poynton, H.C., Varshavsky, J.R., Chang, B., Cavigliolo, G., Chan, S., Holman, P.S., Loguinov, A.V., Bauer, D.J., Komachi, K., Theil, E.C., Perkins, E.J., Hughes, O., Vulpe, C.D., 2007. *Daphnia magna* ecotoxicogenomics provides mechanistic insights into metal toxicity. *Environ. Sci. Technol.* 41, 1044-1050.
- Radlowska, M., Pempkowiak, J., 2002. Stress-70 as indicator of heavy metals accumulation in blue mussel *Mytilus edulis*. *Environ. Int.* 27, 605-608.
- Sanders, B.M., 1993. Stress proteins in aquatic organisms: An environmental perspective. *Crit. Rev. Toxicol.* 23, 49-75.
- Sanders, B.M., Hope, C., Pascoe, V.M., Martin, L.S., 1991. Characterization of the stress protein response in two species of *Collisella* limpets with different temperature tolerances. *Physiol. Zool.* 64, 1471-1489.
- Sanders, B.M., Martin, L.S., 1993. Stress proteins as biomarkers of contaminant exposure in archived environmental samples. *Sci. Total Environ.* 139, 459-470.
- Soares, A.M.V.M., Baird, D.J., Calow, P., 1992. Interclonal variation in the performance of *Daphnia magna* Straus in chronic bioassays. *Environ. Toxicol. Chem.* 11(10), 1477-1483.
- Sørensen, J.G., Dahlgard, J., Loeschcke, V., 2001. Genetic variation in thermal tolerance among natural populations of *Drosophila buzzatii*: down regulation of Hsp70 expression and variation in heat stress resistance traits. *Funct. Ecol.* 15, 289-296.
- Sørensen, J.G., Kristensen, T.N., Loeschcke, V., 2003. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecol. Lett.* 6, 1025-1037.
- Sørensen, J.G., Loeschcke, V., 2002. Natural adaptation to environmental stress via physiological clock-regulation of stress resistance in *Drosophila*. *Ecol. Lett.* 5, 16-19.
- Sørensen, J.G., Michalak, P., Justesen, J., Loeschcke, V., 1999. Expression of the heat shock protein HSP70 in *Drosophila buzzatii* lines selected for thermal resistance. *Hereditas* 131, 155-164.
- Sørensen, J.G., Norry, F.M., Scannapieco, A.C., Loeschcke, V., 2005. Altitudinal variation for stress resistant traits and thermal adaptation in adult *Drosophila buzzatii* from the New World. *J. Evol. Biol.* 18, 829-837.

- Spitze, K., 1991. Chaoborus predation and life-history evolution in *Daphnia pulex*: temporal pattern of population diversity, fitness, and mean life history. *Evolution* 45, 82-92.
- Stuhlbacher, A., Bradley, M.C., Naylor, C., Calow, P., 1992. Induction of cadmium tolerance in two clones of *Daphnia magna* Straus. *Comp. Biochem. Physiol.* 101C, 571-577.
- Stuhlbacher, A., Bradley, M.C., Naylor, C., Calow, P., 1993. Variation in the development of cadmium resistance in *Daphnia magna* Straus: effect of temperature, nutrition, age and genotype. *Environ. Pollut.* 80, 153-158.
- Tedengren, M., Olsson, B., Bradley, B.P., Zhou, L., 1999a. Heavy metal uptake, physiological response and survival of the blue mussel (*Mytilus edulis*) from marine and brackish waters in relation to the induction of heat-shock protein 70. *Hydrobiologia* 393, 261-269.
- Tedengren, M., Olsson, B., Reimer, O., Brown, D.C., Bradley, B.P., 1999b. Heat pretreatment increases cadmium resistance and hsp70 levels in Baltic Sea mussels. *Aquat. Toxicol.* 48, 1-12.
- Triebkorn, R., Köhler, H.-R., Honnen, W., Schramm, M., Adams, S.M., Müller, E.F., 1997. Induction of heat shock proteins, changes in liver ultrastructure, and alterations of fish behaviour: are these biomarkers related and are they useful to reflect the state of pollution in the field? *J. Aquat. Ecosyst. Stress. Recov.* 6, 57-73.
- Tsui, M.T.K., Wang, W.X., 2007. Biokinetics and tolerance development of toxic metals in *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 26 (5), 1023-1032.
- Veldhuizen-Tsoerkan, M.B., Holwerda, D.A., van der Maast, C.A., Zandee, D.I., 1990. Effects of cadmium exposure and heat shock on protein synthesis in gill tissue of the sea mussel *Mytilus edulis* L. *Comp. Biochem. Physiol.* 96C, 419-426.
- Warchalowska-Sliwa, E., Niklinska, M., Gorlich, A., Michailova, P., Pyza, E., 2005. Heavy metal accumulation, heat shock protein expression and cytogenetic changes in *Tetrix tenuicornis* (L.) (Tetrigidae, Orthoptera) from polluted areas. *Environ. Pollut.* 133, 373-381.
- Ward, T.J., Robinson, E.R., 2005. Evolution of cadmium resistance in *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 24 (9), 2341-2349.
- Weber, A., Declerck, S., 1997. Phenotypic plasticity of *Daphnia* life history traits in response to predator kairomones: genetic variability and evolutionary potential. *Hydrobiologia* 360, 89-99.

Zatsepina, O.G., Velikodvorskaia, V.V., Molodtsov, V., Bettencourt, B.R., Lerman, D.N., Feder, M.E., Evgenev, M.B., 2001. A *Drosophila melanogaster* strain from sub-equatorial Africa has exceptional thermotolerance but decreased Hsp70 expression. J. Exp. Biol. 204, 1869-1881.

Kapitel 3: Hsp70 and metallothionein trade-off against one another in *Daphnia magna* cross-tolerance to cadmium and heat stress

Timo Haap, Simon Schwarz, Heinz-R. Köhler

Animal Physiological Ecology Department, University of Tübingen, Auf der Morgenstelle 5
D - 72076 Tübingen

Submitted to: Aquatic Toxicology, 2015

Abstract

The association between the insensitivity of selected populations of invertebrates to environmental stress, such as heavy metal pollution, and overall low hsp levels in these adapted organisms has been attracting attention in various studies. The present study seeks to induce and examine this phenomenon in *Daphnia magna* by multigenerational acclimation in a controlled laboratory setting. In this experiment, interclonal variation was considered: two clones of *D. magna* that have previously been characterized to diverge regarding their cadmium resistance and levels of the stress protein hsp70, were continuously exposed to a sublethal concentration of Cd over four generations to study the effects of acclimation on hsp70, metallothionein (mt), reproduction and cross-tolerance to heat stress. The two clones differed in all the measured parameters in a characteristic way, clone T displaying Cd and heat resistance, lower hsp70 levels and offspring numbers on the one hand and higher mt expression on the other hand, clone S the opposite for all these parameters. We observed only slight acclimation-induced changes in constitutional hsp70 levels and reproductive output. The differential mt expression between clones as well as between acclimated organisms and controls hint at mt accounting for the higher Cd tolerance of clone T. Overall high hsp70 levels featured by clone S did not confer cross tolerance to heat stress, contrary to common expectations. Our results suggest a trade-off between the efforts to limit the proteotoxic symptoms of Cd toxicity by hsp70 induction and those to sequester and detoxify Cd by means of mt.

Keywords: acclimation; daphnid clones; heavy metals; microevolution; heat shock proteins

1. Introduction

Organisms exhibit various patterns of heat shock protein expression in response to stressful conditions, e.g. when being exposed to heavy metals (Warchalowska-Sliwa et al., 2005). Although the genes for hsps are highly conserved and ubiquitous, several studies provide evidence of the strong microevolutionary potential of their regulation (Ketola et al., 2004; Pauwels et al., 2005; 2007). It was found in numerous occasions, that tolerance in natural populations to environmental stress often is associated with low levels of hsps (Arai et al., 1994; Goto and Kimura, 1998; Krebs and Bettencourt 1999; Köhler et al., 2000; Knight and Ackerly, 2001; Sørensen et al., 2001; Zatsepina et al., 2001; Nakano and Iwama, 2002). In a previous study of our lab, this phenomenon has been examined and verified for seven clones of *Daphnia magna* from different geographical regions, where genetically fixed insensitivity to cadmium stress could be related to low hsp70 induction (Haap and Köhler, 2009).

Apart from genetically fixed adaptation, *Daphnia* can acclimate to stressors when being pre-exposed for a certain period of time. This period can range from a few hours (LeBlanc 1982; Stuhlbacher et al., 1992, 1993), often termed “hardening” (Loeschcke and Sørensen, 2005), to several generations (LeBlanc 1982; Bodar et al., 1990; Münzinger, 1990; Muysen and Janssen, 2001, 2002). Numerous laboratory studies have documented induction of tolerance among aquatic organisms in controlled settings (LeBlanc, 1982; Muysen and Janssen, 2004; Dietrich et al., 2010; Messiaen et al., 2010). Furthermore, several multi-generation acclimation studies with cadmium and *D. magna* that have aimed at revealing the underlying mechanisms for the acquisition of tolerance have been published (Bodar et al., 1990; Morgan et al., 2007; Messiaen et al., 2010; Muysen et al., 2010; Dietrich et al., 2010). In the present study the focus was turned to the role of hsp70 during the acquisition of tolerance through acclimation in the laboratory. In an attempt to observe changes in the stress protein response of *D. magna* during and after the acquisition of tolerance, we picked two clones that has differed most in their sensitivity to Cd in our previous study, and acclimated them to a low concentration of Cd over 4 generations.

