

Summary

Transcriptomics is generally believed to hold the potential to elucidate the molecular mechanisms of toxicity to an unprecedented detail. Yet, to fully exploit transcriptomics in ecotoxicology it is necessary to relate molecular stress responses to the effects observed on life cycle endpoints. While initially large-scale gene expression studies were only feasible for species with sequenced genomes, advances in molecular biological techniques made it possible to perform transcriptomics studies with non-sequenced eco(toxico)logical key species. Consequently, this thesis aimed to elucidate the relation between life cycle effects and molecular stress responses in the ecotoxicological model species *Chironomus riparius* for compounds with different modes of action. To this purpose, the following objectives were set:

- To compare life cycle and multigeneration responses of chironomid larvae to compounds with different modes of action.
- To develop transcriptomics resources for *Chironomus riparius* consisting of an annotated transcriptome and a gene-expression microarray, allowing large-scale gene expression studies with chironomids.
- To compare gene expression and life cycle endpoints in toxicant-exposed chironomid larvae.

The non-biting midge *Chironomus riparius* (Insecta: Diptera) was selected for the present study, because of its ecological relevance and because of its long history in sediment toxicity testing with currently four OECD guidelines being available for acute and chronic toxicity tests. Four compounds were selected because they represent different modes of action. Phenanthrene is a polycyclic aromatic compound that acts via a non-specific baseline toxicity known as narcosis. The organometal tributyltin is a biocide that has been shown to cause endocrine disruption in *C. riparius*. The essential metal copper and the non-essential metal cadmium cause oxidative stress, however, the processes differ as copper is a redox-active metal, while cadmium is a redox-inactive metal.

The introduction of transcriptomics in ecotoxicology increased the necessity for reduced experimental variability. To this purpose in chapter 2 I developed easily made artificial sediment and monitored larval development. It was shown that larval development was synchronized and that the days when specific larval stages are reached can be identified. It was concluded that the newly developed artificial sediment will facilitate the application of transcriptomics in ecotoxicity testing with *C. riparius*.

Since compounds with different modes of action may affect life cycles of biota differently, the aim of chapter 3 was to investigate the impact of four chemicals with different modes of action on chronic lethal and sublethal life-cycle effect parameters of the

non-biting midge *C. riparius*. A 28-day sediment toxicity test was performed with the essential metal copper, the non-essential metal cadmium, the organometal tributyltin and the polycyclic aromatic compound phenanthrene. Tributyltin and cadmium delayed emergence significantly over a wide range of sublethal concentrations, while this range was narrow for copper and almost absent for phenanthrene. The chronic LC50/LOEC_{EmT50} ratio, expressing these differences, amounted to 1.5, 3.5, 12.0 and 18.2 for respectively phenanthrene, copper, cadmium and tributyltin. Thus the more specific the compounds mode of action, the higher the chronic LC50/LOEC_{EmT50} ratio, as previously observed for acute-to-chronic ratios (ACRs). Comparison of our results with literature derived LC50/LOEC ratios showed a comparable trend and a lower variability compared to ACRs. It was therefore concluded that the presently proposed chronic ratio is indicative for the specificity of a chemicals mode of action and that it is less variable than the ACR.

The ability of the non-biting midge *C. riparius* to withstand long-term toxicant exposure has been attributed to genetic adaptation. Recently, however, evidence arose that supports phenotypic plasticity. Therefore, chapter 4 aimed to investigate if *C. riparius* indeed copes with prolonged toxicant exposure through phenotypic plasticity. To this purpose, a multigeneration experiment was performed in which *C. riparius* laboratory cultures were exposed for nine consecutive generations to two exposure scenarios of, respectively, copper, cadmium and tributyltin. Total emergence and mean emergence time were monitored each generation, while the sensitivity of the cultures was assessed at least every 3rd generation using acute toxicity tests. It was observed that the cultures exposed to sublethal concentrations were hardly affected, while the cultures that were exposed to substantially higher toxicant concentrations after the 6th generation were severely affected in the 8th generation followed by signs of recovery. A marginal lowered sensitivity was only observed for the highly exposed cadmium culture, but this was lost again within one generation. It was concluded that *C. riparius* can indeed withstand long-term sublethal toxicant exposure through phenotypic plasticity without genetic adaption.

