Etablierung einer *in vivo* Kurzzeitprüfung von endokrin wirksamen Substanzen an juvenilen Fischen

Dissertation
Zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von Diplom-Biologin
Melanie Zerulla

Berlin, März 2001

The scientific Progress goes "BOINK" ?
Bill Watterson, 1991

Für meine Lieblings-Oma

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dietrich für die Möglichkeit dieser Dissertation und die Betreuung in dieser Zeit.
Den Mitgliedern der EMSG-Projektgruppe für die finanzielle, ebenso wie für die Unterstützung in wissenschaftlichen Fragen.
Herrn Prof. Rothhaupt für die Übernahme des Zweitgutachtens.
Ich danke allen Mitarbeitern der Experimentellen Toxikologie der Schering AG für einfach alles, es gibt keine einzige Arbeitsgruppe, bei der ich im Laufe der letzten 3 Jahre nicht schon Geräte oder Chemikalien geschnorrt oder sonstige Hilfe erhalten habe.
Ganz besonders bedanke ich mich natürlich bei meinen "Mentoren" Herrn Dr. Länge und Herrn Dr. Steger-Hartmann für das offene Ohr bei diversen Fragen, jede noch so blöde Frage wurde bereitwillig diskutiert.
Meinen besonderen Dank an die Mitarbeiter der Ökotoxikologie Micha, Heidi und Karen für die vielen Hilfestellungen bei größeren und kleineren Problemen im täglichen Laborleben. Ganz speziell ist hier aber noch Mirco hervorzuheben, ohne ihn wäre diese ganze Arbeit nicht zu schaffen gewesen.
Ich bedanke mich bei allen Mitgliedern der AG Umwelttoxikologie der Universität Konstanz für die Hilfe und Unterstützung besonders in den Zeiten in Konstanz.
Mein spezieller Dank gilt allen meinen Freunden, die vor allem in letzter Zeit viel mit mir mitmachen mussten.

1. Einleitung 6
1.1 Was sind Endocrine Disrupters (ED)? 6
1.2 Das endokrine System und die Vitellogeninsynthese beim Fisch 7
1.3 Die Steroid-Biosynthese 9
1.4 Eingesetzte Tiere 11
1.5 Eingesetzte Substanzen 12
1.6 Zielsetzung 15
2. Material und Methoden 16
2.1 Zucht von Fettkopfbrassen 16
2.1.1 Auswahl der Fische 16
2.1.2 Zuchtbedingungen 16
2.1.3 Aufzucht der Embryos 17
2.2 Verlängerter Fischtest (Systemische Verträglichkeitsprüfung) an juvenilen Fettkopfbrassen über 21 Tage 17
2.2.1 Testaufbau 18
2.2.2 Eingesetzte Tiere 19
2.2.3 Test Konzentrationen 19
2.2.4 Fütterung 20
2.2.5 Parameter 20
2.3 Statistische Auswertung der Kurzzeittests 21
2.4 Early-Life Stage Test 22
2.4.1 Testaufbau 22
2.4.2 ELS-Vorversuche mit Methyltestosteron 24
2.5 Kompetitiver Vitellogenin ELISA (*Enzyme linked Immunosorbent Assay*) 25
2.5.1 Homogenisation 26
2.5.2 Kontrollen 26
2.5.3 Durchführung 27
2.5.4 Verwendete Puffer 29
2.6 Kompetitiver Steroid-ELISA 31
2.6.1 Tracer-Präparation 32
2.6.2 Schematische Darstellung des Ablaufs einer Tracerpräparation 34
2.6.3 Checkerboard-Titration 35
2.6.4 Probenvorbereitung 36
2.6.5 Assay 37
2.6.6 Verwendete Puffer 38
2.7 Kompetitiver RIA (Radioimmuno-Assay) 41
2.7.1 Durchführung 41
2.7.2 Verwendete Puffer 42
2.8 RNA-Präparation mit TRIzol® 43
2.8.1 DEPC-Behandlung 44
2.9 Poly(A)$^+$ RNA-Anreicherung aus Gesamt-RNA 44
2.9.1 Verwendete Puffer 45
2.10 RNA-Analyse mittels Northern-Hybridisierung 46
2.10.1 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese 46
2.10.2 Northern Transfer (Turbo Blotting) 47
2.10.3 Northern Hybridisierung 48
2.10.4 Detektion 49
2.10.5 Vewendete Puffer 50
2.11 RT-PCR 54
2.11.1 Reverse Transkription 54
2.11.2 PCR (Polymerase Chain Reaction) 55
2.11.3 Verwendete Primersequenzen 56
2.11.4 Agarose-Gelelekrophorese 56
2.11.5 Verwendeter Puffer 57
2.12 PCR-Produkt Extraktion aus einem Agarosegel mit *QIAquik Gel Extraction Kit®* 57
2.12.1 Durchführung 58
2.13 CERBA (cytosolischer Estrogen-Rezeptor Bindungs-Assay) 58

2.13.1 Leber-Cytosolpräparation ... 58
2.13.2 Bindungs-Assay Durchführung (Sättigung) ... 59
2.13.3 Bindungs-Assay Durchführung (Kompetition) ... 61
2.13.4 Verwendete Puffer ... 61
2.14 PROTEINWERTBESTIMMUNG ... 62
2.14.1 Herstellung der BSA-Verdünnungsreihe ... 62
2.14.2 Probenverdünnung ... 63
2.14.3 Verwendete Puffer ... 63
2.15 VERWENDETE CHEMIKALIEN ... 64
2.16 VERWENDETE GERÄTE ... 67

3. Ergebnisse und Diskussion ... 70

3.1 ETABLIERUNG DES VITELLOGENIN ELISAS (*ENZYME LINKED IMMUNOSORBANT ASSAY*) ... 70
3.2 ETABLIERUNG DES STEROID ELISAS ... 72
3.2.1 Extraktionsmittel ... 73
3.2.2 High-speed Zentrifugation ... 73
3.2.3 Aliquotieren ... 75
3.2.4 Wiederholung der Aufarbeitung mit sämtlichen bisherigen Veränderungen ... 75
3.2.5 Proteinase K Behandlung der Ganzkörperhomogenate ... 75
3.2.6 Radioaktive Messung der Wiederfindungsrate ... 76
3.2.7 Wiederfindung von Testosteron im Ganzkörperhomogenat ... 77
3.2.8 Wiederfindung von Estradiol und Testosteron in Plasmaproben ... 77
3.3 ETABLIERUNG DES STEROID RIAS (RADIOIMMUNO ASSAY) ... 78
3.3.1 Testosteron Wiederfindung durch kaltes Dotieren an Einzelfischen ... 79
3.3.2 Testosteron Wiederfindung durch heißes Dotieren an Einzelfischen ... 79
3.3.3 Estradiol Wiederfindung durch kaltes Dotieren an Einzelfischen ... 80
3.3.4 Estradiol Wiederfindung durch heißes Dotieren an Einzelfischen ... 81
3.4 ETABLIERUNG DES MRNA NACHWEISES MITTELS NORTHERNBLOT ... 81
3.5 ETABLIERUNG EINER RT-PCR ZUM NACHWEIS DER VTG UND ER MRNA ... 81
3.6 VERLÄNGERTE FISCHTESTS MIT 3 ENDOKRIN WIRKSAMEN SUBSTANZEN ... 83
3.6.1 Ethinylestradiol Range-finding Test (TXST 19980250) ... 84
3.6.2 Ethinylestradiol definitiver Test (TXST 19990138) ... 85
3.6.3 Methyltestosteron Range-finding Test (TXST19980071) ... 89
3.6.4 Methyltestosteron definitiver Test (TXST 19990053) ... 92
3.6.5 Fadrozol Range-finding Test (TXST 19990075) ... 97
3.6.6 Fadrozol definitiver Test (TXST 19990109) ... 99
3.6.7 Vergleich der definitiven Tests ... 101
3.6.8 Kombinationsversuch (TXST 20000131) ... 105
3.7 EARLY-LIFE STAGE TEST ... 109
3.7.1 Vorversuche ohne Substanz ... 109
3.7.2 Methyltestosteron ELS ... 111

4. Zusammenfassende Diskussion ... 113

4.1 ETHINYLESTRADIOL ... 113
4.2 METHYLTESTOSTERON ... 116
4.3 FADROZOL ... 118
4.4 KOMBINATIONSVERSUCH ... 119
4.5 INTERNE KONTROLLEN ... 121
4.6 BEWERTUNG DES TESTSYSTEMS ... 122

5. Zusammenfassung ... 126

5.1 SUMMARY ... 127

6. Literaturverzeichnis ... 128

1. Einleitung

Viele Chemikalien, die in die aquatische Umwelt gelangen, sind nur in geringem Umfang öko-toxikologischen Tests unterzogen worden. Für einige dieser Chemikalien, beispielsweise Industriechemikalien, wurden lediglich einfache Toxizitätstests zur Bestimmung eines "Sicherheits"-Limits durchgeführt.

Hinweise für die Beeinflussung von Wildtierpopulationen oder einzelnen Individuen durch eine ganze Reihe verschiedener Chemikalien verdichteten sich im Laufe der letzten Jahre. Effekte von Tributylzinn aus Antifouling-Schiffsanstrichen auf marine Schnecken-populationen (Langston, 1996; Oehlmann *et al.*, 1996), Effekte durch polychlorierte Biphenyle (PCBs) auf Robben (Reijnders, 1986; Brouwer *et al.*, 1989), Vermännlichung von nordamerikanischen Fischen, ausgelöst durch Abflüsse der papierherstellenden Industrie (Howell, 1980; Munkittrick *et al.*, 1991, 1992), Verweiblichung von Fischen in britischen Flüssen unterhalb von Kläranlagenausflüssen (Jobling und Sumpter, 1993; Purdom *et al.*, 1994; Harries *et al.* 1997), Gonadenabnormalitäten bei Alligatoren im Lake Apopka (Guillette *et al.*, 1994,1995,1996) und Effekte auf nordamerikanische Vögel (Fry und Toone, 1981; Fry 1995) sind nur einige der wichtigsten und am besten dokumentierten Beispiele für diese Beeinflussung.

Aus diesem Grund bildete das *European Chemical Industry Council* (CEFIC) eine Unterorganisation, die *Endocrine Modulators Steering Group* (EMSG), welche sich speziell mit dem Thema *Endocrine Modulators* oder *Endocrine Disrupters* beschäftigt. Im Rahmen der von EMSG etablierten Zielsetzung wurde die Entwicklung von *Screening Assays* und Prüfmethoden für die Wirkung hormonell aktiver Chemikalien in Fischen mit hoher Priorität belegt, da von der OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*) entsprechende Prüfmethoden standardisiert werden sollen.

1.1 Was sind Endocrine Disrupters (ED)?

Beim Europäischen Workshop zu "*Impact of Endocrine Disrupters on Human Health and Wildlife*" in Weybridge im Dezember 1996 einigten sich über 70 Vertreter aus Wissenschaft und Behörden der EU, USA und Japan sowie von den Institutionen OECD, WHO (*World Health Organisation*) und den Interessenverbänden CEFIC und WWF (*World Widelife Fund for Nature*) auf folgende Definition:

"*An endocrine disrupter is a substance or mixture that alters function(s) of the endocrine system and consequently causes adverse health effects in an intact organism, or its progeny, or (sub)populations*."

Diese Definition setzt eine Exposition bei einer bestimmen Dosis voraus, während eine weitere Definition von Xenohormonen von den inhärenten Eigenschaften einer Substanz ausgeht (Reisner-Oberlehner, 1998):

"*A potential endocrine disrupter is an exogenous substance or mixture that possesses properties, that might be expected to lead to endocrine disruption in an intact organism, or its progeny, or (sub)populations*."

Das bedeutet, daß eine Substanz entsprechend der zweiten Definition auch dann ein *Endocrine Disrupter* sein kann, wenn Mensch und Tier damit nicht bzw. nicht in ausreichenden Konzentrationen in Berührung kommen, was der ersten Definition nach der Fall wäre.

Derzeit sind etwa 600+ Stoffe bekannt, die im Verdacht stehen, hormonelle Aktivität zu besitzen. Dazu zählen natürlich nicht nur estrogene Effekte, sondern auch androgene, antiandrogene und antiestrogene Effekte. Die Mechanismen der pseudohormonellen Wirkung sind vielfältig, da sie nicht nur direkt durch Bindung an den Rezeptor wirken können, sondern z.B. auch durch Beeinflussung des physiologischen Metabolismus von Hormonen in der Leber, Schilddrüse, oder durch Wirkungen auf das Immun- oder Nervensystem.

1.2 Das endokrine System und die Vitellogeninsynthese beim Fisch

Das endokrine System von Fischen, wie auch das von Säugetieren, besteht aus einem sehr komplexen Zusammenspiel zwischen externen Stimuli, Hypothalamus- und Hypophysen-hormonen, Hormonen der Gonaden und der Deaktivierung dieser Hormone durch die Leber.

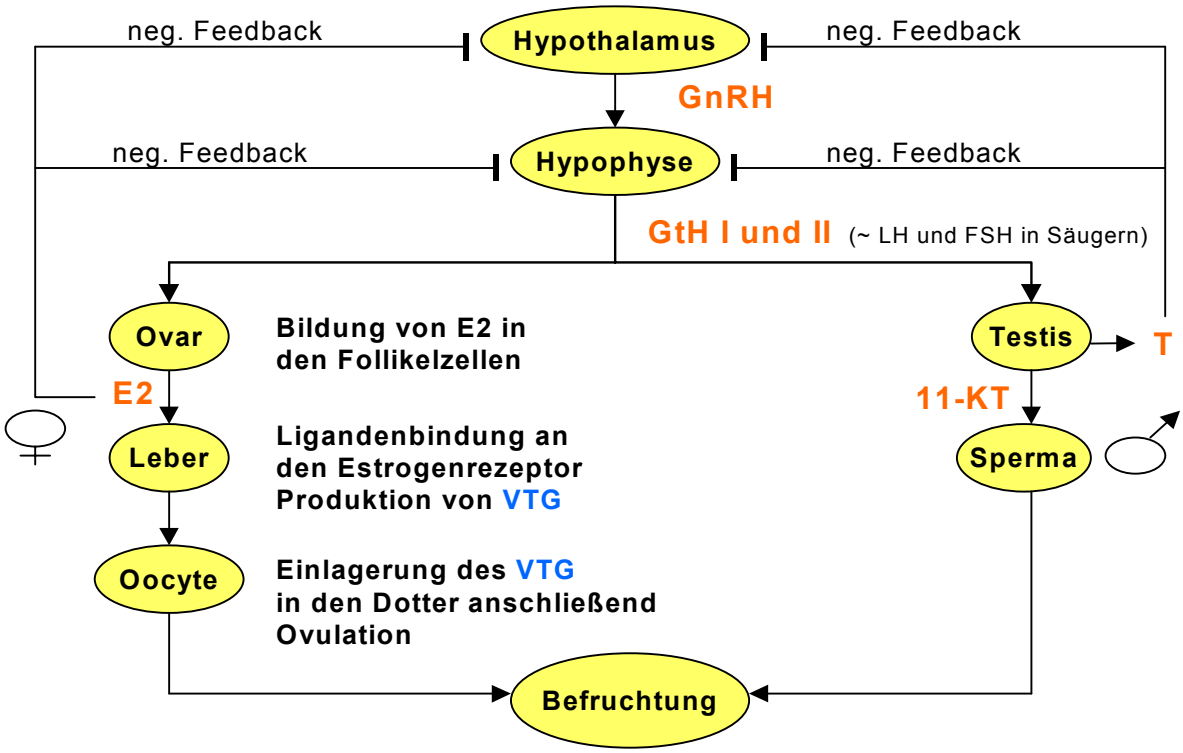

Abbildung 1.1. Humoraler Regelkreis des Reproduktionssystems bei Fischen. GnRH = Gonadotropin Releasing Hormon, GtH = Gonadotropin, LH = Luteinisierendes Hormon, FSH = Follikel-stimulierendes Hormon, E2 = Estradiol, T = Testosteron, 11KT = 11-Ketotestosteron, VTG = Vitellogenin (modifiziert nach Kime,1998)

Die Reifung der Gonaden wird bei verschiedenen Spezies durch unterschiedliche externe Parameter, wie z.B. Temperatur, Photoperiode, Regen etc. in Gang gesetzt. Der Hypothalamus wird stimuliert Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH) freizusetzen, welches seinerseits die Freisetzung von Gonadotropin (GtH) durch die Adenohypophyse bewirkt (s. Abb. 1.1). Einige Fische besitzen 2 Arten Gonadotropin (GtH-I und GtH-II), analog dem luteinisierenden Hormon (LH) und dem Follikel stimulierenden Hormon (FSH) der Säuger. GtH induziert die Gonadenentwicklung und die Produktion von Steroidhormonen durch die Gonaden.

Bei den Steroidhormonen unterscheidet sich das endokrine System der Fische von dem der Säuger. In Männchen ist 11-Ketotestosteron (11KT) das für die Ausbildung von sekundären Geschlechtsmerkmalen und Verhalten verantwortliche Hormon (Arai, 1967; Kime, 1998). Testosteron (T), das "männliche" Hormon bei Säugern, wird hier von beiden Geschlechtern gleichermaßen synthetisiert und ausgeschieden, allerdings ist die Funktion beim Fisch noch weitgehend unklar. Auch beim Estradiol (E2), dem ovariellen Estrogen, gibt es Unterschiede im Vergleich zum Säuger. Es wird in den Follikelzellen einer reifenden Oocyte produziert. Dieser Follikel besteht aus äußeren Thekazellen, welche durch Gonadotropin zur Testosteron-Synthese angeregt werden und inneren Granulosazellen, in denen die Aromatisierung des Testosterons zum Estradiol vonstatten geht (Kime, 1998).

Das hauptsächliche Zielgewebe des Estradiols ist die Leber (s. Abb. 1.2). Das Steroidhormon wird an Steroidbinde-Globuline gebunden (Hautanen, 2000; Paolucci und Di Fiore, 1994), im Blutstrom zur Leber transportiert, in die Hepatocyten aufgenommen und bindet dort an den cytoplasmatischen Estrogen Rezeptor (ER; Flouriot *et al.*, 1996; MacKay *et al.*, 1996). Dieser Rezeptor gehört zur Familie der Steroid/Thyroid-Hormon/Retinolsäure-Rezeptoren, deren Mitglieder auf Grund der Rezeptor-Liganden-Bindung als induzierbare Transkriptionsfaktoren wirken (Flouriot *et al.*, 1997). Durch die Bindung des Hormons an den Rezeptor lösen sich die rezeptor-assoziierten Hitzeschockproteine Hsp 90, Hsp 70 und p55 ab (Landel *et al.*, 1995), es kommt zu einer Dimerisierung (Weigel,1996). Das Rezeptor/Hormon-Dimer bindet an spezifische DNA-Abschnitte, sogenannte *estrogen responsive elements* (ERE; Katzenellenbogen *et al.*, 1993). Diese DNA-Sequenzen werden als *Enhancer*-Elemente bezeichnet, da sie die Transkription eines davor- oder dahinterliegenden Gens fördern, dieses Gen kodiert beispielsweise die Vitellogenin mRNA.

Bei Fischen handelt es sich bei Vitellogenin (VTG) um ein großes Lipoglykophosphoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 150 - 180kDa für das Monomer (Folmar *et al.*, 1996), wobei es natürlicherweise im Körper als Homo-Dimer vorliegt. Bei den meisten eierlegenden Wirbeltieren spielt die Dottersynthese (Vitellogenese) in weiblichen Tieren eine entscheidende Rolle für den Erfolg der Reproduktion, denn der Dotter bildet die Ernährungsgrundlage des sich im Ei entwickelnden Embryos. Vitellogenin stellt eine Vorstufe

verschiedener Dotterkomponenten dar und dient als Transportform dieser Verbindungen, die von der Leber als dem Ort ihrer Synthese über das Blut zu den Gonaden als dem Ort des Einbaus in die Eizellen transportiert werden.

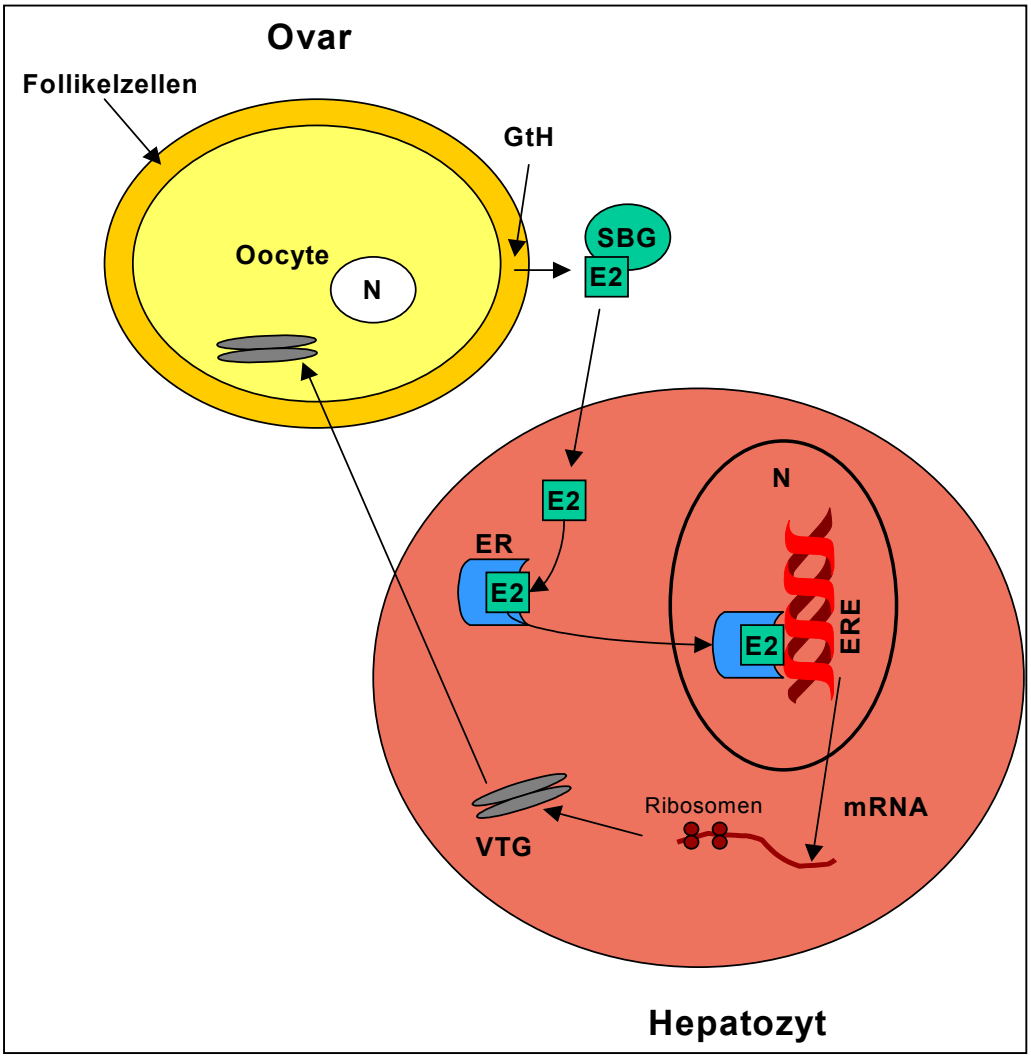

Abbildung 1.2. Estradiol abhängige hepatische Vitellogeninsynthese (Detail). SBG = Steroidbinde-Globulin, ERE = *estrogen responisve element*, ER = Estrogen Rezeptor-Dimer, VTG = Vitellogenin, N = Zellkern (modifiziert nach Kime, 1998).

Die Vitellogeninsynthese ist somit ein estrogen-abhängiger Prozess. Daher bot es sich an, eine induzierte Vitellogeninproduktion bei männlichen oder juvenilen Fischen, die normalerweise kein Vitellogenin in messbaren Mengen produzieren, als Indikator für eine Exposition mit estrogen wirksamen Substanzen heranzuziehen.

1.3 Die Steroid-Biosynthese

Sämtliche Steroidhomone leiten sich vom Cholesterin ab, welches bei Wirbeltieren vor allem in der Leber produziert wird. Es ist die Vorstufe für fünf Hauptklassen von Steroidhormonen: Gestagene, Glukocorticoide, Mineralcorticoide, Androgene und Estrogene.

Der erste Schritt des Stoffwechselweges besteht in der Entfernung einer C_6-Einheit aus der Seitenkette des Cholesterins, wobei Pregnenolon entsteht (s. Abb. 1.3). Das adrenocorticotrope Hormon (ACTH, Corticotropin), ein Polypeptid aus dem Hypophysenvorderlappen, stimuliert diese Umwandlung. Als *second messenger* dient hierbei cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat). In zwei weiteren Schritten entsteht aus Pregnenolon Progesteron.

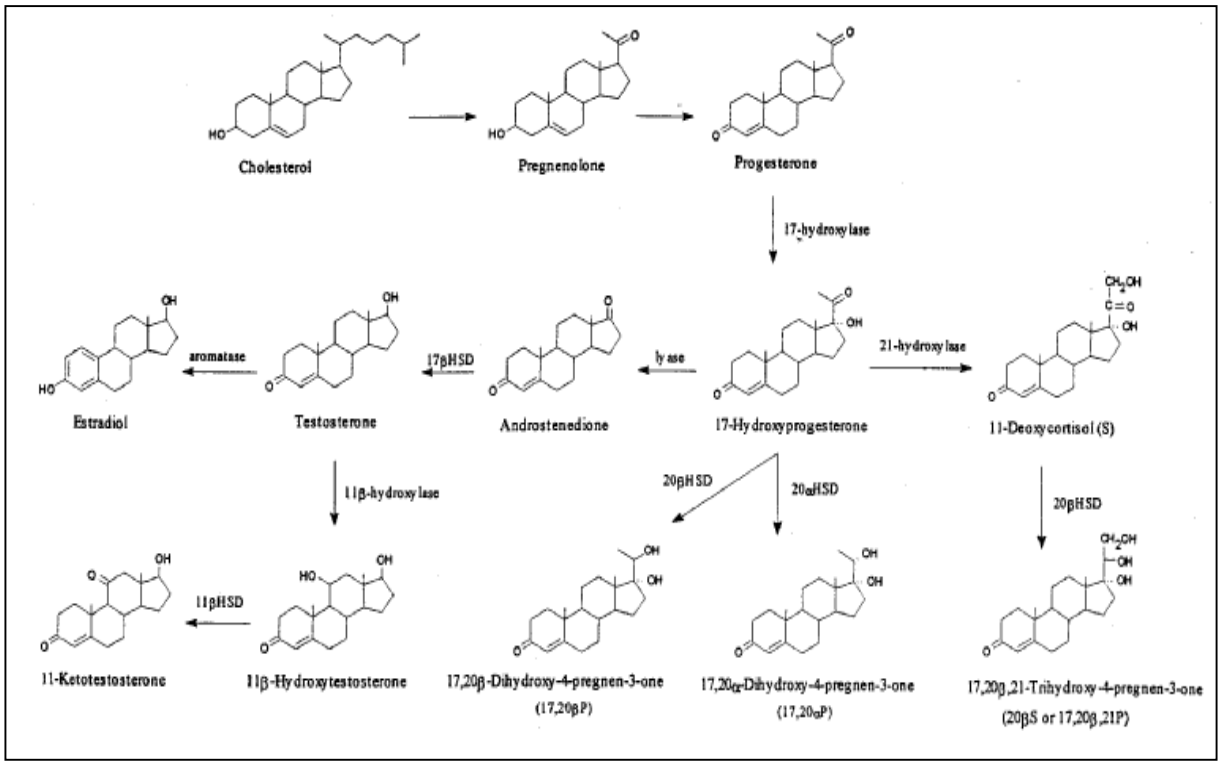

Abbildung 1.1. Biosyntheseweg der Steroide bei Fischen, aus *Endocrine Disruption in Fish*, D.Kime, 1998, HSD = Hydroxysteroid-Dehydrogenase.

Die Synthese der Androgene beginnt mit der Hydroxylierung von Progesteron am C-17. Anschließend wird seine aus C-20 und C-21 bestehende Seitenkette abgespalten und man erhält Androstendion, ein Androgen. Testosteron wird durch die Reduktion der 17-Ketogruppe des Androstendions bereitgestellt. Durch eine weitere Hydroxylierung und anschließende Reduktion am C-11 entsteht 11-Ketotestosteron, das eigentliche Androgen bei Fischen (Arai, 1967). Testosteron besitzt 19 Kohlenstoffatome und wird durch Entfernen der C-19-Methylgruppe und Aromatisierung von Ring A in Estrogene umgewandelt. Das Estrogen Estron leitet sich vom Androstendion ab, während Estradiol aus Testosteron gebildet wird (Stryer, 1988).

Die Aromatase (EC 1.14.14.1), welche die Aromatisation des Androstedions oder des Testosterons katalysiert, ist ein im Endoplasmatischen Retikulum lokalisierter Enzymkomplex, bestehend aus einem spezifischen Cytochrom P450-Häm und einer Flavoprotein NADPH abhängige Cytochrom P450-Reduktase (Kelloff *et al.*, 1998).

1.4 Eingesetzte Tiere

Für die hier beschriebenen Versuche wurden juvenile Fettkopfbrassen (*Pimephales promelas*; Cope, 1868) eingesetzt.

Abbildung 1.1. männliche geschlechtsreife Fettkopfbrasse, das Foto wurde freundlicherweise von G. Panter zur Verfügung gestellt.

Die Fettkopfbrasse ist der "Standardfisch" der FDA (*US Food and Drug Administration*) und der EPA (*US Environmental Protection Agency*) für die Prüfung der Wirkung von Arzneimittelwirkstoffen und anderen Chemikalien auf Warmwasser-Fische. Aus diesem Grund waren schon verschiedene Daten über die Entwicklung und das Wachstum der Fische unter Einfluss verschiedener Substanzen bekannt. Die Fische sind relativ klein (bis max. 7.5cm) und wenig aggressiv, daher können sie in großen Gruppen auf begrenztem Raum gehalten werden. Die geringe Größe bedingt allerdings auch das sehr kleine Probenvolumen im Falle von benötigten Plasmaproben oder einzelnen Organe wie z. B. der Leber. Der wesentlichste Vorteil dieser Fischart, für den Einsatz in den durchgeführten Versuchen besteht in schnellem Wachstum, leichter Nachzüchtbarkeit und der Entwicklung von sehr ausgeprägten sekundären Geschlechtsmerkmalen. Die Geschlechter der adulten Tiere können aufgrund von Färbung, Kopfform und Fettansatz vor der Rückenflosse phänotypisch bestimmt werden.