The elevated tolerance of clones with low hsp levels suggests the presence of distinct, proteotoxicity-limiting mechanisms, such as the alteration of metal biokinetics, changes in enzyme sensitivity, or the development of a particular defense system in these

organisms (Mulvey and Diamond, 1991). Metal binding proteins such as metallothioneins (mt), cysteine-rich proteins of low molecular weight (6-8 kDa) and characterized by the absence of aromatic amino acids, are known to be involved in the detoxification process of metal trace elements such as Cd (Dallinger et al., 1997; Klaassen et al., 1999; Palmiter, 1998; Asselman et al., 2012). In many organisms, mt are the major ligands for cadmium and involved in the acquisition of tolerance to this metal (reviewed in Amiard et al., 2006; Fraysse et al., 2006; Shaw et al., 2007). Thus we hypothesized that the Cd insensitivity of organisms with low hsp levels could be explained by a trade-off between hsp70 production and the expression of mt, which was assessed in the present study in Cd acclimated and non-acclimated animals of both a sensitive and a tolerant *Daphnia* clone.

Apart from metal pollution, mostly of anthropogenic origin, organisms in nature are subjected to other stress factors of physical and biological origin. *D. magna* lives in rather small waterbodies such as ponds and, often temporal, shallow waters, experiencing large temperature fluctuations in the wild. Consequently, this species is expected to be particularly vulnerable to global warming (reviewed in Sokolova and Lannig, 2008). The production of hsps is a fundamental mechanism to overcome acute heat stress, protects cells during heat stress, and facilitates repair and degradation of denatured proteins following a stressful event (Parsell and Lindquist, 1993). Individuals adapted to contaminated environments that exhibit low expression of hsps may, therefore, be expected to show reduced fitness in response to other stressors, such as high temperatures, an observation which is commonly referred to as a “cost of tolerance” (Medina et al., 2007). Research on the genetic (inter-clonal) variation of interactive effects of chemicals and natural stressors is highly underrepresented in the literature (Messiaen et al., 2012; De Coninck et al., 2013). In an attempt to further characterize the occurrence of intraspecific variation in hsp induction, the examination of possible cross tolerance to heat stress was included in our multigenerational test design.

Since adaptive processes such as the production of hsp or mt are largely energy demanding, re-allocation of energy resources may bear negative fitness consequences (Beyers et al., 1999, Knops et al., 2001). For instance, following chronic Cd exposure of *Daphnia*, decrease in neonate production has been reported (De Coen and Janssen, 1997; Muysen et al., 2010). To address also this potential trade-off in our study, reproduction of *D. magna* was measured in the two, acclimated and non-acclimated, clones as well. Thus, we addressed the following questions:

- 1) Can low expression rates for hsp70 that have previously been observed in tolerant phenotypes be experimentally explained by the protective potential of increased capacities to induce mt?
- 2) Is it possible to induce tolerance to metals in a metal-sensitive *D. magna* clone and, even further, in a metal tolerant one by multi-generation exposure?
- 3) Do either metal tolerance or the potential of high hsp70 induction confer heat tolerance in *D. magna*?
- 4) Are the “costs” of metal tolerance reflected by lower reproduction rates in tolerant daphnids? Will multi-generation acclimation to Cd change this situation?

2. Materials and Methods

2.1. Maintenance and acclimation

Two *D. magna* strains, originating from Munich, Germany and Moscow, Russia, named “Tolerant” (T) and “Sensitive” (S), respectively, that have been characterized regarding their sensitivity to Cd and their hsp70 levels upon exposure to Cd in our previous study (Haap and Köhler 2009, herein named clones K and R) were chosen. Based on preliminary acclimation experiments with the two clones, a concentration of 5 µg l⁻¹ Cd (as CdCl₂) was selected as the sublethal pre-exposure concentration to which they were acclimated over 4 generations. For both clones, control cultures were established and treated the same way as the “acclimation cultures”, however, without addition of CdCl₂. Both clonal cultures were started from a single parthenogenetic female each, and were kept at the same laboratory conditions for more than 6 months. Daphnids were maintained in 5 litre plastic aquaria and daily fed *Scenedesmus subspicatus* according to the animal's age: 3 × 10⁶, 5 × 10⁶, and 6 × 10⁶ cells/d per individual aged 0 to 7 d, 8 to 15 d, and >15 d, respectively. Algae cultures were centrifuged and resuspended in Daphnia culture medium: filtered tap water, aged and dechlorinated for 4 days in 50 litre aerated plastic tanks supplemented with 1 µg l⁻¹ selenium at pH 7.7 and a hardness of 25 mmol l⁻¹ CaCO₃ was used throughout the study. For the acclimation cultures, 5 µg l⁻¹ Cd (as CdCl₂) was added to this culture medium. The medium was renewed twice a week, the cultures were strictly synchronized. Exposures in all experiments were carried out simultaneously for the two clones. Cultures and all experiments were run in a climate

chamber at a temperature of 20°C and a light:dark photoperiod of 16:8 h. Before and after exposures, the parameters pH, dissolved oxygen and temperature were measured.

2.2. Chemicals and measurements

A stock solution of 1 g l⁻¹ Cd was prepared using CdCl₂ and acidified (0.2%, HNO₃), with no pH variations in the test media. In all controls, respective amounts of acidified water (0.2% HNO₃) were added. Materials in contact with the culture and the test media were soaked for 24 h in 5% HNO₃ and subsequently rinsed with deionized water. All Cd concentrations in test media samples were verified by flame atom absorption spectrophotometry (F-AAS, Perkin-Elmer M1100, Waltham, Massachusetts, USA) using a Tritisol Cd standard (1 g l⁻¹, Merck Darmstadt, Germany). Water samples of 9 ml were acidified with 1 ml concentrated HNO₃. Calibration standards and a reagent blank were analysed with every 10 samples. Measured concentrations never differed more than 10% from the nominal values. The amount of Cd in the control samples was below the detection limit.

2.3. Acute immobilisation test

The 48-h acute toxicity tests were conducted using the OECD standard operating procedure 202 (OECD 2004). Twenty daphnids younger than 24 h were used for the controls and each treatment. All controls and treatments were subdivided into four replicates containing five daphnids each. The test volume was 50 ml, respectively. In the tests addressing Cd tolerance, treatments were: control, 200, 400, 500, 600 and 800 µg l⁻¹ Cd, nominal concentrations. In the tests on heat tolerance, treatments were 20, 28, 30, 31, 32 and 34 °C. Beakers were heated accordingly in a water bath. During exposure, daphnids were not fed and the medium was not renewed during 48 h of exposure.

2.4. Reproduction

The reproduction was measured during 21 d according to OECD guideline 211 (OECD 2008). For both the acclimation treatment with 5 µg l⁻¹ Cd and the control, 10 replicates of 1 individual each (<24h old) were kept in 50-ml glass beakers. Renewal of the test medium for all treatments and controls took place every 2 days. Organisms were fed

daily as described above for the stock culture. Immobilisation as a proxy for mortality of the parent daphnids, and the number of offspring were assessed daily. The live neonates were counted and removed from the test beakers after each brood release, and the reproductive performance of the daphnids was expressed as the average number of neonates per adult over 21 days.

2.5. Hsp70 and mt induction

Five-days-old animals were exposed in plastic aquaria containing 2 liters of medium. Exposure time was 24 h. A control was run in addition to treatments with the Cd concentrations 5, 20, 50, 100 and 300 $\mu\text{g l}^{-1}$ Cd for the hsp70 experiments and 20, 100 and 300 $\mu\text{g l}^{-1}$ Cd for the mt experiments (lower number of test concentrations in the mt experiments were due to limitations in capacity). For the induction experiments with elevated temperatures, aquaria were heated in water baths to 20, 26, 28, 30 and 32°C. Exposure concentrations and conditions were chosen from pre-experiments that had shown these temperatures to affect hsp70 levels without induction of mortality. After exposure, hsp70 levels were measured by an immunoblot-based assay as described in Haap and Köhler (2009) with a methodological variation of $\pm 2.7\%$ only (Köhler et al., 2005).

2.6. Mt real-time PCR

Total RNA was isolated from each biological replicate of the different exposure conditions using the Trizol extraction method (Invitrogen), including a DNA digestion step to ensure the absence of genomic DNA contamination. The cDNA was synthesized using oligo-dT or random hexamer primers with HMinus Reverse Transcriptase (Fermentas). Mt and 18S rRNA qPCR primers, accession numbers DV437826 and AF070104, respectively, were chosen from Poynton et al., (2008) and tested for doubling time by a dilution of 1:2 and ensuring that there was exactly a loss of 1 CT; primer efficiency was thereafter assumed to be 100%. PCR reactions were performed in triplicate technical repeats for each biological replicate. The amplification of cDNA was performed with PerfeCta SYBR Green Super Mix (Quanta Biosciences) using the following program: 95 °C for 2 min, 40 cycles of 95 °C for 15 s, and 60 °C for 1 min. The PCR reactions were ran in the Bio-Rad CFX384 Real Time PCR system (Bio-Rad). Expression

levels were normalized according to the expression of the 18s rRNA housekeeping gene. The CFX Manager software (Bio-Rad) was used for the quantification of relative expression levels.

2.7. Statistics

EC₅₀ values and corresponding 95% confidence limits were calculated by probit analysis using a Microsoft Excel spreadsheet. The statistical analysis was carried out using JMP 11.0 (SAS Systems). Datasets were tested for normality using the Pearson-D'Agostino-Omnibus test and Levene's test for homogeneity of variance. If necessary, data were transformed with either square root, third root, fourth root or log₁₀ functions to fit the assumptions of normality. For those tests the significance level was set to $\alpha=0.01$.

ANCOVA was used to assess the effects of clone combined with temperature or cadmium concentration on the biochemical parameters, as well as their interactions. The comparison of EC₅₀ and LT₅₀ values between clones and pre-exposures was done via two-way-ANOVA. Significance level was set to $\alpha=0.05$.