Whole-transcriptome gene-expression analyses are commonly performed in species that have a sequenced genome and for which microarrays are commercially available. To do such analyses in species with no or limited genome data, i.e. non-model organisms, necessary transcriptomics resources, i.e. an annotated transcriptome and a validated gene-expression microarray, must first be developed. The aim of chapter 5 was therefore to establish an advanced approach for developing transcriptomics resources specifically for non-model organisms by combining next-generation sequencing (NGS) and microarray technology. This approach was applied to the non-biting midge *C. riparius*. I sampled many individuals covering all *C. riparius* developmental stages as well as toxicant-exposed larvae and obtained from a normalized cDNA library 1.5M NGS reads totalling 501 Mbp. Using the NGS data transcriptomics resources were developed in several steps. First, 844k probes

were designed directly on the NGS reads, as well as 76k probes targeting expressed sequence tags of related species. These probes were tested for their affinity to *C. riparius* DNA and mRNA, by performing two biological experiments with a 1M probe-selection microarray that contained the entire probe-library. Subsequently, the 1.5M NGS reads were assembled into 23,709 isotigs and 135,082 singletons, which were associated to ~55k, respectively, ~61k gene ontology terms and which corresponded together to 22,593 unique protein accessions. An algorithm was developed that took the assembly and the probe affinities to DNA and mRNA into account, what resulted in 59k highly-reliable probes that targeted uniquely 95% of the isotigs and 18% of the singletons. It was concluded that this approach allowed the development of high-quality transcriptomics resources for *C. riparius*, and is applicable to any non-model organism. It is expected that these resources will advance ecotoxicity testing with *C. riparius* as whole-transcriptome gene-expression analysis is now possible with this species.

Molecular stress responses are frequently presumed to be more sensitive than traditional ecotoxicological life cycle endpoints such as survival and growth. Yet, the focus to reduce test duration and to generate more sensitive endpoints has caused transcriptomics studies to be performed at low doses during short exposures, separately and independently from traditional ecotoxicity tests, making comparisons with life cycle endpoints indirect. Therefore the aim of chapter 6 was to directly compare the effects on growth, survival and gene expression of the non-biting midge *C. riparius*. To this purpose, I analysed simultaneously life cycle and transcriptomics responses of chironomid larvae exposed to four model toxicants. It was observed that already at the lowest test concentrations many transcripts were significantly differentially expressed, while the life cycle endpoints of *C. riparius* were hardly affected. Analysis of the differentially expressed transcripts showed that at the lowest test concentrations substantial and biologically relevant cellular stress was induced and that many transcripts responded already maximally at these lowest test concentrations. The direct comparison between molecular and life cycle responses after fourteen days of exposure revealed that gene expression is more sensitive to toxicant exposure than life cycle endpoints, underlining the potential of transcriptomics for ecotoxicity testing and environmental risk assessment.

This thesis advanced on the understanding of stress responses in toxicant-exposed chironomids. [I] The specificity of compounds, or their mode of action, was effectively expressed by a new metric based on life cycle analysis and also by differences in gene expression, albeit the molecular mechanisms need to be further elucidated. [II] Time of exposure and time of effect observation was evaluated as a key factor both in quantifying whole organism response as well as in the identification of gene expression. [III] Multigeneration effects of chemical stress may involve genetic adaptation, but also non-inheritable transgenerational effects. The species *C. riparius* was demonstrated to be highly

Summary

plastic and put forward as a suitable test species to verify molecular responses over multigenerational exposure. [IV] The advances in ecotoxicogenomics are rapidly taking place with third generation sequencers on their way to revolutionize the field once again. However, till that time the transcriptomic tools developed in the present study can be applied to any species of interest, and here it allowed the first large-scale gene expression study with *C. riparius*. [V] The claim that ecotoxicogenomics could replace whole organism testing for risk assessment or hazard identification is critically discussed. This thesis showed that investigating transcriptome changes in response to toxic compounds provides a better understanding of the mechanisms of toxicity, and that molecular stress responses are more sensitive than life cycle effects. However, I also pointed out the necessity to relate molecular responses to toxic effect on the whole organism level. Considering these arguments it is expected that transcriptomics studies in ecotoxicology will eventually become an integrated part of environmental hazard and risk assessment where it will complement standardized ecotoxicity testing without fully replacing it.

