

Strategien zur Vermeidung von Schäden durch Hitze: Feldstudien und Laborversuche mit südfranzösischen Landschnecken der Art *Xeropicta derbentina* (KRYNICKI 1836)

ANDREAS DIETERICH, MADDALENA ANGELA DI LELLIS, SANDRA TROSCHINSKI, ULF FISCHBACH,
MARKUS LUDWIG, ULRICH GÄRTNER, RITA TRIEBSKORN & HEINZ-R. KÖHLER

Abstract: Hot and dry conditions as they can be found during summer in Southern France constitute hostile conditions for animals with high water content. Despite this fact *Xeropicta derbentina* (KRYNICKI 1836) snails can be found in high abundances in Southern France. The Hsp protection system was analyzed in different populations and during different months of a year to investigate the reaction of *X. derbentina* on severe heat load.

Keywords: *X. derbentina*, Hsp70 induction, protection system, population, Southern France

Zusammenfassung: Heiße und trockene Umgebungen, wie sie im Sommer in Südfrankreich anzutreffen sind, stellen Organismen mit hohem Wassergehalt, wie zum Beispiel Schnecken, vor schwerwiegende Probleme. Trotz dieser Tatsache können Individuen von *Xeropicta derbentina* (KRYNICKI 1836) in hohen Dichten in Südfrankreich gefunden werden. Populationen dieser Art aus Südfrankreich wurden bezüglich ihres Hitzeschockprotein (Hsp)-Schutzsystems und dessen Induzierbarkeit im Verlauf eines Jahres im Feld untersucht.

Einleitung

Hohe Umgebungstemperaturen, wie sie im mediterranen Raum im Sommer auftreten, stellen Organismen mit hohem Wassergehalt vor schwerwiegende Probleme. Besonders Schnecken mit einem Wassergehalt von ca. 75-80 % (REUNER & al. 2008) sind von Austrocknung und Überhitzung bedroht. Dennoch sind Individuen der Gattung *Xeropicta* in hohen Dichten im Süden Frankreichs zu finden. *Xeropicta derbentina* (KRYNICKI 1836), eine zu den Hygromiiden gehörende Vertreterin xerophiler Landschnecken, wurde erstmals 1949 in der Provence gefunden (ALTENA 1960) und breitet sich seither stetig in dieser Region nach Norden aus (KISS & al. 2005, AUBRY & al. 2006). Diese nachtaktive Art wird im Adultstadium ca. 12-16 mm groß und erklettert am frühen Morgen vertikale Objekte jeglicher Art, um tagsüber den widrigen Bedingungen in Bodennähe zu entgehen. Dieses Verhalten trägt vermutlich stark zur Verbreitung dieser aus Südosteuropa und dem Nahen Osten stammenden Art bei (AUBRY & al. 2006). Individuen, die am Tage z. B. nach Berührung auf den Boden fallen, versuchen umgehend das nächstgelegene Objekt zu erklettern (Abb. 1). Hierbei sind die Tiere nicht wählerisch, so konnten die Autoren bereits mehrfach Individuen an Pkws entdecken, die auch nach längerer Fahrt wieder aktiv wurden. Trotz dieser Anpassungen muss *X. derbentina* tagsüber Umgebungstemperaturen von über 40 °C und direkte Sonneneinstrahlung für mehrere Stunden bewältigen.

Das Kletterverhalten und die Nachtaktivität können als erste Anpassungen von *X. derbentina* an ihre Umwelt gesehen werden. Neben diesen Verhaltensanpassungen sind es jedoch besonders die in den Zellen ablaufenden Schutzsysteme, die es *X. derbentina* ermöglichen, in Umgebungen mit hohen Temperaturen zu überleben. Das bekannteste und am besten untersuchte Schutzsystem ist das sogenannten Hitzeschockprotein-(Hsp, Stressprotein-)System. Hitzeschockproteine existieren bei fast allen bislang untersuchten Tierarten und sind selbst in Situationen, die für den Organismus keinen Stress bedeuten, in gewissen Konzentrationen in der Zelle zu finden (FEDER & HOFMANN 1999). Im nicht gestressten Organismus beteiligen sich diese Proteine an diversen intrazellulären Prozessen. Zudem können sie in Stresssituationen vermehrt neu synthetisiert werden und helfen in solchen Fällen, dass körpereigene Proteine ihre Faltung behalten. Darüber hinaus können kleinere, durch proteotoxische Stressoren hervorgerufene Störungen in der Proteinfaltung korrigiert werden. Neu synthetisierte Proteine werden durch Stressproteine bei der korrekten Faltung unterstützt. Als proteotoxische Stressoren können sowohl Hitze als auch jegliche andere, die Proteinintegrität schädigende Belastung wie zum