3. Results

3.1. Immobilisation tests

In Figure 1 the obtained 48 h EC₅₀ Cd values from several test runs together with mean values thereof, are compiled for the two clones before, during, and after the acclimation to Cd. Acclimation to Cd resulted in enhanced Cd tolerance for both clones, which was statistically significant for both clones (two-way-ANOVA: clone: $F=34.5175$, $p<0.0001$, pre-exposure: $F=12.5973$, $p=0.0023$).

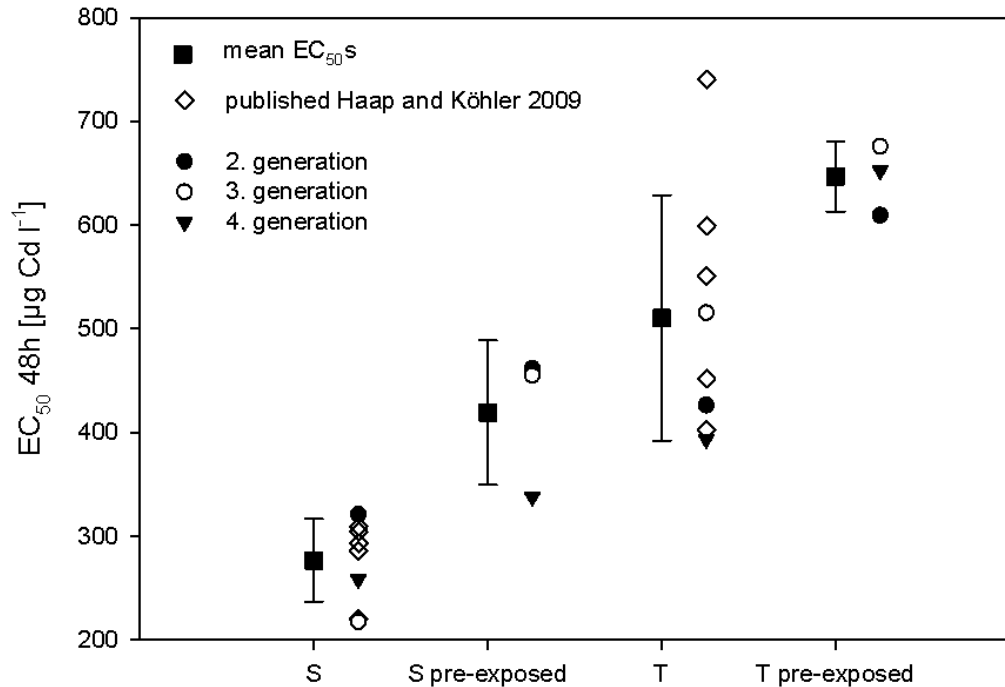


Fig. 1. 48 h EC₅₀ values from acute immobilisation tests with Cd. Mean values with standard deviation (error bars), alongside single EC₅₀s of each test run, respectively.

Figure 2 shows the LT₅₀ values resulting from exposure to a temperature gradient for 48 h, together with the corresponding mean values. Clone S was more sensitive to acute heat exposure, mirroring also the differences in sensitivity to Cd. In both clones, multigenerational Cd pre-exposure had no effect on tolerance to heat (two-way ANOVA: $F=17.2805$, $p=0.0013$, pre-exposure: $F=0.4397$, $p=0.5198$). Only third generation organisms of clone S displayed a trend towards increased heat sensibility. Cross tolerance between the two clones exists as the Cd-tolerant clone T was found to be also more heat-tolerant than clone S. Furthermore, the set of immobilisation tests applied to multiple generations of the daphnids revealed consistent relative tolerance to Cd and heat across the generations for both clones.

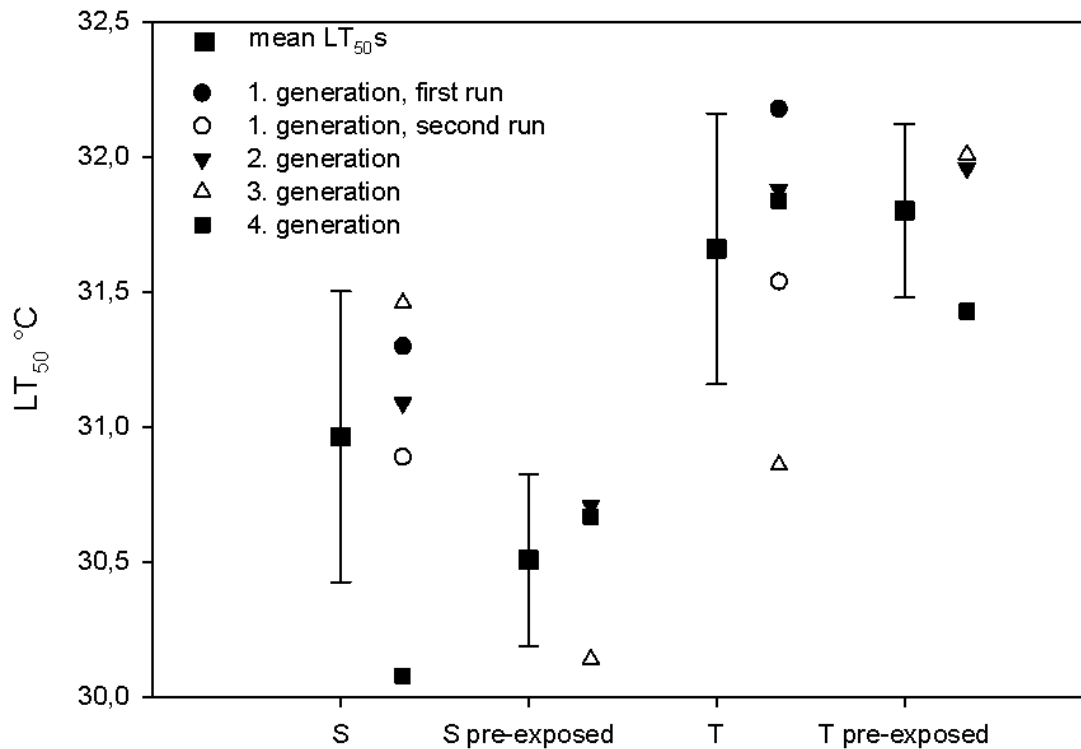


Fig. 2. 48 h LT₅₀ values for heat exposure. Mean values with standard deviation (error bars), alongside single LT₅₀s of each test run, respectively.

3.2. Hsp70 induction

Figure 3 displays hsp70 levels obtained after simultaneous, acute exposure of the two *D. magna* clones to a set of elevated Cd concentrations. Cadmium caused induction of hsp70 levels in both clones, either pre-exposed or not. Generally, clone S displayed higher constitutive levels and a stronger upregulation of hsp70 at lower concentrations of Cd in comparison to clone T. (control: ANCOVA, clone: $F=73.3238$, $p<0.0001$, Cd-conc.: $F=100.5954$, $p<0.0001$; pre-exposure: ANCOVA, clone: $F=86.2985$, $p<0.0001$, Cd-conc.: $F=40.4612$, $p<0.0001$). Tentatively in clone T, pre-exposure to Cd managed to increase the potential of hsp70 induction in response to acute Cd exposure (ANCOVA: pre-exposure: $F=20.7444$, $p<0.0001$, cadmium: $F=89.1066$, $p<0.0001$). In the 'sensitive' clone S, this effect could not be seen as clear, since the control animals showed higher Hsp70 levels at two highest Cd concentrations than the pre-exposed animals (ANCOVA: interaction: $F=14.4387$, $p=0.0003$).

