

| | | | |
|------------------------------|----|---------|--------------------------------|
| Mitt. dtsh. malakozool. Ges. | 87 | 11 – 16 | Frankfurt a. M., Dezember 2012 |
|------------------------------|----|---------|--------------------------------|

Durch Platin²⁺ ausgelöste Schaleninternalisierung bei der Paradiesschnecke *Marisa cornuarietis* – Stand der Forschung

LEONIE MARSCHNER, RAPHAELA OSTERAUER, RITA TRIEBSKORN & HEINZ-R. KÖHLER

Abstract: Organisms in the environment are continuously exposed to potentially harmful substances. To evaluate the threat that these substances may pose, toxicity tests like the *Marisa cornuarietis* (LINNAEUS 1758) embryo toxicity test have been developed. Exposure to platinum during embryonic development leads to an internalization of the shell in *Marisa*. SEM images and histological investigations show that mantle anlage, shell gland, and mantle edge do not grow across the visceral sac during ontogeny as in controls, but they shift to the ventral side of the visceral sac. There, calcium carbonate is secreted into the interior of the body, forming an internal shell. The molecular mechanisms leading to the shell internalization are not yet known.

Keywords: *Marisa cornuarietis*, platinum, embryogenesis, shell internalization, mantle formation

Zusammenfassung: Da kontinuierlich potenziell schädliche Substanzen in die Umwelt freigesetzt werden, ist es notwendig, zu untersuchen, welchen Einfluss diese Substanzen besitzen. Hierzu wurden Toxizitätstests wie der Embryotest mit der Paradiesschnecke *Marisa cornuarietis* (LINNAEUS 1758) entwickelt. Die Exposition von *Marisa cornuarietis* während der Embryonalentwicklung gegenüber dem Schwermetall Platin führt zu einer Internalisierung der Schale. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen und histologische Schnitte zeigen, dass während der Ontogenie Mantelanlage, Schalendrüse und Mantelrand nicht über den Eingeweidesack wachsen, sondern auf die ventrale Seite des Eingeweidesacks verschoben werden und dort Calciumcarbonat in das Innere der Schnecke abgegeben wird. Die molekularen Mechanismen, die zu einer Schaleninternalisierung führen, sind noch nicht bekannt, es gibt aber verschiedene Möglichkeiten, die künftig untersucht werden sollen.

Einleitung

Die Umwelt wird auf vielfältige Art und Weise mit Chemikalien belastet: Medikamente werden von Mensch und Tier ausgeschieden und gelangen in Oberflächengewässer (FENT & al. 2006), Regen spült Biozide in Bäche und Flüsse (KAHLE 2009) und Metalle, wie zum Beispiel Platin, können aus Autokatalysatoren freigesetzt und von Organismen aufgenommen werden (TURNER & PRICE 2008).

Die Ökotoxikologie untersucht die Auswirkungen solcher Chemikalien auf Organismen in der Umwelt, dazu werden häufig Toxizitätstests eingesetzt (FENT 2007). Ein solcher Test ist der von SCHIRLING & al. (2006) entwickelte Embryotest mit der Paradiesschnecke *Marisa cornuarietis* (LINNAEUS 1758). Setzt man Embryonen der Paradiesschnecke während ihrer Entwicklung Schwermetallen wie Kupfer oder Blei aus, so kann man eine Reduktion des Körpergewichts beobachten. Nickel, Zink, Kupfer, Palladium, Lithium und Blei verzögern die Entwicklung, und Zink und Kupfer erhöhen die Mortalität (SAWASDEE & KÖHLER 2009, 2010).

Die Exposition gegenüber Platinionen während der Embryonalentwicklung zeigt jedoch einen wesentlich spektakuläreren Effekt: Die Schnecken bilden keine externe Schale, sondern es kommt zu einer Schaleninternalisierung (OSTERAUER & al. 2010). Abb. 1 zeigt sowohl nicht-exponierte Tiere der Kontrolle und gegenüber Platin²⁺ exponierte Paradiesschnecken verschiedenen Alters. Um zu ermitteln, wie Platinionen zu dieser morphologischen Umgestaltung führen, haben wir die Individualentwicklung exponierter und nicht-exponierter Embryonen untersucht und miteinander verglichen (MARSCHNER & al. 2012). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollen hier kurz dargestellt werden.