Beispiel chemischer Stress, oxidativer Stress oder andere Umwelteinflüsse zählen. Diese Stressproteine wurden ursprünglich als das Produkt lokaler Aktivitätsmuster in Chromosomen der Larven von *Drosophila melanogaster* MEIGEN 1830 nach temporärer Exposition gegenüber einem Hitzeschock (RITOSSA 1962) nachgewiesen und wurden nach diesem Ereignis zunächst „Hitzeschock Proteine“ genannt (TISSÉRES & al. 1974). Der Name wurde trotz der Induzierbarkeit durch andere Stressoren vielfach beibehalten. Die Funktion und Regulation der Hitzeschock- oder auch Stressproteine wurde bereits in diversen Review-Artikeln ausführlich dargelegt (KÖHLER 2009, DAUGAARD & al. 2007, FEDER & HOFMANN 1999, LINDQUIST & CRAIG 1988, MAYER & BUKAU 2005, SØRENSEN & al. 2003).

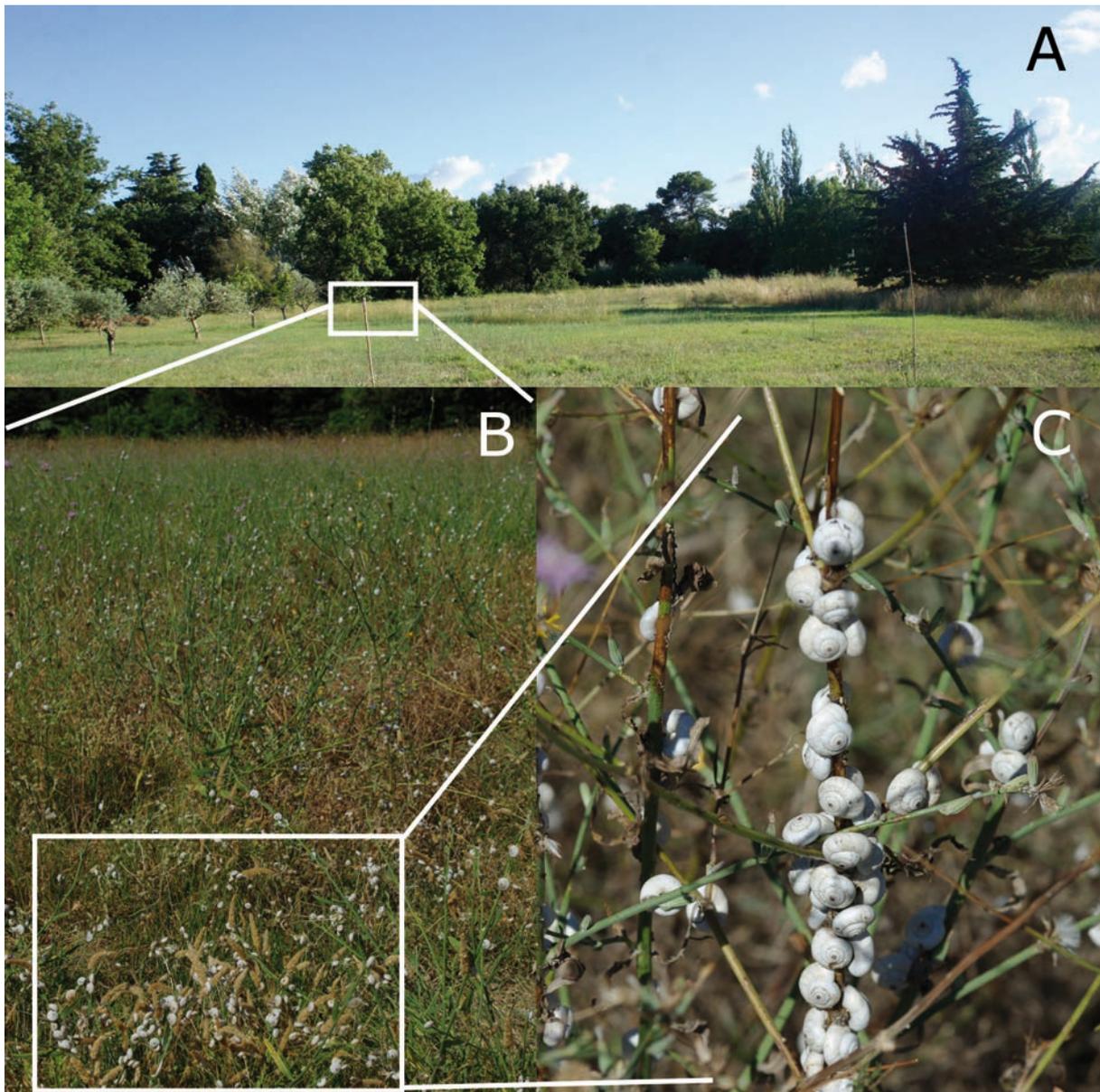


Abb. 1: *Xeropicta derbentina* im natürlichen Habitat.

A) Die in DIETERICH & al. (2012) beprobte Sammelstelle bei Modène. B) Vergrößerung eines Wiesenausschnittes. Besonders in Vordergrund sind zusammengelagerte *X. derbentina* zu sehen. C) Detailaufnahme von gekletterten und zusammengelagerten *X. derbentina* an einer anderen Stelle der Wiese (Fotos: A. DIETERICH).

