

Zusammenfassung der Dissertation

Die Effekte abiotischer Stressoren und Substanzen verschiedener Schadstoffklassen auf *Chironomus riparius* wurden sowohl im Lebenszyklustest als auch auf genomischer Ebene mit dem Ziel untersucht, ein auf einem DNA-Mikroarray („ChiroChip“) basierendes Screeningverfahren zu entwickeln. Der ChiroChip ist der erste uns bekannte Mikroarray mit *Chironomus*-cDNA.

Die empfindlichsten Endpunkte der Lebenszyklustests für alle Substanzen mit signifikanten Unterschieden zu den Kontrollen waren die Mortalität, der Anteil fruchtbarer Eigelege, der mittlere Schlupfzeitpunkt der Weibchen sowie das Gewicht der Männchen. Temperaturveränderungen um $\pm 6^\circ\text{C}$ gegenüber einer normalen Hälterungstemperatur von 20°C führten in allen Endpunkten zu hochsignifikanten Effekten. Eine LC_{10} konnte nur für die Salinität berechnet werden (0,66‰, KI: 0,26 – 1,68‰). Aufgrund der nicht-linearen Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen konnte nur für den mittleren Schlupfzeitpunkt der Weibchen nach einer Exposition gegenüber Cadmium eine EC_{50} (0,53 mg/kg, KI: 0,29 – 0,97 mg/kg) bestimmt werden. Obwohl die Substanzen in den untersuchten Konzentrationen nicht unmittelbar toxisch wirkten, sind Effekte auf Entwicklung und Fortpflanzung der Population nicht auszuschließen.

In den Versuchen mit Methyltestosteron, Ethinylöstradiol, Carbamazepin, Fluoxetin, Blei und Tributylzinn (mit denen auch molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt wurden) waren die empfindlichsten Endpunkte mit signifikanten Unterschieden zur Kontrolle die Mortalität, der Anteil fruchtbarer Eigelege, der mittlere Schlupfzeitpunkt der Weibchen sowie die Populationswachstumsrate. Carbamazepin (CBZ) wirkte schlupfverzögernd bei den Weibchen. 10 mg CBZ/kg führte zu einer höheren Mortalität, weniger Eigelegen, die auch vermehrt unfruchtbar waren, sowie zu einer geringeren Populationswachstumsrate. Fluoxetin (FX) wirkte bei beiden Geschlechtern schlupfverzögernd. 0,9 mg FX/kg führte zu einer erhöhten Mortalität, weniger und vermehrt unfruchtbaren Eigelegen und einer geringeren Populationswachstumsrate. In der höchsten Konzentration (5,9 mg/kg) waren die Weibchen leichter als die Kontrolltiere.

Tributylzinn (in $\mu\text{g Sn/kg}$ angegeben) bewirkte eine höhere Mortalität und geringere Populationswachstumsrate bei 100 $\mu\text{g Sn/kg}$ und führte zu einer Verzögerung im Schlupfverlauf bei den Weibchen. Bei 160 $\mu\text{g Sn/kg}$ gab es weniger Eigelege, die auch vermehrt unfruchtbar waren. Die Männchen, die gegenüber Konzentrationen von 120 und 160 $\mu\text{g Sn/kg}$ exponiert wurden, waren leichter als die Kontrolle. Expositionen gegenüber Blei (Pb) in Konzentrationen von 0,65 – 65 mg/kg führten bei 6,5 mg Pb/kg zu einer erhöhten Mortalität und zu mehr unfruchtbaren Gelegen. Bei 0,65 mg Pb/kg waren die Männchen leichter und bei 6,5 mg Pb/kg schwerer. Die Anzahl der fruchtbaren Gelege pro Weibchen war bei 3,25 und 6,5 mg Pb/kg geringer als in der Kontrolle.