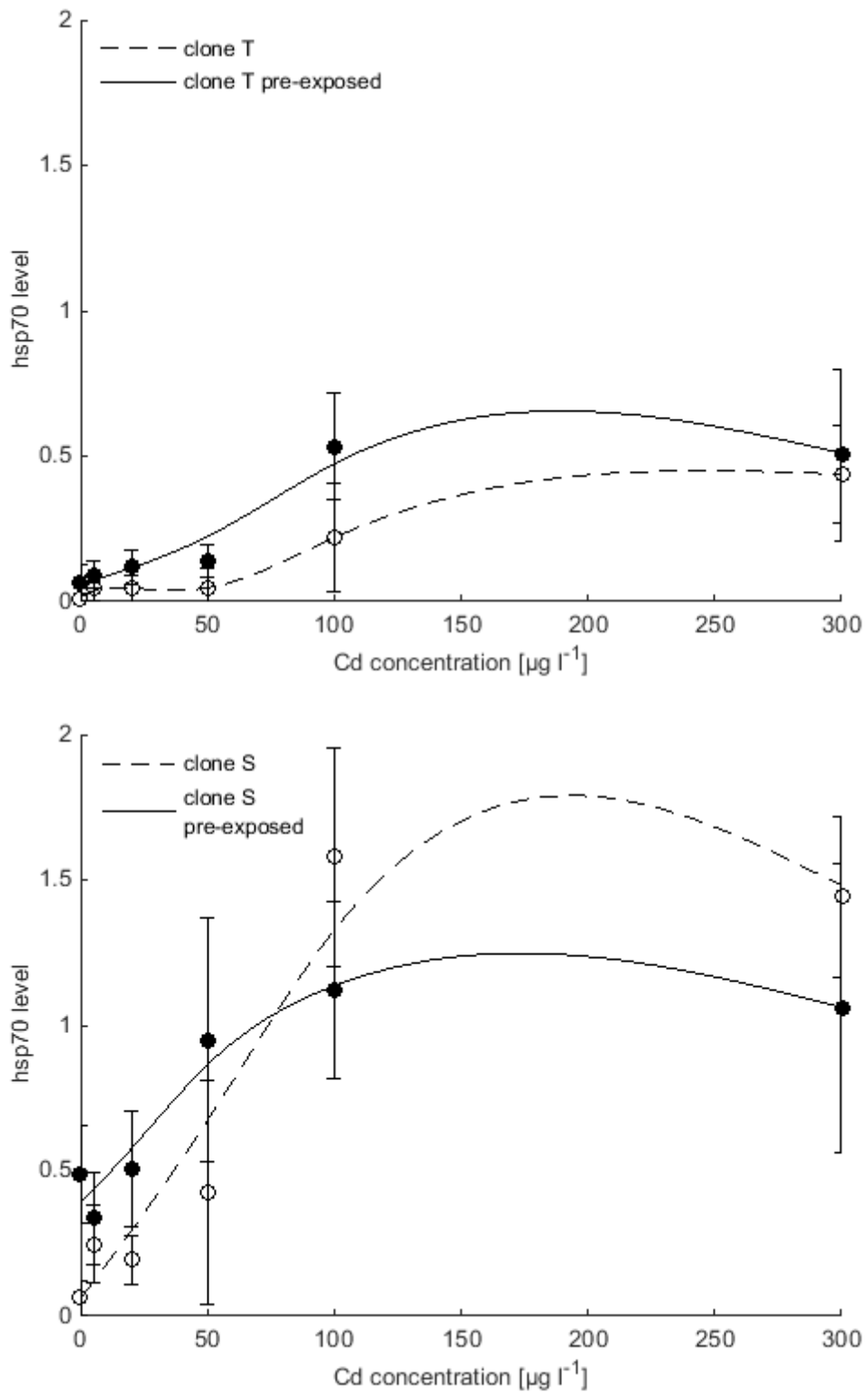


Fig. 3. Hsp70 levels relative to a standard after exposure of the clones to a Cd concentration gradient. 0 = control, replicates per dataset were between 7 and 10. Error bars correspond to standard deviation.

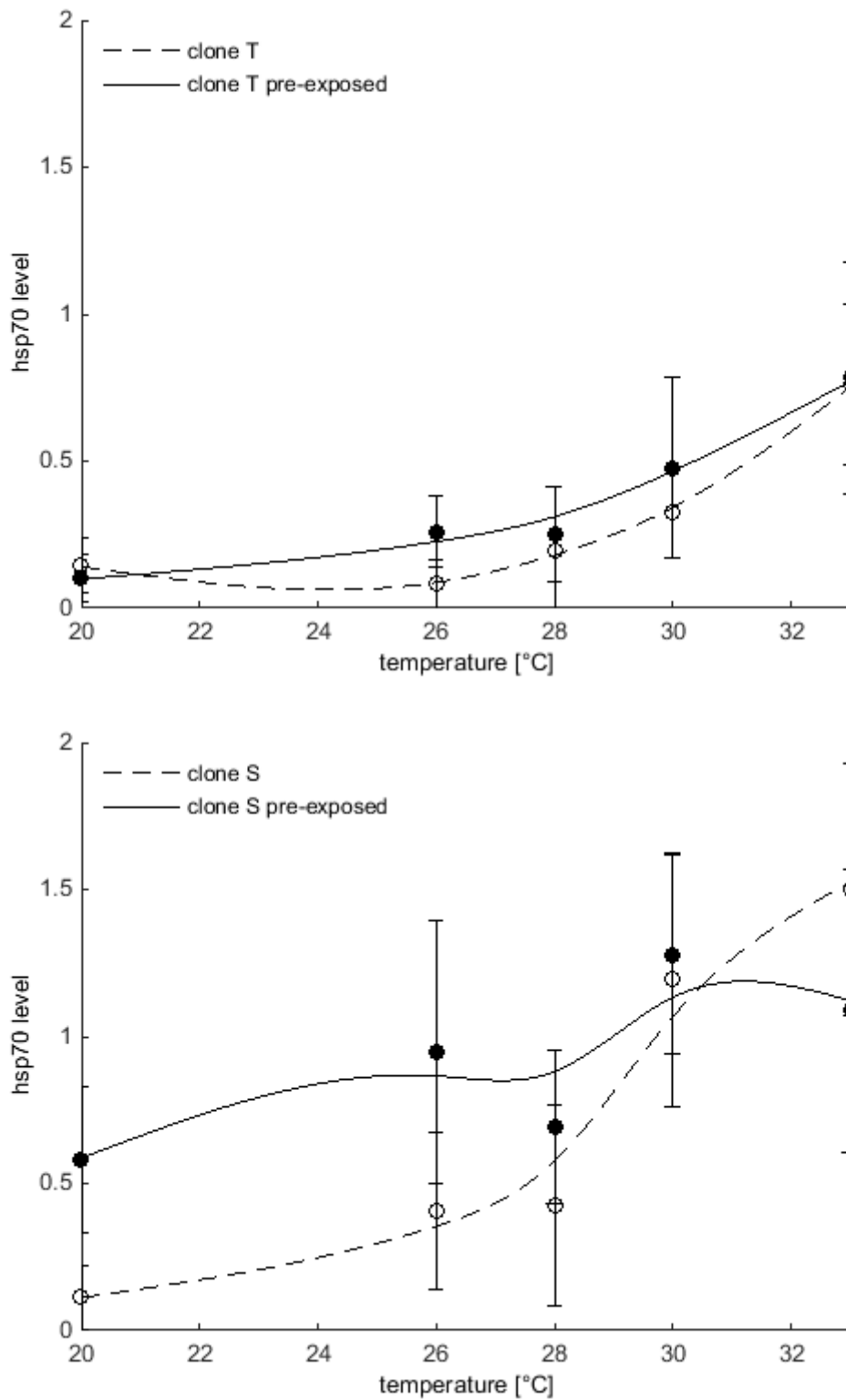


Fig. 4. Hsp70 levels relative to a standard after exposure of the clones to a temperature gradient. 0 = control, replicates per dataset were between 8 and 10. Error bars correspond to standard deviation.

In general, the stress protein response to elevated temperature resembled the findings for acute Cd exposure. Figure 4 displays hsp70 levels in response to heat stress. Clone T showed remarkably low hsp70 levels in relation to clone S and a similar pattern of kinetics as reported above for Cd exposure (pre-exposure: clone: $F=72.0327$, $p<0.0001$, temperature: $F=42.1429$, $p<0.0001$; control: comparison not possible due to significant interaction between the factors). Acclimation to Cd resulted in a trend to enhanced hsp70 levels, (clone T: ANCOVA: pre-exposure: $F=3.3343$, $p=0.0715$, clone S: ANCOVA: interaction: $F=19.7055$, $p<0.0001$), with a single exception at the highest temperature, 33°C.

3.3. Mt induction

In native daphnids, without pre-exposure, a significantly higher expression and earlier induction of mt could be found in the tolerant clone T, compared to clone S (ANCOVA: clone: $F=13.3226$, $p=0.0007$, Cd-conc.: $F=14.2134$, $p=0.0005$). This effect could also be seen in the pre-exposed animals, but was much less pronounced (ANCOVA: clone: $F=5.0127$, $p=0.0309$). However, four generations of Cd-pre-exposure of clone S resulted in distinctly, albeit not significantly, elevated mt expression upon acute exposure to 100 $\mu\text{g l}^{-1}$ Cd, compared to non-acclimated animals (ANCOVA: pre-exposure: $F=3.3219$, $p=0.0755$, Cd-conc.: $F=3.4847$, $p=0.0689$). For clone T, the effect of pre-exposure was smaller (ANCOVA: pre-exposure: $F=1.1085$, $p=0.2986$, Cd-conc.: $F=11.9078$, $p=0.0013$). Individuals of clone S without pre-exposure displayed the least expression of mt in the first place but were able to continuously increase mt expression in response up to 300 $\mu\text{g l}^{-1}$ Cd. In all others, particularly in pre-exposed clone S, mt expression rates in response to 300 $\mu\text{g l}^{-1}$ Cd fell below the maximum mt expression rate, which was observed for 100 $\mu\text{g l}^{-1}$ Cd.