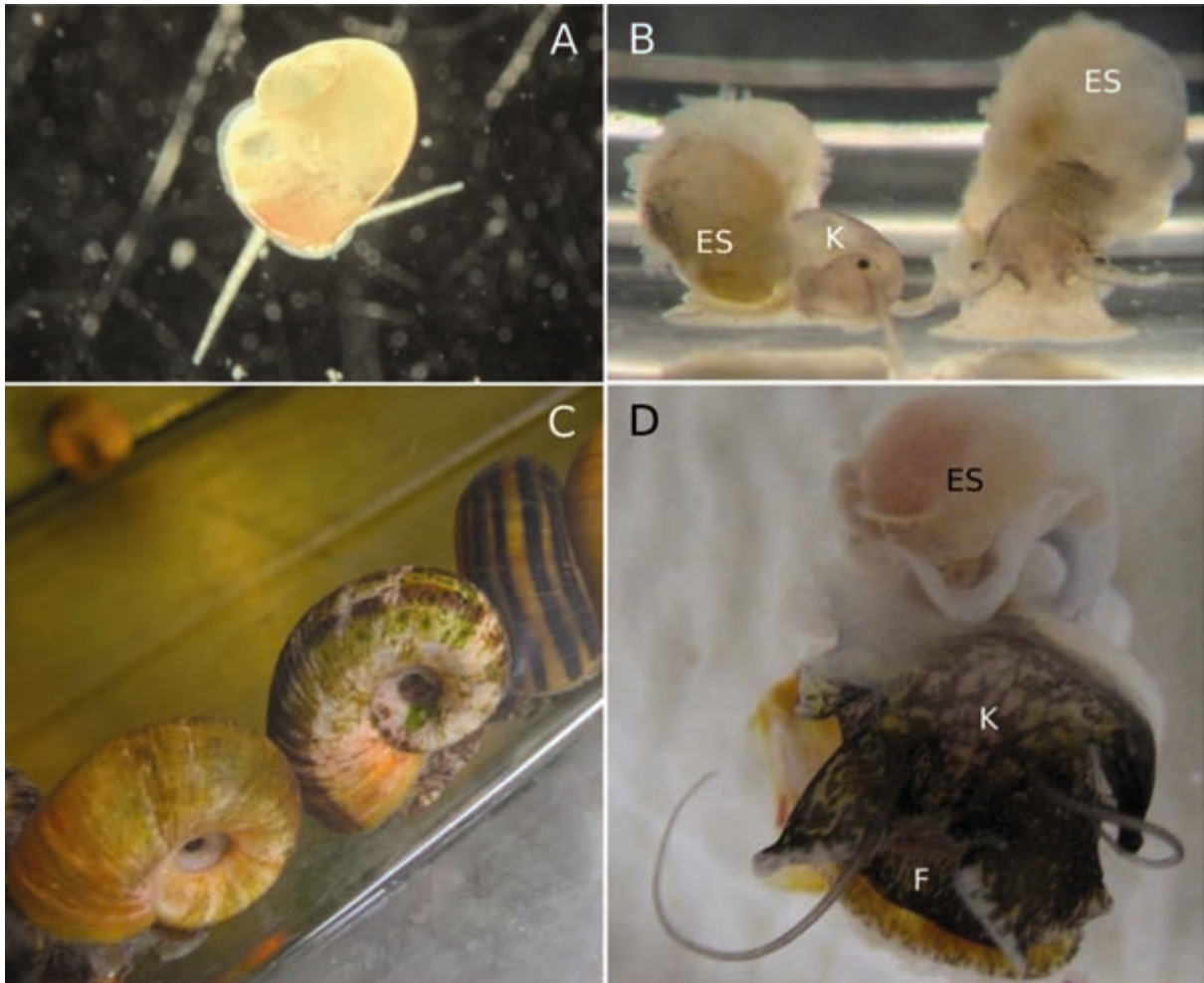


Abb. 1: *Marisa cornuarietis*

A: Normal entwickelte Schnecke kurz nach dem Schlupf; B: gegenüber Platin²⁺ exponierte Schnecken kurz nach dem Schlupf; C: Adulte normal entwickelte Schnecken; D: Gegenüber Platin exponierte Schnecke, ca. 3 Monate alt; ES: Eingeweidesack, F: Fuß, K: Kopf