Samenvatting

Transcriptoom studies hebben – zo neemt men aan - de potentie om de moleculaire mechanismen van toxiciteit tot in het kleinste detail te ontrafelen. Echter, om transcriptoom studies te kunnen toepassen in de ecotoxicologie zullen moleculaire stressresponsen eerst gerelateerd moeten worden aan de levenscycluseffecten van de betreffende testorganismen. De grootschalige genexpressie studies die hiervoor nodig zijn waren aanvankelijk alleen mogelijk met soorten waarvan het genoom volledig gesequenced was. Recente ontwikkelingen in moleculair biologische technieken maken het nu echter ook mogelijk om transcriptoom studies uit te voeren met eco(toxico)logische sleutelsoorten waarvan het genoom niet gesequenced is. Dit proefschrift had daarom als doel om de relatie tussen levenscycluseffecten en moleculaire stress responsen te ontrafelen in het ecotoxicologische modelorganisme *Chironomus riparius* blootgesteld aan toxische stoffen met verschillende werkingsmechanismen. Hiertoe werden de volgende doelstellingen geformuleerd:

- Het vergelijken van levenscyclus en multi-generatie responsen van chironomidenlarven blootgesteld aan stoffen met verschillende werkingsmechanismen.
- Het ontwikkelen van transcriptomics instrumenten voor *Chironomus riparius* bestaande uit een geannoteerd transcriptoom en een genexpressie microarray, waardoor grootschalige genexpressie studies met chironomiden mogelijk worden.
- Het vergelijken van genexpressie en levenscycluseffecten in chironomidenlarven die zijn blootgesteld aan toxische stoffen.

De dansmug *Chironomus riparius* (Insecta: Diptera) is gekozen als testorganisme voor de huidige studie vanwege zijn ecologische relevantie en vanwege het veelvuldig gebruik van deze soort voor het testen van sedimenttoxiciteit, vastgelegd in vier OESD richtlijnen voor acute en chronische toxiciteitstesten. Vier stoffen met verschillende werkingsmechanismen zijn geselecteerd: Phenanthrene is een polycyclische aromatische verbinding met een niet-specifiek werkingsmechanisme beter bekend als narcose. Het organometaal tributyltin is een biocide die het endocrine systeem van *C. riparius* kan verstoren. Het essentiële metaal koper en het niet-essentiële metaal cadmium veroorzaken beide oxidatieve stress, echter via verschillende mechanismen, omdat koper een redox-actief metaal is, terwijl cadmium redox inactief is.

De integratie van transcriptomics in de ecotoxicologie heeft de behoefte aan het terugdringen van experimentele variatie nog verder versterkt. Daarom heb ik in hoofdstuk 2 een eenvoudig samen te stellen artificieel sediment ontwikkeld en heb ik de larvale ontwikkeling van de dansmuggen in dit sediment gevolgd. Aangetoond werd dat de larven zich synchroon ontwikkelden en dat de dagen waarop specifieke larvale stadia werden bereikt goed geïdentificeerd konden worden. Dientengevolge werd de verwachting uitgesproken dat het nieuw ontwikkelde artificiële sediment de toepassing van

transcriptomics in ecotoxiciteitstesten met *C. riparius* zou kunnen faciliteren en is het in alle achtervolgende hoofdstukken toegepast.

Aangezien stoffen met verschillende werkingsmechanismen de levenscyclus van een organisme anders zouden kunnen beïnvloeden, was het doel van hoofdstuk 3 om de effecten van vier chemicaliën met verschillende werkingsmechanismen op chronische letale en subletale levenscycluseffectparameters van de dansmug *C. riparius* te onderzoeken. Hiertoe werd een 28-daagse sediment toxiciteitstest uitgevoerd met het essentiële metaal koper, het niet-essentiële metaal cadmium, het organometaal tributyltin en de polycyclische aromatische verbinding phenanthrene. Tributyltin en cadmium vertraagden het uitvliegen van de dansmuggen aanzienlijk over een breed scala van subletale concentraties, terwijl dit concentratiebereik smal was voor koper en voor phenanthrene bijna afwezig was. De chronische LC50/LOEC_{EmT50} ratio, die deze verschillen tot uitdrukking brengt, bedroeg 1.5, 3.5, 12.0 en 18.2 voor respectievelijk phenanthrene, koper, cadmium en tributyltin. Dus hoe specifiek het werkingsmechanisme van de stof, hoe hoger de chronische LC50/LOEC_{EmT50} ratio, zoals eerder waargenomen voor acute-to-chronic ratio's (ACRs). Vergelijking van onze resultaten met LC50/LOEC ratio's uit de literatuur liet een vergelijkbare trend zien waarbij onze nieuwe ratio een lagere variabiliteit vertoonde in vergelijking met de ACRs. Daarom werd geconcludeerd dat de hier voorgestelde chronische ratio indicatief is voor de specificiteit van het werkingsmechanisme van een stof en dat deze minder variabel is dan de ACR.