Material und Methoden

In der von DIETERICH & al. (2012) durchgeführten Studie wurden Individuen von *X. derbentina* in Modène (Südfrankreich, Departement Vaucluse) direkt im Feld untersucht. Hierbei wurden Tiere aus einer Population auf einer privaten, nicht wirtschaftlich genutzten, nicht mit Pestiziden behandelten

und während des Jahres nur im Winter gemähten Wiese betrachtet. In vier verschiedenen Monaten wurde die Probestfläche jeweils 20 bis 24 Stunden lang beprobt, wobei je Stunde zehn Individuen der Population entnommen wurden. Durch die extrem hohe Abundanz dieser Art auf dieser Wiese (siehe auch Abb. 1) war die Entnahme ökologisch unbedenklich. Die Analyse der individuellen Hsp70-Levels erfolgte nach gängigen biochemischen Methoden (DIETERICH & al. 2012).

Ergebnisse und Diskussion

Xeropicta derbentina reagiert auf erhöhte Umgebungstemperaturen tagsüber im Feld mit einer Erhöhung des 70 kD-Stressprotein-(Hsp70)-Levels im Vergleich zu niedrigeren Umgebungstemperaturen in den kühleren Nachtstunden. Generell konnte in vier verschiedenen Monaten eine deutliche Reaktion von *X. derbentina* auf erhöhte Tagestemperaturen ermittelt werden.