Versuchsdurchführung

Frische Gelege werden aus den Aquarien entfernt und die Eier mit einer Rasierklinge voneinander getrennt. Die Eier werden so in Plastikpetrischalen mit den Testlösungen verteilt, dass jede Schale 20 Eier aus mindestens drei verschiedenen Gelegen enthält. Für die Platinexposition dient eine Platinlösung aus 1 Liter Aquarienwasser und 200 µl Platin Standard (Ultra Scientific), für die Kontrollen wird Aquarienwasser verwendet. Die Petrischalen kommen in einen Wärmeschrank bei 26 °C und sind einem Hell-Dunkel Rhythmus von 12:12 Stunden ausgesetzt. Die Lösungen werden täglich erneuert. Schaleninternalisierung ist ab etwa Tag 8 der Embryonalentwicklung gut sichtbar. Zur weiteren Aufzucht werden Schnecken mit interner Schale in Glaspetrischalen bzw. später in Glasschalen mit Aquarienwasser gesetzt und im Wärmeschrank gehalten. Die maximale Lebensdauer beträgt 6 - 8 Monate.

Die Ontogenie von *Marisa cornuarietis*

Die Embryonalentwicklung von *Marisa cornuarietis* verläuft direkt und wurde von DEMIAN & YOUSIF (1973a, 1973b, 1973c, 1973d, 1975) ausführlich beschrieben. Abb. 2 zeigt rasterelektronenmikroskopische Bilder von *Marisa*-Embryonen. Sowohl bei Kontrollen (Abb. 2A) als auch bei gegenüber Platin²⁺ exponierten Tieren (Abb. 2C) bildet sich auf der linken Seite des Eingeweidesacks die Schalendrüse. Diese Drüse befindet sich in einer vom Mantelrand gebildeten Falte. Schalendrüse und Mantelrand umschließen die neugebildete Schale, die auf dem Gewebe liegt, das den Mantel bildet.

Während der normalen Entwicklung wächst das Gewebe auf der linken Seite des Eingeweidessacks (Mantelanlage, Mantelrand und Schalendrüse) stärker als das Gewebe auf der rechten Seite. Dieses differentielle Wachstum führt zu einer horizontalen Rotation des Eingeweidessacks, in deren Verlauf das Gewebe auf der rechten Seite des Eingeweidessacks eingefaltet und vom Mantel überwachsen wird und so die Mantelhöhle bildet (Abb. 2B).

