

## 7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß natürlicher und anthropogener Stressoren (Cd) auf die Induktion von MT-Isoformen untersucht und ausgehend von diesen Ergebnissen eine Beurteilung der MT-Isoformen als Biomarker einer Schwermetallexposition vorgenommen. Als Untersuchungsorganismus wurde die Kliesche (*Limanda limanda*) gewählt, die bereits mehrfach in Effektmonitoringprogrammen eingesetzt worden ist, so daß viele Daten hinsichtlich Schadstoffgehalten, Krankheiten und Populationsbiologie vorhanden ist.

Basierend auf einer Isolierung, Charakterisierung und anschließenden Identifizierung der MT-Isoformen wurde eine Quantifizierungsmethode zur Bestimmung der Hauptisoformen MT-1 und MT-2 entwickelt. Die Methode beruht auf einem Austausch der gebundenen Metalle gegen Cd. Als effektiver Reinigungsschritt wurde eine zweistufige Acetonfällung der Proteine vorgenommen und das so gereinigte Isolat mittels IEC in die Isoformen getrennt. Die Quantifizierung erfolgte indirekt über die Cd-Gehalte der erhaltenen IEC-Eluatate mittels GF-AAS. Die Methode ist ausreichend empfindlich, eine Bestimmung des Isoforms MT-2 und des in geringen Mengen vorkommenden Isoforms MT-1 vorzunehmen.

Es wurden Hälterungsexperimente, Freilandprobenahmen in Nord- und Ostsee sowie die saisonale Untersuchung im Zeitraum von einem Jahr an einer festgelegten Station vorgenommen. Parallel zu den MT-Gehalten wurden die Gehalte an Zn und Cd in den Lebern der untersuchten Fische bestimmt.

Es zeigten sich unterschiedliche Induktionen der Isoformen beim Vergleich der Klieschen unterschiedlicher Stationen. Dabei konnten die niedrigsten Gehalte in Klieschen der Ostsee, die höchsten in Klieschen von Stationen im Englischen Kanal und vor Schottland festgestellt werden. Speziell für MT-1 konnten die höchsten Gehalte in Klieschen der Station im Englischen Kanal bestimmt werden. Beim Vergleich der Daten zwischen Winter und Frühsommer ergaben sich für MT-2 höhere Gehalte im Winter. Parallele Entwicklungen im jahreszeitlichen Vergleich konnten auch für die Zn-Gehalte festgestellt werden. Es konnte sowohl im Winter als auch im Frühsommer eine Korrelation von MT- und Zn-Werten gezeigt werden. Lediglich im Winter ergaben sich Korrelationen von Cd- und MT-Gehalten.

Eine Induktion durch Cd konnte im Hälterungsexperiment nachgewiesen werden, wobei eine Zunahme der MT-Werte erst bei Cd-Konzentrationen in der Leber festgestellt werden konnte, die die natürlichen weit überschreiten. In den Hälterungsexperimenten konnte ebenfalls eine Induktion der Isoformen durch eine Temperaturänderung bzw. Salinitätsänderung erreicht werden.

Diese Ergebnisse wurden in der saisonalen Untersuchung der Klieschen einer festgelegten Station vor Helgoland im Zeitraum eines Jahres genauer untersucht. Es ergaben sich ausgeprägte saisonale Zyklen für MT-2-, Zn- und Lipidgehalte. Ein Vergleich mit dem

Laichzyklus und der Wassertemperatur zeigte, daß die MT-2-Gehalte einerseits durch steigende Zn-Gehalte während der Ovarienentwicklung als auch durch steigende Temperaturen im Sommer induziert werden. MT-1 zeigt diesen saisonalen Zyklus nicht. Es konnte kein Zusammenhang zwischen Cd- und MT-Werten festgestellt werden. Vor diesem Hintergrund wurden die beschriebenen Ergebnisse der unterschiedlichen MT-Gehalte in Klieschen der weit voneinander entfernten Stationen betrachtet. Es zeigte sich, daß hauptsächlich natürliche Einflüsse für die Induktion der MT verantwortlich sind. Anthropogene Einflüsse, im Form von Cd, haben einen geringeren Einfluß. Die Bewertung der MT als Biomarker ist daher abhängig von der genauen Kenntnis der saisonalen Zusammenhänge für Fische einer Station. Ansonsten könnten der Einfluß natürlicher Faktoren wie Wassertemperatur und Laichzyklus als anthropogener Einfluß gewertet und so irrtümlicherweise ein schadstoffbezogener Zusammenhang gezogen werden.

Die Eignung der Kliesche als Monitoringorganismus ist als begrenzt anzusehen. Die positive Eigenschaft der relativen Standorttreue wird durch die ausgeprägten saisonalen Zyklen mit den damit verbundenen Auswirkungen auf die Physiologie des Fisches eingeschränkt.

## Summary

The present study was undertaken to investigate the influence of anthropogenic (Cd) and natural stressors on MT isoform induction. Based on these results the suitability of MT isoforms as biomarkers of a heavy metal exposure should be evaluated. The marine flatfish dab (*Limanda limanda*) was selected because of its use as a monitoring organism and available data on xenobiotic burdens, diseases and population biology.

Based on the isolation, characterisation and subsequent identification a quantification method for both isoforms (MT-1 and MT-2) was developed. The method rest upon exchange of naturally bound metals against Cd. A two step acetone precipitation was carried out as an effective clean-up procedure. The isolated proteins were separated by means of IEC and eluates were fractionated. Indirect MT determination was performed by measuring the Cd content of these fractions with GF-AAS. The method was sensitive enough to determine minute amounts of MT-1.

Dabs from laboratory experiments and sampling sites in the North Sea and Baltic Sea (December and May) were examined. Seasonal changes and possible influences were evaluated over a 1-year period at a fixed site northwest of Helgoland in the German Bight. Additionally Cd and Zn contents of dab livers were determined.

The mean hepatic MT concentration varied significantly in female dab from different sites. Female dab collected at sites in the Baltic Sea had lower hepatic MT levels, while dab from sites at the Firth of Forth (northwest North Sea) and the English Channel showed the highest levels. Highest MT-1 concentrations were observed in dab from the English Channel, while

dab from other site showed no differences for this isoform. A comparison of data from December and May revealed differences for MT-2 and Zn contents with higher concentrations in December. There was a strong correlation between Zn and MT contents in December and May but only correlation between Cd and MT contents in December.

Laboratory experiments showed an induction of MT isoforms at Cd concentrations 40 to 200 times higher than Cd burden found in the North Sea. Furthermore an induction of MT isoforms by temperature or salinity changes was observed.

Seasonal changes during one year were observed for MT-2, Zn and lipid content. No significant changes could be observed for MT-1. MT-2 content were influenced by water temperature and spawning period affecting Zn contents in the latter case. There was a strong correlation between Zn and MT-2 contents but no correlation between Cd and MT contents.

With this information a re-evaluation of MT results from dab in the North Sea and Baltic Sea was undertaken. It was shown that differences in MT contents might be caused by differences in spawning status and anthropogenic Cd burden.

The assessment of MT isoforms as a biomarker of heavy metal exposure depends on knowledge of seasonal changes at every sampling site. Without these information a natural influence on MT induction like water temperature changes or spawning status might be evaluated as an anthropogenic influence.

The suitability of the dab as a monitoring organism is limited. The positive attribute of minor fluctuations in an area is restricted by strong seasonal variations due to spawning physiology.