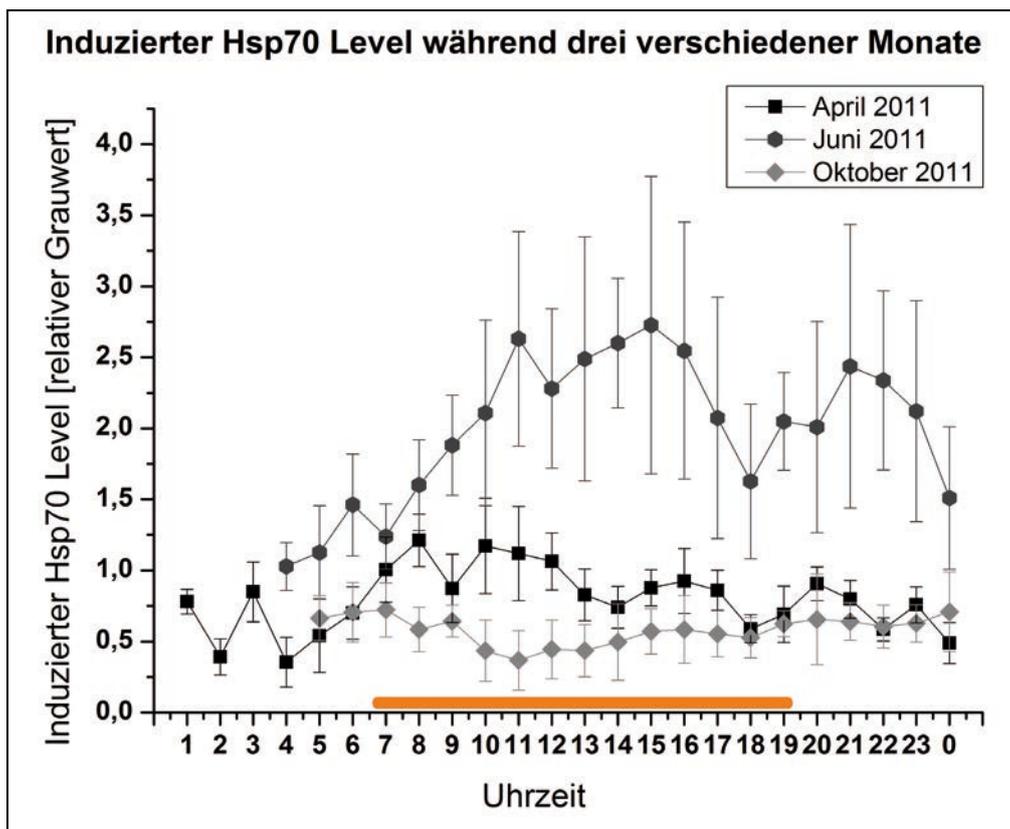


Abb. 2: Verlauf des induzierten Hsp70 Levels während eines Probestages zu drei der vier beprobten Monate. Grafik verändert nach DIETERICH & al. (2012). Linie auf der y-Achse zeigt die Besonnung der Wiese während der Probenahmen an.

Es konnte gezeigt werden, dass der Hsp70-Gehalt in *X. derbentina* den Tagesverlauf der Temperatur widerspiegelt (Abb. 2). Mit dem Sonnenaufgang begann der Hsp70-Level zu steigen und erreichte in den heißen Nachmittagsstunden sein Maximum. Mit absinkender Temperatur am Abend konnte ein Absinken des Hsp70-Levels beobachtet werden. Während der Wachstumsphase von *X. derbentina* im Frühjahr bis Sommer konnte ein zweiter Anstieg des Hsp70-Gehalts während der Nachtstunden aufgezeigt werden, der vermutlich auf Stoffwechselaktivität, Wachstum und Wiederherstellung des Säure-Basen-Haushaltes des Tieres zurückzuführen ist. Hierbei wird vermehrt Hsp70 benötigt, um die korrekte Faltung neuer Proteine zu gewährleisten. Im Gegensatz zu den Ergebnissen für die anderen in dieser Studie untersuchten Monate konnte im Herbst keine Erhöhung des Hsp70-Levels während der wärmeren Stunden des Tages mehr beobachtet werden. Trotz der Tatsache, dass die Temperaturen vergleichbar mit denen des Frühjahres waren, konnte keine positive Korrelation zwischen Temperatur und Hsp70-Level, wie sie bei den drei Beprobungen zuvor aufgezeigt werden konnte, gefunden werden. Mit steigenden Temperaturen am Tag verringerte sich bei den im Herbst beprobten Tieren der Hsp70-Level sogar, was zu einer negativen Korrelation von Hsp70-Level und Umgebungstemperatur

fürte. Diese Tatsache wurde einerseits mit der sehr energieintensiven Eiproduktion der Tiere und andererseits mit einer Überlastung des Hsp70-Schutzsystems durch langzeitige Hitzeeinwirkung der heißen Monate zuvor erklärt.

