

8 Zusammenfassung/Summary

8.1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte die Eignung von Apoptose als Biomarker für das biologische Effektmonitoring überprüft werden. Die Untersuchungen zur Apoptose erfolgten in Lebern der marinen Fisch-Spezies Kliesche (*Limanda limanda* L.).

Hierfür wurden Laborexperimente mit den ausgewählten Modellkontaminanten Cadmium, PCB 118 und PCB 77 durchgeführt, um mögliche Effekte durch anthropogene Stressoren auf die Apoptose nachzuweisen. Ferner sind in Laborexperimenten mögliche Einflüsse natürlicher Stressoren wie Salzgehalt- und Temperaturänderungen auf die Apoptose untersucht worden.

Parallel dazu wurde die Apoptose im Freiland an unterschiedlich kontaminierten Stationen zu zwei verschiedenen Jahreszeiten in Nord- und Ostsee bestimmt. Zur Überprüfung möglicher saisonaler Schwankungen in der Apoptoserate wurde an der Nordsee-Station N01 ein sog. Jahresgang aufgenommen, d.h. die monatliche Messung der Apoptoserate.

Die Bestimmung der Apoptose erfolgte mittels DNA-Elektrophorese und anschließender Quantifizierung der DNA-Fragmente zwischen ca. 180 und 1500 bp sowie mittels des TUNEL-assay an Gefrierschnitten und anschließender Image-Analyse. Den Untersuchungen zur Apoptose vorangestellt erfolgte die Optimierung der Methoden.

In den Laborexperimenten konnte gezeigt werden, daß im Februar bei einem niedrigen Apoptose-Grundlevel Apoptose durch Cadmium und PCB 118 induzierbar ist. Hohe Konzentrationen der stark toxischen Substanzen PCB 77 und Cadmium haben hauptsächlich Nekrose im Lebergewebe induziert.

Im Sommer dagegen, bei einem hohen Apoptose-Grundlevel, führte die Inkubation mit PCB 118 und PCB 77 zu einer konzentrationsabhängigen Reduzierung der Apoptoserate.

In den Laborexperimenten mit den natürlichen Stressoren wurde durch eine Reduzierung des Salzgehalts kein Effekt erzielt, eine Erhöhung der Temperatur führte jedoch im Mai zu einer leichten Erhöhung TUNEL-positiver Zellen.

Die Untersuchung der Freilandstationen zeigte im Dezember höhere Apoptoseraten in der Ostsee als in der Nordsee auf, im Mai dagegen waren kaum Unterschiede zwischen den einzelnen Stationen zu messen. Die Bestimmung der Apoptose im Jahresgang ergab eine Erhöhung der Apoptoserate zwischen Juli und Oktober und ein Minimum im Frühjahr.

Die Apoptoserate an den Freilandstationen korrelierte im Dezember invers zum Zink- und Cadmiumgehalt der Lebern, zum GSI und zur Wassertemperatur, nicht jedoch zu den

organischen Schadstoffen PCB und DDE. Ferner bestand eine Korrelation zu den Biomarkern MT (invers) und zur EROD-Aktivität.

Im Mai korrelierte neben dem Zink- und Cadmiumgehalt der Fettgehalt der Lebern mit der Apoptoserate und im Jahresgang wiederum die Wassertemperatur und der Fettgehalt.

Es hat sich gezeigt, daß die Apoptose in Klieschenlebern einen deutlichen Zusammenhang zu saisonalen und physiologischen Schwankungen aufweist.

Die Apoptoserate sinkt im Herbst, wenn der Hormonspiegel steigt, der Fettgehalt der Lebern abnimmt und der Gonadenaufbau beginnt, und sie erhöht sich im Sommer nach dem Ablachen, wenn wieder vermehrt Energie in Form von Fett in den Lebern gespeichert wird.

Die Eignung von Apoptose als Biomarker ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht gegeben. Zwar ist durch die potentielle Induzierbarkeit von Apoptose durch Schadstoffe eine der Grundvoraussetzungen für die Eignung von Biomarkern erfüllt, es müssen jedoch noch die genauen Zusammenhänge zwischen dem Mechanismus und den Einflußfaktoren der Apoptose bekannt werden, um mit der Apoptose genaue Aussagen zur Schadstoffbelastung des Meeres treffen zu können.

8.2 Summary

The aim of the present study was to evaluate the suitability of apoptosis as a biomarker for biological effect monitoring. The investigations were carried out with the marine fish species dab (*Limanda limanda* L.).

For this purpose, aquarium experiments with the selected model contaminants cadmium, PCB 118 and PCB 77 were carried out, to examine possible effects of anthropogenic stressors on apoptosis. In further laboratory experiments the effects of the natural stressors salinity and temperature alterations on apoptosis were investigated.

In parallel, apoptosis was analyzed in field studies on different contaminated areas in the North Sea and the Baltic Sea at two different seasons. For an investigation of possible seasonal alterations in the apoptotic level, apoptosis was analyzed monthly for the period of one year at the station N01.

Determination of apoptosis was carried out by DNA gel electrophoresis and quantification of DNA fragments from about 180 to 1500 basepairs as well as by TUNEL-assay in frozen sections, followed by image analysis. The first step of the study was the optimization of the two methods.

In the laboratory experiments could be shown, that in February with a low apoptotic ground level apoptosis is inducible by cadmium and PCB 118. High concentrations of the toxic substances PCB 77 and cadmium resulted mainly in hepatic necrosis.

In summer, when the apoptotic ground level was higher, the exposure of PCB 118 and PCB 77 resulted in a concentration dependent reduction of the apoptotic rate.

The laboratory experiments concerning the natural stressors showed no effects after a reduction of salinity, but an increase in temperature led to a slight increase in TUNEL positive cells.

The investigations of the field stations turned out higher apoptosis levels in December in the Baltic Sea compared to the North Sea, whereas in May scarcely any differences between the stations could be measured. The determination of apoptosis in the annual cycle resulted in an increase in the apoptotic level from July to October and in a minimum in spring.

The apoptotic levels of the field stations correlated in December reversed to the hepatic zinc and cadmium contents, to the GSI and to the water temperature but not to the organic pollutants PCB and DDE. In addition, a correlation could be found to the biomarkers MT (reversed) and to the EROD activity.

In May the apoptosis rate correlated in addition to the hepatic zinc and cadmium level to the lipid content and in the annual cycle to the water temperature and to the hepatic lipid content.

It has shown that there is an apparent connection of apoptosis to seasonal and physiological variations. The apoptotic level decreases in autumn when the hormon level increases, the hepatic lipid content decreases and the formation of the gonads starts, and it increases in summer after spawning at a time of energy uptake and storage of hepatic lipid.

The suitability of apoptosis as a biomarker is not given at the present time. The potential inducability of apoptosis by anthropogenic contaminants is one of the basic requirements for the suitability of biomarkers, but at the moment there is a further need to investigate the mechanism and the influencing factors of apoptosis to be enabled for giving a statement about the condition of marine pollution.