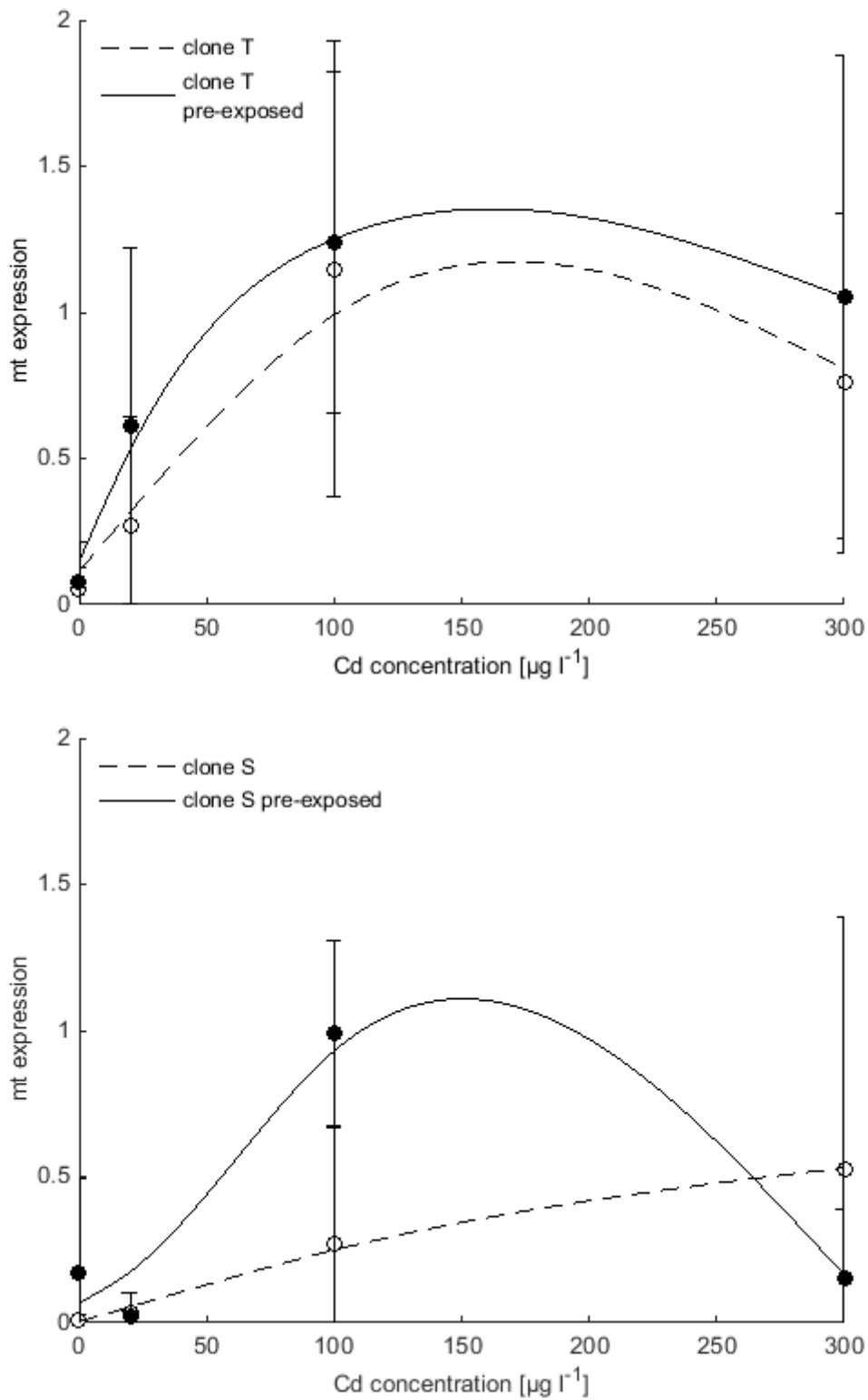


Fig. 5. Mt expression after exposure of the clones to a Cd concentration gradient. 0 = control, biological replicates per dataset were between 4 and 7. Error bars correspond to standard deviation.

3.4. Reproduction

There was a general trend for individuals of clone S to exhibit a higher reproductive output than for those of clone T (Fig. 6). In both clones, four generations of pre-exposure furthermore resulted in a trend towards elevated offspring numbers in comparison to control individuals of the “non-acclimated” 4th generation (two-way-ANOVA: clone: $F=33.6961$, $p<0.0001$, pre-exposure: $F=14.3774$, $p=0.0006$).

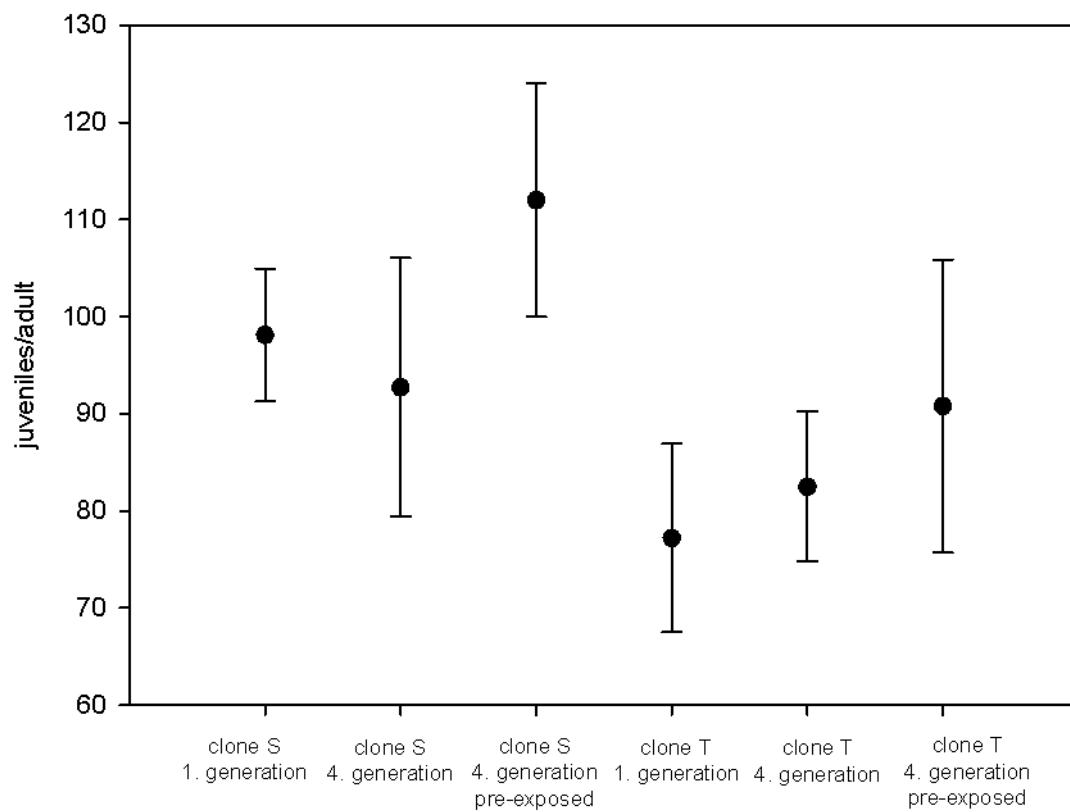


Fig. 6. Reproductive output (average number of neonates per adult over 21 days). Mean values with standard deviation (error bars).

5. Discussion

It has been reported that there are genetic differences among both laboratory and wild populations of *D. magna*, accounting for a variation of responses in acute toxicity tests (Barata et al., 2002; Bossuyt and Janssen, 2005; Oda et al., 2007). Also in this study, the two *D. magna* clones displayed different, but largely consistent tolerance to Cd and heat over several generations, which proves genetic fixation of these traits (Baird and Barata, 1998). Nevertheless, acclimation resulted in enhanced Cd tolerance for both clones. These results are congruent with similar experimental studies over a few generations that tested the effect of acclimation to sublethal Cd stress to *D. magna*. For instance, Muysen and Janssen (2004) observed a maximal increase (by a factor 7.2) in acute tolerance (48-h EC₅₀) after *D. magna* individuals were exposed to low Cd concentrations for two to three generations. Other multigenerational studies with *Daphnia* found an increase in acute Cd tolerance due to physiological acclimation as well, even though mostly to a minor extent, as in the present study (LeBlanc 1982; Guan and Wang, 2006; Muysen et al., 2010).

It is known that hsp70 can be induced by Cd in *D. magna*, as a response to the proteotoxic action of this metal (Connon et al., 2008). Due to the hydrophilic character of this ion, the acute hsp70 response is expected to persist at a constant level over time (Köhler et al., 1999). As for resistance in the immobilisation tests, consistency of induction and baseline levels of hsp70 upon exposure to Cd, but also in controls, after 4 generations (Haap and Köhler, 2009) shows distinctly defined genetic fixation of the trait “low versus high hsp70 levels”.

The Cd concentration of 5 µg l⁻¹ chosen for the acclimation experiments in the present study was within the range of concentrations of Cd commonly reported for polluted water bodies (Bervoets and Blust, 2003; Lopes et al., 2006; Messiaen et al., 2010). It proved to be sufficient to affect the animals of both clones during the acclimation period and led to an upregulation of constitutive hsp70 levels as well as to an enhancement of Cd tolerance and offspring numbers after 4 generations. Generally, in both clones, pre-exposure resulted also in a more intense upregulation of hsp70 and mt in response to lower Cd concentrations. In this context, the lower maximum hsp70 induction levels of acclimated daphnids of clone S in response to acute exposure at highest Cd concentrations but also at high temperatures reflect some “weakened” condition of these individuals, caused by the pre-exposure. Particularly the decrease of hsp70 levels at 33 °C and the breakdown of mt

expression in these animals indicate overwhelming of both the stress protein as well as the mt response, presumably caused by the permanent burden of pre-exposure plus imposed acute exposure. Biochemical stress response mechanisms, such as hsp70, have been described to follow an optimum curve resulting from exposure to various stressors, explaining the observed reduction of the hsp70 levels and mt expression as resulting from damage to the proteosynthetic machinery (Hofmann and Somero, 1996; Schill et al., 2003; Hofmann 2005). Possible explanations for the phenomenon of overwhelming biochemical processes could be manifold, e.g. the negative effect of Cd on cellular biosynthetic capacity such as transcription and/or translation processes (Pytharopoulou et al., 2006) and cellular energy deficiency that can limit the amount of ATP available for hsp/mt synthesis and/or function (Lannig et al., 2006; 2008; Sokolova and Lannig, 2008; Ivanina et al., 2009).

Although genetic variation in tolerance to single stressors has been described extensively, genetic variation in interactive effects between two stressors has only rarely been investigated (Muyssen et al., 2010; De Coninck et al., 2013). According to Sokolova and Lannig (2008), long-term acclimation is an important, but understudied aspect of temperature–pollution interaction. In the present study, cross-tolerance to acute warming has been tested after 4 generations of acclimation to Cd in the two clones that differ remarkably in their hsp70 levels. It could be hypothesized that overall higher quantities of hsp70 featured by clone S which have been induced to counteract one stressor (Cd) will also ameliorate the effects of the other (heat) (Feder and Hofmann, 1999; Paul et al., 2004). Hallare et al. (2005), for instance, found pre-hatched zebrafish embryos to be less sensitive to Cd at higher temperatures due to the higher expression of hsp70. However, in the present study, the high hsp70 levels characterizing the Cd-sensitive clone S did not confer tolerance to heat stress. Reasons for the heat-tolerance of clone T could be based on the effectivity of hsp70 isoforms, on factors that modulate the activity of hsp70 (Favatier et al., 1997; Kabani and Martineau, 2008), on differences in the basal metabolism, or on overall stability of proteins against denaturation, allowing this clone to limit its hsp70 induction. In this context, it can be expected that metal toxicity generally increases in combination with elevated temperature (Heugens et al., 2001; Sokolova and Lannig 2008; Holmstrup et al., 2010). In contrast, Muyssen et al. (2010) found an increase in thermal tolerance limits in Cd-acclimated *D. magna*. In the present study, acclimation to Cd had no significant effect on heat tolerance, except for Cd-acclimated animals of clone S that were a little less tolerant to heat stress, as they were also to Cd.