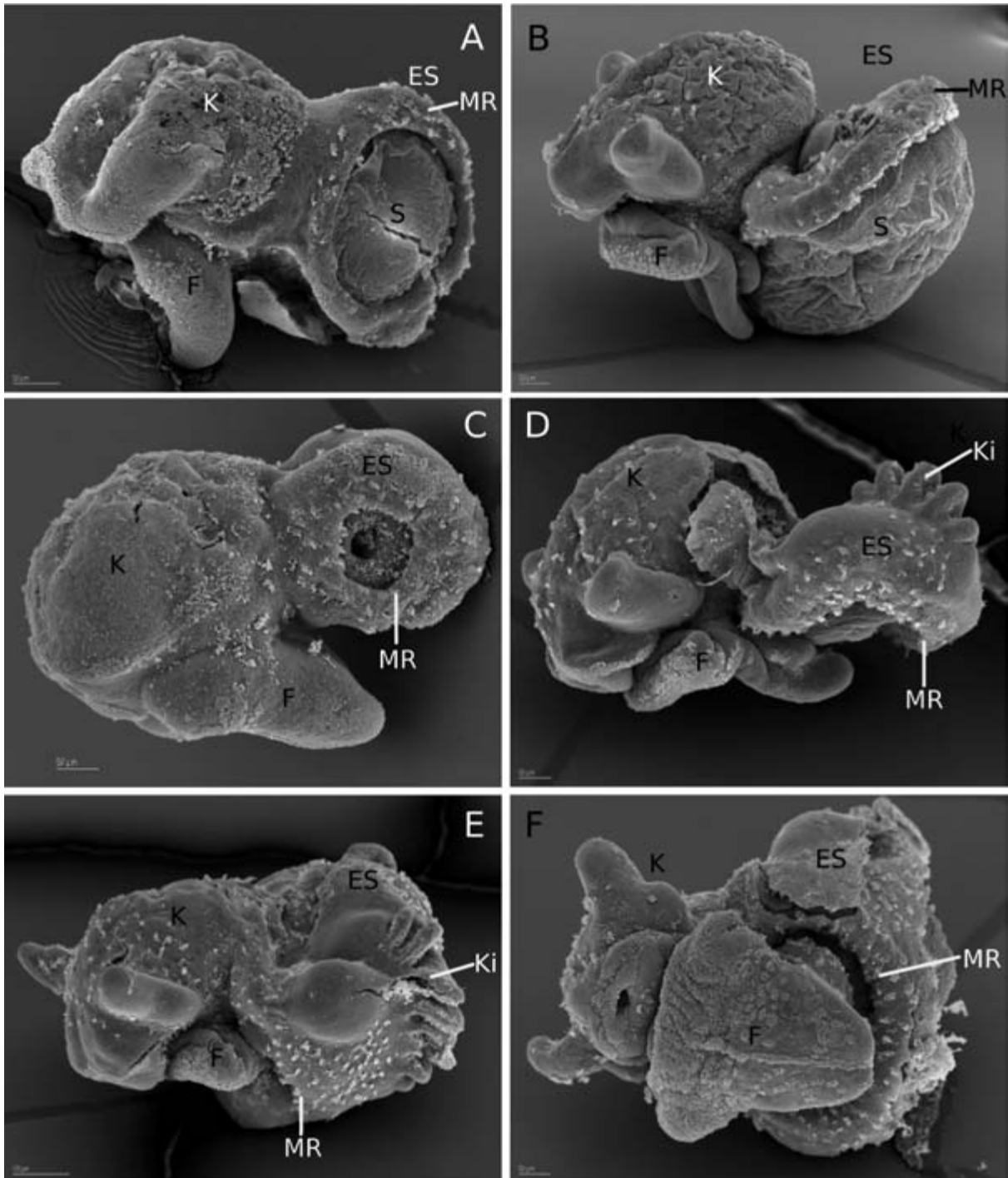


Abb. 2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *Marisa cornuarietis*-Embryonen

A: 3 Tage alter Embryo ohne Platin²⁺-Exposition, Ansicht von links; B: 4 Tage alter Embryo ohne Platin²⁺-Exposition, Ansicht von links; C: 4 Tage alter gegenüber Platin²⁺ exponierter Embryo, Ansicht von links; D: 6 Tage alter gegenüber Platin²⁺ exponierter Embryo, Ansicht von links; E: 8 Tage alter gegenüber Platin²⁺ exponierter Embryo, Ansicht von links; F: 9 Tage alter gegenüber Platin²⁺ exponierter Embryo, Ansicht von ventral; ES: Eingeweidessack, F: Fuß, K: Kopf, Ki: Kieme, MR: Mantelrand, S: Schale

Bei den gegenüber Platin^{2+} exponierten Embryonen findet dieses differentielle Wachstum nicht statt: Mantelanlage, Schalendrüse und Mantelrand wachsen nicht weiter, sondern verbleiben auf der linken Seite des Eingeweidesacks. Der Eingeweidesack selbst rotiert vertikal um 90° , sodass Mantelanlage, Schalendrüse und Mantelrand auf der ventralen Seite des Eingeweidesacks positioniert werden (Abb. 2D, F). Die Kiemen bleiben posterior auf dem Visceropallium lokalisiert und werden nicht, wie normal bei *Marisa*, über den Kopf verlagert (Abb. 2E). Schalendrüse und Mantel bleiben auf der ventralen Seite des Eingeweidesacks und sekretieren Calciumcarbonat in das Innere der Schnecke. Auf diese Weise entsteht eine interne Schale, die die Mitteldarmdrüse umschließt. Eine solche Schale zeigt die Abb. 3.