Het vermogen van de dansmug *C. riparius* om langdurige blootstelling aan toxische stoffen te overleven wordt vaak toegeschreven aan genetische adaptatie. Onlangs echter is bewijs geleverd voor fenotypische plasticiteit als onderliggend mechanisme van deze waarnemingen ondersteunt. Daarom werd in hoofdstuk 4 onderzocht of *C. riparius* inderdaad middels fenotypische plasticiteit langdurige blootstelling aan toxische stoffen weerstaat. Hiertoe werd een multi-generatie experiment uitgevoerd waarin laboratoriumculturen van *C. riparius* gedurende negen opeenvolgende generaties werden blootgesteld aan twee blootstellingsscenario's van respectievelijk, koper, cadmium en tributyltin. Het totale aantal uitgevlogen dansmuggen en hun gemiddelde uitvliegtijd werden elke generatie gemeten, terwijl de gevoeligheid van de culturen tenminste elke derde generatie werd vastgesteld door middel van acute toxiciteitstesten. Er werd waargenomen dat de culturen die aan subletale concentraties waren blootgesteld hier nauwelijks door beïnvloed werden, terwijl de culturen die na de zesde generatie aan aanzienlijk hogere toxische concentraties werden blootgesteld, in de achtste generatie zwaar werden aangetast, waarna voorzichtig herstel volgde. Een marginaal verlaagde gevoeligheid werd alleen waargenomen voor de cultuur die aan hoge concentraties cadmium was blootgesteld, maar dit was de volgende generatie al weer verdwenen. Er werd daarom geconcludeerd dat *C. riparius* langdurige blootstelling aan toxische stoffen inderdaad kan

weerstaan door middel van fenotypische plasticiteit, en niet door genetische adaptatie. *C. riparius* is dus een zeer plastische soort, die geschikt is voor het bestuderen van de moleculaire stressresponsen tijdens multi-generatie blotstelling aan toxische stoffen.

Genexpressie studies die het gehele transcriptoom bestuderen, worden gewoonlijk uitgevoerd met soorten waarvan het genoom volledig gesequenced is en waarvoor microarrays commercieel verkrijgbaar zijn. Om dergelijke analyses te doen met soorten waarvoor geen of hooguit beperkte sequentiedata beschikbaar is moeten eerst de nodige transcriptomics instrumenten worden ontwikkeld, zoals een geannoteerd transcriptoom en een gevalideerde genexpressie microarray. Het doel van hoofdstuk 5 was dan ook om een geavanceerde benaderingswijze te ontwikkelen die het mogelijk maakt om specifiek voor niet gesequenced organismen transcriptomics instrumenten te ontwikkelen middels het combineren van Next-Generation Sequencing (NGS) en microarray technologie. Deze benaderingswijze werd vervolgens toegepast op de dansmug *C. riparius*. Vele individuele dansmuggen werden bemonsterd om een genormaliseerde cDNA bibliotheek te maken die alle *C. riparius* ontwikkelingsstadia bevatte, inclusief larven blootgesteld aan toxische stoffen. Het sequencen resulteerde in 1.5M NGS sequentie fragmenten met een totale lengte van 501 Mbp. De NGS data werd vervolgens gebruikt om in een aantal stappen transcriptomics instrumenten te ontwikkelen. Eerst werden 844K probes direct op de NGS sequentie fragmenten ontworpen, als ook 76k probes op basis van sequenties van verwante soorten. Om de affiniteit van al deze probes voor *C. riparius* DNA en mRNA te bepalen, werd de gehele probe bibliotheek op een 1M probeselectiemicroarray gezet en werden twee microarray experimenten uitgevoerd. Vervolgens werden de 1.5M NGS sequentie fragmenten geassembleerd in 23.709 isotigs en 135.082 singletons, die geassocieerd werden met ~55k, respectievelijk, ~61k genontologietermen, en die gezamenlijk overeenkwamen met 22.593 unieke eiwitten. Een algoritme werd ontwikkeld dat op basis van de transcriptoom assemblage en de probeaffiniteiten voor DNA en mRNA, 59k zeer betrouwbare probes selecteerde die 95% van de isotigs en 18% van de singletons uniek konden bevragen. Geconcludeerd werd dat met deze aanpak de ontwikkeling van hoogwaardige transcriptomicsinstrumenten voor *C. riparius* mogelijk is en dat deze toepasbaar zijn op elk nietgesequenced organisme. De verwachting is dat deze transcriptomicsinstrumenten een bijdrage zullen leveren aan de verdere ontwikkeling en interpretatie van ecotoxiciteitstesten met *C. riparius* aangezien ze genexpressie analyses in deze soort mogelijk maken.