1.5 Eingesetzte Substanzen

Bei der hier vorgestellten Arbeit handelt es sich um ein Gemeinschaftsprojekt an dem 3 verschiedene Labore beteiligt waren, AstraZeneca (Brixham, UK), Shell (Thornton, UK) und Schering (Berlin, D). Es wurden 9 verschiedene, endokrin wirksame Substanzen getestet, wobei jedes Labor für 3 Substanzen zuständig war. Im Rahmen dieser Dissertation wurden Ethinylestradiol, Fadrozol und Methyltestosteron eingesetzt.

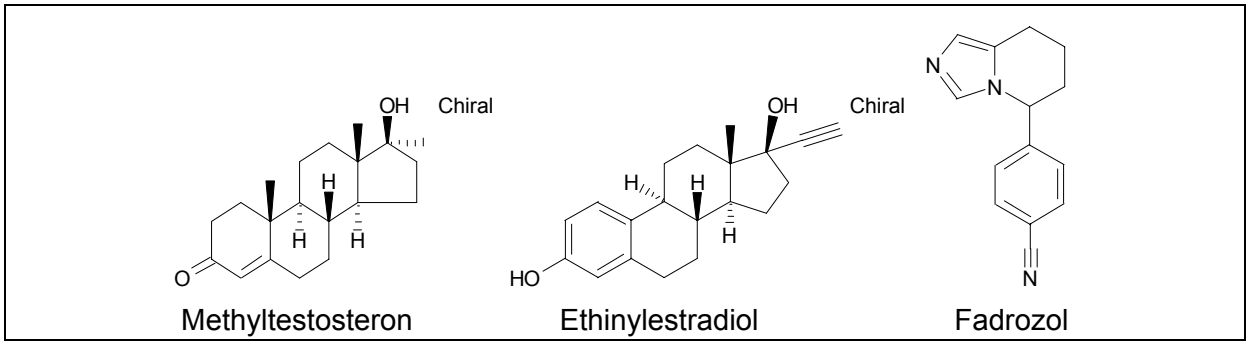

Abbildung 1.1. Strukturformeln der eingesetzten Substanzen.

- ⇨ Ethinylestradiol (**EE2**, 19-Nor-17α-pregna-1,3,5[10]-trien-20-in-3,17-diol, CAS 57-63-6), dieses synthetisches Estrogen ist - neben Mestranol (CAS 72-33-3) - die wichtigste Estrogen Komponente in oralen Kontrazeptiva. Durch Einführung der Ethinylgruppe in der 17α-Position zeigt die Verbindung, verglichen mit dem endogenen Hormon 17β-Estradiol, eine höhere Stabilität und besitzt eine höhere Bioverfügbarkeit (Schweinfurth *et al.*, 1997). Es bindet an den Estrogen Rezeptor und löst damit die estrogen abhängige Expression bestimmter Gene aus.
  So wurden beispielsweise in Trinkwasserproben 0.1-1.4ng/l, im Grundwasser 0.1-0.2ng/l gemessen, in Oberflächenwasser ebenfalls 0.1-0.2ng/l und in Kläranlagen-abflüssen 0.2-0.6ng/l (Kalbfus *et al.*, 1998).
- ⇨ Methyltestosteron (**MT**, 17α-methyl-4-androsten-17β-ol-3-one, CAS. 58-18-4), ein synthetisches Androgen, das rountinemäßig in der kommerziellen Fischzucht eingesetzt wird, um große, phänotypisch männliche Fische zu produzieren (Feist *et al.*, 1995). Es gibt auch Studien, bei denen Methyltestosteron zur Behandlung von hypogonodal impotenten Männern, die am Klinefelter-Syndrom leiden, eingesetzt wurde (Loughlin, 1995; Zhu, 1990). Zudem wird Methyltestosteron in der *hormone-replacement* Therapie bei Männern und zur Bekämpfung von Brustkrebs bei postmenopausalen Frauen eingesetzt. In Deutschland ist es allerdings in keinem Medikament als Wirkstoff zugelassen. Es sind keine Daten über Methyltestosteron Konzentrationen in der Umwelt publiziert.

Für dieses Projekt wurde es als Androgen eingesetzt, da es durch die Methylgruppe in der 17α-Position von endogenem Testosteron unterschieden werden kann.

⇨ Fadrozol (**F**, 4-[5,6,7,8-Tetrahydromidazo{1,5-α}pyridin-5-yl]benzonitril, CAS 102676-47-1), ein Imidazol und potenter Aromatase-Inhibitor, der von der Firma Novartis (Basel, CH) hauptsächlich zur Therapie von Brust- und Prostatakrebs entwickelt wurde. Der nicht-steroidale Inhibitor bindet an die Hämgruppe des Enzyms und verhindert so die enzymatische Reaktion (Kelloff *et al.*, 1998). Im Gegensatz zu steroidalen Inhibitoren besitzen nicht-steroidale keine hormonell agonistische oder antagonistische Aktivität. Die Wirksamkeit von Fadrozol als potentem Aromatase-Inhibitor wurde bereits am Mensch und an der Ratte nachgewiesen (Kelloff *et al.*, 1998), es gibt aber nur sehr wenig Publikationen bei denen die Wirksamkeit am Fisch getestet wurde. Beispielsweise beschrieben Alfonso *et al.* 1996 eine reduzierte Estradiolproduktion von Coho-Lachs Follikelzellen, nach Fadrozolbehandlung. Auch von dieser Substanz sind keine umweltrelevanten Konzentrationen bekannt und publiziert.

Die verwendeten Substanzen haben unterschiedliche Angriffspunkte in der Steroid-Biosynthese (s. Abb. 1.6). Ethinylestradiol bindet an den Estrogen Rezeptor und aktiviert dadurch die Expression verschiedener estrogen abhängiger Gene, z.B. des Vitellogenins. Methyltestosteron bindet an den Androgen Rezeptor. Fadrozol hemmt die Aromatase und verhindert damit die Konvertierung von Testosteron in Estradiol.

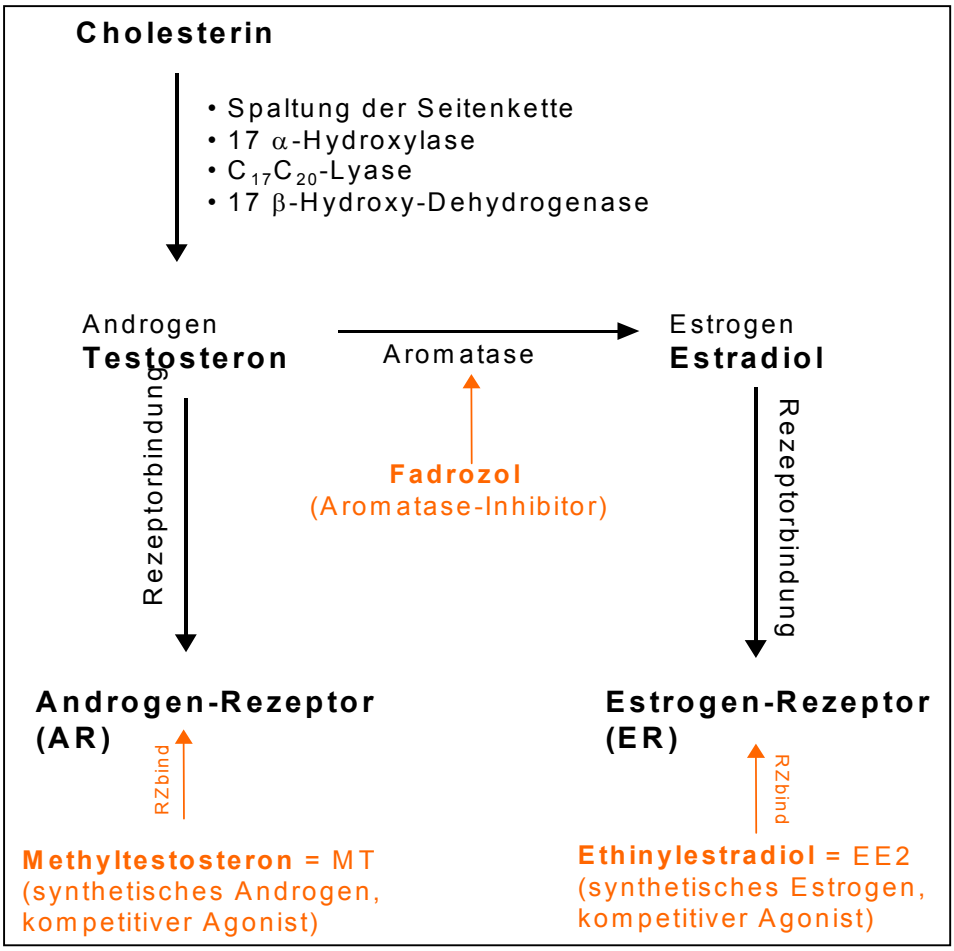

Abbildung 1.2. Angriffspunkte im Steroidstoffwechsel der getesteten Substanzen.

Es wurde ein drei-wöchiger Kurzzeittest mit juvenilen Fettkopfbrassen (*Pimephales promelas*) entwickelt, welche im Durchflussverfahren verschiedenen Konzentrationen der beschriebenen Substanzen ausgesetzt wurden.

Im Gegensatz zu vielen in der Literatur beschriebenen Testsystemen wurden hier juvenile, noch nicht geschlechtsdifferenzierte Fische der zu testenden Substanz direkt im Wasser ausgesetzt. In verschiedenen, bereits publizierten Tests wurden die Tiere mit einer angereicherten Diät gefüttert (Carlson *et al.* 1999) oder intraperitoneal injiziert (Christiansen *et al.*,1998; Crim *et al.*, 1980; Hernández *et al.*, 1992). Zudem wurde sehr häufig mit anderen, größeren Spezies gearbeitet, beispielsweise Karpfen (*Cyprinus carpio*) oder Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*), wobei es sich meistens um adulte Tiere handelte.

1.6 Zielsetzung

In der europäischen Chemikaliengesetzgebung (ChemG, Neufassung 1994) ist festgelegt, dass neue Substanzen, darunter auch Synthesezwischenprodukte, bestimmten ökotoxikologischen Tests unterzogen werden müssen, um deren Gefährdungspotential und mögliche ökotoxikologische Risiken beurteilen zu können. Im Rahmen von Screening-Test - z.B. akute Toxizität am Fisch (OECD Guideline 203), akuter Immobilisierungstest am Wasserfloh (OECD Guideline 202), Wachstumshemmtest an Grünalgen (OECD Guideline 201) und einem Abbautest (OECD Guideline 209) - können lediglich Mortalität (LC_{50}), Zellwachstumshemmung oder ein qualitativer Hinweis auf leichte Abbaubarkeit ermittelt werden. Da Konzentrationen von Chemikalien in möglichst einfachen Testverfahren und zu einem frühen Zeitpunkt der Entwicklung ermittelt werden sollten, die auch im subletalen Bereich ohne negative Wirkung auf die Population bleiben, ist diese Screening-Testbatterie als unvollständig anzusehen.

Bei endokrin wirksamen Substanzen kann es durch eine chronische Exposition viel mehr zu einer Veränderung im Hormonstatus der Tiere kommen. Diese Veränderung kann sich dann auf die Reproduktionsfähigkeit auswirken und damit einer Population weit mehr Schaden zufügen.

Um schon in einem frühen Stadium einer Prüfstrategie mögliche negative Eigenschaften hinsichtlich einer endokrinen Wirkung erkennen zu können, ist ein *in vivo* Kurzzeittest, der aufgrund von bestimmten Markern Hinweise auf diese Eigenschaften gibt, erforderlich. Eine längerfristige Prüfung auf Entwicklungs- und Reproduktionsstörungen sollte aus tierschutzrechtlichen und ökonomischen Gesichtspunkten nur mit solchen Substanzen durchgeführt werden, bei denen Hinweise auf dieses Potential vorhanden ist.

Als Marker für endokrine Wirksamkeit bieten sich biochemische Parameter wie beispielsweise Dotterproteine (Folmar *et al.*, 1996), *Zona radiata* Proteine (Oppen-Bernsten *et al.*, 1999) oder endogene Steroidlevel (Tremblay und van der Kraak, 1999) an. In der vorliegenden Arbeit wird über die Forschung an biochemischen und molekular-biologischen Methoden berichtet und die verschiedenen Marker hinsichtlich ihrer Ausprägung unter Expositionsbedingungen untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Zucht von Fettkopfbrassen

Da für die systemischen Verträglichkeitsprüfungen, ebenso wie für den Early-life stage Test jeder Zeit frischer Laich, bzw. juvenile Fettkopfbrassen zur Verfügung stehen mußten, wurde eine eigene Zucht etabliert.

Die Zucht wurde nach der EPA (*United States Environmental Protection Agency*) Guideline 600/4-90/027F, Appendix A (1993) und Kramer *et al.* (1998) durchgeführt.

2.1.1 Auswahl der Fische

Es wurden Zuchtgruppen bestehend aus einem adulten Männchen und fünf bis sechs adulten Weibchen, bzw. zwei Männchen und zehn bis zwölf Weibchen gebildet. Die Männchen sollten einige sekundäre Geschlechtsmerkmale wie die Fetteinlagerung am Kopf (Papillen) oder eine Schwarzfärbung zumindest der Kiemendeckel aufweisen, noch vorteilhafter ist eine Streifung des gesamten Körpers. Bei Weibchen sollte lediglich beachtet werden, daß der Bauch nicht aufgebläht ist, da das auf eine eingetretene Laichstarre hindeuten kann und die Weibchen dadurch nicht mehr ablaich bereit waren.

Zudem war zu beachten, daß der Allgemeinzustand der Fische gut ist, d.h. die Schuppen glänzend anliegen, die Augen nicht aus ihren Höhlen hervortreten, keine Abmagerung und keine Wirbelsäulenverkrümmung vorlag.

2.1.2 Zuchtbedingungen

Kleine Zuchtgruppen bestehend aus 6 Tieren wurden in 25l Vollglasaquarien gehalten, größere Zuchtgruppen mit 12 Tieren in 60l Aquarien. In jedem Aquarium wurden mindestens 3 halbierte Tontöpfe als Laichhöhlen angeboten. Es mußte darauf geachtet werden, daß immer genug Laichplätze zur Verfügung standen, da geschlechtsreife Männchen sehr aggressiv um Laichhöhlen kämpfen. Um eine zu große Ablenkung der Fische zu vermeiden (beispielsweise durch vor den Becken vorbei laufende Personen) wurden die Becken an der zum Durchgang gerichteten Seite mit durchscheinender Folie (blau oder grün) beklebt.

Ein schwacher Wasserdurchfluß verhinderte eine Abnahme des gelösten Sauerstoffs und der Temperatur sowie schnelles Verschmutzen der Aquarien, dadurch wurde häufiges Putzen und damit Streß für die Fische vermieden. Aus diesem Grund wurden die hydrographischen Parameter (Temperatur, pH, O_2-Gehalt) nur jeden 2. Tag bestimmt und die Laichhöhlen ebenfalls nur an diesen Tagen kontrolliert.

Die Belichtungsdauer war auf 16h hell, 8h dunkel (ohne Dimmung) eingestellt. Der Sauerstoffgehalt des Wassers betrugt zwischen 8 ± 1mg/l, der pH 8 ± 0.5, die Temperatur 25 ± 2°C.

Das verwendete Wasser wurde in einem 400l Tank vortemperiert und über ein Gefälle in die Becken geleitet.

Sämtliche Tiere werden zweimal täglich mit aufgetauten Mückenlarven (schwarz, rot und weiß) gefüttert.

2.1.3 Aufzucht der Embryos

Die Laichhöhlen wurden dreimal pro Woche am späten Vormittag kontrolliert, da bei *Pimephales promelas* die Balz und das Ablaichen erst mit der Belichtung beginnt. Dazu wurden die Tontöpfe vorsichtig im Becken umgedreht und begutachtet. Waren Eier vorhanden, wurden die Töpfe aus dem Zuchtbecken entfernt. Die Aufzucht erfolgte in 30l Becken, welche mit Moskitonetz in 4 weitere Kammern unterteilt waren. Zur Aufzucht von juvenilen Fettkopfbrassen stellte man die Töpfe mit der größeren Öffnung nach unten auf den Boden einer Kammer und plazierte einen Sprudelstein so, daß die Eier ständig einer leichten Wasserbewegung ausgesetzt waren.

Bei einer Wassertemperatur von 25 ± 2°C schlüpften nach ca. 4 Tagen die Larven. Nach weiteren 2 - 3 Tagen ist der Inhalt des Dottersacks verbraucht und die Larven begannen zu fressen. Als Futter dienen 24h alte Salinenkrebschen (Artemien Naupliden) und herkömmliches Staubfutter (Silberhorn *et al.*, 1993).

Sobald die Larven eine Größe von etwa 0.7 – 1 cm erreicht hatten, wurden sie in größere Aquarien umgesetzt und mit aufgetauten Mückenlarven oder Cyclops gefüttert.

2.2 Verlängerter Fischtest (Systemische Verträglichkeitsprüfung) an juvenilen Fettkopfbrassen über 21 Tage

Die Tests wurde gemäß der SOP EMSG/AQ/001 modifiziert nach OECD Test Guideline 204 durchgeführt.

Im Rahmen des EMSG-Forschungsprojekts „Reproduktion und Entwicklung von Fischen unter Einfluß von endokrin wirksamen Substanzen“ sollte eine Methode entwickelt werden, mit der die endokrine Wirkung hormonell wirksamer Chemikalien in einer Kurzzeitprüfung am Fisch untersucht werden kann. Dazu wurden juvenile Fettkopfbrassen 3 Wochen lang in einem Durchflußsystem einer bestimmten Substanz ausgesetzt. Als Substanzen wurden, wie

bereits in der Einleitung beschrieben, Ethinylestradiol (EE2), Methyltestosteron (MT) und Fadrozol (F) verwendet.

Alle Substanzen wurden in subletalen Dosen eingesetzt. Hierfür wurden zuerst Range-finding-Tests gleichen Testaufbaus (s. 2.2.1) über 14 Tage durchgeführt.

2.2.1 Testaufbau

Die definitiven Tests wurden ebenso wie die Range-finding-Tests in 20l Aquarien durchgeführt, deren Füllvolumen durch eine Bohrung auf 10l begrenzt sind. Der Zulauf erfolgte über ein 5l Mischgefäß in dem sich unter ständigem Rühren die Substanzstammlösung mit frischem, vortemperiertem Leitungswasser mischte. Dieses Mischgefäß besaß einen Ablauf, der durch ein T-Stück auf zwei Replikate verteilt wurde. Insgesamt wurden pro Stunde 8l Lösung in beide Replikate geleitet, d.h. 4l pro Replikat pro Stunde.

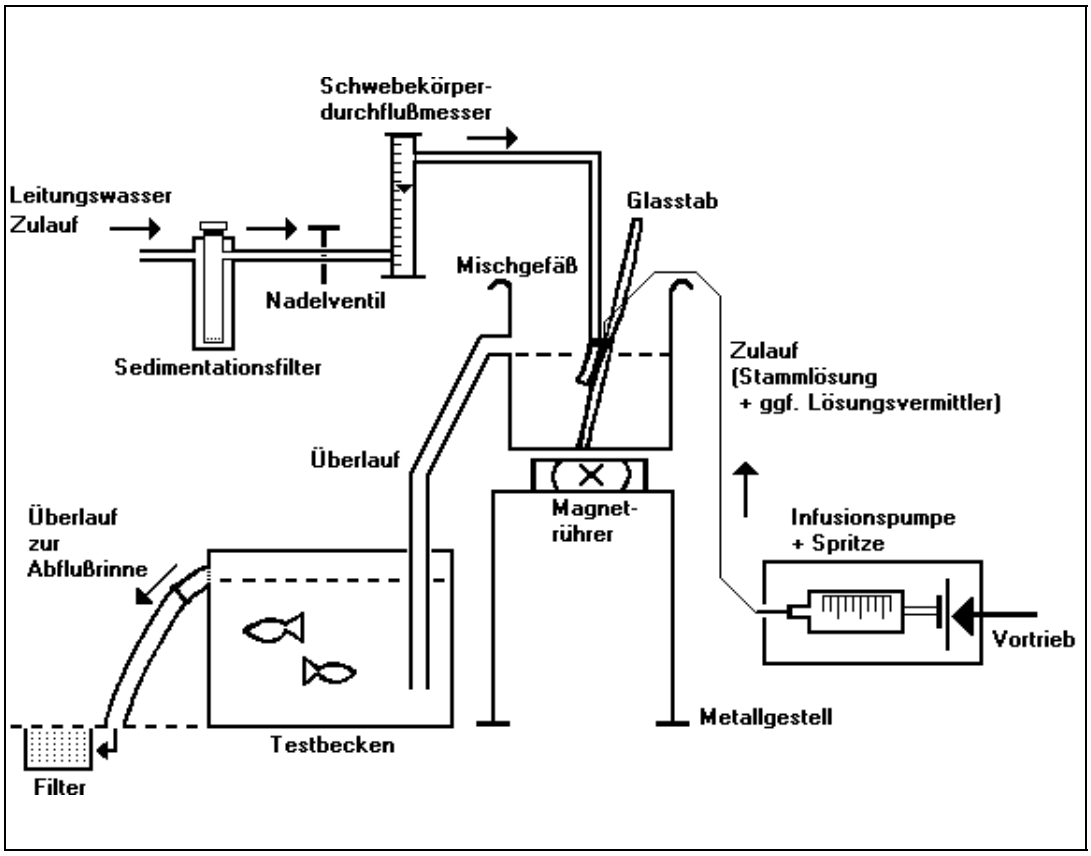

Abbildung 2.1. Schematischer Testaufbau einer systemischen Verträglichkeitsprüfung am Fisch (Abbildung aus Akute Toxizitätsprüfung am Fisch im Durchflussverfahren, Wendt, 1999)

2.2.2 Eingesetzte Tiere

Die verwendeten Fische sollten folgende Kriterien erfüllen: Gewicht ca. 150 ± 30mg, Länge ca. 20 ± 4mm. Sämtliche Tiere wurden vor dem Einsatz in den Versuch mindestens 2 Wochen akklimatisiert, wobei die hydrografischen Parameter sowie die Mortalität täglich dokumentiert wurden. Bei einer Mortalität von über 10% wurden die Fische nicht verwendet. Zur Aufzucht wurden die Jungfische mit Artemia Nauplien und aufgetauten Cyclops-Copepoden gefüttert, während der Akklimatisation wurde auf Trockenfutter umgestellt.

Für die definitiven Tests wurden 136 Fische pro Konzentration, in Gruppen zu je 8 Tieren randomisiert eingesetzt. Pro Tötungszeitpunkt pro Replikat konnte so auf 17 Fische zurückgegriffen werden. Das Alter der eingesetzten Fische betrug zwischen 3 und 5 Monaten.

2.2.3 Test Konzentrationen

Es wurde bei jedem Versuch eine Leitungswasser- und eine positiv Kontrolle (10ng EE2/l) mitgeführt, zudem wurde jede Substanz in drei verschiedenen Konzentrationen getestet.

Hierzu wurden Stammlösungen der Testsubstanz in entsalztem Wasser (VE-Wasser), bei Methyltestosteron mit Lösungsvermittler (Dimethylformamid = DMF), angesetzt und über Infusionspumpen mittels 60ml Spritzen in die Mischgefäße zudosiert.

1. Ethinylestradiol (TXST 19990138)

Gruppe 1	Leitungswasserkontrolle	
Gruppe 2	nominal 0.005µg/l	
Gruppe 3	nominal 0.010µg/l	enstprach der pos. Kontrolle
Gruppe 4	nominal 0.050µg/l	

2. Fadrozol (TXST 19990109)

Gruppe 1	Leitungswasserkontrolle	
Gruppe 2	nominal 25µg/l	
Gruppe 3	nominal 50µg/l	
Gruppe 4	nominal 100µg/l	
Gruppe 5	nominal 0.010µg/l	pos. Kontrolle

3. Methyltestosteron

Gruppe 1	Leitungswasserkontrolle	
Gruppe 2	Lösungsvermittlerkontrolle (31mg Dimethylformamid/l Testlösung)	
Gruppe 3	nominal 10µg/l	
Gruppe 4	nominal 50µg/l	
Gruppe 5	nominal 100µg/l	
Gruppe 6	nominal 0.010µg/l	pos. Kontrolle

Da Methyltestosterone nicht in den benötigten Mengen wasserlöslich ist, mußte als Lösungsvermittler Dimethylformamid (DMF) eingesetzt werden. Um eine mögliche Beeinträchtigung zu vermeiden wird die, durch die OECD Guideline 204 festgelegte Grenze von ≤ 100mg Lösungsvermittler/l deutlich unterschritten.

4. Kombinationsversuch (Methyltestosteron + Fadrozol)

Gruppe 1	Lösungsvermittlerkontrolle (31mg Dimethylformamid/l Testlösung)
Gruppe 2	nominal 10µg **MT**/l
Gruppe 3	nominal 50µg **F**/l
Gruppe 4	nominal 10µg **MT** + nominal 50µg **F**/l

2.2.4 Fütterung

Die Fettkopfbrassen wurden während der Versuche mit einer Trockenfutter Diät (AstraZeneca, Brixham, UK) gefüttert. Das Futter war zuvor auf mögliche Estrogenität geprüft worden, indem ein Eluat in einem Test mit Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*), die mit dem humane Estrogen Rezeptor transfizierten waren getestet wurde. Das Eluat zeigte keine postitive Wirkung in diesem Test. Die Fütterung erfolgte 2x täglich, mit einer Menge von ca. 2% des durchschnittlichen Körpergewichts.

2.2.5 Parameter

2.2.5.1 Hydrographische (abiotische) Messungen

Die hydgrographischen Parameter (pH, O_2-Sättigung und Temperatur) wurden täglich, der Verbrauch an Substanz-Stammlösung jeden 2. Tag und die Durchflussraten um unnötigen Streß für die Fische zu vermeiden, bei jeden Tötungszeitpunkt bestimmt. Tötungszeitpunkte waren Tag 0, 4, 7, 14 und 21, die Tötung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

2.2.5.2 Biologische Messungen und Beobachtungen

Es erfolgte eine tägliche Dokumentation der Mortalität und eine Begutachtung der Fische auf mögliche krankhafte, makroskopische oder Verhaltensänderungen. Bei einer Mortalität von > 10% in der Kontrollgruppe wurde der Versuch abgebrochen (OECD Guideline 204).

Es sollten verschiedene biochemische und molekularbiologische Parameter bestimmt werden, unter anderem die Vitellogenin- und Steroidkonzentrationen im Ganzkörperhomogenat, die Geschlechtsverteilung und die mRNA Konzentrationen des Estrogenrezeptors (ER) und des Vitellogenins (VTG). Auf die verwendeten Methoden wird in den folgenden Abschnitten eingegangen. Hierzu wurden 34 Fische zu jedem Tötungszeitpunkt (einschließlich am Tag 0 aus der Akklimatisation) den Becken entnommen

und aufgearbeitet. Von den entommenen Fischen wurde vor der Aufarbeitung die Länge und das Gewicht bestimmt, um eine Veränderung des Wachstums zu dokumentieren. Zusätzlich wurden 40 weitere Fettkopfbrassen für eine spätere Geschlechtsbestimmung separat gehalten und bis zur Ausprägung sekunkdärer Geschlechts-merkmale aufgezogen.

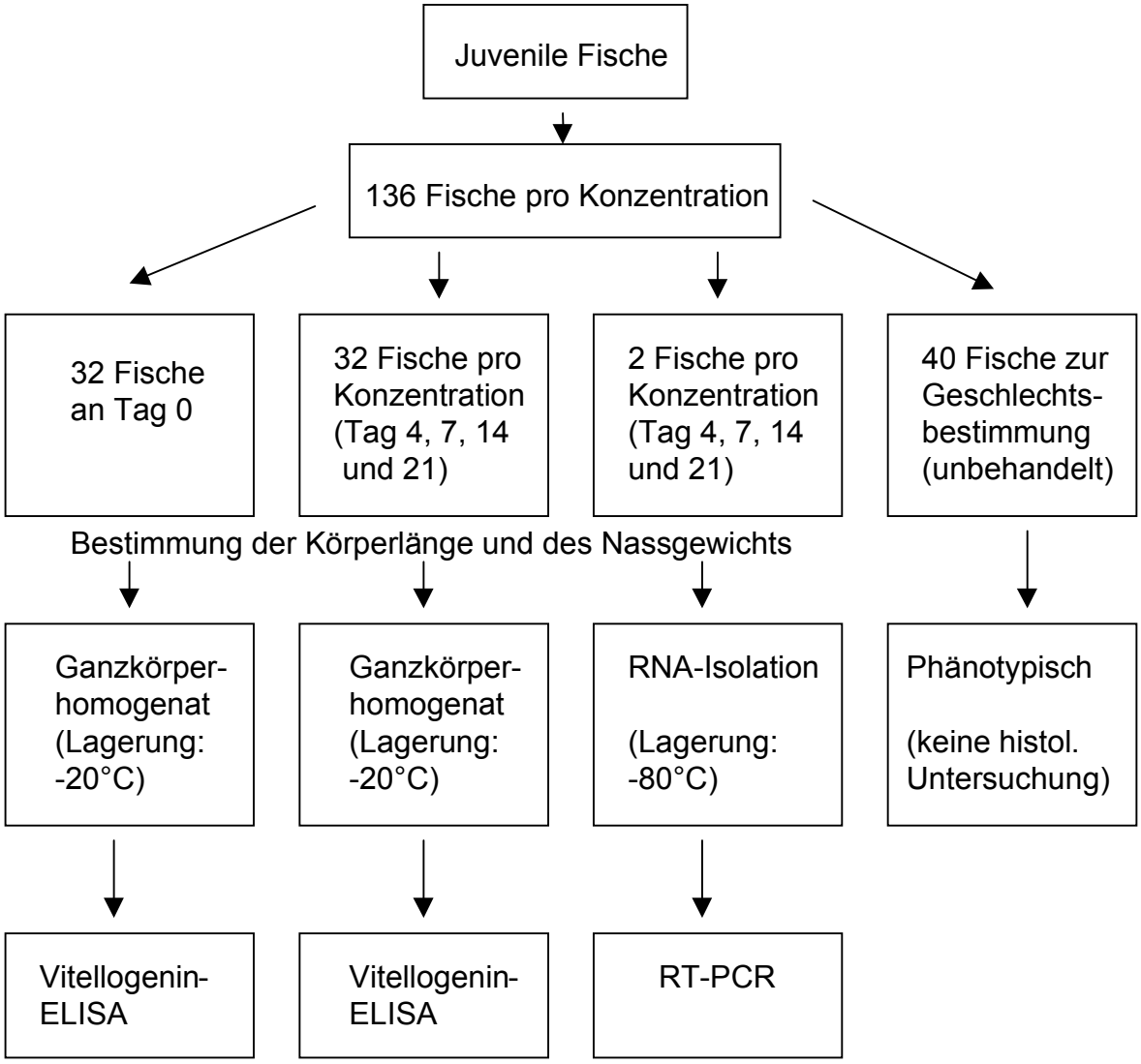

Abbildung 2.1. Schematische Darstellung der Probennahme bei einer systemischen Verträglichkeitsprüfung.