Although the effects of Cd exposure to *D. magna* have been intensely investigated, the exact mechanism of toxicity has yet to be elucidated (Soetaert et al., 2007). The best known biochemical mechanism in invertebrates to cope with heavy metal toxicity involves intercellular sequestration of metal ions by cystein-rich proteins such as metallothioneins (mts) (Klaassen et al., 1999; Amiard et al., 2006; Guan and Wang, 2006). In *Daphnia*, the induction of mts has been proposed to be the major tolerance mechanism to Cd (Frayse et al., 2006; Poynton et al., 2007; Tsui and Wang, 2007). For example, Guan and Wang (2006) have explained differences in Cd tolerances between two clones of *D. magna* with corresponding mt levels. Mt expression was upregulated in both clones after exposure to Cd as described in earlier studies (Shaw et al., 2007; Poynton et al., 2008). In our study, Cd resistance of clone T and the enhanced tolerance of both clones after acclimation are probably based on the stronger expression and earlier inducibility of mt following exposure (Fig. 5). Also this finding is congruent with a number of previous studies of physiological acclimation to Cd (Amiard et al., 2006; Guan and Wang, 2006). The novelty of our study, however, is the documentation of a trade-off between metal detoxification mechanisms like mt and hsps, which particularly may occur under chronic exposure. Clone T was found to be capable to detoxify Cd, obviously via mt, thus preventing intracellular damage rather than counteracting Cd toxicity symptoms by hsp70-triggered repair of damaged proteins, as clone S does.

In this context, Cd pre-exposure resulted in slightly earlier induction and higher expression rates of mt in response to acute Cd exposure, suggesting mt to be responsible for the enhancement of tolerance, compared to non-acclimated control animals. This effect, however, is limited in individuals of clone T, which are featuring a high expression rate of mt already in non-acclimated controls, which is probably responsible for the high tolerance of this clone to Cd.

Net uptake and accumulation of Cd have been previously examined in Haap and Köhler (2009); they did not differ between the two clones and can, consequently, not account for the differences in tolerance. This finding is congruent with a number of previous studies (e.g. Klerks and Weiss, 1987). Thus, independent of the sheer Cd budget, the ability to bind and traffic Cd seems to account for the intrinsic tolerance of clone T.

Multigenerational Cd exposure resulted in slightly enhanced reproduction performance for both clones, which can be explained as hormesis, a stimulatory effect of subinhibitory concentrations of a toxicant. Hormesis effects of Cd on daphnid reproduction have been reported in a number of studies before (Bodar et al., 1988; Elnabarawy et al., 1986;

Muysen and Janssen, 2004; Guan and Wang, 2006). However, there are also reports of acclimation to toxic compounds to be often associated with elevated fitness costs (Xie and Klerks, 2004; Kwok et al., 2009). Although being a quite small effect, clone T features, overall and independently of acclimation, lower numbers of offspring which hints at an energy allocation towards detoxification or repair mechanisms. This could be mt or, to a minor account, additional processes as discussed above. Considering the generally higher and easier induced expression of mt in this clone compared to clone S, this points towards an evolutionary strategy to deal with stressful habitats characterized by lower reproductive output and longevity by means of investments in detoxification mechanisms such as mt.

Since the synthesis of hsp is energetically and otherwise costly (Coleman et al., 1995; Roberts and Feder, 2000; Silbermann and Tatar, 2000), it is likely that organisms from stressful habitats that require frequent induction of hsps may downregulate the heat-shock response, partly to limit its costs, and instead rely predominantly on constitutive hsp70 levels such as daphnids of clone T (Sørensen et al., 2003; Barua et al., 2008; Sokolova et al., 2012).

In summary, our results have revealed distinct clone-specific metal-handling strategies in respect to hsp70 and mt expression, which indicate a trade-off between fighting the primary cause of Cd toxicity by enhanced expression of mt in adapted animals of clone T on the one hand, and, on the other hand, putting emphasis on limiting and controlling symptoms, the damage and denaturation of proteins.

Acknowledgements

We thank P. Kühn and A. Velescu for the help with the F-AAS measurements. Furthermore, we are grateful to C. Chaban, R. Dallinger, D. Schuler, T. Benz, N. Dieter, J. Hutterer and M. Keinath for advice and assistance in the laboratory. T.H. received a scholarship from the Fazit Stiftung, Frankfurt/Main, Germany.

References

- Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow, P.S., 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 76, 160-202.
- Arai, A., Mitani, H., Naruse, K., Shima, A., 1994. Relationship between the induction of proteins in the hsp70 family and thermosensitivity in two species of *Oryzias* (Pisces). *Comp. Biochem. Phys.* 109b, 647-654.
- Asselman, J., Glaholt, S.P., Smith, Z., Smagghe, G., Janssen, C.R., Colbourne, J.K., Shaw, J.R., De Schampelaere, K.A.C., 2012. Functional characterization of four metallothionein genes in *Daphnia pulex* exposed to environmental stressors. *Aquat. Toxicol.* 110-111, 54-65.
- Baird, D.J., Barata, C., 1998. Genetic variation in the response of *Daphnia* to toxic substances: Implications for Risk Assessment, in: Forbes, V.E., (Ed.), *Genetics and Ecotoxicology*. Taylor and Francis, Ann Arbor, pp. 207-221.
- Barata, C., Baird, D.J., Mitchell, S.E., Soares, A.M.V.M., 2002. Among and within population variability in tolerance to cadmium stress in natural populations of *Daphnia magna*: implications for ecological risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1058-1064.
- Barua, D., Heckathorn, S.A., Coleman, J.S., 2008. Variation in heat-shock proteins and photosynthetic thermotolerance among natural populations of *Chenopodium album* L. from contrasting thermal environments: implications for plant responses to global warming. *J. Integr. Plant Biol.* 50(11), 1440-1451.
- Bervoets, L., Blust, R., 2003. Metal concentrations in water, sediment and gudgeon (*Gobio gobio*) from a pollution gradient: relationship with fish condition factor. *Environ. Pollut.* 126(1), 9-19.
- Bodar, C.W.M., van Der Sluis, I., Voogt, P.A., Zandee, D.I., 1988. Effects of cadmium on consumption, assimilation and biochemical parameters on *Daphnia magna*: possible implications for reproduction. *Comp. Biochem. Physiol. C Comp. Pharmacol.* 90(2), 341-346.
- Bodar, C.W.M., van der Sluis, I., Voogt, P.A., Zandee, D.I., 1990. Cadmium resistance in *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.* 16, 33-40.

- Bodar, C.W.M., van Leeuwen, C.J., Voogt, P.A., Zandee, D.I., 1988. Effect of cadmium on the reproduction strategy of *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.* 12, 301-310.
- Bossuyt, B.A.T., Janssen, C., 2005. Copper toxicity to different field-collected cladoceran species: intra- and inter-species sensitivity. *Environ. Pollut.* 136, 145-154.
- Coleman, J.S., Heckathorn, S.A., Hallberg, R.L., 1995. Heat shock proteins and thermotolerance: linking molecular and ecological perspectives. *Trends Ecol. Evol.* 10, 305-306.
- Connon, R., Hooper, H.L., Sibly, R.M., Lim, F.-L., Heckmann, L.H., Moore, D.J., Watanabe, H., Soetaert, A., Cook, K., Maund, S.J., Hutchinson, T.H., Moggs, J., De Coen, W., Iguchi, T., Callaghan, A., 2008. Linking molecular and population stress responses in *Daphnia magna* exposed to cadmium. *Environ. Sci. Technol.* 42, 2181-2188.
- Dallinger, R., Berger, B., Hunziger, P., Kägi, J.H.R., 1997. Metallothionein in snail Cd and Cu metabolism. *Nature.* 388, 237-238.
- De Coen, W.M., Janssen, C.R., 1997. The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. IV. Cellular energy allocation: a new methodology to assess the energy budget of toxicant-stressed *Daphnia* populations. *J. Aquat. Ecosystem Stress Recovery* 6, 4-55.
- De Coninck, D, Janssen, C, De Schamphelaere, K., 2013. An investigation of the inter-clonal variation of the interactive effects of cadmium and *Microcystis aeruginosa* on the reproductive performance of *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.* 140-141:425-431.
- Dietrich, S., Ploessl, F., Bracher, F., Laforsch, C., 2010. Single and combined toxicity of pharmaceuticals at environmentally relevant concentrations in *Daphnia magna* - A multigenerational study. *Chemosphere* 79, 60-6.
- Elnabarawy, M.T., Welter, A.N., Robideau, R.R., 1986. Relative sensitivity of three daphnid species to selected organic and inorganic chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* 5, 393-398.
- Favatier, F., Bornman, L., Hightower, L.E., Gunter, E., Polla, S., 1997. Variation in hsp gene expression and Hsp polymorphism: do they contribute to differential disease susceptibility and stress tolerance? *Cell. Stress.* Chap. 2, 141-155.
- Feder, M.E., Hofmann G.E., 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. *Ann. Rev. Physiol.* 61, 243-282.
- Fraysse, B., Geffard, O., Berthet, B., Quéau, H., Biagianti-Risbourg, S., Geffard, A., 2006. Importance of metallothioneins in the cadmium detoxification process in *Daphnia magna*. *Comp. Biochem. Physiol.* 144, 286-293.