Moleculaire stressresponsen worden vaak gevoeliger geacht dan traditionele ecotoxicologische levenscycluseffecten zoals overleving en groei. De inspanningen om de testduur te verminderen en meer gevoelige effectparameters te genereren heeft ervoor gezorgd dat transcriptomics studies uitgevoerd worden bij lage doses gedurende korte tijd, afzonderlijk en onafhankelijk van traditionele ecotoxiciteitstesten, waardoor de vergelijking

met tussen beiden indirect wordt. Daarom was het doel van hoofdstuk 6 om de effecten op groei, overleving en genexpressie van de dansmug *C. riparius* direct te vergelijken. Om dit doel te bereiken heb ik tegelijkertijd de levenscyclus- en transcriptomicsresponsen geanalyseerd van chironomidenlarven die waren blootgesteld aan vier toxische stoffen. Er werd waargenomen dat al bij de laagste testconcentraties veel transcripten significant verschillend tot expressie kwamen, terwijl de levenscyclusparameters van *C. riparius* nog nauwelijks negatief werden beïnvloed. Analyse van deze transcripten liet zien dat de laagste testconcentraties aanzienlijke en biologisch relevante cellulaire stress induceerden en dat een substantieel deel van deze transcripten al hun maximale respons vertoonde bij deze laagste testconcentraties. De directe vergelijking tussen de moleculaire- en levenscyclusresponsen na veertien dagen blootstelling liet zien dat genexpressie gevoeliger is voor toxicanten dan levenscycluseffectparameters, wat het potentieel van transcriptomics voor ecotoxiciteitstesten en milieurisicobeoordeling nogmaals onderstreept.

Dit proefschrift heeft bijgedragen aan een beter begrip van de stressresponse van chironomiden blootgesteld aan toxische stoffen: [I] De specificiteit van stoffen, of anders gezegd hun werkingsmechanisme, werd effectief tot uitdrukking gebracht door een nieuwe ratio die gebaseerd is op levenscyclusanalyses na langdurige blootstelling en ook door verschillen in genexpressie, hoewel het nodig is om deze moleculaire response nog verder uit te werken. [II] De blootstellingstijd en daarmee de tijd die nodig is om effecten tot uitdrukking te laten komen zijn evenzo belangrijk factoren voor kwantificeren van effecten op de levenscyclus als op de genexpressie. [III] Multi-generatie effecten van chemische stress kunnen genetische adaptatie veroorzaken, maar ook niet-erfelijke transgenerationale effecten. Aangetoond werd dat *C. riparius* een zeer plastische soort is, die geschikt is voor het bestuderen van de moleculaire stressresponse tijdens multi-generatie blootstelling aan toxische stoffen. [IV] De vooruitgang in ecotoxicogenomics vindt snel plaats en het is te verwachten dat met de derde generatie sequencers het onderzoeksveld wederom drastisch zal veranderen. Echter, tot die tijd kan de benaderingswijze die in deze studie ontwikkeld is toegepast worden op elk willekeurig soort en hebben de hier ontwikkelde transcriptomics instrumenten de eerste grootschalige genexpressie studie met *C. riparius* mogelijk gemaakt. [V] Tenslotte is de bewering dat ecotoxicogenomics het testen met organismen voor risicobeoordeling zou kunnen vervangen kritisch besproken. Dit proefschrift liet zien dat het onderzoeken van veranderingen in het transcriptoom als reactie op toxische stoffen een beter begrip van de mechanismen van toxiciteit opleverde, en dat moleculaire stressresponsen gevoeliger zijn dan levenscycluseffecten. Echter, ik heb ook gewezen op de noodzaak om moleculaire responsen te relateren aan toxische effecten op het niveau van het gehele organisme. Rekening houdend met deze argumenten wordt verwacht dat ecotoxicologische transcriptomics studies uiteindelijk een integraal onderdeel zullen worden van milieu risicobeoordeling, waarbij ze gestandaardiseerde ecotoxicologische testen zullen aanvullen in plaats van volledig te vervangen.