2.3 Statistische Auswertung der Kurzzeittests

Es wurde eine statistische Auswertung mit ANOVA durchgeführt, falls die Homogenität der Varianz nicht gegeben war. Im anderen Fall wurde eine Varianzanalyse und ein Student T-Test durchgeführt um die exponierten Gruppen mit der Kontrolle zu vergleichen. Wenn nur eine Leitungswasserkontrolle im Test mitgeführt wurde diente sie als Kontrolle, bei einer zusätzlichen Lösungsvermittlerkontrolle wurde diese als Kontrolle benutzt.

2.4 Early-Life Stage Test

In einem zweiten Teilprojekt sollte die längerfristige Wirkung von Chemikalien auf die Entwicklung von Fischen getestet werden. Hierfür wurde ein ELS Test (*Early-Life Stage Toxicitiy Test*) in Anlehnung an die OECD Guideline 210 durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden zunächst Manipulationen mit unbehandelten Fischeiern und -larven durchgeführt, um die Handhabung zu optimieren und Referenzdaten über Schlupfrate und Mortalität unter Kontrollbedingungen zu erhalten. Im Anschluß sollte ein ELS Test mit Methyltestosteron als Prüfsubstanz durchgeführt.

2.4.1 Testaufbau

Einen Tag vor Testbeginn, wurden sämtliche Eier aus allen Zuchtgruppen entfernt, um gewährleisten zu können, dass die verwendeten Eier nicht älter als 24h waren. An Tag 0 des Tests wurden Eier aus mindestens 3 verschiedenen Zuchtgruppen von den Laichhöhlen entfernt, gepoolt und unter einem Binokkular auf ihren embryologischen Entwicklungstand untersucht. Unbefruchtete und verpilzte Eier wurden gezählt, dokumentiert und aussortiert.

Es wurden unterschiedliche Ansätze getestet.

- Im ersten Ansatz wurden 120 Eier in vier 1l Bechergläser verteilt, mit 800ml temperiertem Frischwasser aufgefüllt, die Gläser mit Gaze abgedeckt und in ein beheiztes Wasserbad (25 ± 2°C) gestellt.
- Im zweiten Ansatz wurde mit den Eiern gleich verfahren, nur dass diesmal die Inkubation bis zum Schlupf nicht in einem Wasserbad, sondern bei Raumtemperatur (~23°C) erfolgte. Sobald die ersten Larven geschlüpft waren, wurden die Bechergläser in ein beheiztes Wasserbad (25 ± 2°C) überführt.
- Im dritten Ansatz wurden die Eier wieder im beheizten Wasserbad (25 ± 2°C) inkubiert, aber mit einer Pasteurpipette sehr vorsichtig belüftet um eine geringfügige Wasserzirkulation zu gewährleisten.
- Im vierten Ansatz kam eine speziell für den ELS entwickelte Apparatur zum Einsatz (s. Abb. 2.3). Dabei handelt es sich um einen Hebearm, der mit einem Motor verbunden war, an dem 4 Plexiglaszylinder befestigt sind, welche mit diesem Arm in zwei Aquarien auf und ab bewegt werden können. Die Plexiglaszylinder waren nach untern mit einer dichten Gaze abgeschossen und dem Wasser ein Ein- und Ausströmen zu ermöglichen, ohne dass Eier dabei verloren gehen konnten.

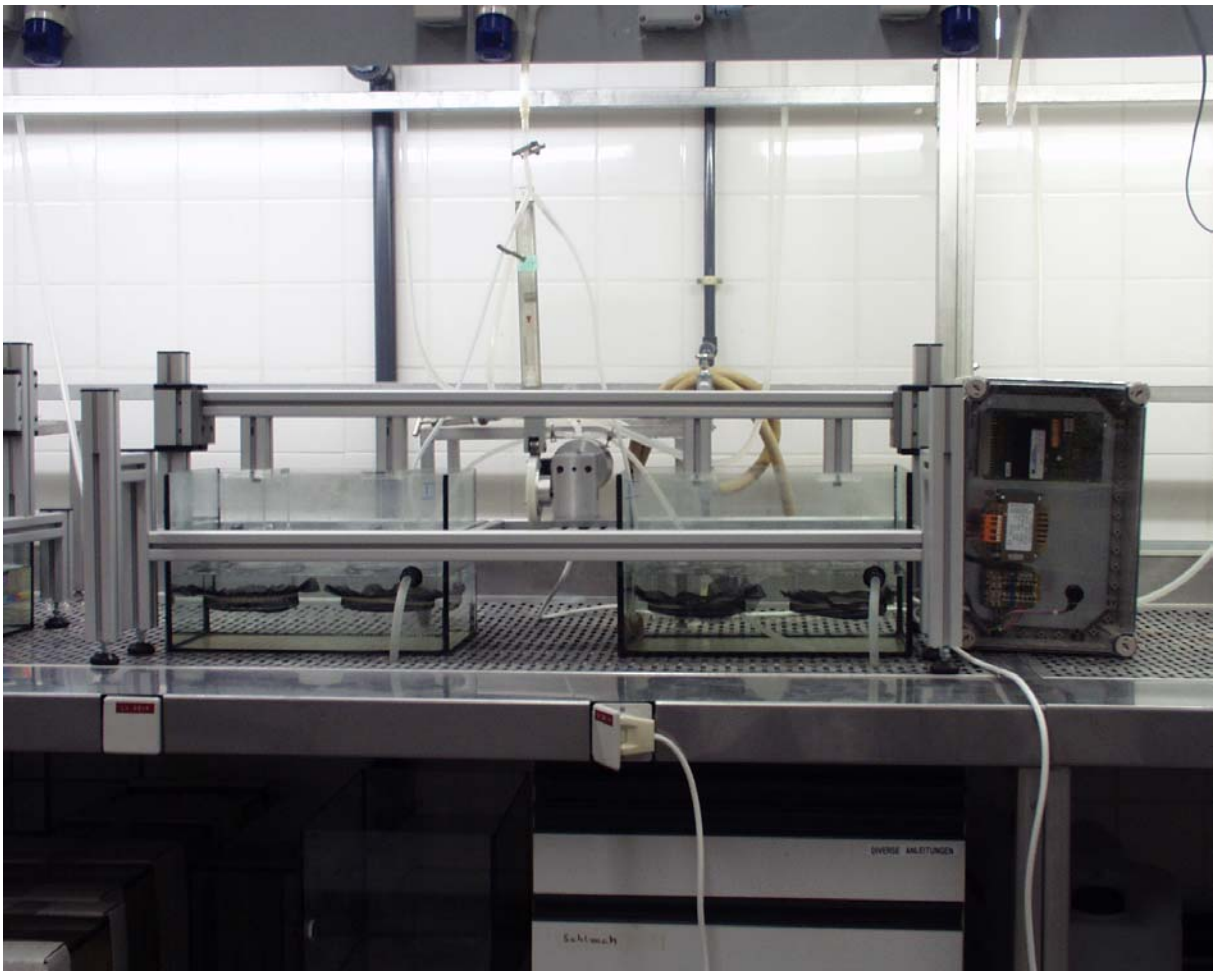

Abbildung 2.1. ELS-Apparatur zum bewegen der Eier in der Prüflösung.

Bei sämtlichen Ansätzen wurden die Eier täglich überprüft und ggf. verpilzte oder sterile Eier, noch am selben Tag soweit es möglich war entfernt und dokumentiert. Es wurde die Zeit bis zum Schlupf und die Schlupfrate erfasst, ebenso wie die Mortalität der geschlüpften Larven bis zum Tag 28 nach Schlupf (n.S.) zudem wurden die Larven makroskopisch begutachtet. Hierzu wurden die Gruppen täglich überprüft, tote Larven entfernt und Verhaltensauffälligkeiten oder Malformationen dokumentiert. Die Schlupfrate sollte >66% betragen, die Mortalität während der Aufzuchtphase sollte <30% sein. Die hydrographischen wurden täglich überprüft und dokumentiert.

Ab Tag 4 n.S. wurde mit der Fütterung der Larven begonnen. Es wurde zwischen 2-3 Mal täglich mit frisch geschlüpften Artemien Naupliden gefüttert. Die Hälterungssysteme wurden täglich von Futter- und Kotresten befreit, damit keine Verpilzung eintreten konnte.

Am Tag 28 n.S. wurden die Jungfische mit MS 222 (Ethyl-3-aminobenzoat-methansulfonat = Fischnarkotikum) bis zum Ableben anästhetisiert und das Körpergewicht und die Standardlänge (Maulspitze bis Schwanzansatz) bestimmt.

Auf diese Weise konnten folgende unterschiedliche Endpunkte erfasst werden:

- Zeit zum Beginn des Schlupfs bis Ende
- Cummulative Mortalität
- % geschlüpfte Larven pro Schlupftag
- Länge und Gewicht der Jungfische nach 28 Tage (n.S.)
- Zahl der Fische mit abnormen Veränderungen

2.4.2 ELS-Vorversuche mit Methyltestosteron

Für diesen Test, mit Methyltestosteron als Prüfsubstanz, wurde ebenfalls Dimethylformamid als Lösungsvermittler eingesetzt. Vor dem definitiven Test wurden ein *Range-finding* Tests durchgeführt mit den Substanzkonzentrationen 0.1, 1 und 10µg/l und ein weiterer mit den Konzentrationen 30, 90 und 180µg/l. Dazu wurden je 8 bzw. 10 Eier pro Konzentration in Bechergläsern bis 7 Tage n.S. exponiert. Bei diesen Dosisfindungs-Tests wurde die Schlupfrate und die Mortalität überprüft.

Die eingesetzten Eier und Larven für den definitiven Test sollten bis zum Tag 28 n.S. in einem Durchflussystem (4l/h) verschiedenen Methyltestosteron Konzentrationen ausgesetzt, zusätzlich wurde eine Leitungswasser- und eine Lösungsvermittlerkontrolle mitgeführt. Hierzu wurden Stammlösungen der Testsubstanz in VE-Wasser mit Lösungsvermittler angesetzt und über Infusionspumpen mittels 60ml Spritzen in ein Mischgefäß zudosiert.

Test Konzentrationen:

Gruppe 1	Leitungswasserkontrolle
Gruppe 2	Lösungsvermittlerkontrolle (DMF + Wasser / 1:4 = 61mgDMF/l)
Gruppe 3	nominal 10µg MT/l
Gruppe 4	nominal 30µg MT/l
Gruppe 5	nominal 90µg MT/l
Gruppe 6	nominal 180.0µg MT/l

Es wurden jeweils 20 Eier pro Plexiglasröhre eingebracht, d.h. 40 Eier pro Gruppe. Die Eier wurden von mindestens 3 Zuchtgruppen gewonnen und der Laich gepoolt, bevor er auf die Kammern aufgeteilt wurde.

Bei dem definitiven Test sollten zustätzliche Endpunkte bestimmt werden:

- Vitellogeningehalt des Ganzkörperhomogenats der Jungfische 28 Tage n. S.
- Geschechtsentwicklung der Jungfische nach der Exposition

2.5 Kompetitiver Vitellogenin ELISA (*Enzyme linked Immunosorbent Assay*)

Der ELISA wurde gemäß der SOP EMSG/AQ/002 und SOP EMSG/AQ/003, modifiziert nach Tyler *et al.* 1999 durchgeführt.

Vitellogenin wird in der Leber von weiblichen oviparen (eierlegenden) Vertebraten synthetisiert, anschließend in die wachsende Oocyte incorporiert und proteolytisch in kleinere Dotterproteine gespalten (Parks *et al.* 1999).

Dieses Protein wurde im Ganzkörperhomogenat von behandelten oder unbehandelten Fettkopfbrassen mit Hilfe eines ELISAs nachgewiesen. Hierzu wurde gereinigtes Karpfen Vitellogenin (Tyler und Sumpter, 1990) an eine *high binding* -Mikrotiterplatte adsorbiert. Parallel dazu wurde in einer zweiten *low binding* -Mikrotiterplatte die zu messende Probe, bzw. die Eichstandards (ebenfalls Karpfen Vitellogenin) mit einem primären Antikörper inkubiert. An Tag 2 wurden die restlichen freien Bindungsplätze der beschichteten Platte mit BSA abgesättigt und danach der Inhalt der Standard Platte in die beschichtete Platte transferiert. In der folgenden Inkubationszeit banden die restlichen, nicht an Antigen gebundenen, Vitellogenin- Antikörper an das Karpfen Vitellogenin an der Plattenwandung. Diese Antikörper wurden anschließend mit einem enzymkonjugierten anti-Kaninchen Antikörper markiert und unter Substratumsatz (o-Phenylenediamin) nachgewiesen. Der Farbumschlag des enzymatisch oxidierten Substrats war hierbei der Menge des Vitellogenins umgekehrt proportional (s. Abb. 2.4).

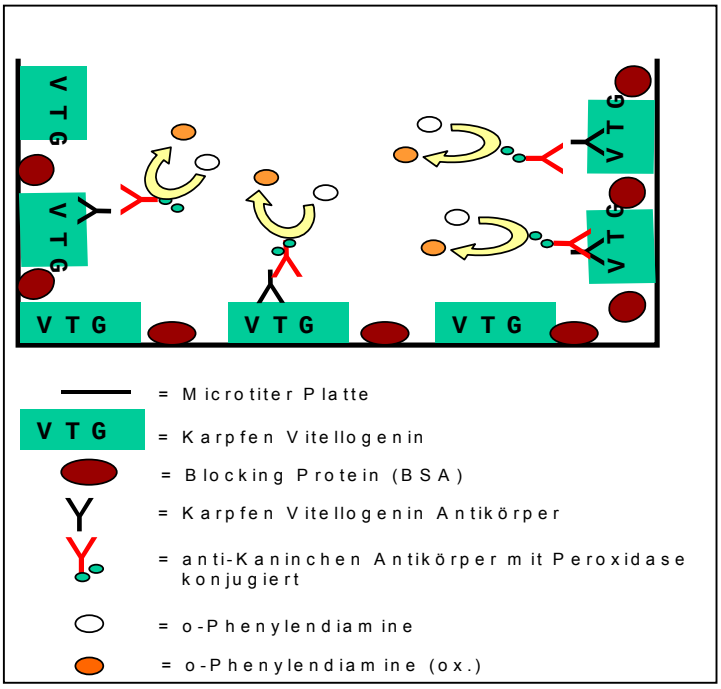

Abbildung 2.1. Schematische Darstellung des VTG-ELISAs.

Die Auswertung erfolgt über eine Eichkurve, die anhand einer Verdünnung eines gereinigten Vitellogeninstandards (500 ng VTG / 60µl) erstellt wurde.

2.5.1 Homogenisation

Um das Vitellogenin im Ganzkörperhomogenat zu messen, wurden die in flüssigen Stickstoff getöteten Fische aufgetaut, gewogen, die Körperlänge gemessen und dokumentiert, anschließend wurden die Fische kopfüber in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, es wurde Phosphatpuffer (Lsg. 2.4.4.6) zugegeben (1µl pro mg Fisch) und von Hand mit einem Micropistill homogenisiert. Das Homogenat wurde mit 8000 g für 7 Minuten abzentrifugiert, nur der Überstand wurde für den ELISA eingesetzt.

Dieser Überstand wurde je nach erwartetem Wert entweder 1:100, 1:1000 oder 1:10000 mit Blockingpuffer (Lsg. 2.4.4.2) verdünnt. Bsp: Ganzkörperhomogenat unbehandelter juveniler Fische 1:100, Ganzkörperhomogenat mit Östrogen behandelter Fische 1:1000, Serumproben behandelter Fische 1:10000.

2.5.2 Kontrollen

2.5.2.1 Max-Wert

Der Max-Wert gab die maximal mögliche Bindung freien Vitellogenin-Antikörpers an das Karpfen-Vitellogenin an der Plattenwandung an. Bei diesen Wells wird der stärkste Farbumschlag gemessen.

2.5.2.2 NSB-Kontrolle

Bei dieser Kontrolle wurden die Wells der beschichteten Platte mit Coating Puffer ohne Vitellogenin inkubiert. Dies bedeutet, der freie Vitellogenin-Antikörper hatte keine Möglichkeit spezifische Bindungen einzugehen. In diesen Wells durfte kein augenscheinlicher Farbumschlag zu sehen sein. Die Extinktionswerte dieser Wells wurden von allen anderen abgezogen, da es sich in diesem Falle um eine nicht spezifische Bindung handelte (= *Blank*).

2.5.3 Durchführung

2.5.3.1 Tag 1

2.5.3.1.1 Beschichten der Platten (Nunc = *High binding plate*)

- 100µl Coatingpuffer (Lsg. 2.4.6.4) mit 60ng VTG / Well in alle Wells außer NSB
- in NSB 100µl Coatingpuffer ohne VTG
- Platte abkleben, über Nacht bei ca. 4°C

2.5.3.1.2 Eichstandard und Probenplatte (Limbro = *Low binding plate*)

- in die unten aufgeführten Wells, 60µl Blockingpuffer (BB = Lsg. 2.4.4.2)

  (NSB, MAX, ST2 - ST15)
- 60µl Eichstandard (500ngVTG/60µl fertig verdünnt von

  der Universität Brunel zur Verfügung gestellt) in ST1 und ST2
- Standardverdünnungsreihe: 1:1 Verdünnungen von ST2 bis ST12

  ST2 durch mehrfaches auf- und abpipettieren gut durchmischen, 60µl aus ST2 in ST3,wieder gut durchmischen, 60µl aus ST3 in ST4 usw., so immer 1:1 verdünnt, die letzten 60µl aus ST12 verwerfen
- Proben (= Überstände der homogensierten Fische, s. 2.4.1) 1:100 in BB verdünnen
- 60µl verdünnte Überstände pro Well pipettieren (mind. Doppelwerte).
- 1. Antikörper (=AK) 1:500 in BB verdünnen (Vorverdünnung 1:100)

  60µl 1. AK / Well (Antikörper wurd ebenfalls vorverdünnt von der Universität

  Brunel zur Verfügugn gestellt)
- Platte abkleben, über Nacht ca. 4°C

2.5.3.2 Pipettierschema

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	**ST1**	**ST2**	**ST3**	**ST4**	**ST5**	**ST6**	**ST7**	**ST8**	**ST9**	**ST10**	**ST11**	**ST12**
B	**ST1**	**ST2**	**ST3**	**ST4**	**ST5**	**ST6**	**ST7**	**ST8**	**ST9**	**ST10**	**ST11**	**ST12**
C	**MAX**	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11
D	**MAX**	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11
E	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20	S21	S22	S23
F	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20	S21	S22	S23
G	S24	S25	S26	S27	S28	S29	S30	S31	S32	S33	S34	**NSB**
H	S24	S25	S26	S27	S28	S29	S30	S31	S32	S33	S34	**NSB**

ST.. = Karpfen VTG-Standard, verdünnt von 500 – 0.244ng/l

MAX = maximale Bindung

NSB = nicht spezifische Bindung

S.. = unbekannte Proben

2.5.3.3 Tag 2

2.5.3.3.1 Beschichtete Platte

- 3x mit Waschpuffer (Lsg. 2.4.4.1) vorsichtig waschen (kleinen Spritzflasche), danach gut ausklopfen
- 150µl BB/ Well
- mit Klebefolie abkleben, 30 min, bei ca. 37°C im Brutschrank inkubieren

2.5.3.3.2 Transfer

- beschichtete Platte 3x waschen (Waschpuffer)
- 100µl der Standardplatte von Reihe A in die Reihe A der Coated-Plate überführen
- abkleben, exakt 60 min, bei RT inkubieren

2.5.3.3.3 2. AK

- α rabbit IgG-Peroxidase-Konjugat 1:2000 in BB verdünnen;
  (Bsp. für eine Platte12ml BB : 6µl 2. AK)
- Platte 3x waschen (Waschpuffer)
- 125µl 2. AK / Well
- abkleben, ≥ 2h, bei ca. 37 °C im Brutschrank inkubieren

2.5.3.3.4 Farbreaktion

- Substratpuffer ansetzen: 10 ml Substratpuffer (2-Komponentengemisch Lsg. 2.4.4.3)
  + eine 5mg OPD-Tablette, ca. 5 min stehen lassen
  bis sie vollständig aufgelöst ist.
  direkt vor der Benutzung
  5µl Wasserstoffperoxid zugeben
- Platte 3x waschen (Waschpuffer)
- 125µl Substratpuffer / Well
- abkleben, 50 min, bei RT im Dunkeln inkubieren

2.5.3.3.5 Abstoppen

- 30µl 3M Schwefelsäure (Lsg. 2.4.4.5) zugeben
- ca.10 min, RT, im Dunkeln abgedeckt stehen lassen

2.5.3.3.6 ELISA-Reader

- 450nm / 5sek schütteln

anschließend die gemessene Platte unter dem Abzug vollständig ausdampfen lassen

2.5.4 Verwendete Puffer

2.5.4.1 Waschpuffer

Zusammensetzung:	Herstellung bei Endvolumen 1000 ml:
0.01M NaH_2PO_4	1.2g
0.90% NaCl	9.0g
0.05% Tween 20	500µl
	ad 1000ml VE-Wasser

pH : 7.4
Lagerung : RT
Haltbarkeit : 6 Monate

2.5.4.2 Blockingpuffer

Zusammensetzung:

Waschpuffer (Lsg. 2.4.4.1)	100ml
Mit 1% BSA	1g

Lagerung : RT

Haltbarkeit : 1 Tag

2.5.4.3 Substratpuffer

Substratpuffer-Grundlage (2-Komponenten-Gemisch)

Komponente A:

0.2M Na_2HPO_4	5.68g/200ml VE-Wasser

Komponente B:

0.1M Zitronensäure	3.84g/200ml VE-Wasser

Mischung: 25.7ml Komponente A
+ 24.3ml Komponente B
+ 50ml VE-Wasser

Mischung auf pH 5.0 einstellen

Lagerung : RT

Haltbarkeit : 6 Monate

Substratpuffer Fertigstellung:

Die Fertigstellung des Substratpuffers erfolgt direkt vor Gebrauch

2-Komponentengemisch (Pkt. 2.4.4.3)	10ml
OPD-Tablette	1 Stk.

Ca. 5 min. stehenlassen, bis die Tablette vollständig gelöst ist.

Wasserstoffperoxid	5µl

2.5.4.4 Coatingpuffer

0.05M Na_2CO_3	2.1g
	ad 500ml VE-Wasser

pH : 9.6

Lagerung : RT

Haltbarkeit : 6 Monate

2.5.4.5 Stopplösung Schwefelsäure 3 M

Lagerung : RT

Haltbarkeit : 6 Monate

2.5.4.6 Phosphatpuffer (2-Komponenten-Gemisch)

1M K_2HPO_4	40ml
1M KH_2PO_4	10ml
	ad 1000ml VE-Wasser

pH = 7.4

Lagerung : RT

Haltbarkeit : 6 Monate

2.6 Kompetitiver Steroid-ELISA

Mit Hilfe dieses *Enzyme linked Immunosorbent Assays* (modifiziert nach Ciusset *et al.*, 1994) sollten endogene Steroidkonzentrationen in Fisch-Ganzkörperhomogenaten bestimmt werden. Es handelte sich hierbei ebenfalls um einen kompetitiven ELISA.

Es wurde eine *High-binding plate* mit sekundärem Antikörper beschichtet. Dieser bindet einen primären Antikörper, welcher das endogene Steroid der Probe oder des Standards, ebenso wie einen zugeführten Tracer (Steroid-CMO-Achetylcholinesterase-Konjugat) erkennen kann. Nach einer Inkubationszeit in der die Antikörperbindung erfolgte, wurde überschüssiger Tracer durch Waschen entfernt und eine Farbreaktion auf Grund einer enzymatischen Reaktion durch Zugabe von Ellmans Reagenz (5,5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoesäure = DTNB) hervorgerufen. Dabei wurde, durch die am Tracer gebundene Achetylcholinesterase (=AChE) Achetylcholin gespalten, hierbei wurden SH-Gruppen frei, wodurch es zu einer Gelbfärbung des Ellmans Reagenz kam. Die Konzentration des Steroids in der Probe war somit umgekehrt proportional zur Stärke des Farbumschlags.

Der hier beschriebene Prozess beinhaltet 3 Schritte:

a) Tracer-Präparation
b) Checkerboard-Titration
c) Steroid-ELISA

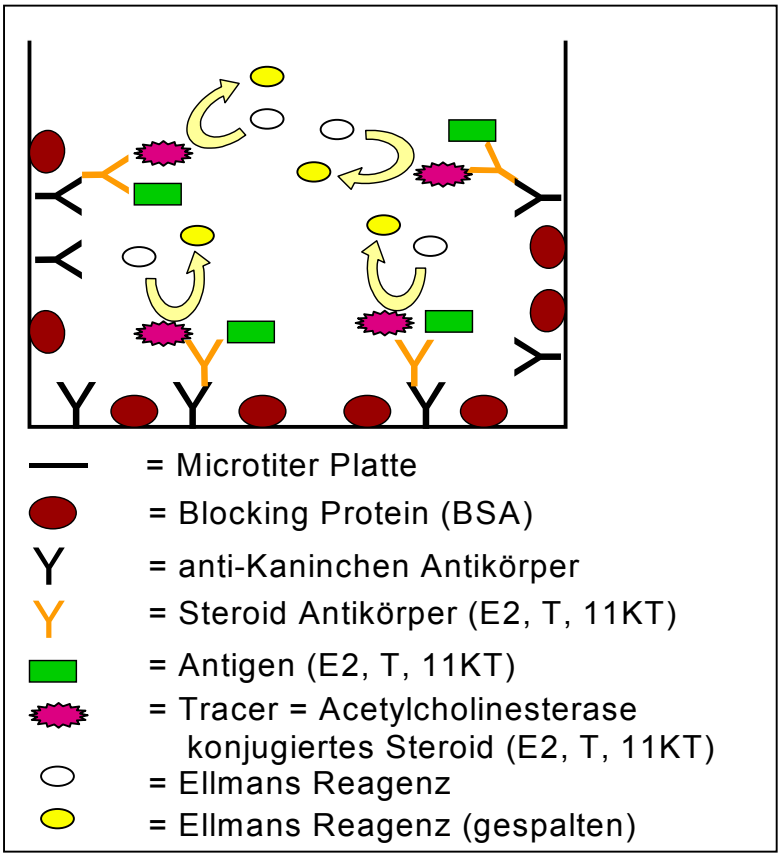

Abbildung 2.1. Schematische Darstellung des Steroid-ELISAs.

2.6.1 Tracer-Präparation

Hier erfolgte die Bildung eines Steroid-Carboxy-methoxylamin-hemihydrochlorid (CMO) - Konjugats mit einer anschließenden Kopplung der AChE an das CMO.

2.6.1.1 CMO-Kopplung

2.6.1.1.1 Kopplungsreaktion

Auf diese Weise konnten nur Steroide mit einer Ketogruppe an C3 gekoppelt werden, beispielsweise Testosteron und 11-Ketotestosteron, Estradiol-CMO wurde käuflich erworben.

- In einem Glasgefäß wurden 1.0mg Steroid + 1.1mg CMO + 3.0mg Na-Acetat mit 100µl Methanol gemischt (stark vortexen, 40 sek. Ultraschallbad)

  Inkubation über Nacht bei ca. 4°C

2.6.1.1.2 Präzipitation, Extraktion und Dünnschicht-Chromatographie

- Präzipitation durch 250µl saures Wasser (mit Eisessig, pH 2),

  vortexen, 10 min Inkubation
- Extraktion mit 3ml Ethylacetat, 30 min in einem Überkopfschüttler, anschließende Zentrifugation: 10 min, 700g, organische Phase in ein Glasscintillationsgefäß (Packard Vial, 20ml) überführen.
- Dünnschicht-Chromatographie zur Überprüfung der Kopplung: 10µl der organischen Phase langsam auf die Startfront einer halbierten TLC-Platte spotten (es sollte dabei kein sehr großer Fleck entstehen) daneben ca. 25µl Steroidstandard (1mg/ml abs. EtOH) als Kontrolle auftragen.

  Laufzeit: 50 min in TLC-B5 (Chloroform : Methanol; 95:5), Visualisierung unter UV-Licht.

  Das gekoppelte Steroid wandert nur sehr wenig von der Lauffront weg, im Gegensatz zum ungekoppelten.
- Die restliche organische Phase wird unter Vakuum eingeengt.

Bei diesem Prozess entstanden ca. 0.5-1.0mg gekoppeltes Steroid-CMO.

2.6.1.2 Acethylcholinesterase-Präparation

2.6.1.2.1 Trypsinierung der AChE

- Anlösen von 1mg AChE in 500µl Phosphatpuffer pH 7 (Lsg. 2.6.6.2)
- Zugabe von 25µl Trypsin-Stammlösung (25µg/ml Phosphatpuffer pH 7)
- Inkubation über Nacht bei ca. 4°C

2.6.1.2.2 Dialyse

- Ca. 5-8cm Dialyseschlauch, 2h in VE-Wasser äquilibrieren
- Vorsichtiges Einfüllen der trypsinierten AChE in den Dialyseschlauch, Verschluß durch Dialyseklammern.
- Die Dialyse erfolgt durch Boratpuffer pH 8.5 (Lsg. 2.6.6.3) über ~ 24h, dabei sollte der Puffer mindestens 4x ersetzt werden (Pufferverbrauch ca. 2l)

2.6.1.3 Konjugation

2.6.1.3.1 Aktivierung des Steroid-CMO

- Anlösen des eingetrockneten Extrakts in 1ml absolutem EtOH (mittels Vortex und Ultraschallbad), aliquotieren in 174µl Fraktionen, anschließend Eintrocknen der Fraktionen unter dem Abzug (müssen absolut trocken sein, da sonst eine Hydrolyse des Dicyclocarbodiimid eintritt).
- Lösen des getrockenten Steroid-CMO in 32µl frischem N-Hydroxysuccinimid (1mg/ml Dimethylformamid) und 38µl frischem Dicyclocarbodiimid (2mg/ml Dimethylformamid)
- Inkubation über Nacht, RT im Dunkeln.

2.6.1.3.2 Konjugation des aktivierten Steroid-Konjugats mit der AChE

- 200µl AChE (s. 2.6.1.2.2) mit 30µl aktivierten Steroid-CMO (s. 2.6.1.3.1) mischen
- Inkubation: 2h, RT im Dunkeln
- Nach der Inkubation vorsichtiges Mischen mit 200µl Chromatographie-Puffer (Lsg. 2.6.6.4) um eine Präzipitation auf der Säule zu vermeiden.