Die gegenüber 17α -Methyltestosteron (MET) exponierten Mücken hatten geringere Mortalitäten als in der Kontrolle und zeigten auch einen verfrühten Schlupf beider Geschlechter. Ab 27 $\mu\text{g MET/kg}$ gab es weniger unfruchtbare Gelege, leichtere Männchen sowie erhöhte Populationswachstumsraten. 17α -Ethinylöstradiol (EE_2) führte ebenfalls zu einem verfrühten Schlupf bei beiden Geschlechtern sowie zu erhöhten Populationswachstumsraten. Bei 9 $\mu\text{g EE}_2/\text{kg}$ gab es weniger unfruchtbare Gelege.

Die Exposition von *Chironomus*-Larven gegenüber Methyltestosteron, Ethinylöstradiol, Fluoxetin, Carbamazepin, Tributylzinn und Blei führte zur differentiellen Expression von neun (Methyltestosteron) bis 49 (Carbamazepin) Genen. Bei der Untersuchung der exprimierten Proteine fällt auf, dass kaum bekannte Stressproteine (z.B. Glutathion-S-Transferase oder Cytochrom P450) differentiell reguliert wurden. Bei der Exposition wurden verschiedene Prozesse durch eine veränderte Genexpression beeinflusst. Eine

Exposition gegenüber Methyltestosteron führte nur zu einer Beeinträchtigung von drei identifizierten biologischen Prozessen, während bei den anderen Substanzen sieben bis acht Prozesse beeinflusst waren. Die am häufigsten beeinflussten Prozesse waren der Protein- und der Energiemetabolismus. Der Sauerstofftransport ist ein Prozess, der bei allen Substanzen beeinflusst wurde, jedoch mit unterschiedlichen Anteilen. Bei einer Exposition gegenüber Methyltestosteron war der Anteil des Sauerstofftransports an den beteiligten Prozessen mit 84,6% am größten und mit 10,5% bei Fluoxetin am geringsten. Die veränderte Genexpression der Globine kann möglicherweise aufgrund der schadstoffspezifischen Veränderungen als Biomarker für das Monitoring von Freilandgewässern angewendet werden. Da Tubulin und Aktin häufig nach einer Exposition gegenüber Stressoren differenziell exprimiert wird (bei Tributylzinn und CBZ in der vorliegenden Arbeit und bei Antidepressiva und Östrogenen in anderen Studien) wären die beiden Proteine möglicherweise ebenfalls als Biomarker für Chemikalienstress geeignet.

Vor der Verwendung des ChiroChips als Screeninginstrument für die Chemikalienuntersuchung und das Biomonitoring müssen noch Untersuchungen zur konzentrationsabhängigen Genexpression und zur Expression in unbehandelten Larven und weiteren Lebensstadien erfolgen. Des Weiteren müssen die vorliegenden Daten verifiziert und die Funktion der differentiell regulierten Gene vertieft untersucht werden.

Bezug zum Postgradualstudium

Aquatische Ökotoxikologie und Biomonitoring:

Lebenszyklustests mit *C. riparius* sind eine gute Basis für die Bewertung der Sedimenttoxizität, was auch durch die Ergebnisse der vorliegenden Versuche bestätigt wird. Jedoch sollte man sich nicht auf die Mortalität als Endpunkt stützen, da die anderen Parameter meistens empfindlicher und eindeutiger reagierten. Lebenszyklustests mit Chironomiden können wichtige Informationen für die Risikobewertung der Chemikalien liefern, sollten aber in Zusammenhang mit erhobenen Daten von anderen empfindlichen Organismen und mit Daten zum Umweltverhalten der Substanzen bewertet werden.

Die Anwendung des Mikroarrays als Screeningverfahren ist sinnvoll, und im Anschluß können anhand der Ergebnisse schnelle Methoden wie die quantitative RT-PCR verwendet werden. Wenn Leitgene feststehen, die nach einer Schadstoffexposition eindeutig unter- oder überreguliert werden, kann man diese als Biomarker für eine Chemikalienbewertung oder im Gewässermonitoring verwenden.