Sažetak

Općenito se vjeruje da proučavanje transkriptoma može pomoći u razumijevanju molekularnih mehanizama u pozadini toksičnosti. Ipak, kako bi se u potpunosti iskoristio potencijal takvih istraživanja u ekotoksikologiji potrebno je povezati molekularni odgovor organizma na stres s efektima na razini životnog ciklusa. Međutim, analize transkriptoma, tj. ekspresije svih gena u jednome organizmu, izvorno su bile moguće samo u vrsta s potpuno sekvenciranim genomima. Ipak, napredci u molekularno biološkim tehnikama omogućili su analize transkriptoma u ključnih eko(toksiko)loških vrsta čiji genomi do tada još nisu bili sekvencirani. Cilj ovog doktorata je razjasniti odnos između efekata određenih životnim ciklusom i molekularnih reakcija na stres uzrokovanih spojevima s različitim djelovanjem u vrste *Chironomus riparius*, koju se koristi kao modelni organizam za ekotoksikološka istraživanja. U tu svrhu, postavljeni su bili slijedeći ciljevi:

- Usporediti multi-generacijske reakcije i one vezane uz životni ciklus u hironomidnim ličinkama nakon izloženosti spojevima sa različitim načinima djelovanja.
- Razviti sredstva koja omogućuju analizu transkriptoma *Chironomus riparius* koja se sastoje od dokumentiranog (annotated) transkriptoma i ekspresijskog *microarray-a*.
- Usporediti parametre bazirane na genskoj ekspresiji i životnom ciklusu u hironomidnim ličinkama izloženim toksičnim spojevima.

Dvokrilac *Chironomus riparius* (Insecta: Diptera) izabran je za ovaj doktorat zbog svoje ekološke važnosti i duge povijesti u ekotoksikološkom testiranju sedimenta, s trenutno četiri OECD smjernice za akutne i kronične toksikološke testove. Izabrana su četiri spoja s različitim načinima djelovanja: Fenantren je policiklički aromatski spoj nespecifične toksičnosti poznate kao narkoza. Organometal tributiltin je biocid koji može uzrokovati endokrine poremećaje u *C. riparius*. Iako esencijalan metal bakar i ne-esencijalan metal kadmij oba uzrokuju oksidativni stres, procesi se razlikuju jer je bakar redoks-aktivan metal, dok je kadmij redoks neaktivan.

Integriranje transkriptomike u ekotoksikologiju iziskuje smanjenu eksperimentalnu varijabilnost. Zato sam u drugom poglavlju razvio umjetni sediment i pratio razvoj ličinki u ovom sedimentu. Ovo istraživanje je pokazalo da se razvoj ličinki može sinhronizirati i da se mogu identificirati dani kad ličinke dosegnu specifične razvojne faze. Zaključeno je da će novo razvijeni umjetni sediment unaprijediti primjenu transkriptomike u ekotoksikološkom testiranju na *C. riparius*.

Budući da spojevi različitog djelovanja mogu drugačije utjecati na životni ciklus organizma, cilj trećeg poglavlja je bio istražiti utjecaj četiri kemikalije različitog djelovanja na kronične letalne i subletalne parametre životnog ciklusa dvokrilca *C. riparius*. Izvedeni