2.6.1.3.3 PD-10 Säulenlauf

- Deckelkappe der Säule entfernen, Lagerungflüssigkeit verwerfen, Bodenkappe abschneiden
- Äquilibrierung mit 3x 4.5ml Chromatographie-Puffer pH 7.4
- Vor dem Trockenlaufen der Säule vorsichtige Zugabe der 430µl Konjugationsansatzes (s. 2.6.1.3.2), sobald diese Lösung in die Säule eingelaufen ist, Zugabe von 2.07ml Chormatographie-Puffer (Endvolumen: 2.5ml)
- Elution mit 4ml Chromatographie-Puffer, Auffangen von ca. 0.5ml-Fraktionen
- Waschen der Säule mit 4.5ml Chromatographie-Puffer, anschließend Schließen der Bodenkappe, auffüllen der Säule mit 2-3ml Chromatographie-Puffer, Schließen der Deckelkappe und aufrechte Lagerung bei 4°C, um eine mehrfache Verwendung der Säulen zu gewährleisten.
- Alle gesammelten Fraktionen werden auf AChE-Aktivität getestet, indem man 1µl abnimmt und mit 175µl Ellman Reagenz (Lsg. 2.6.6.6) in einer Mikrotiterplatte mischt. Nach 2h wird die Extinktion bei λ 405 nm (5 sek schütteln) bestimmt, sämtliche Fraktionen mit einer OD über 1.5 werden gepoolt.

  Kurzzeitige Lagerung bei 4°C, länger bei –20°C (ca. 3 Monate)

2.6.2 Schematische Darstellung des Ablaufs einer Tracerpräparation

	Steroid-CMO	AChE
Tag 1	CMO-Konjugation	Trypsinierung
Tag 2	Präzipitation Extraktion TLC Eintrocknen Aktivierung	Dialyse
Tag 3	AChE-Steroid-Kopplung PD-10-Säule Nachweis mit Ellman Reagenz	

2.6.3 Checkerboard-Titration

Dieser Schritt legte die spezifischen Assay-Bedingungen, Antikörper- und Tracer-Verdünnungen, fest.

2.6.3.1 Beschichten der Platte (Costar *ultralow-binding*)

- 150µl/Well anti-Kaninchen Antikörper in Kaliumphosphat-Puffer pH 7.4 (Lsg. 2.6.6.9) (1:3125),

  Platte abkleben
- Inkubation über Nacht, ca. 4°C
- 100µl Steroid-Blocking-Puffer pH 7.4 (SBB, Lsg. 2.6.6.8) zugeben
- Inkubation über Nacht, ca. 4°C, oder wenn die Platte sofort benötigt wird mind. 2h, RT
- Lagerung: 4°C, ≤ 1 Monat, abgeklebte Platte

2.6.3.2 Checkerboard-Titration

- 3 maliges Waschen einer beschichteten Platte mit Waschpuffer pH 7.4 (Lsg. 2.6.6.7)
- Beschriften der Platte wie folgt (die Pfeile geben nur die Verdünnungsrichtung an):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Z/X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X/NSB
B	Y					↓						
C	Y					↓						
D	Y	→→	→→	→→	→→	↓→→	→→	→→	→→	→→	→→	
E	Y					↓						
F	Y					↓						
G	Y					↓						
H	Y					↓						

- 100µl Steroid-Assay-Puffer (SAP, Lsg. 2.6.6.5) in alle Wells außer Z
- 100µl Steroid-Antikörper (AK) in alle Y-Wells, 200µl in Z (AK-Verdünnung, doppeltkonzentriert, da noch ein weiterer Verdünnungschritt folgt).
- 1 : 1 Verdünnungsreihe von Reihe 1 bis Reihe 11 (mit der Pipette mischen, 100µl aus Reihe 1 in Reihe 2.....bis Reihe 11, die letzten 100µl verwerfen)
- Reihe 12 kein Antikörper ⇒ NSB (siehe VTG-ELISA, 2.5.2.2)

- 100µl Tracer (wiederum nur die ½ der gewünschten Anfangsverdünnung) in alle X-Wells
- 1 : 1 Verdünnungsreihe von Reihe A bis Reihe H (s.o.)
- 50µl SAP in jedes Well (Endvolumen 150µl; enspricht Endvolumen im ELISA)
- Inkubation: 2h, RT
- 3x Waschen der Platte
- 175µl Ellman Reagenz (Lsg. 2.6.6.6) in jedes Well
- Inkubation: über Nacht, RT im Dunkeln, abgeklebte Platte
- ELISA-Reader λ = 405nm (5 sek schütteln)
- Graphische Darstellung Tracer- oder AK-Verdünnung auf der X-Achse, Extinktion auf der Y-Achse.
- Auswählen der Verdünnungen, bei der gewählten Inkubationszeit ca. eine Extinktion von 1.5 erreicht hat.
- Diese Verdünnungen werden 4fach konzentriert in den folgenden ELISAs eingesetzt (es werden nur 25µl Tracer bzw. AK verwendet; Bsp: beste AK-Verdünnung war 100µl 1:6400, im ELISA 25µl 1:1600 einsetzten)

2.6.4 Probenvorbereitung

- Fische in flüssigen Stickstoff töten, wiegen, vermessen und in Phosphatpuffer (s. 2.6.6.2) mit Hilfe eines Micropistills homogenisieren (s. 2.5.1). Es wurden hier bereits fertige Überstände aus den definitiven Tests verwendet, bei denen die VTG-Bestimmung abgeschlossen war.
- Überführen der gesamten Probe (kompletter Überstand eines Fisches) in ein 20ml Reagenzglas
- Extraktion in 3ml Diethylether, 30 min Überkopfschüttler, RT
- Zentrifugation: 5 min, ~1000g, 4°C (Hettich)
- Obere organische Phase in ein Glas Packard Vial dekandieren (ausfrieren in MeOH/Trockeneis oder flüssigem Stickstoff)
- Unter einem Abzug auf einer Heizplatte einengen.
- Lösen des Extrakts in SAP (5 sek vortex, 30 sek Ultraschallbad)
- Gelöster Extrakt muß sofort verwendet werden.

2.6.5 Assay

- Beschichtete Platte (s. 2.6.3.1) 3x mit Waschpuffer pH 7.4 waschen
- Pipettierschema:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	**ST1**	**ST2**	**ST3**	**ST4**	**ST5**	**ST6**	**ST7**	**ST8**	**ST9**	**ST10**	**MAX**	**NSB**
B	**ST1**	**ST2**	**ST3**	**ST4**	**ST5**	**ST6**	**ST7**	**ST8**	**ST9**	**ST10**	**MAX**	**NSB**
C	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
D	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
E	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20	S21	S22	S23	S24
F	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20	S21	S22	S23	S24
G	S25	S26	S27	S28	S29	S30	S31	S32	S33	S34	S35	S36
H	S25	S26	S27	S28	S29	S30	S31	S32	S33	S34	S35	S36

ST.. = Steroid-Standard, verdünnt von 400 – 0.78pg/Well

MAX = maximale Bindung (nur Tracer und AK, kein Steroid)

NSB = nicht spezifische Bindung (kein Steroid-AK)

S.. = unbekannte Proben

- 100µl SAP in die Wells ST1 – ST10, MAX und NSB.
- 92µl SAP in ST1 + 8µl 100ng/ml Standard (Lsg. 2.6.6.10)
- 1 : 1 Verdünnungsreihe von Reihe A/B 1 bis Reihe AB 10 (gut mit der Pipette mischen, 100µl aus Reihe 1 in Reihe 2.....bis Reihe 10, die letzten 100µl verwerfen).
- 100µl in SAP gelöste Probe (Doppelwerte) in S1 bis S36.
- In jedes Well 25µl Tracer (Verdünnung in SAP siehe Checkerboard).
- In jedes Well, außer NSB, 25µl AK (Verdünnung in SAP siehe Checkerboard).
- In NSB 25µl SAP.
- Inkubation: 2h, RT, Platte abkleben
- Platte 3x waschen
- 175µl Ellman Reagenz in jedes Well
- Inkubation: über Nacht, RT, Platte abkleben (idealerweise sollte die OD der maximalen Bindung bei ca. 1.5 liegen)
- Reader: λ = 405nm nach 5 sek schütteln

2.6.6 Verwendete Puffer

2.6.6.1 Stammlösung C (PPBS)

Zusammensetzung:	Herstellung bei Endvolumen 2500ml:
1M Kaliumphosphat	457g K_2HPO_4 x 3 H_2O
	67g KH_2PO_4
1.55M NaCl	225g
	ad 2500ml VE-Wasser

pH: 7.4
Lagerung: RT
Haltbarkeit: 6 Monate

2.6.6.2 0.1M Phosphat-Puffer

2-Komponenten-Gemisch

Komponente X:	
0.2M Na_2HPO_4	2.84g/100ml
Komponente Y:	
0.2M NaH_2PO_4	2.4g/100ml
Mischung:	57.7ml Komponente X
	42.3ml Komponente Y

pH: 7.4
Lagerung: RT
Haltbarkeit: 6 Monate

2.6.6.3 0.1M Boratpuffer

Zusammensetzung:	Herstellung bei Endvolumen 100ml:
0.1M Borsäure	618mg
	ad 100ml VE-Wasser

pH: 8.5
Lagerung: RT
Haltbarkeit: 6 Monate

2.6.6.4 Chromatographie-Puffer

Zusammensetzung:	Herstellung bei Endvolumen 1000ml:
0.01M Tris	1.32g TRIZMA®HCl
	0.194g TRIZMA®Base
0.01M $MgCl_2$	2.03g
1M NaCl	58.44g
0.15mM Na-Azide	150µl (1M Stammlsg)
	ad 1000ml VE-Wasser

pH: 7.4
Lagerung: RT
Haltbarkeit: 6 Monate

2.6.6.5 Steroid-Assay-Puffer

Zusammensetzung:	Herstellung bei Endvolumen 1000ml:
0.1M PPBS	100ml Stammlsg. C
1mM EDTA	370mg
0.1% BSA	1g
0.15mM Na-Azide	150µl (1M Stammlsg)
	ad 1000ml VE-Wasser

pH: 7.4
Lagerung: 4°C
Haltbarkeit: 6 Monate

2.6.6.6 Ellman Reagenz Stammlösung

Zusammensetzung:	Herstellung bei Endvolumen 20ml:
0.02M PPBS	20ml Stammlsg. C
0.75mM Acetylthiocholin	200mg
0.5mM DTNB	215mg

Lagerung: -20°C in 0.4ml Aliquots
Haltbarkeit: 6 Monate
Vor dem Einsetzen mit 20ml VE-Wasser verdünnen.

2.6.6.7 Waschpuffer

Zusammensetzung:	Herstellung bei Endvolumen 5000ml:
0.02M PPBS	100ml Stammlsg. C
0.05% Tween-20	2.5ml
	ad 5000ml VE-Wasser

pH: 7.4
Lagerung: RT
Haltbarkeit: 6 Monate

2.6.6.8 Steroid-Blocking-Puffer

Zusammensetzung:	Herstellung bei Endvolumen 200ml:
0.1M PPBS	20ml Stammlsg. C
1mM EDTA	370mg
25mM Na-Azide	1ml (1M Stammlsg)
3% BSA	6g
	ad 200ml VE-Wasser

pH: 7.4
Lagerung: 4°C
Haltbarkeit: 6 Monate

2.6.6.9 0.05M Kaliumphosphat-Puffer

2-Komponenten-Gemisch

<u>Komponente A</u>	
1M K_2HPO_4	34.8g/200ml VE-Wasser
<u>Komponente B</u>	
1M KH_2PO_4,	27.9g/200ml VE-Wasser
Mischung:	40ml Komponente A
	10ml Komponente B
	ad 1000ml VE-Wasser

pH: 7.4
Lagerung: RT
Haltbarkeit: 6 Monate

2.6.6.10 Steroid-Standard Herstellung

Herstellung einer 1mg/ml Stammlösung in abs. EtOH

Verdünnung: 10µl Stock 1 (1mg/ml) → + 990µl 25% EtOH → 10µg/ml

10µl Stock 2 (10µg/ml) → + 990µl VE-Wasser → 100ng/ml

2.7 Kompetitiver RIA (Radioimmuno-Assay)

Mit Hilfe dieser Methode (modifiziert nach einem Protokoll der AG Analytische Biochemie Dr. Bunte, Schering) sollten ebenfalls Steroide im Ganzkörperhomogenat von Fettkopfbrassen nachgewiesen werden.

Dazu wurden die Fische nach dem Wiegen mit einem Ultrathurrax homogenisiert, abzentrifugiert und der Überstand extrahiert. Nach dem Ausfrieren der organischen Phase wurde diese eingengt und in RIA-Puffer (s. 2.7.2.1) angelöst. Der angelöste Extrakt wurde anschließend ein weiteres Mal extrahiert und erneut eingeengt. Der Rückstand wurde zuletzt direkt in Antikörper-Lösung gelöst, mit radioaktiv markiertem Antigen (= Ag*, zu messendes Steroid) gemischt und inkubiert.

Während dieser Inkubation konkurrieren die Steroide der Probe oder des Standards mit dem radioaktiven Steroid um die Bindungsplätze am Antikörper. Zuletzt wurden die noch freien Steroide durch Zugabe einer Aktivkohlelösung abgefangen und nach einer Zentrifugation aus der Lösung entfernt. Der Überstand wurde mit Scintillator versetzt und im Scintillationcounter gemessen.

Die Auswertung erfolgte über einen Vergleich der Messwerte mit einer Eichgerade aus verschiedenen Steroid-Konzentrationen.

2.7.1 Durchführung

- Die Fische in flüssigen Stickstoff töten und nach dem Auftauen wiegen
- Einzelne Tiere in ein Reagenzglas überführen, 2ml PBS (s. 2.7.2.2) zugeben und 60 sek mit einem Ultrathurrax homogenisieren
- Nochmal 2ml PBS zugeben und erneut 60 sek homogenisieren
- Homogenat 30 min, 12000g, RT (RC5, SS-34-Rotor entspr. 10000rpm) abzentrifugieren

  Bestimmen des Gesamtvolumens des Überstands
- Extraktion des Überstands mit Tertiär-butyl-methyl-Ether

  1 Teil Überstand : 4 Teilen Ether, 30 min, RT, *end-over-end*-Schüttler
- 5 min, 4°C, ~1000g (3000rpm) in einer begasten und explosionsgeschützten Cryofuge abzentrifugieren
- wässrige Phase mit Trockeneis/EtOH wegfrieren, Überstand dekandieren und einengen
- Extrakt in 1ml RIA-Puffer (s. 2.7.2.1) anlösen

- 2. Extraktion

  für den RIA erforderliche Menge an gelöstem Extrakt (20, 50, oder 100µl) in 1x Röhrchen abnehmen und mit 2.5ml Ether versetzen, Röhrchen verschließen und 15 sek vortexen

  7 min, 4°C, ~1000g (3000 rpm) in der Cryofuge unter Stickstoff abzentrifugieren

  wässrige Phase ausfrieren (Trockeneis/EtOH), Überstand dekandieren und einengen
- 200µl Tracer ≅ 5000cpm (Ag* in RIA-Puffer) zum Extrakt geben
- 200µl AK zugeben, 10 sek vortexen und über Nacht bei 4°C inkubieren
- Proben 5 - 10min in Eiswasser kühlen
- gekühlte Aktivkohlelösung (Lsg. 2.7.2.3) zugeben und 10 min inkubieren
- Aktivkohle abzentrifugieren 15 min, 4°C, ~1000g (3000 rpm) in Cryofuge
- Überstand in Minnivials dekandieren, 3.6ml Scintilator zusetzen, mischen und verschließen
- Counter, 4 min pro Proben

2.7.2 Verwendete Puffer

2.7.2.1 RIA-Puffer

Zusammensetzung:	Herstellung bei Endvolumen 1000ml:
40.8mM $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$	7.26g
75.9mM KH_2PO_4	3.52g
1% Na-Azide	1g
0.1% BSA	1g
	ad 1000ml VE-Wasser

pH: 7.0

Lagerung: 4°C

Haltbarkeit: 2-4 Wochen

2.7.2.2 PBS

RIA-Puffer ohne BSA

2.7.2.3 Aktivkohlelösung

500mg Dextran 110 in 1l RIA-Puffer lösen (ca. 15' rühren)

5.0g Aktivkohle zugeben 10 min rühren

Lagerung: 4°C

Haltbarkeit: 1-2 Tage

2.8 RNA-Präparation mit TRIzol®

Mit dieser Methode (nach Chomczynski und Sacchi,1987) kann aus Gewebe, Zellkultur und Ganzkörperhomogenaten RNA isoliert werden.

Dazu wurden die Fische, ohne Kopf und Schwanz, in einem Mörser mit flüssigen Stickstoff und TRIzol®, einer einphasigen Lösung aus Phenol und Guanidinisocyanat, homogenisiert. Diese Lösung verhinderte während des Homogenisierens eine Degradation der RNA, bei gleichzeitigem Zellaufschluß. Die Zugabe von Chloroform und die anschließende Zentrifugation bewirkte eine Trennung der Lösung in eine wässrige und eine organische Phase, wobei die RNA sich ausschließlich in der wässrigen Phase befand. Es folgte noch ein Präzipitations- und ein Waschschritt mit Isopropanol bzw. Ethanol.

- Fisch dekapitieren und nach entfernen des Schwanz und Kopfes, in kleine Stücke scheiden.
- Stücke in einer kleinen Wägeschale abwiegen und mit flüssigem Stickstoff schockfrieren, gefrorene Stücke in einen kalten, autoklavierten Mörser geben und in gefrorenen Zustand homogenisiert.
- Homogenat mit TRIzol® mischen (1ml/50-100mg Fisch) langsam auftauen lassen dabei mit dem Pistill mischen bis alles aufgetaut ist.

  Jeweils 1ml Homogenat in ein 2.2ml Reaktionsgefäß füllen (falls mehrere Fische auf diese Weise bearbeitet werden, kurzzeitige Lagerung der Reaktionsgefäße in flüssigen Stickstoff)
- die Proben 5 min, RT in Trizol® inkubieren
- 200µl Chloroform/ml Trizol® zugeben und sofort die Gefäße verschließen.
- 15 sek von Hand schütteln, anschließend 2-3 min bei RT inkubieren.
- ≤12.000g, 2-8°C, 15 min
- Farblose, wässrige Phase (enthält RNA) vorsichtig abnehmen (200µl Pipette → weniger Sog), ohne die Interphase (Protein) aufzuwirbeln.
- Wässrige Phase in einem frischen Eppendorf Gefäß, mit 0.5ml Isopropanol/ml TRIzol® versetzten, 10 min, RT
- ≤12.000g, 2-8°C, 15 min
- Überstand abnehmen und das RNA-Pellet 1x mit 75% EtOH waschen (vortexen)

  (1 ml EtOH / ml Trizol®)
- ≤7.500g, 2-8°C, 5 min
- RNA-Pellet an der Luft in umgekehrten Reaktionsgefäßen, auf einem Kleenex®, trocknen lassen (nicht zu lange, damit sich die RNA danach wieder resuspendieren läßt),.
- Pellet in DEPC behandeltem Wasser lösen (s. 2.8.1), anschließend für 10 min bei 55-60°C

  denaturieren.
- $A_{260/280}$ messen.

2.8.1 DEPC-Behandlung

DEPC = Diethylpyrocarbonat = RNase Inhibitor

Lösung mit 0.1% (v/v) DEPC versetzen (karzinogen), 2h unter Rühren inkubieren, anschließend autoklavieren.

2.9 Poly(A)$^+$ RNA-Anreicherung aus Gesamt-RNA

Bei dieser Methode (nach Medcalf *et al.*,1986; modifiziert durch A. Walter, Schering, Berlin) handelt es sich um eine Affinitätschromatographie an Oligo(dT)-Cellulose im Batchverfahren. Jede mRNA bestitzt zu ihrem kodierenden Teil zusätzlich einen Poly(A$^+$)-Schwanz, der für die Translation essentiel vorhanden sein muß. Aufgrund dieses Endes konnte die mRNA von vorhandener tRNA und rRNA getrennt werden.

Dazu wurde die mRNA an Oligo(dT)-Cellulose gebunden und so von der restlichen RNA getrennt.

- 1.8ml Bindungspuffer (Lsg. 2.9.1.1) + 0.2ml Oligo(dT)-Cellulose (s. 2.9.1.4) in ein 2.2ml Eppendorf Gefäß vorlegen, über Nacht bei 4°C quellen lassen.
- Gequollene Cellulose auf RT erwärmen und mischen, um ausgefallenes SDS zu resuspendieren.
- 100µg Gesamt-RNA zugeben
- 1h, Überkopfschüttler, RT
- 2500rpm, RT, 5 min (Biofuge 15, Rotor 3754)
- Überstand verwerfen
- Pellet in 2ml Bindungspuffer aufnehmen
- 2500rpm, RT, 5 min (s.o.)

  2x mit 2ml Bindungspuffer wiederholen
- Pellet in 1ml Waschpuffer aufnehmen und in ein 1.5ml Reaktionsgefäß überführen
- 2500rpm, RT, 5 min (s.o.)
- Pellet in 100µl Elutionspuffer aufnehmen

  Elution: Thermomixer 5 min, 65°C, 1300rpm

  sofort abzentrifugieren, 2500rpm, RT, 5 min

  Elution 3x wiederholen, Überstände in einem frischen 1.5ml Eppendorf Reaktionsgefäß vereinigen
- 44µl Na-Acetat pH 5.3 + 1ml kaltes EtOH zugeben

  1h, -20°C präzipitieren

  20 min, RT, 15000rpm (Hermle Zentrifuge)
- Überstand zügig, aber nicht mit zu viel Schwung abgießen

- RNA-Pellet mit 1ml 80% EtOH waschen
  10 min, RT, 15000rpm; Überstand verwerfen
- Pellet 5 min in einer Speed-Vac® trocknen
- RNA-Pellet in 5µl DEPC-Wasser aufnehmen

2.9.1 Verwendete Puffer

2.9.1.1 Bindungspuffer

Zusammensetzung:	Herstellung bei Endvolumen 200ml:
0.5M NaCl	5.84g
10mM TRIZMA®HCl	315.2mg
1mM EDTA	74.4mg
0.1% (v/v) SDS	200mg

pH: 7.4
Lagerung: RT
Haltbarkeit: 6 Monate

2.9.1.2 Waschpuffer

Zusammensetzung:	Herstellung bei Endvolumen 200ml:
0.1M NaCl	1.17g
10mM TRIZMA®HCl	315.2mg
1mM EDTA	74.4mg
0.1% (v/v) SDS	200mg

pH: 7.4
Lagerung: RT
Haltbarkeit: 6 Monate

2.9.1.3 Elutionspuffer

Zusammensetzung:	Herstellung bei Endvolumen 200ml:
10mM TRIZMA®HCl	315.2mg
1mM EDTA	74.4mg
0.1% (v/v) SDS	200mg

pH: 7.4
Lagerung: RT
Haltbarkeit: 6 Monate

2.9.1.4 Vorbereitung Oligo(dT)Cellulose

Typ 7 (Pharmacia) 40 mg/ml

Typ 77F (Pharmacia) 12 mg/ml

2.10 RNA-Analyse mittels Northern-Hybridisierung

Durchführung nach Boehringer Mannheim (1996 und 1995)

2.10.1 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

Eine denaturierende Agarose-Gelelektrophorese trennt RNA in Abhängigkeit ihrer Länge, wobei der denaturierte Zustand während der Elektrophorese durch die Zugabe von Formaldehyd aufrechterhalten wird (Fourney *et al.*, 1988). Die RNA wandert im Gel von der Kathode [-] zur Anode [+].

Danach konnte die aufgetrennte RNA auf eine Nylonmembran geblottet werden. Eine spezifische, Digoxigenin-markierte RNA-Sonde (DIG-Sonde) erkannte die komplementäre RNA auf der Membran. Die Detektion erfolgte über anti-Digoxigenin-Antikörper und eine Visualisierung durch ein Chemilumineszenssubstrat (CSPD).

- Gelschlitten und Kammer mit RNase Easy® reinigen und mit DEPC-Wasser (s. 2.8.1) nachspülen, dabei werden möglicherweise vorhandene RNasen entfernt.
- Agarosegel 0.8%

  680mg Agarose + 62.05ml DEPC-Wasser + 8.5ml 10x MOPS (Lsg. 2.10.5.1) aufkochen
- Auf ca. 60-65°C abkühlen lassen (Wasserbad)
- Zugabe von 14.5ml Formaldehyd (Vorsichtig unter Vermeidung von Luftblasen)
- Gelschlitten mit breitem Klebestreifen (Tesaband) abkleben, Agarose eingießen und gewünschte Anzahl an Kämmen einstecken.
- Laufpuffer: 500ml 1x MOPS
- Auspolymerisiertes Gel ohne Klebestreifen und Kämme in die Kammer einsetzten und ca. 5 min ohne Proben einlaufen lassen (ca. 70-80V evt. vorhandene Schmutzpartikel wandern dann vor den Proben)
- Probenvorbereitung:

  9µl RNA (10µg RNA/9µl) + 31µl Auftragslösung (Lsg. 2.10.5.2)

  5µl RNA molecular weight Marker II mit 4µl DEPC-Wasser verdünnen + 31µl Auftragslösung

  in einer Tischzentrifuge kurz anzentrifugieren

  15 min bei 65°C im Thermomixer denaturieren

  5 min bei 0°C in Eisethanol-Wasser abkühlen (verhindert erneute Zusammenlagerung)

  4µl Stopplösung (Lsg. 2.10.5.3) zugeben

  in einer Tischzentrifuge kurz anzentrifugieren

Probe komplett (44µl) in die Gelslots pipettieren

- Gellauf: ca. 90 min bei 120V/100mA (1-5V pro cm Elektrodenabstand) dies entspricht ca. 80% der Gellänge.

2.10.2 Northern Transfer (Turbo Blotting)

Hierbei handelte es sich um eine Übertragung von RNA aus dem Agarosegel auf eine Nylon Membran (modifiziert nach Thomas, 1980). Der Puffer floß durch Kapillarkräfte und Schwerkraft von oben nach unten durch das Blot Sandwich und zog so die RNA aus dem Gel auf die Membran.

- Gelvorbereitung:

  In einer sterilen Glaspetrischale mit Deckel (∅ ca. 15cm) etwas DEPC-Wasser vorlegen

  Geltaschen abschneiden und Gel von dem Gelschlitten vorsichtig (rutscht leicht) in die Petrischale gleiten lassen.

  Die Petrischale soweit wie möglich mit DEPC-Wasser auffüllen und auf einem Schüttler 3x7min waschen.

  10 min in 20x SSC (Lsg. 2.10.5.4) äquilibrieren.

- Blottkammer vorbereiten:

  Alle Teile mit RNase Easy-Lösung reinigen und mit DEPC-Wasser nachspülen.

- Nylonmembran vorbereiten:

  Die Membran nicht mit den Händen, sondern nur mit einer sterilen, stumpfen Pinzette anfassen. Membran auf die gewünschte Größe zuschneiden.

  In einer sterilen Glaspetrischale mit Deckel (∅ ca. 15cm) etwas DEPC-Wasser vorlegen, Membran anfeuchten, Wasser dekantieren und anschließend mindestens 10 min in 20x SSC äquilibrieren.

- Turbo-Blotter GB-Set (Set aus verschiedenen Whatmanpapierfiltern) vorbereiten:

  In einer sterilen Glaspetrischale mit Deckel (∅ ca. 18cm) etwas 20x SSC vorlegen und 4 dünne Filter (GB 002) darin anfeuchten (einzeln mit Pinzette), restliches Set auf steriler Alufolie bis zur Verwendung lagern.

- Turbo-Blot Sandwich zusammenbauen:

  Von unten nach oben:
  14x GB 004 trocken
  4x GB 002 trocken
  1x GB 002 naß
  Membran
  Gel
  Mit Parafilm die Ränder abdecken
  3x GB 002 naß
  1x Transferfilter naß
  Deckelplatte

  In den Rand der Deckelplatte 20x SSC einfüllen

- Blotting: 3h, RT

- RNA-Fixierung:

  Blotmembran in Alufolie einpacken, Probenseite nach oben, Alufolie so verschließen, daß sie die Membranoberseite möglichst nicht berührt. 2h, 80°C im Hybridisierungsofen, bzw. 30 min, 120°C im Trockenschrank.
- Lagerung des Blots trocken im Kühlschrank
- Um die Blotting-Effizienz zu überprüfen kann das Gel in Ethidiumbromid gefärbt und in VE-Wasser entfärbt werden (s. 2.11.4); es sollten dann unter UV-Licht keine Banden mehr zu sehen sein.

2.10.3 Northern Hybridisierung

Hier erfolgt eine *in vitro* bzw. eine *in situ* Zusammenlagerung komplementärer DNA- bzw. RNA-Einzelstränge über die Ausbildung von Basenpaaren. Diese Technik diente dem Vergleich von Nukleotidsequenzen.

- Vorbereitung der Membran (Prähybridisierung):

  Hybridisierungofen auf 42°C vorheizen und darin High-SDS-Lösung (Lsg. 2.10.5.8) erwärmen um das ausgefallene SDS zu lösen.

  In einer sterilen Glaspetrischale mit Deckel (∅ ca. 15cm) 15ml 5x SSC vorlegen und markierte Blotmembran (eine Ecke zur Markierung abgeschnitten) vorsichtig mit einer stumpfen Pinzette in die Schale gleiten lassen. Die rRNA ist für einen kurzen Augenblick als Schatten sichtbar.

  Rehydrierte Membran in eine Hybridisierungröhre transferieren und ca. 15ml High-SDS zugeben.

  1h, 42°C unter Rollen inkubieren (leere Röhre als Gegengewicht), hierbei wird die blaue Farbstoffront aus dem Blot gelöst.
- DIG-Sonde ansetzen:

  Sonden-Stammlösung auftauen (VTG- und ER-Sonde Regenbogenforelle gestellt von der AG Y. Valotaire, Universität Rennes, F), 1.75µl (ER) oder 2.5µl (VTG) in ein frisches steriles Eppendorf Reaktionsgefäß pipettieren, 20µl DEPC-Wasser zugeben, vortexen und kurz anzentrifugieren. 10 min in kochendem Wasser denaturieren. Den gesamten Ansatz in ein steriles Falcon Röhrchen überführen und 10ml High-SDS zugeben (Es können auch beide Sonden gemeinsam angesetzt werden; Lagerung bei –20°C; mehrfache Verwendung).
- DIG-Sonde vorbereiten:

  Wasserbad auf 68°C vorheizen und ca. 15 min vor Ende der Prähybridisierung die fertig verdünnte DIG-Sonde auftauen und für 10 min im Wasserbad denaturieren.
- Hybridisierung:

  Prähybridisierungslösung dekantieren (Sondermüll, giftig)

  5ml DIG-Sonden-Lösung einfüllen und durch Schwenken gut verteilen

  16h, 42°C, im Hybridisierungsofen inkubieren, wiederum mit einer leeren Röhre als Gegengewicht.
- Waschen der Membran:

  50ml Waschpuffer I (Lsg. 2.10.5.10) vorbereiten, DIG-Sonde dekantieren, nicht verwerfen

  Waschpuffer I einfüllen, gut verteilen, 10min, RT, im Hybridisierungsofen

Waschpuffer II (Lsg. 2.10.5.11) vorbereiten und im Wasserbad auf 68°C erwärmen

Waschpuffer I dekantieren (Sondermüll) und 2x mit jeweils 50ml Waschpuffer II, 15 min, 68°C waschen.