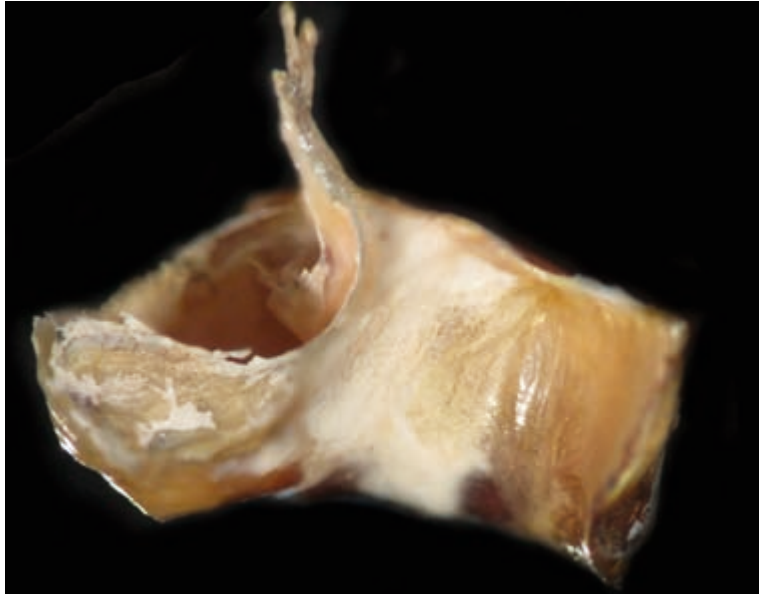


Abb. 3: Interne Schale eines gegen Platin^{2+} exponierten Individuums von *Marisa cornuarietis*.

Diskussion

Die Entwicklung der gegenüber Platin^{2+} exponierten Embryonen verläuft analog zu derjenigen von Kontrolltieren bis zu dem Zeitpunkt, an dem unter normalen Umständen die Rotation des Eingeweidesacks beginnt. Diese Rotation ist eine Konsequenz des differentiellen Wachstums des auf der linken Seite des Eingeweidesacks lokalisierten Gewebes (DEMIAN & YOUSIF 1973b). Bei gegenüber Platin^{2+} exponierten Embryonen findet diese Rotation nicht statt, der Eingeweidesack rotiert jedoch vertikal um 90° , sodass das schalenbildende Gewebe auf der ventralen Seite des Eingeweidesacks liegt. Diese Drehung erklärt auch, warum die Kiemen, die auf der rechten Seite des Eingeweidesacks angelegt werden, bei Schnecken ohne externe Schale links der Körperlängsachse zu liegen kommen.

DEMIAN & YOUSIF (1973b) bezeichnen die horizontale Rotation des Eingeweidesacks von *Marisa* als „Torsion“. Wenn man davon ausgeht, dass die Rotation bei *Marisa* ähnliche Auswirkungen hat wie die als „Torsion“ bezeichnete Rotation des Visceropalliums relativ zum Cephalopodium bei Vetigastropoda und Patellogastropoda, würde man vermuten, dass ohne ein Stattfinden dieser Rotation auch die für die Torsion typischen morphologischen Merkmale nicht zu beobachten sind (GARSTANG 1929, PAGE 2003). Dies trifft nach erfolgter Platin^{2+} -Exposition für die Kiemen zu, sie liegen posterior und nicht anterior. Der Anus allerdings liegt auch bei Schnecken mit interner Schale anterior über dem Kopf (MARSCHNER & al. 2012). Unsere Ergebnisse legen nahe, dass, unter der Voraussetzung, dass die bei *Marisa* zu beobachtende Rotation des Eingeweidesacks zumindest teilweise der archetypischen Torsion von Gastropoden entspricht, bei *Marisa* die posttorsionale Lage der Organe nur zu einem Teil durch unterschiedliches Wachstum der rechten und linken Hälfte des Eingeweidesacks verursacht wird.

Zukünftige Untersuchungen werden sich vor allem auf mögliche Mechanismen konzentrieren, die zur Schaleninternalisierung durch Inhibition von differentiellem Wachstum führen können. Stressproteine

sind bekanntermaßen an der Steuerung der Embryonalentwicklung bei Mollusken beteiligt. Ihre Inhibition kann wiederum zu einer Falschanordnung von Geweben führen (GUNTER & DEGNAN 2008).