In Laborversuchen mit Individuen derselben Wiese sowie anderer Populationen in der Umgebung (Departement Vaucluse, Südfrankreich) konnte die Induktion des Hsp70-Levels von *X. derbentina* als Reaktion auf verschiedene Temperaturen näher charakterisiert werden. Die Arbeiten von DI LELLIS & al. (2014) und TROSCHINSKI & al. (2014) zeigten, dass die Maximalinduktion von Hsp70 bei *X. derbentina* bei Temperaturen von 38–40 °C vorliegt (Abb. 3). Ausgehend von einer Kontrolltemperatur von 25 °C, bei der lediglich der obligatorisch (d. h. konstitutiv) vorhandene Gehalt an Hsp70 zu beobachten war, konnte ein stetiger Anstieg des Hsp70-Levels bis zum ermittelten Maximum beobachtet werden. Beim Überschreiten dieses Maximums wurde ein Rückgang des Hsp70-Levels beobachtet, der ein Minimum bei 45 °C aufwies, das deutlich unter dem Niveau der Kontrolltemperatur von 25 °C lag. Die Phase vor Erreichen des Maximums wird als Reaktionsphase definiert, in der die Schnecken auf die Hitze als Stressor reagieren. Die Phase nach dem Maximum wird als Destruktionsphase beschrieben. In dieser waren bereits histopathologische Schäden in beeinflussten Organen nachweisbar. Hinsichtlich der Induzierbarkeit von Hsp70 unterschieden sich verschiedene Populationen quantitativ voneinander (Abb. 3), was nahelegt, dass unterschiedliche Strategien zur Hitzestressbewältigung bei ein- und derselben Art im gleichen Habitat möglich sind.

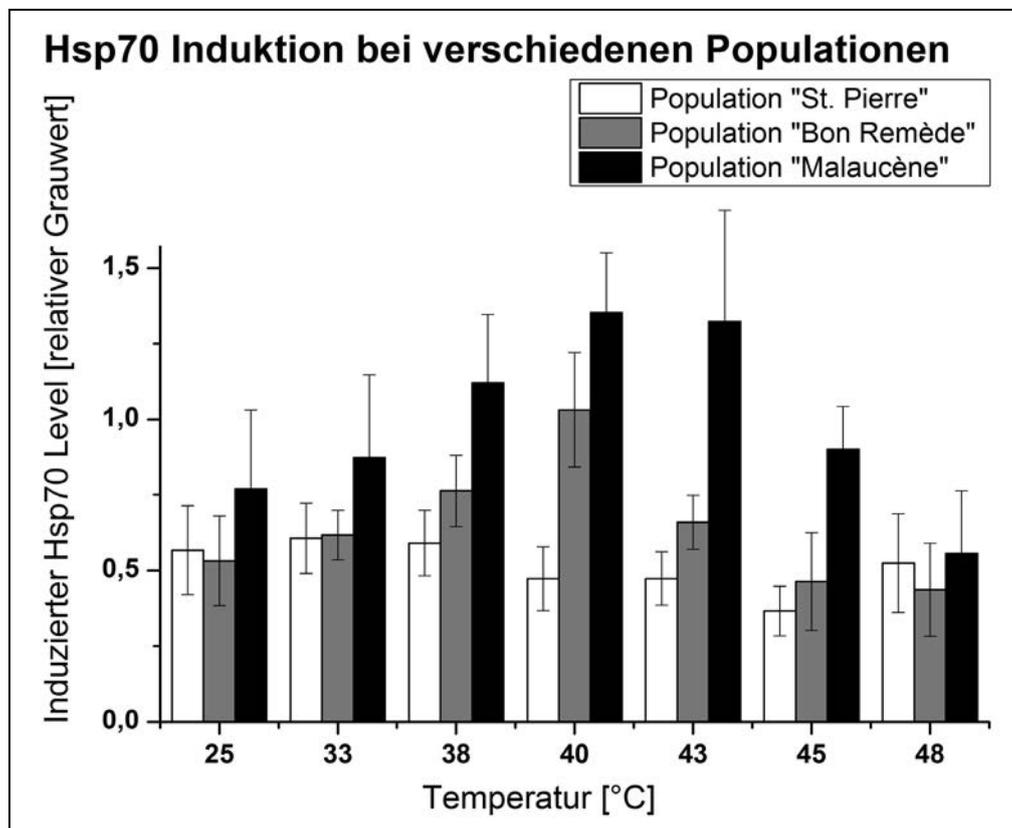


Abb. 3: Induzierter Hsp70 Level in drei unterschiedlichen Populationen aus Südfrankreich nach Exposition gegen verschiedene Temperaturen. Grafik verändert nach DI LELLIS & al. (2014).