- Goto, S.G., Kimura, M.T. 1998. Heat- and cold-shock response and temperature adaptations in subtropical and temperate species of *Drosophila*. *J. Insect Physiol.* 44, 1233-1239.
- Guan, R., Wang W.-X., 2006. Comparison between two clones of *Daphnia magna*: Effects of multigenerational cadmium exposure on toxicity, individual fitness, and biokinetics. *Aquat. Toxicol.* 76, 217-229.
- Haap, T., Köhler, H.-R., 2009. Cadmium tolerance in seven *Daphnia magna* clones is associated with reduced hsp70 baseline levels and induction. *Aquatic Toxicology* 94, 131-137.
- Hallare, A.V., Schirling, M., Luckenbach, T., Köhler, H.-R., Triebkorn, R., 2005. Combined effects of temperature and cadmium on developmental parameters and biomarker responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *J. Therm. Biol.* 30, 7-17.
- Heugens, E.H.W., Hendriks, A.J., Dekker, T., van Straalen, N.M., Admiraal, W., 2001. A review of the effects of multiple stressors on aquatic organisms and analysis of uncertainty factors for use in risk assessment. *Crit. Rev. Toxicol.* 31, 247-284.
- Hofmann, G.E., 2005. Patterns of hsp gene expression in ectothermic marine organisms on small to large biogeographic scales. *Integr. Comp. Biol.* 45, 247-255.
- Hofmann, G.E., Somero, G.N., 1996. Interspecific variation in thermal denaturation of proteins in the congeneric mussels *Mytilus trossulus* and *M. galloprovincialis*: evidence from the heat-shock response and protein ubiquitination. *Mar. Biol.* 126, 65–75.
- Holmstrup, M., Bindsbøl, A.M., Oostingh, G.J., Duschl, A., Scheil, V., Köhler, H.-R., Loureiro, S., Soares, A.M.V.M., Ferreira, A.L.G., Kienle, C., Gerhardt, A., Laskowski, R., Kramarz, P.E., Bayley, M., Svendsen, C., Spurgeon, D.J., 2010. Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: A review. *Sci. Total. Environ.* 408, 3746-3762.
- Ivanina, A.V., Taylor, C., Sokolova, I.M., 2009. Effects of elevated temperature and cadmium exposure on stress protein response in eastern oysters *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Aquat. Toxicol.* 91, 245–254.
- Kabani, M., Martineau, C.N., 2008. Multiple hsp70 isoforms in the eukaryotic cytosol: mere redundancy or functional specificity? *Curr. Genomics.* 9 (5) 338.
- Ketola, T., Laakso J., Kaitala, V., Airaksinen, S., 2004. Evolution of Hsp90 expression in *Tetrahymena thermophila* (Protozoa, Ciliata) populations exposed to thermally variable environments. *Evolution* 58, 741-748.

- Klaassen, C.D., Liu, J., Choudhuri, S., 1999. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 267-294.
- Klerks, P.L., Weis, J.S., 1987. Genetic adaptation to heavy metals in aquatic organisms: a review. *Environ. Pollut.* 45, 173-205.
- Knight, C.A., Ackerly, D.D., 2001. Correlated evolution of chloroplast heat shock protein expression in closely related plant species. *Am. J. Bot.* 88, 411-418.
- Knops, M., Altenburger, R., Segner, H., 2001. Alterations of physiological energetics, growth and reproduction of *Daphnia magna* under toxicant stress. *Aquat. Toxicol.*, 53, 79-90.
- Köhler, H.-R., Alberti, G., Seniczak, S.T., Seniczak, A., 2005: Lead-induced hsp70 and hsp 60 pattern transformation and leg malformation during postembryonic development in the oribatid mite, *Archezogozetes longisetosus* Aoki. *Comp. Biochem. Physiol., Part C* 141, 398-405.
- Köhler, H.-R., Knödler, C., Zanger, M., 1999. Divergent kinetics of hsp70 induction in *Oniscus asellus* (Isopoda) in response to four environmentally relevant organic chemicals (B[a]P, PCB52, g-HCH, PCP): Suitability and limits of a biomarker. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 36, 179–185.
- Köhler, H.-R., Zanger, M., Eckwert, H., Einfeldt, I., 2000. Selection favours low hsp70 levels in chronically metal-stressed soil arthropods. *J. Evol. Biol.* 13, 569-582.
- Krebs, R.A., Bettencourt, B.R., 1999. Evolution of thermotolerance and variation in the heat-shock protein, hsp70. *Am. Zool.* 39, 910– 919.
- Kwok, K.W.H., Grist, E.P.M., Leung, K.M.Y., 2009. Acclimation effect and fitness cost of copper resistance in the marine copepod *Tigriopus japonicus*. *Ecotox. Environ. Safe.* 72, 358-64.
- Lannig, G., Cherkasov, A.S., Pörtner, H.-O., Bock, C., Sokolova, I.M., 2008. Cadmium dependent oxygen limitation affects temperature tolerance in eastern oysters (*Crassostrea virginica* (Gmelin)). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol* 294, 1338-1346.
- Lannig, G., Flores, J.F., Sokolova, I.M., 2006. Temperature-dependent stress response in oysters, *Crassostrea virginica*: pollution reduces temperature tolerance in oysters. *Aquat. Toxicol.* 79, 278–287.
- LeBlanc, G.A., 1982. Laboratory investigation into the development of resistance of *Daphnia magna* (Straus) to environmental pollutants. *Environ. Pollut.* 27 309-322
- Loeschcke, V., Sørensen, J.G., 2005. Acclimation, heat shock and hardening– a response from evolutionary biology. *J. Therm. Biol.* 30, 255-257.

- Lopes, I., Baird, D.J., Ribeiro R., 2006. Genetic adaptation to metal stress by natural populations of *Daphnia longispina*. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 63(2), 275-285.
- Medina, M.H., Correa, J.A., Barata, C., 2007. Micro-evolution due to pollution: possible consequences for ecosystem responses to toxic stress. *Chemosphere* 67(11), 2105-2114.
- Messiaen, M., De Schamphelaere, K.A.C., Muysen, B.T.A., Janssen, C.R., 2010. The microevolutionary potential of *Daphnia magna* population exposed to temperature and cadmium stress. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 73, 1114-1122.
- Messiaen, M., Janssen, C.R., Thas, O., De Schamphelaere, K.A.C., 2012. The potential for adaptation in a natural *Daphnia magna* population: broad and narrow- sense heritability of net reproductive rate under Cd stress at two temperatures. *Ecotoxicology* 21, 1899-1910.
- Morgan, A.J., Kille, P., Stürzenbaum, S., 2007. Microevolution and ecotoxicology of metals in invertebrates. *Environ. Sci. Technol.* 41, 1085-1096.
- Mulvey, M., Diamond, S.A., 1991. Genetic factors and tolerance acquisition in populations exposed to metals and metalloids, in: Newmann, C., McIntosh A.W., (Eds.), *Metal ecotoxicology - concepts & applications*. Lewis Publishers, pp. 301-321.
- Muysen, B.T.A., Janssen, C.R., 2001. Multi-generation zinc acclimation and tolerance in *Daphnia magna*: implications for water quality guidelines and ecological risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 2053-2060.
- Muysen, B.T.A., Janssen, C.R., 2002. Tolerance and acclimation to zinc of *Ceriodaphnia dubia*. *Environ. Pollut.* 117, 301-306.
- Muysen, B.T.A., Janssen, C.R., 2004. Multi-generation cadmium acclimation and tolerance in *Daphnia magna*. *Environ. Pollut.* 130, 309-316.
- Muysen, B.T.A., Messiaen, M., Janssen, C.R., 2010. Combined cadmium and temperature acclimation in *Daphnia magna*: Physiological and sub-cellular effects. *Ecotox. Environ. Safe.* 73, 735-742.
- Nakano, K., Iwama, G.K., 2002. The 70-kDa heat shock protein response in two intertidal sculpins, *Oligocottus maculosus* and *O. snyderi*: relationship of hsp70 and thermal tolerance. *Comp. Biochem. Phys.* 133A, 79-94.
- Oda, S., Tatarazako, N., Dorgerloh, M., Johnson, R.D., Kusk, K.O., Leverett, D., Marchini, S., Nakari, T., Williams, T., Iguchi, T., 2007. Strain difference insensitivity to 3,4-dichloroaniline and insect growth regulator, fenoxycarb, in *Daphnia magna*. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 67, 399-405.

- OECD, 2004. Guideline for Testing of Chemicals, Test No. 202, *Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test. Environment Directorate OECD, Paris.
- OECD, 2008. Guideline for Testing of Chemicals, Test No. 211: *Daphnia magna* Reproduction Test. Section 2: Effects on Biotic Systems. Organization of Economic Cooperation and Development, Paris.
- Palmiter, R.D., 1998. The elusive function of metallothioneins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 8428–30.
- Parsell, D.A., Lindquist, S., 1993. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. Annu. Rev. Genet. 27, 437-496.
- Paul, R.J., Lamkemeyer, T., Maurer, J., Pinkhaus, O., Pirow, R., Seidl, M., Zeis, B., 2004. Thermal acclimation in the microcrustacean *Daphnia*: a survey of behavioural, physiological and biochemical mechanisms. J. Therm. Biol. 29, 655–662.
- Pauwels, K., Stoks R., De Meester L., 2005. Coping with predator stress: interclonal differences in induction of heat-shock proteins in the water flea *Daphnia magna*. J. Evol. Biol. 18, 867-872.
- Pauwels, K., Stoks, R., Decaestecker, E., De Meester, L., 2007. Evolution of heat shock protein expression in a natural population of *Daphnia magna*. Am. Nat. 170, 800-805.
- Poynton, H.C., Loguinov, A.V., Varshavsky, J.R., Chan, S., Perkins, E.J., Vulpe, C.D., 2008. Gene expression profiling in *Daphnia magna* part I: concentration-dependent provide support for the no observed transcriptional effect level. Environ. Sci. Technol. 42, 6250-6256.
- Poynton, H.C., Varshavsky, J.R., Chang, B., Cavigiolio, G., Chan, S., Holman, P.S., Loguinov, A.V., Bauer, D.J., Komachi, K., Theil, E.C., Perkins, E.J., Hughes, O., Vulpe, C.D., 2007. *Daphnia magna* ecotoxicogenomics provides mechanistic insights into metal toxicity. Environ. Sci. Technol. 41, 1044-1050.
- Pytharopoulou, S., Kouvela, E.C., Sazakli, E., Leotsinidis, M., Kalpaxis, D.L., 2006. Evaluation of the global protein synthesis in *Mytilus galloprovincialis* in marine pollution monitoring: Seasonal variability and correlations with other biomarkers. Aquat. Toxicol. 80(1), 33-41.
- Roberts, S.P., Feder, M.E., 2000. Changing fitness consequences of hsp70 copy number in transgenic *Drosophila* larvae undergoing natural thermal stress. Funct. Ecol. 14, 353-357.
- Schill, R. O., Görlitz, H., Köhler, H.-R., 2003. Laboratory simulation of a mining accident: acute toxicity, hsc/hsp70 response, and recovery from stress in *Gammarus*