Beschreibung des Eigenanteils an den Arbeiten

Die ökotoxikologischen Versuche im Labor, d.h. die Sedimenttests mit den Chironomiden, wurden von mir durchgeführt.

Die molekularbiologischen Arbeiten erfolgten in Zusammenarbeit mit und größtenteils durch Mitarbeiter der Firma GENterprise Genomics GmbH in Mainz. Wo die Arbeiten durch andere Personen erfolgten, ist dies in der Dissertation kenntlich gemacht. Die Herstellung der cDNA-Banken und des ChiroChips erfolgte durch Mitarbeiter der Firma GENterprise.

Bei den molekularbiologischen Arbeiten arbeitete ich im Labor bei der Vorbereitung der DNA-Proben mit. Die Identifizierung der exprimierten Gene bzw. Proteine erfolgte eigenständig (gelegentlich mit Unterstützung durch Mitarbeiter der Firma GENterprise) anhand der Ergebnisse der Expressionstests. Die Interpretation und Diskussion der Auswirkungen der Genreaktionen auf die Chironomiden nach Identifikation der Gene und Proteine erfolgte eigenständig.

Verzeichnis der Publikationen

Diplomarbeit

Wirzinger G (2002). Einsatz des Comet Assay und Mikrokerntest zum Nachweis genotoxischer Schäden beim Dreistachligen Stichling (*Gasterosteus aculeatus* L.) an Standorten mit unterschiedlicher Gewässerbelastung.

Publikationen

Wirzinger G, Weltje L, Gercken J & Sordyl H (2007). The detection of genotoxic damage in field-collected three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) by means of the comet assay and micronucleus test. *Mutation Research* 628: 19-30.

Wirzinger G, Vogt C, Bachmann J, Hasenbank M, Liers C, Stark C, Ziebart S & Oehlmann J (2007). Imposex of the netted whelk *Nassarius reticulatus* (Prosobranchia) in Brittany along a transect from a point source. *Cahiers des Biologie Marines* 48: 85-94.

Abstracts

Wirzinger G, Weltje L, Gercken J & Sordyl H (2004). Genotoxic damage in field-collected three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.). Tagungsband Internationales Symposium "Genotoxicity and Immunotoxicity – Unwelcome effects in water systems" in Koblenz, Seite P7.

Wirzinger G, Burger B, Schmidt ER, Hankeln T & Oehlmann J (2005). ChiroChip: Entwicklung eines DNA-Mikroarray-basierenden Screening-Verfahrens zur Vorhersage von Substanzeffekten bei *Chironomus riparius*. Abstractband, SETAC-GLB-Tagung in Basel, Seite 177.

Wirzinger G, Burger B, Schmidt ER, Hankeln T & Oehlmann J (2006). ChiroChip: Entwicklung eines DNA-Mikroarray-basierenden Screening-Verfahrens zur Vorhersage von Substanzeffekten bei *Chironomus riparius*. Abstractband, SETAC-GLB-Tagung in Landau, Seite 119.

Vogt C, Schmitt C, Wirzinger G, Scheider J & Oehlmann J (2007). Imposex of the netted whelk *Nassarius reticulatus* (Prosobranchia) in Brittany along a transect from a point source. Abstractband, 16. Weltkongreß der Malakologischen Gesellschaft in Antwerpen, Seite 234.

Wirzinger G, Burger B, Bitz O, Schmidt ER, Hankeln T & Oehlmann J (2007). ChiroChip: Entwicklung eines DNA-Mikroarray-basierenden Screening-Verfahrens zur Vorhersage von Substanzeffekten bei *Chironomus riparius*. Abstractband, SETAC-GLB-Tagung in Leipzig, Seite 58-59.

Wirzinger G, Burger B, Bitz O, Schmidt ER, Hankeln T & Oehlmann J (2007). ChiroChip, a DNA-microarray-based screening method for the assessment of chemical-induced effects in *Chironomus riparius*. Abstractband, 3. NORMAN Workshop, Amsterdam, Seite 29.