su toksikološki testovi koji traju 28 dana koristeći esencijalni metal bakar, ne-esencijalni metal kadmij, organometal tributiltin i policiklički aromatski spoj fenantren. Tributiltin i kadmij su značajno usporavali izljetanje dvokrilaca nakon korištenja širokog niza subletalnih koncentracija, dok je taj niz bio sužen za bakar, i skoro odsutan za fenantren. Kronični $LC50/LOEC_{EmT50}$ pokazatelj, koji izražava te razlike, iznosio je 1.5, 3.5, 12.0 i 18.2 za fenantren, odnosno, bakar, kadmij i tributiltin. Znači da se u specifičnijem djelovanju spoja odražava veći kronični $LC50/LOEC_{EmT50}$ pokazatelj, što je u skladu s omjerom akutnog i kroničnog (eng. *acute-to-chronic ratio's (ACRs)*). Usporedba naših rezultata s $LC50/LOEC$ pokazateljima iz literature potvrdio je sličan trend, s tim da se naš kronični pokazatelj pokazao manje varijabilnim u odnosu na *ACRs*. Stoga je zaključeno da je ovdje predloženi kronični pokazatelj indikativan za specifičnost načina djelovanja kemikalija i da je manje varijabilan od *ACR*.

Sposobnost dvokrilca *C. riparius* da izdrži dugotrajno izlaganje toksikantima često je pripisivana genetskoj adaptaciji. Nedavno su, međutim, predstavljeni dokazi koji podržavaju fenotipsku plastičnost kao odgovorni mehanizam. Stoga, u četvrtom poglavlju je istraženo preživljava li doista *C. riparius* dugoročno izlaganje toksikantima putem fenotipske plastičnosti. Proveden je multi-generacijski eksperiment u kojem su laboratorijske kulture *C. riparius* devet uzastopnih generacija bile izložene bakru, odnosno, kadmiju i tributiltinu. U prvom scenariju koncentracija toksikanta je bila konstantna svih devet generacija, dok je u drugom scenariju koncentracija povećana nakon šeste generacije. Tijekom eksperimenta, pratilo se koliko bi dvokrilaca izletjelo u svakoj generaciji te koje im je bilo prosječno vrijeme izljetanja, dok se najmanje svake treće generacije utvrđivala osjetljivost kultura pomoću akutnih toksičnih testova. Primijetili smo da kulture koje su bile izložene subletalnim koncentracijama skoro da nisu bile zahvaćene. S druge strane, kulture izložene znatno višim koncentracijama nakon šeste generacije, bile su znatno zahvaćene u osmoj generaciji, nakon čega su se počinjale oporavljati. Smanjena osjetljivost nađena je samo kod kulture izložene visokoj koncentraciji kadmija, no već tijekom slijedeće generacije se izgubila. Zaključeno je da *C. riparius* doista može izdržati dugoročno izlaganje toksikantima putem fenotipske plastičnosti bez genetske adaptacije. Dakle, *C. riparius* je uistinu jako plastična vrsta, prikladna za proučavanje molekularnih odgovora na stres tijekom multi-generacijskog izlaganja toksičnim spojevima.

Analiziranje cjelokupnog transkriptoma obično se radi na vrstama čiji je genom sekvenciran i za koji se *microarrays* komercijalno mogu nabaviti. Kako bi se takve analize moglo provesti na vrstama bez, ili u najboljem slučaju ograničenom količinom, sekvenci, potrebno je razviti načine analize transkriptoma temeljene na dokumentiranom transkriptomu i ekspresijskom *microarray-u*. Cilj petog poglavlja stoga je bio uspostaviti naprednu metodu za razvijanje sredstava koja omogućuju analizu transkriptoma ne-sekvenciranih vrsta kombinirajući *Next Generation Sequencing (NGS)* i *microarray*

tehnologiju. Ova nova metoda zatim je primijenjena na *C. riparius*. Prvo, uzorci svih razvojnih faza *C. riparius*, uključujući ličinke izložene toksičnim spojevima, korištene su za generiranje normalizirane baze DNA sekvenci. Potom, sekvenciranje te baze je rezultiralo s 1.5M NGS sekvenciranih fragmenata ukupne dužine od 501 Mbp. Na temelju NGS fragmenata dizajnirao sam 844k probe, tj. oligonukleotide, potom sam dodatno dizajnirao 76k probe na temelju sekvenci srodnih vrsta. Afinitet svih proba prema *C. riparius* DNA i mRNA testirao sam pomoću dva *microarray* eksperimenata. Nakon toga su 1.5M NGS sekvencirani fragmenti povezani u 23,709 *isotig* i 135,082 *singleton* i spojeni pomoću ~55k, odnosno ~61k *Gene Ontology* pojmova, što je odgovaralo 22,593 jedinstvenim bjelančevinama. Zatim je razvijen algoritam koji na bazi spojenih sekvenci i afiniteta selektirao 59k pouzdanih proba. One su omogućile jedinstveno ispitivanje 95% *isotig-a* i 18% *singleton-a*. Zaključeno je da je ovaj pristup omogućio razvoj kvalitetnih sredstava za analizu transkriptoma u vrste *C. riparius*, i da se može koristiti za bilo koji organizam koji nema sekvenciran genom. Očekuje se da će ova metodologija dodatno potaknuti ekotoksikološka ispitivanja na *C. riparius* jer omogućuju ispitivanje transkriptoma ove vrste.