- fossarum* (Crustacea, Amphipoda) exposed to a pulse of cadmium. *Biometals*, 16, 391-401.
- Shaw, J.R., Colbourne, J.K., Davey, J.C., Glaholt, S.P., Hampton, T.H., Chen, C.Y., Folt, C.L., Hamilton, J.W., 2007. Gene response profiles for *Daphnia pulex* exposed to the environmental stressor cadmium reveals novel crustacean metallothioneins. *BMC Genomics* 8, 477.
- Silbermann R., Tatar, M., 2000. Reproductive costs of heat shock protein in transgenic *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 54, 2038-2045.
- Soetaert, A., Vandenbrouck, T., van der Ven, K., Maras, M., van Remortel, P., Blust, R., De Coen, W. M., 2007. Molecular responses during cadmium-induced stress in *Daphnia magna*: Integration of differential gene expression with higher-level effects. *Aquat. Toxicol.* 83(3), 212-222.
- Sokolova, I.M., Frederich, M., Bagwe, R., Lannig, G., Sukhotin, A.A., 2012. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Marine Environmental Research*, 79, 1-15.
- Sokolova, I.M., Lannig, G., 2008. Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: implications of global climate change. *Clim. Res.* 37, 181-201.
- Sørensen, J.G., Dahlgaard, J., Loeschcke, V., 2001. Genetic variation in thermal tolerance among natural populations of *Drosophila buzzatii*: down regulation of hsp70 expression and variation in heat stress resistance traits. *Funct. Ecol.* 15, 289-296.
- Sørensen, J.G., Kristensen, T.N., Loeschcke, V., 2003. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecol. Lett.* 6, 1025-1037.
- Stuhlbacher, A., Bradley, M.C., Naylor, C., Calow, P., 1992. Induction of cadmium tolerance in two clones of *Daphnia magna* Straus. *Comp. Biochem. Physiol.* 101, 571-7.
- Stuhlbacher, A., Bradley, M.C., Naylor, C., Calow, P., 1993. Variation in the development of cadmium resistance in *Daphnia magna* Straus: effect of temperature, nutrition, age and genotype. *Environ. Pollut.* 80, 153-158.
- Tsui, M.T.K., Wang, W.X., 2007. Biokinetics and tolerance development of toxic metals in *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 26(5), 1023-1032.
- Warchalowska-Sliwa, E., Niklinska, M., Gorlich, A., Michailova, P., Pyza, E., 2005. Heavy metal accumulation, heat shock protein expression and cytogenetic changes in *Tetrix tenuicornis* (L.) (Tetrigidae, Orthoptera) from polluted areas. *Environ. Pollut.* 133, 373-381.

Xie, L., Klerks, P.L., 2004. Fitness cost of resistance to cadmium in the least killifish *Heterandria formosa*. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 1499-503.

Zatsepina, O.G., Velikodvorskaja, V.V., Molodtsov, V., Bettencourt, B.R., Lerman, D.N., Feder, M.E., Evgenev, M.B., 2001. A *Drosophila melanogaster* strain from sub-equatorial Africa has exceptional thermotolerance but decreased hsp70 expression. *J. Exp. Biol.* 204, 1869-1881.

Danksagung

Der überwiegende Teil der vorliegenden Arbeit wurde im Institut für Evolution und Ökologie im Lehr- und Forschungsbereich Physiologische Ökologie der Tiere der Universität Tübingen durchgeführt.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Heinz-R. Köhler, welcher mir stets bei Fragen und Ungewissheiten hilfreich zur Seite stand, sich für mein Thema begeisterte und stets dafür offen und diskussionsbereit war.

Dr. Christina Chaban vom Zentrum für Molekularbiologie der Pflanzen, Universität Tübingen, danke ich für die Hilfe bei den molekularbiologischen Arbeiten im Labor und deren Auswertung. Bei ihren DoktorandInnen und MitarbeiterInnen bedanke ich mich für weiterführende fachnahe Diskussionen, die Einlernung in die Methoden im Labor und für die sehr schöne Zeit im ZMBP. Besonderer Dank gilt dabei Dr. Tobias Kirchler und Melanie Keinath.

Bei Prof. Dr. Rita Triebkorn bedanke ich mich für ihren Anteil bei der Betreuung des 1. Kapitels meiner Dissertation, sowie für die wichtige Unterstützung und Beratung bei den Untersuchungen zu Lösungsvermittlern und Pharmazeutika.

Ein Dank geht auch an Prof. Dr. Reinhard Dallinger, Leiter der Arbeitsgruppe Aquatische Ökologie und Toxikologie an der Universität Innsbruck, in dessen Abteilung ich erste Methoden zur Quantifizierung von Metallothioneinen erlernen durfte.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Andre Velescu, unter dessen Betreuung ich am Institut für Geographie und Geoökologie der Universität Tübingen die Analytik mit F-AAS durchführen konnte.

Bei Martha Dörfler, Johanna Hutterer und Stefan Böhler bedanke ich mich für ihre große Hilfe bei der graphischen Gestaltung.

Besonders möchte ich mich auch bei den Technischen AssistentInnen und Zivildienstleistenden bedanken, die mir bei praktischen Belangen hilfreich zur Seite standen: Heidi Casper, Stefanie Kraus, Tobias Benz und Niels Dieter.

Bei der FAZIT-Stiftung und der Richard-Winter-Stiftung bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung in Form von Stipendien. Für finanzielle Beihilfen für Kongressbesuche und Aufenthalte an anderen Universitäten zum Erlernen von neuen Methoden bedanke ich mich des Weiteren bei der Reinhold-und-Maria-Teufel-Stiftung.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ewald Müller und Herrn Prof. Dr. Oliver Betz für ihre Bereitschaft, als Prüfer bei meiner Disputation zu fungieren.

Danksagung

Ein ganz herzlicher Dank geht an alle MitarbeiterInnen, DiplomandInnen, DoktorandInnen und PraktikantInnen des Lehr- und Forschungsbereichs Physiologische Ökologie der Tiere, die zu einer sehr angenehmen Arbeitsatmosphäre beigetragen haben. Besonderer Dank gebührt (in zufälliger Reihenfolge) Simon Schwarz, Heidi Casper, Stefanie Kraus, Dr. Raphaela Osterauer, Dr. Cornelia Kienle, Dr. Nils Dittbrenner, Dr. Miriam Langer, Katja Wallmeier, Dr. Katja Bader, Dr. Edita Mazurova, Volker Pott, Dr. Christopher Harvey, Dr. Volker Scheil und Dr. Stephanie Merbt.

Und natürlich ein Dank an diejenigen, die mich auf meinem Weg begleiteten, bereicherten und bestärkten: Meine gesamte, liebe Familie und alle meine Freunde.

Publikationsliste

Originalpublikationen in wissenschaftlichen Zeitschriften

Haap, T., Triebskorn, R., Köhler, H.-R., 2008. Acute effects of diclofenac and DMSO to *Daphnia magna*: immobilisation and hsp70 induction. *Chemosphere* 73, 353-359.

Haap, T., Köhler, H.-R., 2009. Cadmium tolerance in seven *Daphnia magna* clones is associated with reduced hsp70 baseline levels and induction. *Aquatic Toxicology* 94, 131-137.

Heinz, P., Marten, R.A., Linshy, V.N., Haap, T., Geslin, E., Köhler, H.-R., 2012. 70 kD stress protein (Hsp70) analysis in living shallow-water benthic foraminifera. *Marine Biology Research* 8, 677-681.

Haap, T., Schwarz, S., Köhler, H.-R., 2015. Hsp70 and metallothionein trade-off against one another in *Daphnia magna* cross tolerance to cadmium and heat stress. *Aquatic Toxicology*, submitted.

Tagungsbeiträge

Haap, T., Köhler, H.-R., 2008. Effects of diclofenac and DMSO to *Daphnia magna*: acute toxicity and hsp70-induction. SETAC (Society of Environmental Toxicology and Chemistry) Europe. The multiple stressors for the environment - present and future challenges and perspectives, 17. SETAC Europe Jahrestagung, Porto, Portugal, 20.-24.05.2007. Poster.

Haap, T., Köhler, H.-R., 2009. Cadmium tolerance in *Daphnia magna* is associated with reduced hsp70 induction. SETAC (Society of Environmental Toxicology and Chemistry) Europe Protecting ecosystem health: facing the challenge of a globally changing environment. 19. SETAC Europe Jahrestagung, Göteborg, Schweden, 31.5.-04.06.2009. Poster.

Haap, T., 2010. Tolerance to cadmium and thermal stress in *Daphnia magna* clones: role of hsp70, metallothionein and acclimatisation. Meeting StEvE; Annual meeting of Students in Evolution and Ecology at research facilities in Tübingen, Tübingen, Deutschland, 25-26.11.2010. Vortrag.