- Hier kann die Membran eventuell getrocknet und bei 4°C gelagert werden, allerdings darf die Membran auf keinen Fall trocknen, falls sie nach der Detektion gestrippt werden soll.

2.10.4 Detektion

- Vorbereitungen:

  Gerät zu Photoentwicklung einschalten.

  100ml Waschpuffer III (Lsg. 2.10.5.12) und 50ml Blockierungslösung (Lsg. 2.10.5.13) ansetzten.
- Membran kurz in Waschpuffer III äquilibrieren
- 1h, RT in ca. 30ml Blockierungslösung blocken
- Antikörper koppeln:

  α-Digoxigenin-AK kurz anzentrifugieren

  2µl AK-Stammlösung/20ml Blockierungslösung (= 75mU/ml) dazugeben

  30 min, RT
- Membran waschen:

  Ab jetzt erfolgt jeder Schritt in Glaspetrischalen, nicht mehr in Hybridisierungsröhren.

  Dazu die Membran vorsichtig aus der Hybridisierungsröhre entfernen und mit der Blotseite nach oben in die Petrischale überführen.

  2x 15 min in Waschpuffer III, RT

  2 min in 50ml Detektionspuffer (Lsg. 2.10.5.14), RT
- Detektion:

  Hybridisierungsofen auf 37°C vorheizen.

  Haushaltsfolie zuschneiden und ggf. auf einer Seite zuschweißen.

  Membran auf die Folie legen und CSPD-Lösung auftropfen, mit der Folie abdecken, glatt steichen und ggf. verschweißen. Oberfläche mit 70% Ethanol (zur Verringerung der elektrostatischen Einwirkung auf den Film) abwischen.

  In der Dunkelkammer:

  Ein passend geschnittenes Röntgenfilmstück in der Expositionsbox auf die eingeschweißte Membran legen und lichtdicht verschließen.

  Inkubation bei 37°C, ca. 30 min, ab 10 min erscheinen die ersten, schwachen Signale.

  Film entwickeln
- Strippen:

  Die Membran darf hierfür nach der Fixierung nie getrocknet worden sein

  100ml 0.1% SDS in DEPC-Wasser aufkochen. Die Membran in eine Petrischale überführen und die kochende Lösung darüber verteilen.

  10-30 min unter Schütteln ohne weiteres Erhitzen inkubieren

  5 min in 2x SSC/0.1% SDS waschen, RT

Prähybridisierung erneut starten (oder in einer verschweißten Folie in 2x SSC bei 4°C lagern)

Variante:

Man kann auch nur sehr kurz strippen, waschen und sofort mit dem Antikörper starten.

Generell wird dadurch der Hintergrund wesentlich schwächer als im Orginal.

- Methylenblau-Färbung:

  Sobald die Membran nicht mehr benötigt wird kann sie mit Methylenblau eingefärbt werden (erkennbar sind allerdings nur die rRNA-Banden)

  5 min, 5% Essigsäure, RT

  10-15 min, 0.3M Na-Acetat pH 5.2, 0.03% Methylenblau, RT

  in Wasser entfärben bis deutliche Banden sichtbar sind.

  Membran lufttrocknen

2.10.5 Vewendete Puffer

2.10.5.1 10x MOPS (MOPS = 3-Morpholinopropansulfonsäure)

Zusammensetzung	Herstellung bei Endvolumen1000ml:
0.2M MOPS	41.85g
0.05M Na-Acetat	6.8g
0.01M EDTA	3.72g
	ad 1000ml VE-Wasser

mit DEPC behandeln (s. 2.8.1) und autoklavieren

pH: 7.0 (NaOH bzw. Essigsäure)

Lagerung: RT, lichtgeschützt

Haltbarkeit: 6 Monate

2.10.5.2 Auftragslösung

Zusammensetzung	Herstellung pro Probe:
10x MOPS	4µl
deionisiertes Formamid	20µl
Formaldehyd (37%)	7µl

Immer frisch ansetzten und den nicht verwendeten Mastermix nach Gebrauch verwerfen.

2.10.5.3 Stopplösung

Zusammensetzung	Herstellung bei Endvolumen 50ml:
50% Glycerol	25g
0.4% Bromphenolblau	0.2g
0.01M EDTA	0.1ml (0.5M Stammlösung)
	ad 50ml DEPC-Wasser

keine DEPC-Behandlung möglich, daher nur zertifiziert RNase-freie Chemikalien verwenden, mit DEPC-Wasser ansetzen und 2x autoklavieren

Lagerung: RT

Haltbarkeit: 6 Monate

2.10.5.4 20x SSC

Zusammensetzung	Herstellung bei Endvolumen1000ml:
3M NaCl	175.32g
0.3M Na_3Citrat	88.23g
	ad 1000ml VE-Wasser

mit DEPC behandeln (s. 2.8.1) und autoklavieren

pH: 7.0 (NaOH bzw. Zitronensäure)

Lagerung: RT

Haltbarkeit: 6 Monate

2.10.5.5 30x SSC-Stammlösung

Zusammensetzung	Herstellung bei Endvolumen1000ml:
4.5M NaCl	262.98g
0.45M Na_3Citrat	132.35g
	ad 1000ml VE-Wasser

mit DEPC behandeln (s. 2.8.1) und autoklavieren

pH: 7.0 (NaOH bzw. Zitronensäure)

Lagerung: RT

Haltbarkeit: 6 Monate

2.10.5.6 1M NaPP-Stammlösung

Zusammensetzung	Herstellung bei Endvolumen 500ml:
1M Na_2HPO_4	89g
konz. H_3PO_4	2ml
	ad 500ml VE-Wasser

mit DEPC behandeln (s. 2.8.1) und autoklavieren

pH: 7.2 (NaOH bzw. Phosphorsäure)

Lagerung: RT

Haltbarkeit: 6 Monate

2.10.5.7 10% N-Lauroylsarcosin-Stammlösung

Zusammensetzung	Herstellung bei Endvolumen 100ml:
10% (w/v) N-Lauroylsarcosin	10g
	ad 100ml in DEPC-Wasser
	sterilfiltrieren

Lagerung: 4°C

Haltbarkeit: 3 Monate

2.10.5.8 High-SDS-Lösung

Zusammensetzung	Herstellung bei Endvolumen100ml:
5% SDS	5g
50% Formamid	50ml
5x SSC	16.6ml 30x SSC-Stammlösung
2% Blocking Reagenz	20ml 10%-Stammlösung
50mM NaPP	5ml 1M Stammlösung
0.1% N-Lauroylsarcosin	1ml 10%-Stammlösung
	ad 100ml mit DEPC-Wasser
	(leicht erwärmen zum Anlösen)

pH: 7.0

Lagerung: RT

Haltbarkeit: 6 Monate

2.10.5.9 Maleinsäure-Puffer

Zusammensetzung	Herstellung bei Endvolumen1000ml:
0.1M Maleinsäure	11.6g
0.15M NaCl	8.77g
	ad 1000ml VE-Wasser

mit DEPC behandeln (s. 2.8.1) und autoklavieren

pH: 7.5 (NaOH-Plätzchen, ~8g/l)

Lagerung: RT

Haltbarkeit: 6 Monate

2.10.5.10 Waschpuffer I

Zusammensetzung	Herstellung bei Endvolumen 50ml:
5x SSC	12.5ml 20x SSC
0.2% SDS	1ml 10% SDS
DEPC-Wasser	36.5ml

Kein pH einstellen

Immer frisch ansetzten

2.10.5.11 Waschpuffer II

Zusammensetzung	Herstellung bei Endvolumen 100ml:
2x SSC	10ml 20x SSC
0.2% SDS	2ml 10% SDS
DEPC-Wasser	88ml

Kein pH einstellen

Immer frisch ansetzten

2.10.5.12 Waschpuffer III

Zusammensetzung	Herstellung bei Endvolumen 100ml:
Maleinsäure-Puffer	100ml
0.3% Tween-20	300µl

Kein pH einstellen

Immer frisch ansetzten

2.10.5.13 Blockierungslösung

Zusammensetzung	Herstellung bei Endvolumen 50ml:
Maleinsäure-Puffer	45ml
Blockierungs Reagenz	5ml 10% Stammlösung (BioRad)
Kein pH einstellen	
Immer frisch ansetzten	

2.10.5.14 Detektionspuffer

Zusammensetzung	Herstellung bei Endvolumen1000ml:
0.1M TRIZMA®HCl	12.11g
0.1M NaCl	5.84g

keine DEPC-Behanldung möglich, daher nur zertifiziert RNase-freie Chemikalien verwenden, mit DEPC-Wasser ansetzen und 2x autoklavieren

pH: 9.5 (HCl)

Lagerung: RT

Haltbarkeit: 6 Monate

2.11 RT-PCR

Diese Methode (modifiziert nach *Roche Molecular Biochemicals*, 1999), bestehend aus einer reversen Transkription mit anschließender Polymerase-Ketten-Reaktion, diente der semi-quantitativen Bestimmung der Menge an Vitellogenin und Estrogenrezeptor mRNA. Als interner Standard (Housekeeping-Gene = qualitative Kontrolle, durch ein konstetutiv exprimiertes Gen) wurde das skeletale α-Actin verwendet.

2.11.1 Reverse Transkription

- RNA denaturieren : 5–10 min bei 55-60°C
- RNA-Menge photometrisch bestimmen:

  $A_{260/280}$ (= Proteinverunreinigung) Soll: 1.9–2.0

  A_{260} = 1 => 40µg/µl

  A_{260} x VF = µg RNA/µl

  VF= Verdünnungsfaktor = [(µl H_2O/µl Probe) x 40] : 1000
- Verdünnen der RNA auf 0.5µg/µl in DEPC-Wasser
- 1µl RNA + 9µl Mastermix mischen

Mastermix :	pro Probe
DEPC-Wasser	1.1µl
10x PCR-Puffer	1.0µl
$MgCl_2$ (25 mM)	1.4µl
dNTPs	4.0µl
Rnase Inhibitor	0.5µl
MuLV (Transkriptase)	0.5µl
Random Hexamers (Transkriptionsprimer)	0.5µl
+ RNA	1.0µl
Σ	10µl

- Thermocycler: 10 min 25°C (Aufwärmen)
  1 h 42°C (Transkription)
  5 min 99°C (Denaturierung)
- Deckelheizung 110°C
- Die cDNA ist anschließend 1:10 verdünnt

2.11.2 PCR (Polymerase Chain Reaction)

- Mastermix herstellen

	pro Probe
steriles Wasser	13.625 µl
10x PCR-Puffer	2.5µl
20x Gel-Puffer (Lsg. 2.11.5.1)	1.25µl
dNTPs	2.0µl
Primer jeweils	1.25µl
$MgCl_2$	2.0µl
Taq-Polymerase	0.125µl
Σ	24 µl

- Die Menge an sterilem Wasser kann variiert werden, es muss aber immer ein Endvolumen von 24µl Mastermix + 1µl cDNA erreicht werden.
- 1 µl cDNA (nochmals 1:10 verdünnt in sterilem Wasser) in 0.2µl PCR-Tubes vorlegen.
- 24 µl Mastermix zugeben, mischen (von Hand, „anticken“)
- Thermocyclerprogramm:

	1) Deckelheizung		110 °C	
	2) 2 min		95 °C	(Vordenaturierung)
3) 30x		30 sek	95 °C	(Denaturierung)
		30 sek	60 °C	(Anlagerung der Primer)
		30 sek	72 °C	(Elongation)
	4) Deckelheizung aus			

5) *Ramp* 4°C über 3°C/sek (Abkühlen)

6) *Hold* 4°C

- Die Proben können nun direkt auf das Agarosegel aufgetragen werden.

2.11.3 Verwendete Primersequenzen

Name	Sequenz (5' → 3')		T_A [°C]	Prod [Nuk.]	Start	Quelle
Carp-a-actfw	gga ctt cga gaa cga gat gg	F	60	400	256	Karpfen *(Cyprinus carpio)* (CYISAA1)
Carp-a-actrev	aca tct gct gga agg tgg ac	R			654	
VTG-fatfw	gtt gct ctc cag acc ttt gc	F	60	600	2251	Fettkopfbrasse *(Pimephales promelas)* (AF130354)
VTG-fatrev	cct cag ttt cag cag gaa gg	R			3150	
ER-gold-**1**for	cca acc tgg cgg aca aag agc ttg ttc	F	50	323	DBD	Goldfisch (*Carassius auratus*) (AF061269)
ER-zeb-**1**rev	gat gag tat gat ggc ttt gag aca cac	R			DBD	Zebrafisch (*Danio rerio*) (DRE275910)
ER-gold-**3**for	gct tgt ctc aaa gcc atg atc ctt ctc	F	64	218	DBD	Goldfisch (*Carassius auratus*) (AF061269)
ER-zeb-**2**rev	ctc atg tgt ctg atg tgt gag agc agc	R			DBD	Zebrafisch (*Danio rerio*) (DRE275910)

F = forward Primer (Leserichtung: 5' → 3')
R = reverse Primer (Leserichtung: 3' → 5')
Start = Startpunkt in der bekannten Sequenz bzw. Domäne in der Consensussequenz
Prod = erwartete Produktlänge
DBD = DNA-Bindedomäne
T_A = Anlagerungstemperatur der Primer
C = Cytosin; G = Guanin; A = Adenin; T = Thymin

2.11.4 Agarose-Gelelekrophorese

- 1.2% Agarose-Gel (zur Auftrennung der ER-Bande wurde ein 2.0%iges Agarose-Gel verwendet)

  1020mg (für 2.0%: 1700mg) Agarose mit 85ml 0.5x TBE aufkochen, dabei vorsichtig mischen um Luftblasenbildung zu vermeiden.

  Gießen, Kamm bzw. Kämme einstecken und abkühlen lassen.
- Die Proben können direkt aus dem Themocycler aufgetragen werden
- Marker: 4µl DNA-Ladder + 19.75µl steriles Wasser + 1.25µl 20x Gel-Puffer
- Laufpuffer: 0.5x TBE (Lsg. 2.11.5.2)

  Gellauf: 140V; ~45min
- Ethidiumbromid-Färbung:

  5 min Gel in Ethidiumbromidlösung färben

anschließend ca. 15 – 20 min in VE-Wasser entfärben

⇨Vorsicht carcinogen, keine Latex, sondern Nitrilhandschuhe

⇨Lösungen mit Ethidiumbromid auch das Wasser zum Entfärben sind als Sondermüll zu behandeln

- UV-Transilluminator, fotografieren, Gel danach in speziellen Sondermüll entsorgen

2.11.5 Verwendeter Puffer

2.11.5.1 20x Gelauftragspuffer (nach Hodges *et al.*, 1997)

Zusammensetzung	Herstellung bei Endvolumen 50ml:
30% (w/v) Sucrose	15g
6mM Tatrazine Gelb	160.3mg
3.5mM Cresole Rot	70.8mg
	ad 50ml steriles Wasser

Lagerung: -20°C

Haltbarkeit: >1 Jahr

2.11.5.2 10x TBE

Zusammensetzung	Herstellung bei Endvolumen 1000ml:
890mM TRIZMA® Base	108g
890mM Borsäure	55g
20mM EDTA	40ml 0.5M EDTA-Stammlösung
	ad 1000ml VE-Wasser
	autoklavieren

pH: 8.0

Lagerung: RT

Haltbarkeit: 6 Monate

Sämtliche hier nicht aufgeführte Puffer wurden mit den Kits geliefert.

2.12 PCR-Produkt Extraktion aus einem Agarosegel mit *QIAquik Gel Extraction Kit*®

Mit Hilfe dieses Kits können aufgetrennte PCR-Podukte aus einem Agarosegel eluiert werden.

An eine in einer Säule befestigten Silica-Gel-Membran konnten bis maximal 10µg DNA in *high-salt-buffer* gebunden und anschließend gewaschen werden, um zuletzt mit *low-salt-buffer* eluiert zu werden. Bei diesem Reinigungsschritt wurden Nukleotide, Enzyme, Salze, Agarose und Ethidiumbromid entfernt. Nach der Elution waren die gereinigten PCR-Produkte

in einem kleinen Volumen Elutionspuffer gelöst und konnten daraufhin weiter verwendet werden, beispielsweise für eine Sequenzierung oder eine Klonierung.

2.12.1 Durchführung

- Die DNA wird nach dem Gellauf mit Ethidiumbromid gefärbt und auf der UV-Bank die gewünschte Bande ausgeschnitten
- Gelstück wiegen
- 3 Volumenanteile Puffer QG zu einem Volumenteil Gel hinzufügen

  10 min Inkubation bei 50°C

  Die Flüssigkeit soll gelb sein (pH 7.5), ist sie orange oder violett 10µl Na-Acetat (3M, pH 5.0) hinzufügen
- 1 Gelvolumen Isopropanol hinzufügen
- maximal 800µl der Lösung auf eine Spinsäule auftragen, 1 min, 11000g, RT

  Durchfluß verwerfen, 1 min, 11000g, RT
- Waschen: 500µl Puffer QG auftragen, 1 min, 11000g, RT

  Durchfluß verwerfen

  750µl Puffer PE auftragen, 1 min, 11000g, RT

  Durchfluß verwerfen, 1 min, 11000g, RT
- DNA mit 50µl Elutionspuffer oder Wasser in ein frisches Eppi eluieren

  In die Mitte des Säulchens auftragen, 1 min inkubieren, 1min, 11000g, RT

Die DNA kann zur Aufbewahrung getrocknet, oder in Puffer gelöst bei -80°C eingefroren werden.

Sämtliche, benötigten Puffer wurden mit dem Kit mitgeliefert, lediglich Puffer PE-Konzentrat wurde in absolutem EtOH laut Herstellerangaben verdünnt.

2.13 CERBA (cytosolischer Estrogen-Rezeptor Bindungs-Assay)

Mit Hilfe dieser Methode (modifiziert nach Danzo, 1997) sollte eine mögliche Bindung einer Substanz an den cytosolischen Estrogen-Rezeptor nachgewiesen werden. Dazu wurde der Rezeptor aus Karpfenleber isoliert, mit ^{3}H-Estradiol und der zu bestimmenden Substanz inkubiert und anschließend mit Aktivkohle gestrippt.

2.13.1 Leber-Cytosolpräparation

Ausgewachsene Karpfen (*Cyprnius carpio*, 1.5-2kg) wurden lebend von der Fischerei-genossenschaft Konstanz bezogen.

- Die Fische wurden mit einem Schlag auf den Kopf betäubt, durch einen Schnitt ins Herz getötet, die Lebern entnommen und in einem Becherglas mit eiskaltem Präparationspuffer (Lsg. 2.13.4.1) gewogen und gewaschen.

- Die ganze Leber wird mit einer Schere sehr klein geschnitten (1-2mm³) und erneut in eiskaltem Puffer gewaschen.
- Homogenisieren der Stückchen im 4fachen Volumen (1:4 w/v) Einfrierpuffer (Lsg. 2.13.4.2) mit einem motorbetriebenen Teflonpotter.
- Homogenat 10 min, 4°C bei 10.000g zentrifugieren.
- Überstand abnehmen und in einer Ultrazentrifuge 90 min, 2°C bei 100.000g zentrifugieren.
- Bestimmen des Proteingehalts des gewonnenen Cytosols mit Hilfe einer modifizierten Bradford Methode (s. 2.14).
- Proteingehalt mit Einfrierpuffer auf 1mg/l einstellen.
- Das Cytosol kann bei -80°C gelagert werden.

2.13.2 Bindungs-Assay Durchführung (Sättigung)

Alle Einzelexperimente wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt. Zuerst wurde die B_{max} (maximale Anzahl der Bindungstellen) und die K_D (Dissoziationskonstante; Konzentration von ³H-E2, bei der die Hälfte der Bindungstellen der Estrogenrezeptoren besetzt sind) der cytosolischen Fraktion bestimmt.

- Bestimmung der absoluten Bindung des ³H-E2:

  150µl Einfrierpuffer + 100µl Cytosol + 20µl ³H-E2 (1-20nM; in 5% EtOH; s. 2.12.2.1)

  bei ca. 4°C, 20h in Polypropylen-Röhrchen inkubieren
- Bestimmung der nicht-spezifischen Bindung:

  Ansatz wie oben, zusätzlich mit 10µl nicht radioaktives E2 (1-20µM; in EtOH abs. ; s. 2.13.2.2)

  bei ca. 4°C, 20h in Polypropylen-Röhrchen inkubieren
- Abfangen des nicht gebundenen ³H-E2:

  Zugabe von 300µl Aktivkohlelösung (Lsg. 2.13.4.3)

  5 min Inkubation auf Eis

  10 min, 4°C, 4000g (Megafuge)
- 300µl des Überstandes in 5ml Scintillation-Röhrchen überführen

  3ml Scintillator zugeben, gut vortexen, im Scintillation-Counter messen.

2.13.2.1 Pipettierschema ³H-E2

Stammlösung: 700nM ³H-E2

Endkonz. [nM]	1	2.5	5	10	15	20
Stammlsg. [µl]	3	7.5	15	30	45	60
5% EtOH [µl]	147	142.5	135	120	105	90
Gesamtvol. [µl]	150	150	150	150	150	150

2.13.2.2 Pipettierschema E2

Stammlösung: 1.68mM E2

Endkonz. [µM]	1	2.5	5	10	15	20
Stammlsg. [µl]	1	2.5	5	10	15	20
EtOH abs. [µl]	59	57.5	55	50	45	40
Gesamtvol. [µl]	60	60	60	60	60	60

2.13.2.3 Pipettierschema CERBA

	Absolute Bndg.	Nicht-spez. Bndg.	Blank
Einfriepuffer [µl]	150	150	150
EtOH abs. [µl]	10	--	10
E2 (1-20µM) [µl]	--	10	--
³H-E2 (1-20nM) [µl]	20	20	20µl 5% EtOH
Cytosol [µl]	100	100	100
Gesamtvol. [µl]	280	280	280

Die spezifische Bindung von ³H-E2 ergab sich aus der Subtraktion der nicht-spezifischen Bindung von der absoluten Bindung. Die K_D und B_{max} des Cytosols wurden mit Hilfe von Sättigungsversuchen und einer anschließenden Scatchard-Analyse (Scatchard, 1949) der spezifischen Bindung berechnet. B_{max} ergab sich aus der linearen Regressionsgeraden für y=0, die K_D aus dem negativen Kehrwert der Steigung. Die spezifische Bindung wurde als 100% Bindung in den Tests definiert; die Resultate der Kompetitionsversuche wurden dann,

nach Subtraktion der nicht-spezifischen Bindung, als relative Abnahme des gebundene ^{3}H-E2 gegenüber diesen 100% ausgedrückt.

2.13.3 Bindungs-Assay Durchführung (Kompetition)

Um Methyltestosteron zu testen wurden Kompetitionsversuche durchgeführt. Das Cytosol wurde mit XnM ^{3}H-E2 (entsprechend dem zuvor bestimmten K_D-Wert) und steigenden Konzentrationen der Substanzen in absolutem Ethanol inkubiert (Zugabe von Substanz, statt kaltem E2, ansonsten siehe Pipettierschema 2.13.2.3)

Zur Feststellung der spezifischen Bindung wurde ein Ansatz mit XnM ^{3}H-E2 und ein zweiter mit radioaktivem Estrogen und 1000fachem Überschuß an unmarkierten Estrogen (XµM) durchgeführt. Die so erhaltene spezifische Bindung wurde als 100% Bindung in diesem Test definiert. Die Resultate der Kompetitionsversuche wurden dann, nach Subtraktion der nicht-spezifischen Bindung, als relative Abnahme des gebundenen ^{3}H-E2 gegenüber diesen 100% ausgedrückt.

2.13.4 Verwendete Puffer

2.13.4.1 Präparationspuffer

Zusammensetzung	Herstellung bei Endvolumen 1000ml:
10mM TRIZMA® HCl	1.58g
1.5mM EDTA	438.3mg
20mM Na-Molybdat	4.84g
10% Glycerol	100g
	ad 1000ml VE-Wasser

pH: 7.4
Lagerung: 4°C
Haltbarkeit: 6 Monate

2.13.4.2 Einfrierpuffer

Zusammensetzung	
1ml Monothioglycerol /l	
1ml Phenylmethylsulfonylfluorid /l	in Präparationspuffer

2.13.4.3 Aktivkohlelösung

Zusammensetzung	Herstellung bei Endvolumen 500ml:
3.75% Aktivkohle	18.75g

0.375% Dextran 1.88g
ad 500ml VE-Wasser

pH: 7.4
Lagerung: 4°C
Haltbarkeit: 6 Monate

2.14 Proteinwertbestimmung

Die Proteinwertbestimmung (modifiziert nach Bradford, 1976) basiert auf einem Farbumschlag von Coomassie Brilliant-Blue G-250 durch die Bindung des Farbstoffs an vorhandenes Protein. Diese Bindung verursacht eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465nm zu 595nm, gemessen wird der Anstieg der Absorption bei 595nm.

Die Proteinkonzentration wurde im Vergleich zur Absorption verschiedener BSA-Lösungen bekannter Konzentration bestimmt.

2.14.1 Herstellung der BSA-Verdünnungsreihe

Stammlösung: 10mg/ml

	[µg/ml]	BSA-Lsg. [µl]	Puffer [µl]	Gesamtvol. [µl]
Blank	0	0	1000	1000
1	100	10	990	1000
2	200	20	980	1000
3	300	30	970	1000
4	400	40	960	1000
5	500	50	950	1000
6	600	60	940	1000
7	700	70	930	1000
8	800	80	920	1000
9	900	90	910	1000
10	1000	100	900	1000

2.14.2 Probenverdünnung

Verdünnung	Cytosol [µl]	Puffer [µl]	Gesamtvol. [µl]
1 : 20	50	950	1000
1 : 50	20	980	1000
1 : 100	10	990	1000

- Alle Bestimmungen wurden im Triplikat vorgenommen.
- Als Puffer wurde Einfrierpuffer verwendet, da das Cytosol in Einfrierpuffer vorlag.
- 20µl Proben + 1ml Bio-Rad Reagenz, in einem Eppendorf Reaktionsgefäß gut mischen (vortex)
- Inkubation: 15min, RT
- Photometrische Bestimmung: λ = 595nm in 1.5ml Plastikküvetten

2.14.3 Verwendete Puffer

2.14.3.1 Einfrierpuffer

Siehe 2.13.4.2

2.14.3.2 BioRad Working Reagenz

BioRad Stammlösung 1:5 verdünnen in VE-Wasser

Lagerung: 4°C

Haltbarkeit: max. 2 Wochen

2.15 Verwendete Chemikalien

1. 10x PCR-Puffer (Promega)
2. 11-Ketotestosterone (Sigma)
3. 11-Ketotestosterone Antikörper (Dr. D. Kime, Universität Sheffield)
4. ^{3}H-Estradiol (Schering AG, Pharmakokinetik)
5. 3-Mopholinopropansulfonsäure (ICN)
6. 75 % Ethanol in DEPC- Wasser
7. Acethylcholinesterase (Sigma)
8. Acetylthiocholin (Sigma)
9. Agarose multi purpose (Boehringer Mannheim)
10. Aktivkohle (Norit A®. 4-7µm, Sigma)
11. Anti-Digoxigenin-IgG alkalische Phosphatase-Konjugat (Boehringer Mannheim)
12. Anti-Kaninchen-IgG- Peroxidase Konjugat (Sigma)
13. Bio-Rad Protein Assay Kit I® (BioRad)
14. Blocking Reagenz® (Boehringer Mannheim)
15. Borsäure (Sigma)
16. Bromphenolblau Na-Salz, (Roth, für Elektrophorese)
17. BSA (Rinderserumalbumin) (Sigma)
18. Chloroform p.a. (Roth)
19. CMO = Carboxymethoxylaminhemihydrochlorid (Sigma)
20. Cresole Rot (Na-Salz) (Sigma)
21. CSPD = Dissodium 3-(4-methoxyspiro {1.2-dioxetane-3.2‘-(5‘-chloro)tricycycly [3.3.1.1$^{3.7}$]decan} –4-yl) phenyl phosphat (Boehringer Mannheim)
22. DEPC = Diethylpyrocarbonat (Sigma)
23. DEPC behandeltes VE-Wasser
24. Dextran 110® (Pharmacia)
25. Dextran T70® (Parmacia)
26. Dialyseschlauch (Sigma)
27. Dimethylformamide (Sigma)

28. DNA-Molecular Weight Marker XIV® (Roche)
29. DTNB = Dithionitrobenzoat (Sigma)
30. EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure (Sigma)
31. Eisessig (Merck)
32. Essigsäure p.a. (Fluka)
33. Estradiol (Sigma)
34. Estradiol Antikörper (Cayman Chemicals oder AG Bunte, Schering)
35. Estradiol-6-CMO (Sigma)
36. Estradiol-6-CMO-Achetylcholinesterase (Cayman Chemicals)
37. Ethanol absolut (Fluka)
38. Ethidiumbromid (Sigma)
39. Ethinylestradiol (Schering AG, Berlin)
40. Ethylacetat (Merck)
41. Fadrozol (Novartis Pharma, Basel, CH)
42. Fomaldehyd, 37% (Fluka, für Molekularbiologie)
43. Fromamid (Ameinsensäureamid) (Fluka, für Molekularbiologie)
44. Gene Amp dNTP-Mix® (Perkin-Elmer)
45. Gereinigtes Standard- und Coating- Vitellogenin wird, schon fertig verdünnt in Blockingpuffer von der Universität Brunel (London), ebenso wie der Karpfen-Vitellogenin Antikörper gestellt.
46. Glycerol ultra pure (ICN)
47. HCl-Titrisol (Merck)
48. H_2SO_4-Titrisol (Merck)
49. Isopropanol p.a. (Merck)
50. K_2HPO_4 (Merck)
51. KH_2PO_4 (Merck)
52. KOH-Titrisol (Merck)
53. Konz. HCl, 37%, (Merck)
54. Maleinsäure (Merck)

55. Methanol (Merck)

56. Methylenblau (Roth)

57. Methyltestosteron (Sigma)

58. $MgCl_2$ (25 mM, Promega)

59. $MgCl_2$ (Merck)