Platin gehört zu den Schwermetallen und diese Gruppe von Elementen ist für ihre Proteotoxizität, also die Eigenschaft, Proteine zu schädigen, bekannt (FENT 2007). Ob die Schaleninternalisierung durch eine Schädigung von Proteinen durch Platin²⁺ entsteht, muss noch untersucht werden, es gibt jedoch auch Hinweise auf eine DNA-schädigende Wirkung von PtCl₂ (NORDLIND 1986, MIGLIORE & al. 2002).

Ein weiterer interessanter Aspekt ist die Zusammensetzung der internen Schale. Inwieweit diese einer normalen, lediglich anders geformten Schale gleicht, ist noch nicht bekannt.

Die ganze oder teilweise Verlagerung einer äußeren Schale in das Innere des Tiers ist bei der Evolution der Mollusken mehrfach unabhängig voneinander entstanden. Bei mehreren Gastropodengruppen (z. B. Triviidae, Olividae) wird eine externe Schale von Fuß- und/oder Mantelgewebe überwachsen (PONDER & LINDBERG 2008). In all diesen Fällen wird jedoch die Schale zunächst extern angelegt. Eine Ausnahme hiervon sind pulmonate Nacktschnecken der Familien Arionidae und Limacidae, bei denen die Schale unterhalb des Mantelschilds im Körper angelegt wird (SIMPSON 1901, KÜNKEL 1916), wobei auch hier Unterschiede in der Entwicklung existieren. Im Gegensatz zur natürlich evolvierten Schalenlosigkeit, die entweder mit einer temporär externen Schale oder einem externen Mantel einhergeht, besitzen die Individuen von *Marisa*, bei denen die Schale durch Platin²⁺ internalisiert wurde, zu keinem Zeitpunkt eine externe Schale und auch keinen externen Mantel. Wir vermuten, dass es sich bei der Schaleninternalisierung durch Platin²⁺ um eine künstliche Auslösung einer sehr seltenen aber auch natürlich vorkommenden Entwicklungsstörung handelt. Eine artifizielle Internalisierung der Schale durch Platin²⁺ konnte auch für die pulmonaten Schnecken *Biomphalaria glabrata* (SAY 1818) und auch bei *Planorbarius corneus* (LINNAEUS 1758) gezeigt werden.

Literatur

- DEMIAN, E. S. & YOUSIF, F. (1973a): Embryonic development and organogenesis in the snail *Marisa cornuarietis* (Mesogastropoda: Ampullariidae). IV. Development of the shell gland, mantle and respiratory organs. — *Malacologia*, **12**: 195–211, Ann Arbor.
- DEMIAN, E. S. & YOUSIF, F. (1973b): Embryonic development and organogenesis in the snail *Marisa cornuarietis* (Mesogastropoda: Ampullariidae). I. General outlines of development. — *Malacologia*, **12**: 123–150, Ann Arbor.
- DEMIAN, E. S. & YOUSIF, F. (1973c): Embryonic development and organogenesis in the snail *Marisa cornuarietis* (Mesogastropoda: Ampullariidae). III. Development of the circulatory and renal systems. — *Malacologia*, **12**: 175–194, Ann Arbor.
- DEMIAN, E. S. & YOUSIF, F. (1973d): Embryonic development and organogenesis in the snail *Marisa cornuarietis* (Mesogastropoda: Ampullariidae). II. Development of the alimentary system. — *Malacologia*, **12**: 151–174, Ann Arbor.
- DEMIAN, E. S. & YOUSIF, F. (1975): Embryonic development and organogenesis in the snail *Marisa cornuarietis* (Mesogastropoda: Ampullariidae). V. Development of the nervous system. — *Malacologia*, **15**: 29–42, Ann Arbor.
- FENT, K. (2007): Ökotoxikologie: Umweltchemie, Toxikologie, Ökologie. — IX + 338 S., 63 Tabellen, Stuttgart, New York, NY (Thieme).
- FENT, K., WESTON, A. A. & CAMINADA, D. (2006): Ecotoxicology of human pharmaceuticals. — *Aquatic Toxicology*, **76**: 122–159, Amsterdam.
- GARSTANG, W. (1929): The origin and evolution of larval forms. — Report of the British Association for the Advancement of Science, section **D**: 77–98, London.
- GUNTER, H. M. & DEGNAN, B. M. (2008): Impact of ecologically relevant heat shocks on Hsp developmental function in the vetigastropod *Haliotis asinina*. — *Journal of Experimental Zoology, Part B, Molecular and Developmental Evolution*, **310**: 450–464, Hoboken.
- KAHLE, M. (2009): Biozide in Gewässern: Eintragungspfade und Informationen zur Belastungssituation und deren Auswirkungen. — 50 S., Umweltbundesamt (Hrsg.), Dessau-Roßlau.
- KÜNKEL, K. (1916): Zur Biologie der Lungenschnecken: Ergebnisse vieljähriger Züchtungen und Experimente. — XVI + 441 S., Heidelberg (Winter).