Molekularni odgovori na stres često se smatraju osjetljivijima od tradicionalnih ekotoksikoloških parametara kao što su preživljavanje i rast. Nastojanje u ekotoksikologiji da se smanji vrijeme testiranja i da se definiraju osjetljiviji parametri rezultiralo je analizama transkriptoma u kojima se organizme kratkotrajno izlagalo niskim dozama, odvojeno i nezavisno od tradicionalnih ekotoksičnih testova, što komplicira direktno uspoređivanje različitih efekata. Stoga je cilj šestog poglavlja bio izravno usporediti efekte na rast, preživljavanje i ekspresiju gena u dvokrilca *C. riparius*. U tu svrhu sam istodobno analizirao efekte uzrokovane životnim ciklusom i transkriptom u ličnaka izloženih četirima toksikantima. Primijetili smo da se ekspresija puno transkripata značajno promijenila već na najnižim testiranim koncentracijama, a koje nisu poremetile životni ciklus *C. riparius*. Analiza transkripata pokazala je da već najniže testirane koncentracije uzrokuju biološki značajan stres na staničnom nivou i da se velik dio tih transkripata modulira kod ovakvih niskih doza. Izravna usporedba molekularnih efekata i onih definiranih životnim ciklusom nakon četrnaest dana izloženosti toksikantima pokazala je da je genska ekspresija osjetljivija od efekata definiranih životnim ciklusom, što podupire potencijal transkriptomike u ekotoksikologiji i procjenivanju rizika za okoliš.

Ovaj doktorat je pridonio razumijevanju reakcija na stres u hironomidima izloženim toksičnim spojevima: [I] Specifičnost spojeva, tj. njihov način djelovanja, učinkovito se uspjela karakterizirati novim pokazateljom baziranim na kronično efektima definiranim životnim ciklusom, kao i s promjenama u genskoj ekspresiji. No, molekularne odgovore na stres potrebno je detaljnije izražiti. [II] Vrijeme izloženosti toksikantima, i sukladno tome vrijeme potrebno da vidljivi efekti nastanu, ocijenjeni su kao važni faktori za kvantificiranje

djelovanja na organizam i identifikaciju promjena u genskoj ekspresiji. [III] Multi-generacijski efekti kemijskog stresa mogu uzrokovati genetsku adaptaciju, ali i nenasljedne transgeneracijske efekte. Pokazao sam da je *C. riparius* jako plastična vrsta i kao takva prikladna za proučavanje molekularnih odgovora na stres tijekom multi-generacijske izloženosti toksikantima. [IV] Ekotoksikogenomika se brzo razvija te će dodatni razvoj biti potaknut uvođenjem treće generacije sekvencera. U međuvremenu, metodu za razvoj sredstava koji omogućuju analizu transkriptoma, koju sam u ovome doktoratu razvio, moći će se primijeniti na bilo kojoj vrsti. U ovome doktoratu ova metoda omogućila je prvi veliku analizu genske ekspresije u vrste *C. riparius*. [V] Na kraju sam kritično raspravio tvrdnju da ekotoksikogenomika može zamijeniti testiranje sa organizmima za procjenjivanje rizika za okoliš. Ovaj doktorat pokazao je da proučavanje promjena transkriptoma nakon izlaganja toksičnim spojevima pruža bolje razumijevanje mehanizama toksičnosti, kao i da su molekularni odgovori na stres osjetljiviji od efekta definiranih životnim ciklusom. Međutim, istaknuo sam i da je potrebno molekularne odgovore na stres povezati s efektima uzrokovanim na nivou čitavog organizma. S obzirom na ove argumente očekujem da će analize transkriptoma s vremenom postati nezaobilazan dio tijekom procesa procjene okolišnog rizika, kada će nadopuniti standardizirane ekotoksikološke testove bez da ih potpuno zamijeni.