60. Monithioglycerol (Sigma)

61. MuLV Reverse Transkriptase® (Perkin-Elmer)

62. Na_2CO_3 (Riedel de Haën)

63. Na_2HPO_4 (Merck)

64. Na-Acetat (Merck)

65. Na-Azide (Sigma)

66. NaCl (Merck)

67. NaH_2PO_4 (Merck)

68. Na-Lauroylsarcosin (Fluka, für Molekularbiologie)

69. Na-Molybdat (Sigma)

70. NaOH-Titrisol (1M, Merck)

71. Natrium-Acetat x 3 H_2O (Merck)

72. Natriumhydroxid Plätzchen (Riedel de Haen)

73. N-hydroxysuccinimide (Sigma)

74. NN'dicyclohexylcarbodiimide (Sigma)

75. Oligo(dT)-Cellulose (Pharmacia Biotech)

76. OPD (ortho-Phenyldiamin) –Tabletten (5mg, Sigma)

77. PD-10-Säulen® (Pharmacia Biotech)

78. Phosphorsäure (Riedel de Haen)

79. PMSF = Phenylmethylsulfonylfluorid (Sigma)

80. Primer (Gibco oder MWG)

81. QIAquick Gel extraction Kit® (Qiagen)

82. Random Hexamers (Perkin-Elmer)

83. RNA Molecular weight Marker II®, Dig labeled (1.6-7.4kb) (Boehringer Mannheim)
84. RNase Erase® (ICN)
85. RNAse Inhibitor (Perkin-Elmer)
86. Scintillator (Beckmann)
87. SDS = Sodiumdodecylsulfat (Fluka, für Molekularbiologie)
88. Sucrose D(+) p.a. (Sigma)
89. Taq-Polymerase (Promega)
90. Tatrazine Gelb (Sigma)
91. Testosterone (Sigma)
92. Testosterone-3-CMO (Sigma)
93. Testosterone-3-CMO-Acethylcholinesterase (Cayman Chemicals oder Dr. D. Kime, Universität Sheffield)
94. TLC-Platten (Merck)
95. Tri-Natriumcitrat-2-hydrat (Riedel de Haen)
96. TRIZMA® HCl (Sigma)
97. TRIZMA®Base (Sigma)
98. TRIZMA®-HCl ultra pure (ICN)
99. TRIzol®-Reagenz (Life Technologies)
100. Trypsin (Sigma)
101. Tween-20 (Sigma)
102. Wasserstoffperoxid (Fluka)
103. Zitronensäure (Sigma)

2.16 Verwendete Geräte

1. 12-Kanal-Pipetten (Eppendorf)
2. Agarose-Gelkammer mit Zubehör (BioRad, Minigel + NeoLab, Midigel)
3. Analysenwaage
4. Aquarien diverser Größen (20l, 60l, 250l, Aufzuchtbecken in Kammern unterteilt)

5. Ausrüstung zur Photoentwicklung
6. Autoklav
7. Autoklavierte Pipettenspitzen (Eppendorf)
8. Autoklavierte Reaktionsgefäße (Eppendorf, 2.2ml und 1.5ml)
9. Autoklavierter Mörser + Pistill
10. Biofuge 15 (Heraeus)
11. Biofuge fresco (Heraeus)
12. Dewar-Gefäß
13. Folieneinschweißer
14. Hermle Zentrifuge
15. Hybridisierungsofen
16. IBM-kompatibler Computer
17. Kodak X-Ray Exposure Holder (Sigma)
18. Magnetrührer
19. Megafuge 1 (Heraeus)
20. Microplate Reader (BioRad, Modell 3550)
21. Mikropistill (Eppendorf)
22. Mikrotiterplatten, Costar® high binding, Polystyrene flat bottom, (Costar)
23. Mikrotiterplatten, Costar® non-stick plates, Polystyrene flat bottom, (Costar)
24. Mikrotiterplatten, Low binding Platte (Linbro)
25. Mikrotiterplatten, Nunc Maxisorb = High binding Platte (Life technologie)
26. Mikrotiterplattenschüttler für 4 Platten (Dunn)
27. MikroWellengerät
28. Netz zum Fische fangen
29. Netzgerät für Gelelektrophorese
30. PCR-Tubes (Eppendorf)
31. pH-Meter
32. Photometer

33. Polariodkamera oder Geldokumentationssystem
34. Polyprobpylenröhrchen
35. Präparationsbesteck
36. Quarzküvetten
37. RC5-Zentrifuge mit SS34 Rotor (Sorvall)
38. Reagenzien Reservoirs (Dunn)
39. Reaktionsgefäße (Eppendorf)
40. Rotana TRC-Zentrifuge (Hettich)
41. Scintillation-Counter (Beckmann)
42. Semi-micro 1.5 ml Einweg-Polystyrene Küvetten (BioRad)
43. Speed-Vac
44. Spezial-Klebeband (Dynatech)
45. Steriles Skalpell
46. Stoppuhr (Neolab)
47. Teflonpotter mit Motor (Schütt Labortechnik)
48. Tesaklebeband
49. Thermocycler mit Deckelheizung (MJ Omega)
50. Thermomixer (Eppendorf)
51. Tischzentrifuge (Eppendorf)
52. verstellbare Pipetten (Eppendorf)
53. Trockenschrank
54. Turbo-Blot Apparatur (Schleicher & Schuell)
55. Überkopfschüttler
56. Ultrazentrifuge (Beckmann, Optima Max-E)
57. UV-Photometer
58. UV-Transilluminator
59. Vortex-Schüttler

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Etablierung des Vitellogenin ELISAs (*enzyme linked immunosorbant assay*)

Nach einer Einführung in die Methodik des kompetitiven, indirekten ELISA an der Brunel University (London, UK) wurde der ELISA in 3 unterschiedlichen Laboren (AstraZeneca, Brixham, UK; Shell Thornton, UK und Schering AG, Berlin, D) etabliert.

Um Fehlerquellen bzw. Variationsmöglichkeiten auszuschließen, wurde der Vitellogenin-Antikörper, ebenso wie das gereinigte Karpfen-Vitellogenin zum Beschichten der Platte von der Universität Brunel für das gesamte Versuchsvorhaben gestellt.

Es folgte ein erster Ringtest direkt nach Erlernen des ELISAs, im Oktober 1998.

Tabelle 3.1. Ergebnisse des ersten Ringtests: Vitellogenin Konzentrationen in Fettkopfbrassen Ganzkörperhomogenat und Plasma, SA = Standardabweichung, %CV = Variationskoeffizient (Panter, 1999.).

Fisch Nr.	Brunel	Zeneca	Shell	Schering	Mittelwert	SA	%CV
	[ng /ml]	[ng /ml]	[ng /ml]	[ng /ml]			
Inter-Laborvergleich mit Ganzkörperhomogenat							
Z248-1	70	58	100	46	68.5	23.2	33.8
Z248-2	155	200	270	83	177.0	78.5	44.4
Z248-3	20	<35	<30	<10	20.0		
Z248-4	190	510	500	230	357.5	171.1	47.9
Z248-5	95	150	400	120	191.3	141.0	73.7
Z248-6	170	450	650	180	362.5	231.4	63.8
Z248-7	260	270	725	330	396.3	221.3	55.9
Z248-8	185	510	475	155	331.3	187.1	56.5
Z248-9	300	58	900	660	479.5	373.8	78.0
Z248-10	46	100	nd	130	92.0	42.6	46.3
Inter-Laborvergleich mit Plasma Proben							
Z248-P-11	70	125	105	130	107.5	27.2	25.3
Z248-P-12	72	70	95	126	90.8	26.1	28.8
Z248-P-13	180	240	360	440	305.0	117.0	38.4
Z248-P-14	180	350	380	275	296.3	89.2	30.1
Z248-P-15	100	115	400	215	207.5	138.1	66.6
Z248-P-16	170000	200000	350000	400000	280000.0	112249.7	40.1
Z248-P-17	280000	200000	500000	275000	313750.0	129445.9	41.3
Z248-P-18	220000	210000	575000	300000	326250.0	170654.4	52.3
Z248-P-19	280000	210000	625000	145000	315000.0	213892.5	67.9
Z248-P-20	220000	225000	nd	180000	208333.3	24664.4	11.8
						Mittelwert	47.5
						SA	17.7
						%CV	37.3

nd = keine Daten verfügbar

Knapp ein Jahr später, im August 1999, wurde ein weiterer Ringtest durchgeführt. Es sollte ermittelt werden ob routinierteres Arbeiten mit dem ELISA eine Veränderung im Inter-Laborvergleich ergab (Panter *et al.*, 1999).

Tabelle 3.2. Ergebnisse des zweiten Ringtests: Vitellogenin Konzentrationen in Fettkopfbrassen Ganzkörperhomogenat und Plasma (Panter, 1999).

Fisch Nr.	Brunel [ng /ml]	Zeneca [ng /ml]	Shell [ng /ml]	Schering [ng /ml]	Mittelwert	SA	%CV
Inter-Laborvergleich mit Ganzkörperhomogenat juveniler Fettkopfbrassen							
1	70	58	100	46	69	23	33.9
2	155	200	270	83	177	79	44.4
3	20	<35	<30	9	24	12	48.9
4	190	510	500	230	358	171	47.9
5	95	150	400	120	191	141	73.7
6	170	450	650	180	363	231	63.8
7	260	270	725	328	396	222	56.0
8	185	510	475	155	331	187	56.4
9	300	58	900	660	480	374	78.0
10	46	100	nd	131	92	43	46.6
Inter-Laborvergleich mit Plasma Proben adulter Fettkopfbrassen							
1 M	70	125	105	132	108	28	25.7
2 M	72	70	95	127	91	27	29.1
3 M	180	240	360	440	305	117	38.4
4 M	180	350	380	275	396	89	30.1
5 M	100	115	400	216	208	138	66.5
6 W	170000	200000	3500000	399700	280000	112000	40.0
7 W	280000	200000	500000	275400	314000	129000	41.1
8 W	220000	210000	575000	302000	327000	171000	52.3
9 W	280000	210000	625000	145000	315000	214000	67.9
10 W	220000	225000	nd	182300	209000	23000	11.0
						Mittelwert	55.0
						SA	13.6
						%CV	24.7

nd = keine Daten verfügbar

M = Männchen

W = Weibchen

Vergleicht man die bei Schering erhobenen Daten mit dem Mittelwert, so wurden bei den meisten Proben, etwas weniger VTG nachgewiesen. Im Durchschnitt wurden bei beiden Ringtests 90.5% des VTG im Vergleich zum Mittelwert gemessen (Ringtest 1: 92.4%, Ringtest 2: 88.6%). Die Variationskoeffizienten der Messungen der einzelnen Proben waren sehr hoch, sie lagen zwischen 11% und maximal 78%. Auch der zweite, ein Jahr nach Etablierung der Methode, durchgeführte Ringtest zeigte diese sehr starken Abweichungen. Diese Abweichungen sollten durch die Verwendung einer Charge Antikörper und gereinigten Vitellogenins, für alle 3 Labore vermindert werden.

Im Intralaborvergleich zeigten sich weniger starke Schwankungen der Messergebnisse. Die halbmaximale Bindung der Standardreihe lag bei 8.2ng/l mit einer Standardabweichung von 0.9 und einem Variationskoeffizienten von 11.5%. Um weitere Schwankungen zu vermeiden wurden sämtliche Proben immer zuerst bei einer Verdünnung von 1:100 in Blockingpuffer gemessen und nur bei sehr hohen Werten, ein weiteres Mal bei einer Verdünnung von 1:1000 nachgemessen.

Durch das Verwenden der gleichen Verdünnungen zur Messung aller Proben konnte eine Reproduzierbarkeit der Messwerte gewährleistet werden.

Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse sicherstellen zu können, müssen die Versuchsbedingungen sehr streng reglementiert sein, da schon eine Abweichung der Probenverdünnung in einer Zehnerpotenz eine Abweichung der mit der Verdünnung verrechneten Messergebnisse von ebenfalls einer Zehnerpotenz hervorruft.

Aus diesem Grund, sollten die Ergebnisse dieses ELISAs als eine Tendenz der Vitellogeninwerte angesehen werden, da eine Messung in einem anderen Labor unter anderen Versuchsbedingungen andere Werte zur Folge gehabt hätte. Unter immer gleichen Versuchsbedingungen sind die VTG-Werte allerdings ein guter Indikator, um eine Estrogen Exposition zu detektieren.

3.2 Etablierung des Steroid ELISAs

Um den Zusammenhang zwischen Vitellogenin- und Hormonstatus zu untersuchen, sollten zusätzlich die endogenen Steroide in den exponierten Fischen gemessen werden. Es wurden dazu 3 Steroide ausgewählt, die eine wichtige Rolle in der Geschlechtsbestimmung der Fische spielen; Testosteron (T) als weitverbreitetes Androgen, 11-Ketotestosteron (11KT) als speziell männliches Androgen im Fisch (Arai, 1967; Fostier *et al.*, 1983) und Estradiol (E2) als typischen Estrogen, welches die Expression des Vitellogenins aktiviert.

Die von Cuisset *et al.*, 1994 beschriebene Methode wurde für Plasmaproben etabliert und mußte daher modifiziert werden.

Das Protokoll zur Durchführung dieses ELISAs wurde von David Kime und Jon Nash (Universität Sheffield) zu Verfügung gestellt.

Um den ELISA zu validieren, wurde mit der Wiederfindung des Estradiols begonnen, da dieses Estrogen ein sehr starkes Adsorptionspotential besitzt. Es bindet erfahrungsgemäß sehr leicht an unterschiedliche Oberflächen, wie z.B. Plastikgefäße (Eppendorf Reaktionsgefäße, Zentrifugen-röhrchen usw.). Da weder Testosteron noch 11-Ketotestosteron dieses starke Potential aufweisen, wurde mit der vermeintlich schwierigsten Substanz begonnen.

In allen durchgeführten Verträglichkeitsprüfungen wurden juvenile Fettkopfbrassen (~100mg Körpergewicht, im Alter von 3-5 Monaten) eingesetzt. Bei diesen Fischen war es nicht möglich eine ausreichende Menge Plasma zu gewinnen um 4 unterschiedliche Parameter mit 4 ELISAs zu bestimmen. Daher wurden die Tiere homogenisiert (s. 2.4.1) und das Ganzkörperhomogenat für die Messungen eingesetzt.

Für sämtliche Wiederfindungsexperimente wurde gepooltes Homogenat von ca. 50 juvenilen Fettkopfbrassen verwendet.

3.2.1 Extraktionsmittel

Zu Beginn des Validierungsprozesses sollte das ursprüngliche Protokoll der Universität Sheffield getestet werden.

Dazu wurde gepooltes Homogenat aliquotiert, jedes 2. Aliquot (60µl) mit 300pg E2 (3µl Standard) dotiert und jede Probe mit 5ml Dichlormethan extrahiert. Nach der Zentrifugation wurde die organische Phase eingeengt und in absolutem Ethanol erneut gelöst. Der gelöste Extrakt wurde ein weiteres Mal eingeengt und erst dann in 300µl Steroid-Assay-Puffer gelöst.

Nur 23.9% des zugeführten Estradiols konnten nach dieser Aufarbeitung wiedergefunden werden. Zudem war der Variationskoeffizient (%CV) mit 174.1% sehr hoch. Daher wurde in einem 2. Wiederfindungsversuch das Extraktionsmittel ausgetauscht und statt des Dichlormethans Diethylether verwendet.

Die Wiederfindungsrate betrug hier nur 15.9%, allerdings war der Variationskoeffizient mit 77.9% deutlich niedriger.

Bei einer Extraktion mit Diethylether lag die organische Phase nach der Zentrifugation über der wässrigen und konnte nach Ausfrieren dekantiert werden. Bei einer Extraktion mit Dichlormethan musste die untere Phase aus den Zentrifugenröhrchen, ohne Kontamination mit der wässrigen Phase entnommen werden, was den höheren Variationskoeffizienten zufolge haben könnte. Zudem verkürzte sich die Zeit des Einengens bei Diethylether auf ca. 10 Minuten, im Gegensatz zu Dichlormethan, ca. 1.5 Stunden. Aufgrund der einfacheren Handhabung und des geringeren %CV wurde in der Folge Diethylether als Extraktionsmittel verwendet.

3.2.2 High-speed Zentrifugation

Das eingesetzte Homogenat war nach der ersten Zentrifugation (Abtrennung von nicht homogenisierten Teilen, wie z.B. Schuppen und Gräten) sehr trüb, was als Erklärung für die schlechte Wiederfindungsrate herangezogen werden kann. Möglicherweise störten organische Partikel bei der Antikörperbindung, oder es enstanden Fettmicellen, die durch die

Extraktion angereichert wurden und in die lipophile Substanzen wie die Steroidhormone partionierten, was die starke Variation der Wiederfindungsraten ebenfalls erklären könnte.

Darum wurde das folgende Experiment mit vorangehender Ultrazentrifugation des Homogenats durchgeführt, um größere organische Partikel abzutrennen.

Gepooltes Homogenat wurde für 1h mit 50377g (Heraeus, Biofuge stratos) bei 4°C abzentrifugiert. Danach wurde der fast klare Überstand abgenommen.

Eine Hälfte des Überstandes wurde mit Estradiol dotiert, die andere Hälfte undotiert aliquotiert, mit Diethylether extrahiert, gelöst und in den ELISA eingesetzt. Zusätzlich sollte im Rahmen dieses Versuches ein möglicher Wiederfindungsverlust durch das Wiederanlösen in absolutem Ethanol untersucht werden. Daher wurden 7 der 14 eingetrockneten Extrakte direkt in Steroid-Assay-Puffer gelöst, ohne vorheriges Lösen in Ethanol. Die Dotierung betrug 100pg pro 100µl Probe.

Die Wiederfindung mit Anlösen in absolutem Ethanol betrug nur 11.1% mit einem %CV von 47.0%. Im Gegensatz dazu lag die Wiederfindung ohne Anlösen in Ethanol bei 75.3% mit einem %CV von 57.2%. Eine hochtourige Zentrifugation konnte die sehr starken Variationen in den Wiederfindungsraten nicht beeinflussen. Allerdings war die Wiederfindung ohne vorheriges Anlösen in Ethanol wesentlich höher. Um den Verlust von über 50% zu vermeiden, wurde in den folgenden Versuchen auf das zweimalige Anlösen verzichtet.

Trotzt der starken Variationen wurde der Versuch mit einer hochtourigen Zentrifugation wiederholt, wobei die Proben vor der hochtourigen Zentrifugation dotiert wurden, was auch den tatsächlichen Versuchsbedingungen entspricht.

Die Wiederfindungsrate war mit nur 13.6% und einem Variationskoeffizienten von 226.9% sehr gering, was darauf hindeutet, dass das Estradiol an größere Partikel adsorbiert und nach der Ultrazentrifugation im Pellet verbleibt. Oder es löst sich wiederum in suspendierten Fettmicellen und verbleibt entweder im Pellet oder bindet an die Zentrifugenröhrchenwand.

Zusammenfassend läßt sich aus den Ergebnissen der beiden vorangegangenen Experimente folgendes schließen: Ohne Wiederanlösen in Ethanol, ergab sich eine wesentlich höhere Wiederfindungsrate. Offensichtlich war das meiste Estradiol nach der Ultrazentrifugation im Pellet gebunden und damit aus dem Überstand entfernt. Daher wurde in jedem weiteren Versuch auf eine Ultrazentrifugation ebenso wie auf das Wiederanlösen in Ethanol verzichtet.

Falls Estradiol an Mikropartikel, oder in fein verteilten Fettröpfchen gebunden in der Suspension verblieb, konnte es wahrscheinlich keine Bindung mit dem Antikörper des ELISAs eingehen.

3.2.3 Aliquotieren

Um die Ursache der starken Variationen der Wiederfindung zu untersuchen, wurde im nächsten Schritt Homogenat radioaktiv dotiert und anschließend aliquotiert. Dazu wurde ^{3}H-Estradiol verwendet, welches mit Hilfe eines Scintillation Counter und daher unabhängig von einer Antigen/Antikörper-Wechselwirkung, nachgewiesen werden konnte. Die Möglichkeit, dass Pipettierfehler beim Aliquotieren die Schwankungen verursachten, sollte damit ausgeschlossen werden.

Der Variationskoeffizient war mit nur 1.1% zwischen den neun gemessenen Proben sehr gering, d.h. das Problem lag nicht in der Inhomogenität der Suspension und damit einhergehenden Aliquotierungsproblemen.

3.2.4 Wiederholung der Aufarbeitung mit sämtlichen bisherigen Veränderungen

Wie das Ergebnis des letzten Versuchs zeigte, lag das Problem nicht am Aliquotieren, daher wurde der Extraktionsprozess auf mögliche Verluste untersucht. Hierzu wurde 850µl gepooltes Homogenat mit E2 dotiert, nach einer 10 minütigen Inkubation aliquotiert und extrahiert. Durch das Dotieren der gesamten Probe vor der Fraktionierung sollten Pipettierfehler durch das Dotieren mit nur sehr geringen Volumina (1-3µl Standard/Probe), verringert werden. Mit weiteren 850µl Probe wurde ohne Dotierung wie oben verfahren. Auf das Wiederanlösen in Ethanol wurde verzichtet, die eingetrockneten Extrakte wurden direkt in Steroid-Assay-Puffer gelöst. Die Dotierung betrug 375pg E2/Probe.

Eine Wiederfindungsrate von 76.2% war für den ELISA durchaus akzeptabel, allerdings war der Variationskoeffizient mit 44.5% zu hoch, um verläßliche Ergebnisse produzieren zu können. Mit den durchgeführten Variationen war es möglich, eine reproduzierbare Wiederfindungsrate von ~ 75% zu erreichen. Doch die sehr starken Variationen verhinderten den Einsatz des ELISAs zu diesem Zeitpunkt.

3.2.5 Proteinase K Behandlung der Ganzkörperhomogenate

Um eine Verminderung der Variationen zu erlangen, wurde in einem weiteren Schritt das Homogenat vor der Extraktion mit Proteinase K behandelt. Hierbei sollte der Einfluss von im Homogenat vorhandener Proteine auf die Antikörperbindung untersucht werden. Dazu wurden 20µl gepooltes Homogenat pro Probe mit 10mM EDTA, 1% SDS und 50µg Proteinase K behandelt. Durch einen einstündigen Verdau bei 55°C sollten sämtliche im Homogenat vorhandenen Proteine degeneriert werden. Vor dem Verdau wurden sämtliche Proben mit 100pg E2 dotiert. Da durch diesen Versuch nur die Variationen in der Wiederfindung untersucht werden sollten, wurde auf eine undotierte Kontrolle verzichtet.

Da es sich um gepooltes Homogenat handelte, konnte man davon ausgehen, dass in jeder Probe nach der Behandlung die gleiche Menge an E2 gefunden werden sollte. Die Wiederfindungsrate lag im Mittel bei 234.9%, allerdings war der niedrigste Wert bei 36.0%, der höchste 648.3%, daraus ergab sich ein CV von 85.9%. Da das Problem nicht durch das Entfernen von Proteinen gelöst werden konnte, lag die Vermutung nahe, dass das im Homogenat vorhande Fett und die Bildung einer Emulsion den ELISA störte.

3.2.6 Radioaktive Messung der Wiederfindungsrate

Da die Messung von radioaktiv dotierten Proben Antikörper-unabhängig erfolgt, wurde gepooltes Homogenat mit ^{3}H-Estradiol dotiert und ein weiteres Mal die Wiederfindung gemessen.

Jede Probe wurde mit 10000cpm ^{3}H-E2 dotiert, extrahiert und direkt in einem Scintillationcounter gemessen.

Gemessene Fraktionen:
1) dotiertes Homogenat
2) organische Phase nach der Extraktion
3) wasserlösliche Phase nach der Extraktion

Fraktion 1 wurde direkt gemessen, die Fraktionen 2 und 3 wurden nach der Extraktion eingetrocknet und in Steroid-Assay-Puffer gelöst. Die Counts des Homogenats wurden als 100% angenommen, die Counts der organischen Phase entsprechen X% und damit der Wiederfindung in %.

Tabelle 3.1. Radioaktive Wiederfindung von Estradiol im Ganzkörperhomogenat.

Probe	Homogenat [cpm]	wäs. Phase [cpm]	org. Phase [cpm]	w + o [cpm]	WF [cpm]
1	13415.6	362.6	8646.8	9009.4	67.16
2	13568.4	384.6	9780.4	10165.0	74.92
3	13913.8	337.1	8753.2	9090.3	65.33
4	13811.0	172.4	7777.7	7950.1	57.56
5	13822.4	221.4	6794.9	7016.3	50.76
6	13689.9	385.8	8704.4	9090.2	66.40
7	13717.2	327.6	8290.2	8617.8	62.82
8	13642.5	308.4	9720.7	10029.1	73.51
9	13876.8	323.40	7728.1	8051.5	58.02
10	13709.8	304.7	9732.8	10037.5	73.21
11	13636.9	336.3	6788.7	7125.0	52.25
12	12374.2	248.2	8162.5	8410.7	67.97
Mittelwert	13598.2	309.4	8406.7	8716.1	64.2
SA	409.4	65.1	1035.0	1065.5	8.1
%CV	3.0	21.0	12.3	12.2	12.6

Die Wiederfindungsrate war mit 64.2% akzeptabel, der Variationskoeffizient mit 12.6% ebenfalls. Die obige Tabelle zeigt deutlich, dass die starke Variabilität der Wiederfindungsraten nicht durch die Probenaufarbeitung bedingt wurde, sondern vermutlich durch Fettmicellen. Da für eine radioaktive Wiederfindungsbestimmung keine Antigen/Antikörper-Wechselwirkung benötigt wird, konnte auch das in Micellen gelöste E2 nachgewiesen werden.

3.2.7 Wiederfindung von Testosteron im Ganzkörperhomogenat

Durch die vorangegangenen Versuche wurde klar, dass Estradiol kaum mit einem ELISA im Ganzkörperhomogenat nachgewiesen werden kann. Daher wurde in einem weiteren Experiment Testosteron verwendet, um die Möglichkeit auszuschließen, dass das Problem Steroid spezifisch war. Gepooltes Homogenat wurde mit 100pg Testosteron pro Probe dotiert, mit Diethylether extrahiert und die getrocknete organische Phase in Steroid-Assay-Puffer gelöst.

Die Wiederfindung lag nur bei 13.0% und war damit wesentlich niedriger als die von Estradiol bei einer vergleichbaren Aufarbeitung (s. 3.2.4, ohne Anlösen in EtOH), allerdings war der Variationskoeffizient hier sehr hoch (210.3%). Damit zeigte die Wiederfindung von Testosteron im Ganzkörperhomogenat die gleiche Problematik wie der Estradiol ELISA, die starken Variationen waren daher vermutlich nicht Steroid, sondern auch hier Matrix-abhängig.

3.2.8 Wiederfindung von Estradiol und Testosteron in Plasmaproben

Wie in der Literatur beschrieben (Cuisset *et al.*, 1994 und Nash *et al.*, 2000) wurde der verwendete ELISA ursprünglich zur Messung von Steroiden in Plasmaproben etabliert. Daher wurde als letzter Versuch im Rahmen dieser Etablierung die Wiederfindung von Estradiol und Testosteron in Plasmaproben getestet.

Hierfür wurden 11 adulte Fettkopfbrassen (2M, 9W) in MS 222 (Ethyl-3-aminobenzoat-methansulfonat, Fischnarkotikum, 100mg/l) betäubt und durch Herzpunktion ausgeblutet. Das Vollblut wurde für 30min mit 3000g bei 4°C abzentrifugiert und nur das Plasma gepoolt weiterverwendet.

Die Aufarbeitung erfolgte wie zuvor beschrieben, Extraktion in Diethylether und Anlösen des getrockneten Extrakts in Steroid-Assay-Puffer.

Tabelle 3.1. Wiederfindung von Estradiol in Plasmaproben, Dotierung: 20pg E2/Probe.

Probe	dotiert	undotiert	WF	WF
	[pg/well]	[pg/well]	[pg]	[%]
1	24.39	0.69	23.70	118.50
2	22.97	0.71	22.26	111.30
3	22.04	0.81	21.23	106.15
4	23.40	0.79	22.61	113.05
5	24.28	0.89	23.39	116.95
6	26.26	1.14	25.12	125.60
Mittelwert	23.89	0.84	23.05	115.26
SA	1.45	0.16	1.34	6.69
%CV	6.07	19.62	5.80	5.80

Tabelle 3.2. Wiederfindung von Testosteron in Plasmaproben, Dotierung: 10pg/Probe.

Probe	dotiert	undotiert	WF	WF
	[pg/well]	[pg/well]	[pg]	[%]
1	9.03	0.32	8.71	87.10
2	9.16	0.31	8.85	88.50
3	9.16	0.31	8.85	88.50
4	9.00	0.27	8.73	87.30
5	9.01	0.29	8.72	87.20
6	8.73	0.26	8.47	84.70
Mittelwert	9.02	0.29	8.72	87.22
SA	0.16	0.02	0.14	1.39
%CV	1.75	8.26	1.59	1.59

Die beiden letzten Tabellen zeigen, dass die starken Schwankungen der Wiederfindungsrate der Homogenat-Versuche Matrix abhängig waren und nicht vom Assay selbst hervorgerufen wurden. Prinzipell kann man mit dem etablierten ELISA endogene Steroide im Plasma nachweisen, allerdings ist es bis jetzt, trotz aller Veränderungen der Probenaufbereitung, nicht möglich dies im Ganzkörperhomogenat durchzuführen.

Vermutlich störten bestimmte, im Homogenat vorhandene lipophilen Micellen, in denen die Steroide gelöst wurden, die Antikörper/Antigen-Wechselwirkung. Zudem wurde die Anwendung des ELISAs erschwert durch die sehr geringen Steroidkonzentrationen, welche in den juvenilen Fischen nachgewiesen werden konnten. Es wäre einfacher mit adulten Fischen zu arbeiten, da diese einen höheren Steroidspiegel besitzten und hier die Plasmagewinnung in den benötigten Mengen möglich wäre.

3.3 Etablierung des Steroid RIAs (Radioimmuno Assay)

Der Radioimmuno Assay stellt eine weitere Methode zur Messung von Steroidspiegeln in biologischen Materialien dar. Diese Methode unterscheidet sich in der Probenaufarbeitung kaum vom ELISA, allerdings ist die Auswertung, durch die Verwendung von radioaktivem

Tracer kostspieliger, zeitaufwendiger und nur in entsprechend ausgerüsteten Laboren durchführbar.

Die verwendeten Fische wurden ebenfalls in flüssigem Stickstoff getötet und nach dem Auftauen gewogen und mit Hilfe eines Ultrathurax homogenisiert. Im Gegensatz zum ELISA bestand hier die Möglichkeit auf zweierlei Arten zu dotieren, mit radioaktivem (heiß) oder mit nicht radioaktivem Steroid (kalt).