Die Schalenfarbe der im Feld beprobten Schnecken reichte von uniform weißen Individuen über an der Unterseite der Schale leicht gebänderte Tiere bis hin zu Individuen, die sowohl eine unterbrochene als auch komplette braune Bänderung auf der Oberseite und Unterseite der Schale aufwiesen. Diese phänotypische Varianz wurde bereits von KÖHLER & al. (2009) genutzt, um die Schnecken in unterschiedliche Morphen zu kategorisieren. In diversen Publikationen wurden diese Kategorien weitergeführt (DI LELLIS & al. 2012, TROSCHINSKI & al. 2014, DI LELLIS & al. 2014). Neuste Ergebnisse zeigen, dass *X. derbentina*-Populationen in Südfrankreich, die besonders heterogen bezüglich ihrer phänotypischen Zusammensetzung sind, im Vergleich zu homogen hellen Populationen weniger Hsp70

induzieren, was die postulierte Rolle von Stressproteinen als epigenetisch wirkende „Capacitors“ (Kopplermoleküle) bei der Entwicklung morphologischer Variation unterstreicht (DI LELLIS & al. 2014).

Ausblick

Den genauen Einfluss, den die Bänderung und damit verbunden die kategorische Eingruppierung auf die Induzierbarkeit des Hsp70-Levels von *X. derbentina* in Laborversuchen hat, ist derzeit Gegenstand weiterer Untersuchungen. Es soll hierbei ermittelt werden, ob eine der vier Kategorien besonders hitzetolerant ist. Ebenso soll im weiteren Verlauf geplanter Studien nicht nur der Einfluss der Intensität, sondern auch der Dauer der Hitze einwirkung auf den Hsp70-Level von *X. derbentina* genauer beleuchtet werden. In den bereits durchgeführten Studien konnte Hsp70 mehrfach erfolgreich als Effektmarker für den Einfluss eines Stressors oder einer Mischung diverser Stressoren erklärend herangezogen werden.

Langfristig soll eine enge Kooperation mit der Hochschule Esslingen zu computergestützten Modellen führen, die Vorhersagen zum Überleben von *X. derbentina* bei geänderten Umweltbedingungen zulassen. Hierfür wurden bereits begleitend zu den oben zusammengefassten biologischen Untersuchungen wichtige abiotische Parameter für eine spätere Simulation erhoben. Zusammen mit physiologischen Daten, zum Beispiel zum Sauerstoffmetabolismus und zum Energieumsatz, sowie mit diversen geometrischen Verfahren zur Erfassung äußerer und innerer Strukturen von *X. derbentina* sollen Wärme-flüsse innerhalb und außerhalb der Schnecke nachvollzogen werden und so weitere Einblicke in die Hitzebewältigungsstrategie unseres Modellorganismus gewonnen werden.

Zitierte Literatur

- ALTENA, C. O. VAN REGTEREN (1960): On the occurrence of a species of *Xeropicta* in France. — *Bacteria*, **24**: 21-25, Leiden.
- AUBRY, S., LABAUNE, C., MAGNIN, F., ROCHE, P. & KISS, L. (2006): Active and passive dispersal of an invading land snail in Mediterranean France. — *Journal of Animal Ecology*, **75**: 802-813, Hoboken. doi:10.1111/j.1365-2656.2006.01100.x
- DAUGAARD, M., ROHDE, M. & JÄÄTELÄ, M. (2007): The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. — *FEBS Letters*, **581**: 3702-3710, Amsterdam. doi:10.1016/j.febslet.2007.05.039
- DI LELLIS, M. A., SEIFAN, M., TROSCHINSKI, S., MAZZIA, C., CAPOWIEZ, Y., TRIEBSKORN, R. & KÖHLER, H.-R. (2012): Solar radiation stress in climbing snails: behavioural and intrinsic features define the Hsp70 level in natural populations of *Xeropicta derbentina* (Pulmonata). — *Cell Stress and Chaperones*, **17**: 717-727, Luxembourg, Berlin. doi:10.1007/s12192-012-0344-4
- DI LELLIS, M. A., SEREDA, S., GEIBLER, A., PICOT, A., ARNOLD, P., LANG, S., TROSCHINSKI, S., DIETERICH, A., HAUFFE, T., CAPOWIEZ, Y., MAZZIA, C., KNIGGE, T., MONSINJON, T., KRAIS, S., WILKE, T., TRIEBSKORN, R. & KÖHLER, H.-R. (2014): Phenotypic diversity, population structure, and stress protein-based capacitors in populations of *Xeropicta derbentina*, a heat-tolerant land snail species. — *Cell Stress and Chaperones*, Luxembourg, Berlin. doi:10.1007/s12192-014-0503-x
- DIETERICH, A., FISCHBACH, U., LUDWIG, M., DI LELLIS, M. A., TROSCHINSKI, S., GÄRTNER, U., TRIEBSKORN, R. & KÖHLER, H.-R. (2012): Daily and seasonal changes in heat exposure and the Hsp70 level of individuals from a field population of *Xeropicta derbentina* (KRYNICKI 1836) (Pulmonata, Hygromiidae) in Southern France. — *Cell Stress and Chaperones*, **18**: 405-414, Luxembourg, Berlin. doi:10.1007/s12192-012-0393-8
- FEDER, M. E. & HOFMANN, G. E. (1999): Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. — *Annual Reviews of Physiology*, **61**: 243-282, Palo Alto. doi:10.1146/annurev.physiol.61.1.243
- KISS, L., LABAUNE, C., MAGNIN, F. & AUBRY, S. (2005): Plasticity of the life cycle of *Xeropicta derbentina* (KRYNICKI, 1836), a recently introduced snail in Mediterranean France. — *Journal of Molluscan Studies*, **71**: 221-231, Oxford. doi:10.1093/mollus/eyi030