- MARSCHNER, L., TRIEBSKORN, R. & KÖHLER, H.-R. (2012): Arresting mantle formation and redirecting embryonic shell gland tissue by platinum²⁺ leads to body plan modifications in *Marisa cornuarietis* (Gastropoda, Ampullariidae). — *Journal of Morphology*, **273**: 830–841, Hoboken.
- MIGLIORE, L., FRENZILLI, G., NESTI, C., FORTANER, S. & SABBIONI, E. (2002): Cytogenetic and oxidative damage induced in human lymphocytes by platinum, rhodium and palladium compounds. — *Mutagenesis*, **17**: 411–417, Oxford.
- NORDLIND, K. (1986): Further studies on the ability of different metal salts to influence the DNA synthesis of human lymphoid cells. — *International Archives of Allergy and Immunology*, **79**: 83–85, Basel.
- OSTERAUER, R., MARSCHNER, L., BETZ, O., GERBERDING, M., SAWASDEE, B., CLOETENS, P., HAUS, N., SURES, B., TRIEBSKORN, R. & KÖHLER, H.-R. (2010): Turning snails into slugs: induced body plan changes and formation of an internal shell. — *Evolution & Development*, **12**: 474–483, Hoboken.
- PAGE, L. R. (2003): Gastropod ontogenetic torsion: Developmental remnants of an ancient evolutionary change in body plan. — *Journal of Experimental Zoology*, **297B**: 11–26, Hoboken.
- PONDER, W. F. & LINDBERG, D. R. (2008): Phylogeny and evolution of the Mollusca. — 469 S., Berkeley (University of California Press).
- SAWASDEE, B. & KÖHLER, H.-R. (2009): Embryo toxicity of pesticides and heavy metals to the ramshorn snail, *Marisa cornuarietis* (Prosobranchia). — *Chemosphere*, **75**: 1539–1547, Amsterdam.
- SAWASDEE, B. & KÖHLER, H.-R. (2010): Metal sensitivity of the embryonic development of the ramshorn snail *Marisa cornuarietis* (Prosobranchia). — *Ecotoxicology*, **19** (8):1487-1495, London.
- SCHIRLING, M., BOHLEN, A., TRIEBSKORN, R. & KÖHLER, H.-R. (2006): An invertebrate embryo test with the apple snail *Marisa cornuarietis* to assess effects of potential developmental and endocrine disruptors. — *Chemosphere*, **64**: 1730–1738, Luxemburg, Berlin.
- SIMPSON, G. B. (1901): Anatomy and physiology of *Polygyra albolabris* and *Limax maximus* and embryology of *Limax maximus*. — 314 S, Albany (University of the State of New York).
- TURNER, A. & PRICE, S. (2008): Bioaccessibility of platinum group elements in automotive catalytic converter particulates. — *Environmental Science & Technology*, **42**: 9443–9448, Washington, DC.

Anschriften der Verfasser:

LEONIE MARSCHNER, Dr. RAPHAELA OSTERAUER, Prof. Dr. RITA TRIEBSKORN, Prof. Dr. HEINZ-R. KÖHLER, Physiologische Ökologie der Tiere, Institut für Evolution und Ökologie, Eberhard-Karls Universität Tübingen, Konrad-Adenauer-Str. 20, 72072 Tübingen, Leonie.Marschner@uni-tuebingen.de