3.3.1 Testosteron Wiederfindung durch kaltes Dotieren an Einzelfischen

Hierzu wurden 7 Fische einzeln homogenisiert, und wie unter 2.6 beschrieben aufgearbeitet. Um den RIA zu validieren, wurden unterschiedliche Mengen an gelöstem Extrakt (50 und 100µl) erneut extrahiert, abzentrifugiert und eingeengt. Dieser 2. Extrakt wurde direkt mit Antikörperlösung resuspendiert und anschließend mit dem radioaktiven Tracer versetzt. Die Dotierung betrug 1000pg pro Probe.

Die Wiederfindung war mit 68.1% akzeptabel, der Variationskoeffizient war zwar mit 18.4% relativ hoch, allerdings deutlich niedriger als bei dem zuvor beschriebenen ELISA.

3.3.2 Testosteron Wiederfindung durch heißes Dotieren an Einzelfischen

Bei diesem Versuch wurde Ganzkörperhomogenat mit Tracer versetzt, extrahiert, in RIA-Puffer nach dem Einengen wieder angelöst und danach direkt im Counter gemessen. Zuvor musste allerdings bestimmt werden, ob es durch die Verdünnung des Tracers in Fischhomogenat zu einem Quench kommt, d.h. der Scintillation Counter durch die Trübung der Probe nicht mehr die exakte Menge an Radioaktivität bestimmen kann.

Hierfür wurde ein unbehandelter Fisch homogenisiert, extrahiert und in Puffer angelöst, er diente anschließend als Leerfischextrakt um den Tracer-Quench zu messen.

Tracer-Kontrollen: 1 = 100µl Testosteron-Tracer + 700µl RIA-Puffer

2 = 100µl Testosteron-Tracer + 300µl RIA-Puffer

3 = 100µl Testosteron-Tracer + 700µl Leerfischextrakt

4 = 100µl Testosteron-Tracer + 300µl Leerfischextrakt

Die beschriebenen Tracer-Kontrollen wurden als Replikate pipettiert und jede einzelne Probe 4 Minuten im Counter gemessen.

Tabelle 3.1. Quench Kontrolle des radioaktiven Testosteron-Tracers mit Leerfischextrakt.

	Kontrolle 1 [cpm]	Kontrolle 2 [cpm]	Kontrolle 3 [cpm]	Kontrolle 4 [cpm]
	2651.9	3021.7	2872.6	2989.1
	2804.2	3031.7	2687.8	3014.5
Mittelw.	**2728.1**	**3026.7**	**2780.2**	**3001.8**

Wie aus der obigen Tabelle hervorgeht, war der Quench nicht davon abhängig, ob mit einer BSA-Lösung, oder einem Fischextrakt verdünnt wurde. Zudem konnte man nun auch davon ausgehen, dass das Pipettieren einer Eichgerade in einer BSA-Lösung vergleichbare Ergebnisse lieferte.

Es wurden anschließend 4 Fettkopfbrassen einzeln homogenisiert und anschließend die Homogenate in 2 Aliquots geteilt.

Alle 8 Proben wurden mit 100µl Testosteron Tracer (2849.1cpm) dotiert und anschließend extrahiert. Zudem wurden 2x 200µl der wieder angelösten Probe ein weiteres Mal extrahiert um den zusätzlichen Verlust an Radioaktivität, durch die 2. Extraktion, zu ermitteln. Die cpm-Werte der Proben wurden im Counter 10 min gemessen.

Es gingen bei der 1. Extraktion 20%, bei einer weiteren 10% des externen Standards verloren. Nach der 2. Extraktion konnten noch 67.9% wiedergefunden werden. Der Variationskoeffizient lag bei 5.6%. Im Endeffekt bestätigte sich damit das Ergebnis des kalten Dotierens, mit dem RIA können ca. 70% des Gesamttestosterons nachgewiesen werden. Die geringeren Variationskoeffizienten erklären sich vermutlich durch die Art des Dotierens. Beim kalten Dotieren war das zugegebene Testosteron in absolutem Ethanol gelöst, was vermutlich die Antigen/Antikörper-Wechselwirkung störte, beim heißen Dotieren ist das radioaktive Testosteron in RIA-Puffer gelöst.

Testosteron konnte mit Hilfe dieses RIAs mit einem ~ 30%igen Verlust und nur geringen Variationen nachgewiesen werden.

3.3.3 Estradiol Wiederfindung durch kaltes Dotieren an Einzelfischen

Es wurden 7 Fische einzeln homogenisiert mit 1000pg Estradiol dotiert und wie beschrieben aufgearbeitet. Da noch keine Vorwerte für Estradiol im Ganzkörperhomogenat vorlagen wurden 3 verschiedene Inkubationvolumina getestet (50, 100 und 200µl).

Die Wiederfindung bei Estradiol betrugt nur zwischen 50 und 60% (50µl: 57.8%, 100µl: 59.4%, 200µl: 54.4%), mit vergleichbaren Variationskoeffizienten wie bei der Testosteron Wiederfindung (∅ 23.0%). Es wurde daher gleich verfahren, wie bei der Testosteron Wiederfindung und ebenfalls ein Versuch mit heißem Dotieren durchgeführt.

3.3.4 Estradiol Wiederfindung durch heißes Dotieren an Einzelfischen

4 Fische wurden einzeln homogenisiert und die Homogenate geteilt. Die Proben wurden mit jeweils 100µl Estradiol Tracer (2376.9cpm) dotiert und anschließend extrahiert. Zudem wurden 2x 200µl der wieder angelösten Probe ein zweites Mal extrahiert.

Nach der 1. Extraktion konnten 54.1% mit einem %CV von 24.3% wiedergefunden werden. Nach der 2. Extraktion nur noch 34.6%, mit einem %CV von 21.9%.

Auch hier war ein sehr großer Verlust durch die zweite Extraktion mit einem erneuten Anlösen zu erkennen. Die Wiederfindungsraten des Estradiol RIAs wurden durch ein heißes Dotieren, d.h. kein zusätzliches Lösungsmittel, im Ansatz nicht reduziert. Es traten wieder die gleichen Probleme wie beim Estradiol ELISA auf, daher wurde auf weitere Validierungsarbeit verzichtet.

3.4 Etablierung des mRNA Nachweises mittels Northernblot

Da zum Zeitpunkt des Versuchs weder die Sequenz des Vitellogenins noch des Estrogen Rezeptors der Fettkopfbrasse bekannt war, sollte die entsprechende mRNA mit Hilfe eines Northernblots und Sonden gegen Regenbogenforelle VTG und ER durchgeführt werden. Die Sonden wurden von der AG Y. Valotaire (Universität Rennes, F) gestellt.

Um Gesamt RNA zu erhalten, welche VTG und ER mRNA mit Sicherheit in ausreichenden Mengen enthält, wurden 15 weibliche adulte Fettkopfbrassen über 5 Tage statisch einer im Wasser gelösten Konzentration von 10µg EE2/l ausgesetzt (TXST 19980193). Es wurden täglich 3 Fische aus dem Becken entnommen, durch Dekapitation getötet und die Gesamt RNA isoliert. Am Ende des Versuchs wurden 3 weitere männliche, unbehandelte Fische dekapitiert und ebenfalls die RNA isoliert. Sie dienten im Anschluss als Negativkontrolle.

Die für den Northernblot verwendeten heterologen Sonden waren nicht in der Lage bei unterschiedlichen Bedingungen eine feste Bindung mit der aufgetrennten RNA der Fettkopfbrassen einzugehen. Da die Regenbogenforelle (*Onchorynchus mykiss*) zur Familie der Salmoniden gehört und die Fettkopfbrasse zu den Cypriniden, besteht nur in gewissen Teilbereichen eine Homologie zwischen den Nukleotidsequenzen.

3.5 Etablierung einer RT-PCR zum Nachweis der VTG und ER mRNA

Da mit einem Northernblot der Nachweis der VTG und ER mRNA nicht möglich war, durch den Vitellogenin ELISA aber nur die Menge an Protein bestimmt und daher keine Aussage über die Expression des Vitellogenins getroffen werden kann, wurde eine RT-PCR etabliert.

Anhand der, zum Zeitpunkt der Etabierung, bereits veröffentlichten Sequenz der Vitellogenin cDNA der Fettkopfbrasse (aus PubMed [www.ncbi.nlm.nih.gov], Korte *et al.*, unpubl., 1999,

Accession: AF 130354), wurden Primer abgeleitet. Diese Primer amplifizieren bei einer Anlagerungstemperatur (=T_A = *Annealingtemperatur*e) von 60°C ein Transkript von 400 Basen Länge. Zusätzlich wurde ein *Alignment* (= Vergleich von Sequenzen unterschiedlicher Tiere) für die Sequenz des Estrogen Rezeptors durchgeführt, da hier die Sequenz der Fettkopfbrasse noch nicht bekannt war. Hierbei wurden zuerst die ER-Aminosäuresequenzen sämtlicher in der Genbank auffindbaren Fische verglichen, um hochkonservierte Domänen zu finden. Bei der Steroid- ebenso wie bei der DNA-Bindedomäne handelt es sich um solche hochkonservierten Sequenzbereiche (Pakdel *et al.*, 1990). Zum Ableiten der gesuchten Primer wurde die Nukleotidsequenz der DNA-Bindedomäne des Goldfisches (*Carassius auratus*, Tchoudakova *et al.*, unpubl., 1999, Accession: AF061269) mit der des Zebrabärblings (*Danio rerio*, Legler *et al.*, unpubl., 2000, Accession: DRE275910) verglichen. Es konnten 2 Primerpaare gefunden werden, die ein Produkt von 323 Nukleotiden oder 218 Nukleotiden Länge, bei einer Anlagerungs-temperatur von 50 bzw. 64°C amplifizieren.

Zusätzlich wurde anhand der Sequenz des skeletalen Karpfen α-Actins (*Cyprinus carpio*, Watabe *et al.*, 1995, Accession: CYISAA1) Primer für ein konstitutiv exprimiertes Gen, als sogenanntes Housekeeping-Gen, abgeleitet.

Um die PCR zu etablieren, wurde wiederum die Gesamt-RNA der Ethinylestradiol exponierten Fische zur Etablierung des Northernblots (TXST 19980193) eingesetzt. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden durch eine Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, anschließend aus dem Gel ausgeschnitten, gereinigt und sequenziert.

Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe des Alignmentprogramms Fasta3 (www.ebi.ac.uk/fasta3/) in eine Genbank eingespeist und verglichen.

Tabelle 3.1. Ergebnisse der Sequenzierung von PCR-Produkten.

Bezeichnung	Primerkombi.	Bester Treffer	Identität [%]
VTG	VTG-fatfw VTG-fatrev	Fettkopfbrassen Vitellogenin (AF130345)	99.1
ER 1	ER-gold-1for ER-zeb-1rev	Zebrabärbling Estrogen Rezeptor (DRE275910)	86.4
ER 3+2	ER-gold-3for ER-zeb-2rev	Goldfisch Estrogen Rezeptor (AF177465)	82.5
Actin	Carp-a-actfw Carp-a-actrev	Goldfisch skeletales α-Actin (CASAA2)	86.8

Die zum Teil sehr geringen Identitäten bedingten sich durch die nicht optimale Sequenzierung. Bei den Proben ER 1 und Er 3+2, ebenso wie beim Actin lief ein sehr starker Hintergrund mit, d.h. die Peaks der einzelnen Nukleotide waren sehr niedrig und z.T.

überlagerten sie sich. Aus diesem Grund konnten einige Nukleotide nicht genau zugeordnet werden und mußten als N angegeben werden.

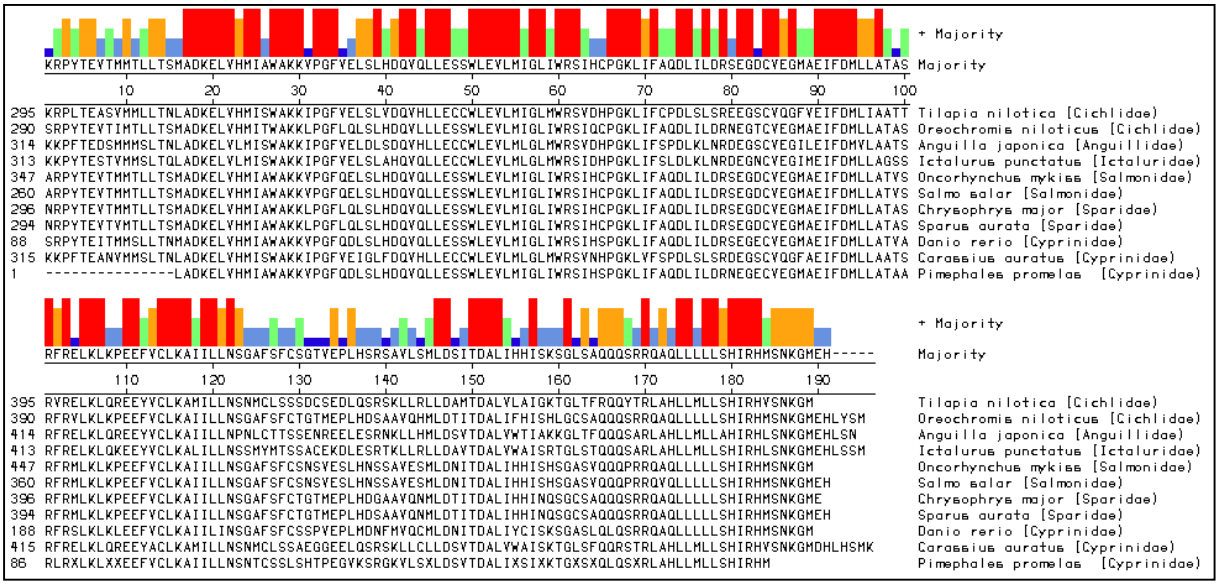

Abbildung 3.1. *Alignment* der Fettkopfbrassen ER Sequenz mit bereits bekannten ER Sequenzen von Fischen

Für das *Alignment* in Abb 3.1 wurden die gefundenen DNA-Sequenzen in die Aminosäure-Sequenz übersetzt und mit bekannten ER Sequenzen von anderen Fischen verglichen. Dabei konnte eine sehr große Homologie zwischen den einzelnen Sequenzen festgestellt werden.

3.6 Verlängerte Fischtests mit 3 endokrin wirksamen Substanzen

Juvenile, noch nicht geschlechts-differenzierte Fische wurden über 14 oder 21 Tage drei endogen aktiven Substanzen ausgesetzt. Es wurden juvenile Tiere verwendet, um mögliche Auswirkungen der endogen aktiven Substanzen auf die Geschlechtsdifferenzierung zu untersuchen. Hierbei handelte es sich um Ethinylestradiol, ein Estrogen, welches z.B. in Kontrazeptiva eingesetzt wird, um Methyltestosteron, ein synthetisches Androgen und Fadrozol, ein Aromatase-Inhibitor der Firma Novartis (Basel, CH). Für jede Substanz wurde vor dem definitiven Test ein auf 14 Tage verkürzter Dosisfindungs-Test durchgeführt. In der Literatur wurden bislang einige Fischtests beschrieben, bei denen die zu testende Substanz direkt im Aquarienwasser gelöst war (Holcombe *et al.*, 1984; Kramer *et al.*, 1998). Allerdings gab es keine Daten zu Methyltestosteron und Fadrozol. Zudem wurde oft mit größeren Spezies gearbeitet, beispielsweise Karpfen (*Cyprinus carpio*) oder Regenbogenforelle

(*Oncorhynchus mykiss*), hier wurde die betreffende Substanz meist intraperitoneal injiziert (Christiansen *et al.*, 1998; Crim *et al.*, 1980; Hernández *et al.* 1992).

Um eine Datengrundlage zu schaffen, war es wichtig, subletale Dosen der verwendeten Substanzen zu finden, die trotz der geringen Konzentration eine Wirkung auf den endogenen Hormonhaushalt der juvenilen Fische ausübten. Aus diesem Grund wurden die Vorversuche auf zwei Wochen Dauer beschränkt und nur eine geringe Anzahl an Fischen eingesetzt.

3.6.1 Ethinylestradiol *Range-finding* Test (TXST 19980250)

3.6.1.1 Eingesetzte Testkonzentrationen

Es wurden zwei Teilversuche hintereinander durchgeführt. Zuerst wurden die Tiere in einer Leitungswasserkontrolle und 3 Testsubstanzkonzentrationen von nominal 5.0, 10.0, 20.0 und 40.0ng/l exponiert, im Anschluß dazu in einem Zusatzversuch in 400.0ng/l.

Da Ethinylestradiol in ausreichenden Mengen wasserlöslich ist (~18mg/l; Schweinfurth *et al.*, 1997) wurde dieser Versuch ohne Lösungsvermittler durchgeführt.

Aufgrund von technischen Schwierigkeiten konnte keine Bestimmung des EE2-Gehalts der Proben aus dem *Range-finding* Test durchgeführt werden.

3.6.1.2 Begutachtung der Fische über den Versuchszeitraum

Über den gesamten Versuchszeitraum kam es im Hauptversuch, lediglich zu einzelnen Todesfällen. Insgesamt verstarben 4 Fische aus Gruppe 2,3 und 4. Im Gegensatz dazu mußte der Zusatzversuch an Tag 10 abgebrochen werden. Innerhalb von 5 Tagen (Tag 6-10) starben 6 Fische und die noch verbleibenden zeigten auffällige Abnormalitäten (Schwimmen nur direkt am Beckenboden, sehr verängstigt, verminderte Nahrungsaufnahme und sehr große Hämatome im Bereich der Rückenflosse). Aus diesem Grund wurden die restlichen Fische des Zusatzversuchs an Tag 10 in flüssigem Stickstoff moribund getötet.

Tabelle 3.1. Mittelwert der Körpergewichte von Fettkopfbrassen exponiert in EE2 über 14 Tage (*Range-finding* Test), n = 16.

Gruppe	Tag 4 [mg]	Tag 10 [mg]	Tag 14 [mg]
1	201.1	-	314.2
2	154.1	-	261.5
3	109.6	-	226.8
4	168.5	-	313.3
5	179.2	-	306.6
6	281.7	319.5	-

3.6.1.3 Vitellogeninkonzentrationen im Ganzkörperhomogenat

Alle getöteten Fische wurden homogenisiert und für die Vitellogeninbestimmung eingesetzt.

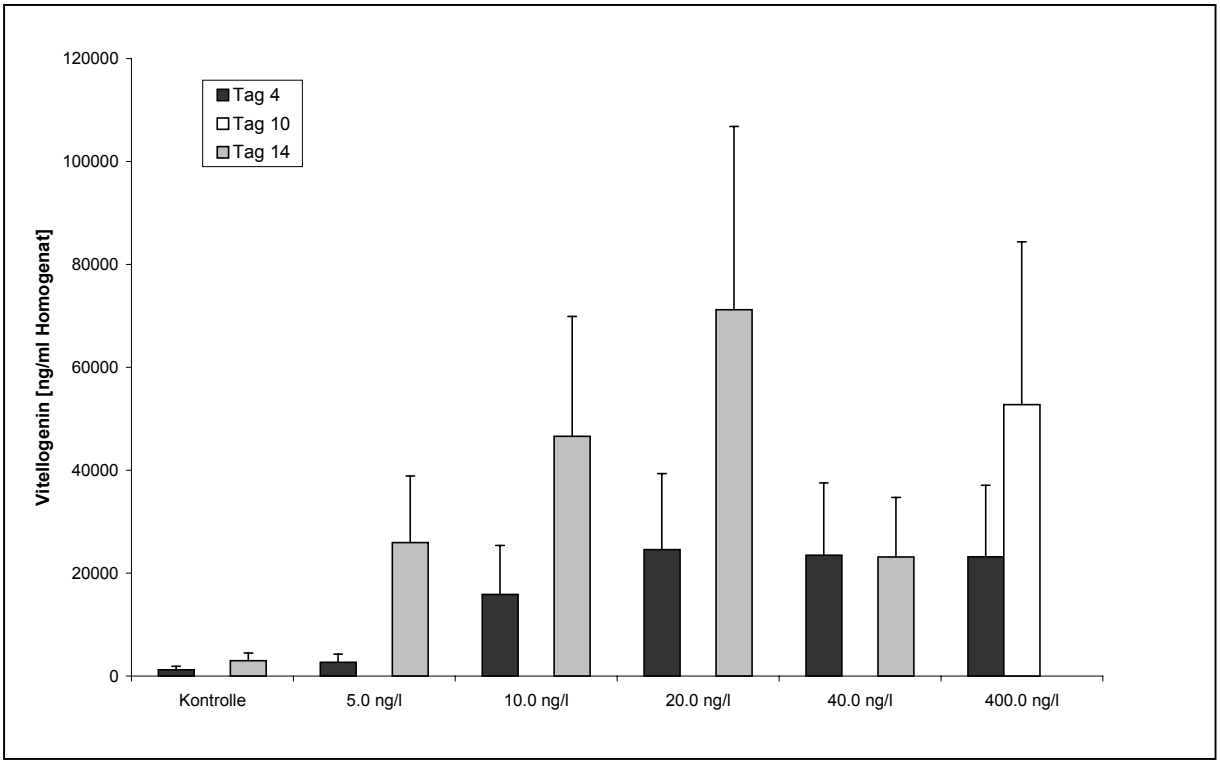

Abbildung 3.1. Vitellogeningehalt in juvenilen Fettkopfbrassen (Ganzkörperhomogenat) exponiert in EE2 über 14 Tage (*Range-finding* Test), n = 16.

Es konnte eine Dosis- und Zeitabhängigkeit durch die Ethinylestradiolbehandlung gezeigt werden. Bei 10ng EE2/l war schon an Tag 4 eine deutliche Steigerung der Vitellogeninkonzentration messbar, wohingegen bei 5ng/l die Steigerung erst bei Tag 14 nachweisbar war. In Gruppe 4 (20ng/l) war der Anstieg noch stärker, im Gegensatz dazu wurde in Gruppe 5 (40ng/l) keine weitere Zunahme an Vitellogenin im Homogenat an Tag 14 beobachtet. Dieses Phänomen kann weder durch ein geringeres oder höheres Körpergewicht, noch durch eine sonstige Abweichung der Fische der Gruppe 5 erklärt werden.

3.6.2 Ethinylestradiol definitiver Test (TXST 19990138)

3.6.2.1 Eingesetzte Testkonzentrationen

Auch bei diesem Versuch wurde kein Lösungsvermittler eingesetzt. Als nominale Testkonzentrationen wurde 5.0, 10.0 und 50.0ng/l getestet, wobei 10.0ng/l die Konzentration darstellte, welche in den anderen definitiven Tests als Positivkontrolle diente.

Tabelle 3.1. Nominale und gemessene Testkonzentrationen des Ethinylestradiol definitiven Tests.

Gruppe	Substanz	nomial [µg/l]	gemessen [µg/l]	% der Nominal-konzentration
1	Leitungswasserkontrolle	0.0	0.0	-
2	Ethinylestradiol	5.0	1.23 ± 0.7	24.6
3	Ethinylestradiol	10.0	3.79 ± 1.0	37.9
4	Ethinylestradiol	50.0	21.56 ± 6.5	43.1

3.6.2.2 Begutachtung der Fische über den Versuchszeitraum

Es kam zu einer leichten dosisabhängigen Zunahme der Mortalität, die allerdings nicht zeitabhängig war. Da aber bei diesem Versuch die Grenze von 10% Mortalität bei weitem unterschritten wurde und die Fische keine Befunde aufwiesen, wurde der Versuch nicht abgebrochen. Die restlichen Fische wiesen keine Verhaltens- oder makroskopischen Veränderungen auf.

Tabelle 3.1. Ethinylestradiol definitiver Test: Todesfälle, n = 136 (gesamt).

Gruppe	Woche 1	Woche 2	Woche 3	Gesamt [Anzahl]	Gesamt [%]
1	-	1	-	1	0.7
2	-	2	-	2	1.4
3	1	3	1	4	2.8
4	3	1	-	4	2.8

Tabelle 3.2. Mittleres Körpergewicht und Länge der Ethinylestradiol exponierten Fische (definitiver Test), n = 32.

Gruppe	Tag 0 [mg/mm]	Tag 4 [mg/mm]	Tag 7 [mg/mm]	Tag 14 [mg/mm]	Tag 21 [mg/mm]
1	unbehandelte Fische 107.9 / 16.4	54.8 / 14.9	102.3 / 16.0	141.1 / 17.4	213.8 / 20.4
2		59.3 / 15.5	102.1 / 16.6	162.3 / 18.3	217.8 / 20.5
3		70.6 / 15.5	113.6 / 17.5	199.7 / 20.3	188.1 / 20.6
4		80.7 / 15.0	81.5 / 16.3	149.1 / 17.8	157.7 / 21.0

Über den gesamten Versuchzeitraum haben die eingesetzten Fische kontinuierlich an Körpergewicht und -länge zugenommen.

3.6.2.3 Vitellogeninkonzentrationen im Ganzkörperhomogenat

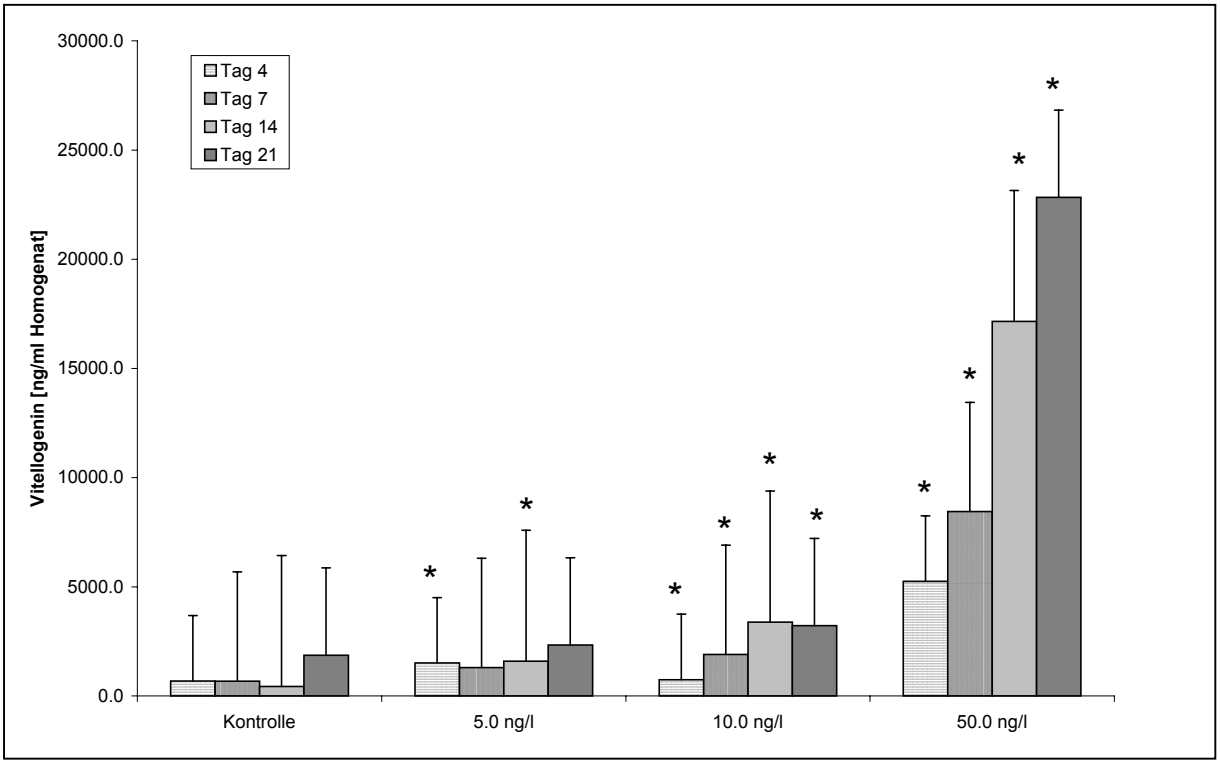

Abbildung 3.1. Vitellogeningehalt in juvenilen Fettkopfbrassen (Ganzkörperhomogenat) exponiert in EE2 über 21 Tage (definitiver Test), n = 32.

Das synthetische Steroid 17α-Ethinylestradiol ist - neben seinem 3-Methylether Mestranol - die wichtigste Estrogen-Komponente in oralen Kontrazeptiva (Schweinfurth *et al.*, 1997). Aus dem obengenannten Grund wurde ein starke Vitellogenin Anstieg durch die Exposition erwartet, welcher in Abbildung 3.3 auch sehr deutlich zu erkennen ist. Es kam dosis- und zeitabhängig zu einem Anstieg der Vitellogeninkonzentration im Ganzkörperhomogenat. Selbst bei der niedrigsten Konzentration, mit nominal 5ng/l konnte an Tag 4 und Tag 14 ein signifikanter Vitellogeninanstieg gemessen werden, bei den höheren Konzentrationen waren alle Messwerte signifikant höher als die Kontrolle ($p \leq 0.05$). Die Ergebnisse des *Range-finding* Tests konnten durch diesen definitiven Test bestätigt werden, auch hier kam es zu einem sehr starken, zeitabhängigen Vitellogeninanstieg, aufgrund der Exposition mit EE2. Allerdings war der VTG Anstieg beim *Range-finding* Test wesentlich höher als bei der definitiven Prüfung (s. Abb. 3.2). Das konnte durch das höhere Körpergewicht der Fische zu Beginn der Exposition erklärt werden (s. Tab. 3.8).

Da es sich bei Vitellogenin um ein Speicherprotein handelt, das zur Versorgung des Embryos dient, hat es eine sehr lange Halbwertszeit, je nach Fisch-Spezies von 132-303 Stunden (Craik *et al.*, 1977). Aus diesem Grund ist die Anreicherung des Vitellogenins

vermutlich nicht nur auf eine Neusynthese, sondern z. T. auch auf eine Akkumulation zurückzuführen.

3.6.2.4 RT-PCR

Mit Hilfe des Vitellogenin ELISAs wurde die Vitellogenin-Protein-Konzentration im Ganzkörperhomogenat gemessen. Es konnte damit keine Aussage über das Expressionsmuster getroffen werden. Deshalb sollte nachgewiesen werden, ob Vitellogenin und Estrogen Rezeptor mRNA von den juvenilen Fischen nach der Exposition mit endokrin wirksamen Substanzen neu-exprimiert wurde. Actin diente hier als Housekeeping Gen, da es in juvenilen Fischen ständig exprimiert wird und daher einen Marker für die Qualität der RNA bzw. der cDNA darstellte.

Abbildung 3.1. RT-PCR der EE2 exponierten Fischen zum Nachweis von VTG, Actin und ER mRNA (definitiver Test), n = 2.