Poster

Wirzinger G, Weltje L, Gercken J & Sordyl H (2004). Genotoxic damage in field-collected three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.). Internationales Symposium "Genotoxicity and Immunotoxicity – Unwelcome effects in water systems" in Koblenz.

Wirzinger G, Burger B, Schmidt ER, Hankeln T & Oehlmann J (2005). ChiroChip: Entwicklung eines DNA-Mikroarray-basierenden Screening-Verfahrens zur Vorhersage von Substanzeffekten bei *Chironomus riparius*. SETAC-GLB-Tagung in Basel.

Vogt C, Schmitt C, Wirzinger G, Scheider J & Oehlmann J (2007). Imposex of the netted whelk *Nassarius reticulatus* (Prosobranchia) in Brittany along a transect from a point source. 16. Weltkongreß der Malakologischen Gesellschaft in Antwerpen.

Wirzinger G, Bitz O, Burger B, Linke M, Schmidt ER, Hankeln T & Oehlmann J (2007). Pollutant-induced life cycle effects and gene expression of *Chironomus riparius*. 3. NORMAN Workshop, Amsterdam

Vorträge

Wirzinger G (2005): Einsatz des Comet Assay und Mikrokerntest zum Nachweis genotoxischer Schäden beim Dreistachligen Stichling (*Gasterosteus aculeatus* L.), gehalten beim Abwasserzweckverband Schwerin.

Wirzinger G, Burger B, Schmidt ER, Hankeln T & Oehlmann J (2006). ChiroChip: Projektvorstellung und erste Ergebnisse. SETAC-GLB-Tagung in Landau.

Wirzinger G, Burger B, Bitz O, Schmidt ER, Hankeln T & Oehlmann J (2007). Schadstoffinduzierte Genexpression bei *Chironomus riparius*. SETAC-GLB-Tagung in Leipzig.

Zusammenfassung der Diplomarbeit

Einsatz des Comet Assay und Mikrokerntest zum Nachweis genotoxischer Schäden beim Dreistachligen Stichling (*Gasterosteus aculeatus* L.) an Standorten mit unterschiedlicher Gewässerbelastung

Ein Bestandteil der biologisch-ökotoxikologischen Gewässerüberwachung ist das Schadstoffmonitoring, womit die räumlichen und zeitlichen Belastungen gemessen werden. Die Schadstofffassung geschieht zunehmend mit sogenannten Bioindikatoren. Aquatische Organismen sind permanent den Schadstoffen ihrer Umwelt ausgesetzt und somit geeignet, die Rolle als Bioindikator zu übernehmen.

In dieser Diplomarbeit wurde das Blut des Dreistachligen Stichlings aus drei Gewässern in Mecklenburg-Vorpommern auf das Vorkommen von DNA-Schädigungen untersucht. Verwendet wurden die Methoden Comet Assay und Mikrokerntest. Der Comet Assay dient dem Nachweis von DNA-Strangbrüchen und alkali-labilen Stellen, während der Mikrokerntest Schäden nachweist, die auf chromosomalen Schädigungen fußen.

Es zeigte sich, dass bei den Tieren aus dem Kraaker Mühlenbach keine signifikanten Unterschiede im Grad der DNA-Strangbrüche feststellbar waren. Bei den Fischen aus dem Ableitergraben zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Augustwerte zu den Ergebnissen der Mai-Beprobung. Aus den Ergebnissen des Mikrokerntests ist ersichtlich, dass die Zahl der Mikrokerne stark individuumsabhängig ist. Dabei hatten die Fische des Kraaker Mühlenbachs die geringste, die Fische aus dem Ableitergraben die höchste Mikrokernrate. Trotz der schwach negativen Korrelation zwischen beiden Biomarkern Comet Assay und Mikrokerntest gibt es allem Anschein nach keinen statistisch nachweisbaren Zusammenhang.