- KÖHLER, H.-R., LAZZARA, R., DITTBRENNER, N., CAPOWIEZ, Y., MAZZIA, C. & TRIEBSKORN, R. (2009): Snail phenotypic variation and stress proteins: do different heat response strategies contribute to Waddington's widget in field populations? — *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, **312B**: 136-147, Hoboken. doi:10.1002/jez.b.21253
- KÖHLER, H.-R. (2009): Die Rolle von Stressproteinen bei der Anpassung an Umweltbedingungen: Ökophysiologische, ökotoxikologische und evolutionsbiologische Implikationen. — *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung*, **21**: 150-159, Luxembourg, Berlin. doi:10.1007/s12302-009-0041-9
- LINDQUIST, S. & CRAIG, E. (1988): The heat-shock proteins. — *Annual Review of Genetics*, **22**: 631-677, Palo Alto.
- MAYER, M. & BUKAU, B. (2005): Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. — *Cellular and Molecular Life Sciences*, **62**: 670-684, Berlin, Heidelberg. doi:10.1007/s00018-004-4464-6
- REUNER, A., BRÜMMER, F. & SCHILL, R. O. (2008): Heat shock proteins (Hsp70) and water content in the estivating Mediterranean Grunt Snail (*Cantareus apertus*). — *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, **151**: 28-31, Amsterdam. doi:10.1016/j.cbpb.2008.05.004
- RITOSSA, F. (1962): A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. — *Cellular and Molecular Life Sciences*, **18**: 571-573, Berlin, Heidelberg. doi:10.1007/bf02172188
- SØRENSEN, J. G., KRISTENSEN, T. N. & LOESCHCKE, V. (2003): The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. — *Ecology Letters*, **6**: 1025-1037, Hoboken. doi:10.1046/j.1461-0248.2003.00528.x
- TISSIÉRES, A., MITCHELL, H. K. & TRACY, U. M. (1974): Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosome puffs. — *Journal of Molecular Biology*, **84**: 389-398, Amsterdam. doi: 10.1016/0022-2836(74)90447-1
- TROTSCHINSKI, S., DI LELLIS, M. A., SEREDA, S., HAUFFE, T., WILKE, T., TRIEBSKORN, R. & KÖHLER, H.-R. (2014): Intraspecific variation in cellular and biochemical heat response strategies of Mediterranean *Xeropicta derbentina* [Pulmonata, Hygromiidae]. — *PLoS ONE*, **9** (1): e86613. San Francisco, Cambridge. doi:10.1371/journal.pone.0086613

Anschriften der Verfasser:

- ANDREAS DIETERICH, MADDALENA ANGELA DI LELLIS, SANDRA TROTSCHINSKI, RITA TRIEBSKORN, HEINZ-R. KÖHLER: Eberhard Karls Universität Tübingen, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, FB-I Biologie, Institut für Evolution und Ökologie, Physiologische Ökologie der Tiere, Konrad-Adenauer-Str.20, 72072 Tübingen, Kontakt: A-Dieterich@gmx.de
- ULF FISCHBACH, MARKUS LUDWIG, ULRICH GÄRTNER: Hochschule Esslingen, Institut für Angewandte Forschung - Energetische Systeme, Kanalstraße 33, 73728 Esslingen