Nur in 3 Proben konnte keine starke Bande des Actins nachgewiesen werden, d.h. die RNA Isolation hatte zu keiner Denaturierung geführt. Trotzdem konnte keine VTG mRNA nachgewiesen werden, auch nach Wiederholung der PCR. Es wäre möglich, dass es durch die Exposition mit EE2 nicht zu einer Neusynthese von VTG mRNA kommt, sondern dass die vorhandene mRNA stabilisiert wird und sich damit ihre Halbwertszeit und demzufolge die Translationsrate erhöht. Allerdings spricht die estrogen-abhängige Transkription des Vitellogenins gegen diese Hypothese, da EE2 an den Estrogen Rezeptor bindet und daher die Expression VTG mRNA fördert. Tenniswood *et al.*, konnten 1983 zeigen, dass in *Xenopus laevis* Hepatocytenzellen die VTG mRNA Akkumulation schon 16h nach der Exposition mit EE2 einen Höhepunkt erreicht. Aus diesem Grund wäre es möglich, dass die Tötungszeitpunkte zum Nachweis der mRNA schlecht gewählt waren, da der Anstieg schon vorrüber war und daher keine VTG mRNA nachgewiesen werden konnte.

Bei Fischen ist die Expression des ER Estrogen abhängig. Flouriot *et al.*, konnten 1997 zeigen, dass die Transskription des hepatischen ER der Regenbogenforelle nur unter Einfluss eines Estrogen-Estrogen Rezeptor Komplexes vonstatten geht. Dies bedeutet, dass eine Exposition mit einem potenten Estrogen in einer verstärkten Transkription der ER

mRNA resultieren sollte. Im Gegenteil dazu ist in Abb. 3.4 vielmehr eine leichte, zeitabhängige Abnahme der ER mRNA in den exponierten Fischen zu erkennen.

3.6.3 Methyltestosteron *Range-finding* Test (TXST19980071)

3.6.3.1 Eingesetzte Testkonzentrationen

Da Methyltestosteron (MT) nur in sehr geringen Mengen wasserlöslich ist (~10mg/l; Lösungsversuch), mußte ein Lösungsvermittler (Triethylenglykol : Aceton, 1:2) eingesetzt werden um eine Stammlösung anzusetzen. Bei den Testkonzentrationen handelte es sich um eine Leitungswasserkontrolle, eine Lösungsvermittlerkontrolle, und 3 Gruppen mit Substanzlösung (nominal 1µl/l, 10µg/l und 100µg/l). An den Tötungszeitpunkten (Tag 7 und Tag 14) wurden aus jedem Becken 20ml Lösung entnommen und in der Öko-Analytik der Gehalt an Testsubstanz bestimmt. Hierzu wurde ein Teil der Probe direkt in eine LC-MS Apparatur (Hochdruck Flüssigkeitschromatographie mit massenselektiver Detektion) injiziert.

Tabelle 3.1. Nominale und gemessene Testkonzentrationen des Methyltestosteron *Range-finding* Tests.

Gruppe	Substanz	nomial [µg/l]	gemessen [µg/l]	% der Nominal-konzentration
1	Leitungswasserkontrolle	0.0	0.0	-
2	Lösungsvermittlerkontrolle	0.0	0.0	-
3	Methyltestosteron	1.0	0.5 ± 0.0	50
4	Methyltestosteron	10.0	5.7 ± 0.1	57
5	Methyltestosteron	100.0	68.3 ± 0.7	68

3.6.3.2 Begutachtung der Fische über den Versuchszeitraum

Während der gesamten Exposition kam es lediglich in Guppe 4 (10µg MT/l) nach 4 Tagen zu einem Todesfall. Es konnte davon ausgegangen werden, dass die Substanz in subletalen Dosen vorlag. Auch kam es zu keinerlei Verhaltensabweichungen der MT exponierten Fische im Vergleich zu den Kontrollfischen. Das Schwimm- und Fressverhalten blieb unverändert, ebenso traten keine makroskopischen Abnormalitäten auf.

Ab Tag 4 des Rang-finding Tests kam es zu einer schwachen Trübung der Lösung im Mischgefäß von Gruppe 2 bis Gruppe 5. Damit einher ging auch ein sehr starker Abfall der Sauerstoff-konzentration von durchschnittlich 7.5mg/l auf 4.6mg/l. Dies ließ auf ein verstärktes Bakterienwachstum durch den Lösungsvermittler schließen, woraufhin in jedem

Becken eine externe Luftzufuhr installiert wurde. Im weiteren Laufe des Versuchs pendelte sich die Sauerstoffsättigung in Becken 2 bis 5 bei durchschnittlich 7.2mg/l ein, allerdings lag sie in der Leitungswasserkontrolle konstant über 8mg/l.

Tabelle 3.1. Mittleres Körpergewicht von Fettkopfbrassen exponierten in Methyltestosteron über 14 Tage (*Range-finding* Test).

Gruppe	Tag 7 [mg]	Tag 14 [mg]
1	349	422
2	292	431
3	441	461
4	539	688
5	422	432

3.6.3.3 Vitellogeninkonzentrationen im Ganzkörperhomogenat

Für die Vitellogeninbestimmung wurden nur die Fische des zweiten Tötungszeitpunktes herangezogen (10 Fische pro Gruppe, Tag 14), da sämtliche Fische vom ersten Tötungszeitpunkt (10 Fische pro Gruppe,Tag 7) für den Steroid ELISA, bzw. RIA extrahiert wurden. Durch die Extraktion war es nicht mehr möglich eine Vitellogeninbestimmung durchzuführen.

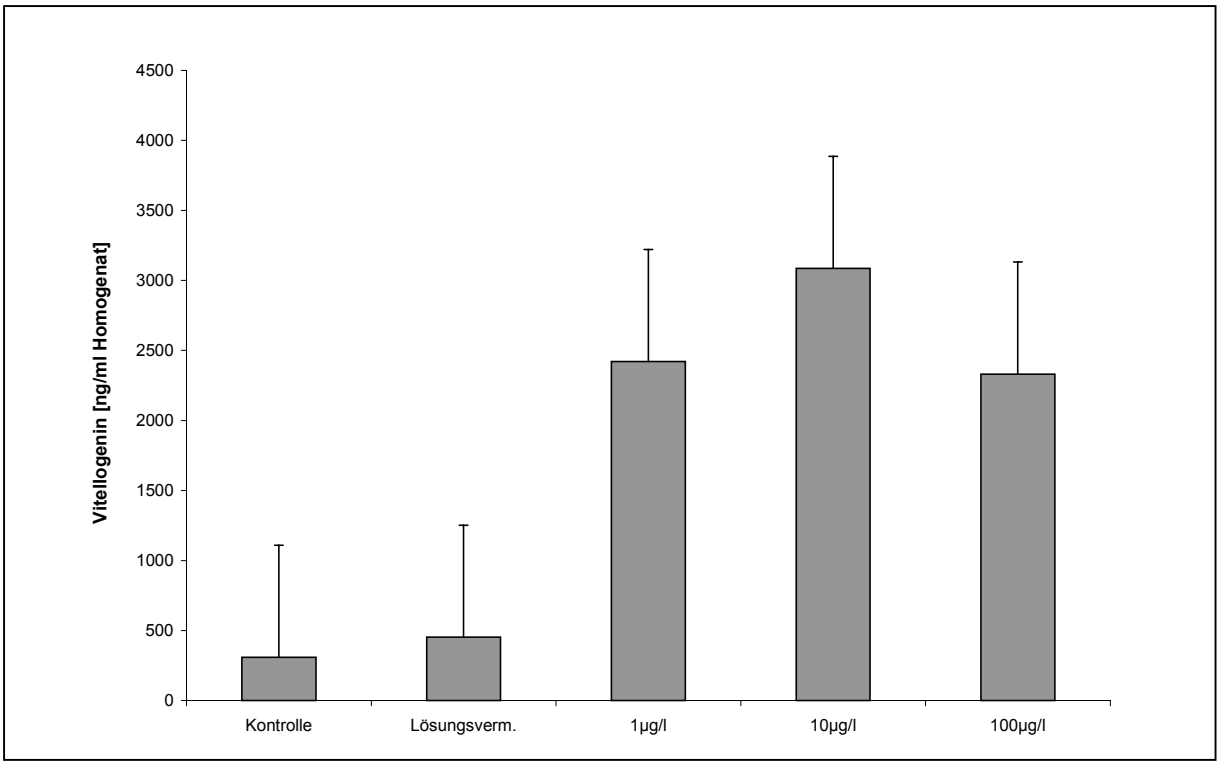

Abbildung 3.1. Vitellogeningehalt in juvenilen Fettkopfbrassen (Ganzkörperhomogenat) exponiert in MT über 14 Tage (*Range-finding* Test), n = 10

Durch die Behandlung mit Methyltestosteron kam es zu einem starken Vitellogeninanstieg, der allerdings nicht dosisabhängig war. Vitellogenin, das eigentlich in größeren Mengen nur von weiblichen geschlechtsreifen Fischen produziert wird, konnte mit Hilfe eines ELISAs auch in nicht- geschlechtsreifen Fettkopfbrassen nachgewiesen werden. Das könnte mit einer nicht-spezifischen Bindung des Methyltestosterons am Estrogen Rezeptor erklärt werden, oder mit einer möglichen Aromatisierung des Methyltestosterons durch die Aromatase im Fisch. Dies wird im weiteren noch geklärt werden.

3.6.3.4 Lösungsvermittlerversuch

Da Methyltestosteron schlecht wasserlöslich ist lag die Vermutung nahe, dass ein Teil der Substanz an dem Bakterienrasen absorbiert, was auch zu der Wiederfindungsrate von nur ∅ 58% (s. Tab. 3.12) beigetragen hätte. Aus diesem Grund wurde ein Versuch ohne Tiere und Substanz, sondern nur mit unterschiedlichen Lösungsmitteln durchgeführt.

Die zur Zeit verfügbare Guideline (OECD Guideline 204) zur Durchführung von aquatischen Tests mit schlecht wasserlöslichen Testsubstanzen beschreibt keine Mehrkomponenten-Lösungsver-mittlersysteme. Aus diesem Grund wurden nur einzelne Lösungsmittel im Durchflußverfahren, jedoch ohne eine Zuleitung in Aquarien getestet.

Verwendete Lösungsmittel:		
	Gruppe 1	Leitungswasser (Kontrolle)
	Gruppe 2	Ethanol
	Gruppe 3	Methanol
	Gruppe 4	Aceton
	Gruppe 5	Dimethylformamid
	Gruppe 6	Triethylenglykol

Nach einer Dichtebestimmung der Lösungsmittel wurden für diesen Versuch 200mg/l, über einen Versuchzeitraum von 14 Tagen eingesetzt.

An Tag 5 kam es zu einer leichten Trübung in Gruppe 2 und 3 (Ethanol und Methanol). An Tag 7 waren in diesen Becken fädige Bakterienkolonien und eine sehr starke Trübung zu erkennen, gleichfalls konnte eine leichte Trübung in Gruppe 4 (Aceton) beobachtet werden. Ab diesem Moment nahm auch die Sauerstoffsättigung in den betroffenen Becken drastisch ab (von ~8.0mg/l auf ~4.5mg/l). Der Versuch wurde für die Gruppen 2 - 4 an Tag 9 abgebrochen. Die Gruppen 1, 5 und 6 wurden noch 5 Tage weitergeführt. Bis Tag 14 trat keine Trübung auf, ebensowenig wie eine Abnahme des Sauerstoffgehalts in der Lösung.

In den weiteren Versuchen wurde Dimethylformamid (DMF) als Lösungsvermittler eingesetzt, da die Viskosität im Vergleich zu Triethylenglykol geringer ist und das Arbeiten mit einer Stammlösung damit erleichtert wurde.

3.6.4 Methyltestosteron definitiver Test (TXST 19990053)

3.6.4.1 Eingesetzte Testkonzentrationen

Als Grundlage der Substanzstammlösung diente ein Gemisch aus DMF und Wasser (1:4). Die Testsubstanz wurde als Stammlösung im Lösungsmittelgemisch in der jeweiligen Konzentration kontinuiertlich (2.1ml/h) in das Mischgefäß zudosiert und mit belüftetem Leitungswasser (8l/h) verdünnt. In die zwei Testbecken pro Konzentration wurde dieses Gemisch jeweils zur Hälfte aufgeteilt. In den Testaquarien ergab sich eine Endkonzentration an Lösungsmittel von 31mg/l, was einem Drittel der maximal erlaubten Lösungsmittelkonzentration (OECD Guideline 204) entsprach.

Insgesamt wurde eine Leitungswasser-, eine Lösungsvermittler- und eine Positivkontrolle (10.0ng EE2/l) mitgeführt. Zudem wurden die nominalen MT-Konzentrationen 10.0, 50.0 und 100.0ng/l getestet.

Tabelle 3.1. Nominale und gemessene Testkonzentrationen des Methyltestosteron definitiven Tests.

Gruppe	Substanz	nomial [µg/l]	gemessen [µg/l]	% der Nominal-konzentration
1	Leitungswasserkontrolle	0.0	0.0	-
2	Lösungsvermittlerkontrolle	0.0	0.0	-
3	Methyltestosteron	10.0	6.9 ± 0.8	69.0
4	Methyltestosteron	50.0	29.5 ± 3.1	59.0
5	Methyltestosteron	100.0	52.4 ± 10.5	52.4
6	Pos. Kontrolle EE2	10.0ng/l	nicht verfügbar	

3.6.4.2 Begutachtung der Fische über den Versuchszeitraum

Es kam zu einigen Todesfällen, allerdings wiesen die restlichen Fische auch bei diesem Versuch über den gesamten Versuchzeitraum keine Verhaltens- oder makroskopischen Veränderungen auf.

Tabelle 3.1. Methyltestosteron definitiver Test: Todesfälle, n = 136 (gesamt).

Gruppe	Woche 1	Woche 2	Woche 3	Gesamt [Anzahl]	Gesamt [%]
1	2	1	1	4	2.9
2	-	1	-	1	0.7
3	-	1	3	4	2.9
4	3	1	3	7	5.1
5	2	4	1	7	5.1
6	2	-	-	2	1.5

Aufgrund des Anstiegs der Mortalität in Gruppe 4 und 5 (50 und 100µgMT/l) konnte nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um substanzbedingten Todesfälle handelte. Die in der OECD Guideline 204 festgelegte Grenze von maximal 10% Mortalität wurde aber in allen Gruppen unterschritten. Da es zu keinen sonstigen, makroskopisch sichtbaren Veränderungen der Fische kam, wurde der Versuch nicht abgebrochen.

Tabelle 3.2. Mittelwert des Körpergewichts und der Länge der Methyltestosteron exponierten Fische (definitiver Test).

Gruppe	Tag 0 [mg/mm]	Tag 4 [mg/mm]	Tag 7 [mg/mm]	Tag 14 [mg/mm]	Tag 21 [mg/mm]
1	unbehandelte Fische 80.4 / 15.8	25.8 / 11.3	27.9 / 11.2	65.3 / 14.7	65.1 / 14.1
2		41.2 / 11.5	35.5 / 12.3	160.3 / 18.1	84.7 / 14.2
3		57.2 / 13.7	79.9 / 14.6	138.1 / 17.5	210.5 / 20.5
4		40.8 / 12.0	65.2 / 13.3	97.3 / 14.8	30.5 / 12.5
5		40.9 / 11.9	91.9 / 14.8	129.8 / 16.9	133.0 / 16.5
6		47.3 / 12.5	69.1 / 14.3	96.0 / 15.9	56.3 / 13.2

In Gruppe 2, 4 und 6 wurden an Tag 21 kleinere Fische gefangen als an den vorangegangenen Tagen. Die Vermutung liegt nahe, dass einzelne sehr kleine Fische, die bis zu diesem Tag nicht aufgefallen waren erst jetzt gefangen wurden. Ansonsten ist in jeder Gruppe eine leichte Gewichts- und Längenzunahme von Tag 4 bis Tag 21 zu erkennen.

3.6.4.3 Vitellogeninkonzentrationen im Ganzkörperhomogenat

An den Tötungszeitpunkten wurden aus jeder Gruppe 34 Fische entnommen, in flüssigem Stickstoff getötet und 32 davon nach dem Wiegen homogenisiert. Diese Fische wurden für die Vitellogeninbestimmung mittels ELISA eingesetzt.

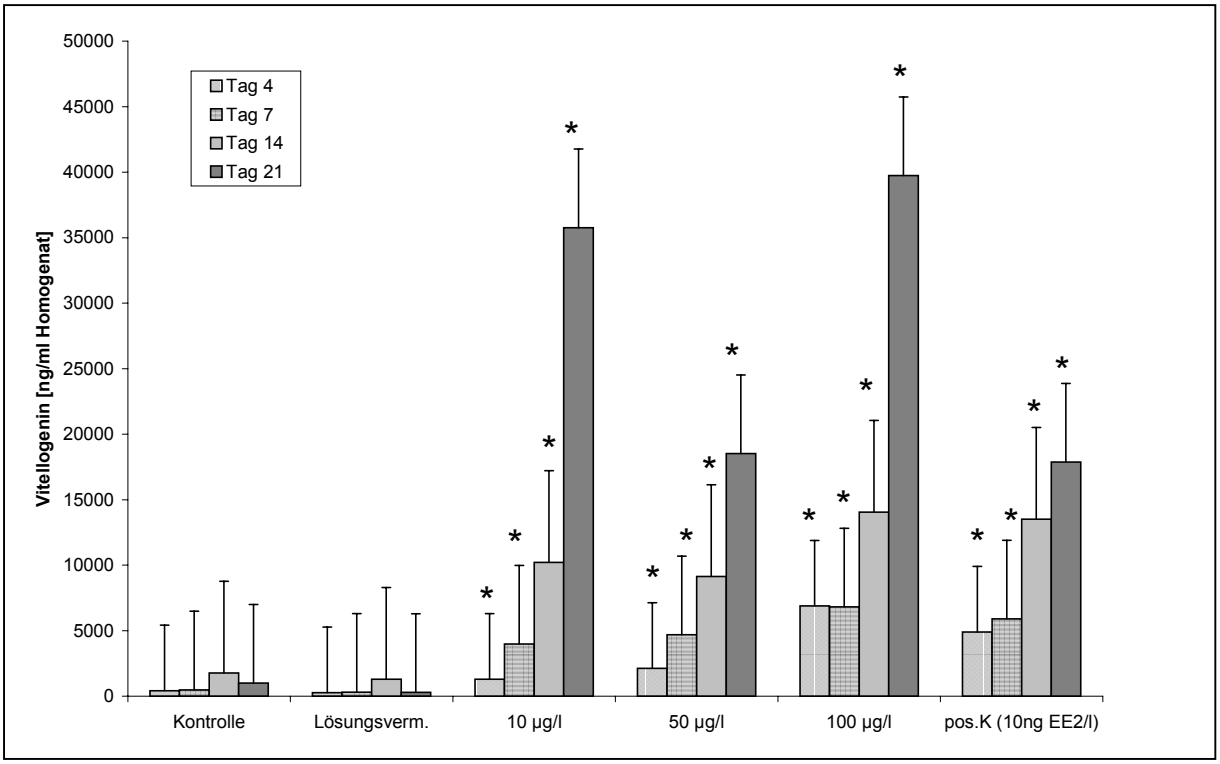

Abbildung 3.1. Vitellogeningehalt in juvenilen Fettkopfbrassen (Ganzkörperhomogenat) exponiert in Methyltestosteron über 21 Tage (definitiver Test), n = 32.

Wie in Abbildung 3.6 sehr deutlich zu sehen ist, kam es zeit- und dosisabhängig zu einem sehr starken, signifikanten Vitellogeninanstieg ($p \leq 0.05$) in allen Substanz exponierten Gruppen. Damit konnten die Ergebnisse des *Range-finding* Tests bestätigt werden (Abb. 3.5). Der Anstieg war in den Methyltestosteron behandelten Fischen sogar noch höher als in der Positivkontrolle, allerdings waren auch die Konzentrationen an Testsubstanz 1000fach erhöht. Die Zunahme an Vitellogenin im Ganzkörperhomogenat wurde schon an Tag 4 der Exposition deutlich und war in allen Gruppen an Tag 7 sehr klar zu erkennen.

Diese paradoxe Induktion der hepatischen Vitellogeninproduktion wurde bereits 1979 durch Hori *et al.* beschrieben. Methyltestosteron führt, genau wie Estrogene, zu einer starken hepatischen Hypertrophie (= Vergrößerung von Gewebe oder Organen, durch Zunahme des

Zellvolumens, bei gleichbleibender Zellzahl) bei Goldfischen. Es folgte eine starke Neusynthese verschiedener Sekretionsproteine, unter anderem auch des Vitellogenins.

Dimethylformamid scheidet als Wirksubstanz aus, obwohl Ren *et al.*, 1996 eine estrogene Wirkung des DMF postulierte. Dies konnte hier nicht bestätigt werden. Der Einsatz von DMF als Lösungsvermittler zeigte zumindest auf die Vitellogeninkonzentrationen im Ganzkörperhomogenat keinen Einfluß (vergleiche Gruppe 1 und 2).

3.6.4.4 RT-PCR

Aus jeder Gruppe wurden zu jedem Tötungszeitpunkt 2 Tiere entnommen und die Gesamt RNA isoliert.

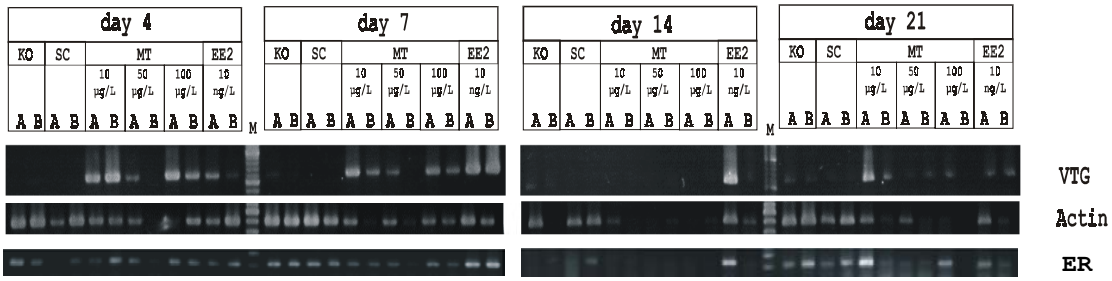

Abbildung 3.1. RT-PCR der Methyltestosteron exponierten Fische zum Nachweis von Vitellogenin, Actin und Estrogen Rezeptor mRNA, n = 2.

Auf dem Agarosegel in Abbildung 3.7 ist sehr deutlich zu erkennen, dass es durch die Exposition mit Methyltestosteron zu einer Expression der Vitellogenin mRNA kam. In den Kontrollfischen (Gruppe 1 und 2) war keine Bande für VTG zu erkennen, im Gegensatz zu den MT und EE2 exponierten Fischen. An Tag 14, ebenso wie bei einigen Fischen an Tag 21 war weder eine VTG, eine ER, noch eine Actin Bande zu erkennen, was daraufhin deutet, dass die RNA bei diesen Fischen durch die Aufarbeitung degeneriert wurde. Es scheint, als würde die mRNA Expression des Estrogen Rezeptors dagegen nicht durch die Exposition der Fische verändert. Pakdel *et al.* zeigten 1991, dass bei Estradiol exponierten Regenbogenforellen (rt) die rtVTG mRNA Akkumulation noch anhält, während die rtER mRNA schon wieder den Basallevel erreicht hat. Dies wäre durch eine verlängerte Halbwertszeit der rtVTG mRNA zu erklären. Der Anstieg der rtVTG mRNA war ca. 1000 mal stärker als der rtER mRNA Anstieg. Der rtER-Promotor weist ein imperfektes ERE (*estrogen responsive element*) auf (Pakdel *et al.*, 1991), was als Erklärung für die abgeschwächte Induktion dienten könnte.

Da zur Gewinnung der Gesamt RNA ganze Fettkopfbrassen eingesetzt wurde und nicht nur die Leber, wäre es möglich, dass aufgrund des Verdünnungseffekts, der nur sehr geringe Anstieg der ER mRNA nicht mit Hilfe einer RT-PCR detektierbar war. Zudem ist es sehr schwierig quantitative Aussagen über eine geringe Konzentrationsänderung, nach einer Auftrennung in einem Agarosegel zu treffen. Möglicherweise war der Zeitpunkt des Anstiegs vor der ersten Probennahme an Tag 4 und konnte aus diesem Grund nicht mehr detektiert werden.

3.6.4.5 CERBA

Es war im Laufe dieser Arbeit nicht möglich Cytosol mit bindungsfähigem ER aus verschiedenen Karpfenlebern zu präparieren. Vermutlich konnte kein Zellaufschluss durch das Pottern erreicht werden. Aus diesem Grund war es auch nicht möglich Bindungsstudien mit Methyltestosteron am hepatischen Estrogen Rezeptor von Cypriniden durchzuführen.

3.6.5 Fadrozol *Range-finding* Test (TXST 19990075)

3.6.5.1 Eingesetzte Testkonzentrationen

Fadrozol ist sehr gut wasserlöslich, daher wurde bei diesem Versuch kein Lösungsvermittler eingesetzt.

Da zum Zeitpunkt dieses Versuches noch keine Analytikmethode für Fadrozol im Wasser verfügbar war, wurde auf eine Analytik des *Range-finding* Tests verzichtet.

Es waren keinerlei Daten aus der Literatur bekannt, die sich mit der Exposition von Fischen in, direkt im Wasser gelösten, Fadrozol beschäftigten. Daher diente dieser Test einer groben Abschätzung der verträglichen Konzentrationen. Es wurden 10.0 und 100.0µg/l getestet. Um Fische einzusparen wurde auf eine Leitungswasserkontrolle verzichtet. Allerdings wurden am Tag des Versuchsbeginns 32 unbehandelte Fettkopfbrassen aus der Akklimatisation in flüssigen Stickstoff getötet. Sie dienten als Kontrolle bei der Vitellogeninbestimmung.

3.6.5.2 Begutachtung der Fische über des Versuchszeitraum

Über den gesamten Versuchszeitraum kam es zu keinem Todesfall. Die eingesetzten Tiere zeigten auch keine Verhaltens- oder makroskopischen Veränderungen.

Tabelle 3.1. Körpergewicht der Fadrozol exponierten Fische (*Range-finding* Test), n = 16.

Gruppe	Tag 7 [mg]	Tag 14 [mg]
1	264.1	276.5
2	175.7	242.4

3.6.5.3 Vitellogeninkonzentrationen im Ganzkörperhomogenat

An jedem Tötungszeitpunkt (Tag 7 und Tag 14) wurden 16 Fische aus beiden Gruppen in flüssigem Stickstoff getötet. Sämtliche Fische wurden homogenisiert und zur Vitellogeninbestimmung herangezogen. Als Kontrollfische galten hier die an Tag 0 getöteten Fettkopfbrassen.

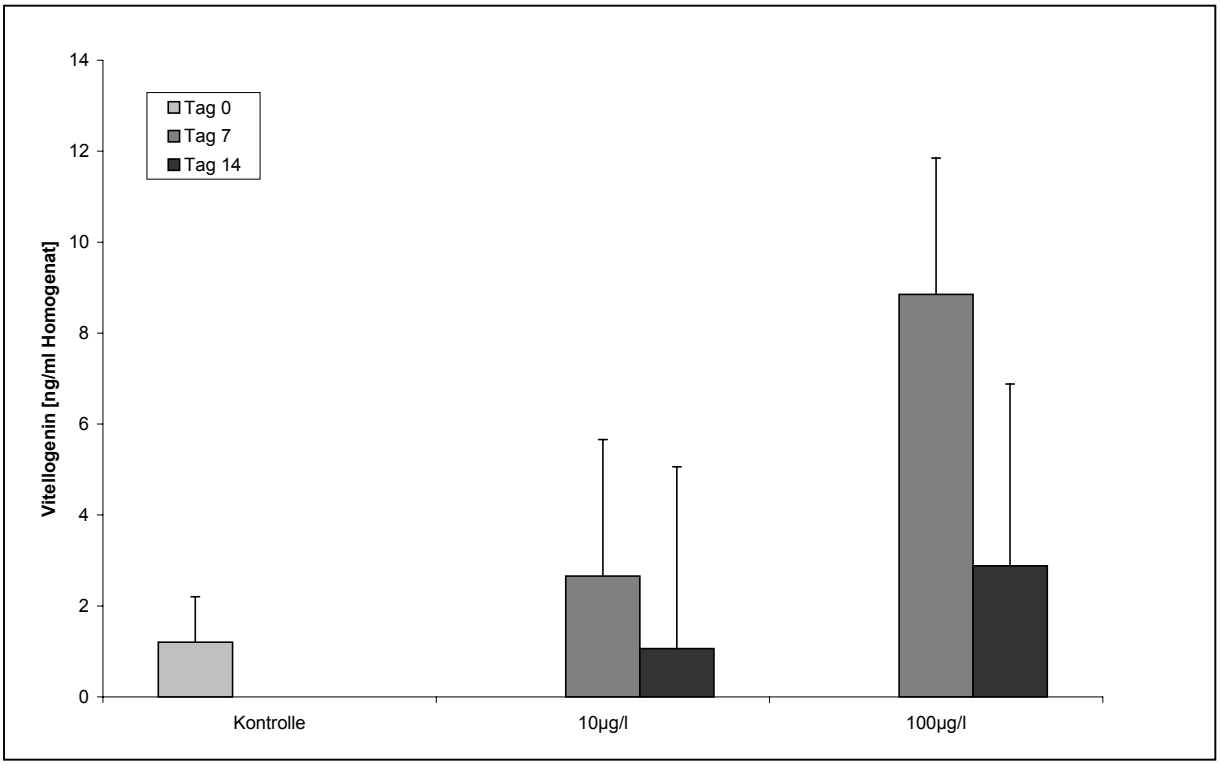

Abbildung 3.1. Vitellogeningehalt in juvenilen Fettkopfbrassen (Ganzkörperhomogenat) exponiert in Fadrozol über 14 Tage (*Range-finding* Test), n= 16.

Trotz der Exposition mit einem Aromatase-Inhibitor kam es zu einer nicht erklärbaren Steigerung der Vitellogeninkonzentrationen im Ganzkörperhomogenat der exponierten Fische. Allerdings wurde das Vitellogenin nicht wie bei den vorangegangenen Versuchen akkumuliert, sondern der Gehalt nahm von Tag 7 zu Tag 14 ab. Diese Zunahme, mit der anschließenden Abnahme konnte nicht erklärt werden.

3.6.6 Fadrozol definitiver Test (TXST 19990109)

3.6.6.1 Eingesetzte Testkonzentrationen

Es wurden 3 verschiedene Fadrozol Konzentrationen getestet (nominal 25.0, 50.0 und 100.0 µg/l), zudem wurde eine Leitungswasser- und eine Positivkontrolle (10.0ng EE2/l) mitgeführt. Die Bestimmung der Fadrozol Konzentration im Wasser erfolgte durch HPLC-Analytik.

Tabelle 3.1. Nominale und gemessene Testkonzentrationen der Fadrozol exponierten Fische (definitven Test).

Gruppe	Substanz	nomial [µg/l]	gemessen [µg/l]	% der Nominal-konzentration
1	Leitungswasserkontrolle	0.0	0.0	-
3	Fadrozol	25.0	37.7 ± 3.1	150.7
4	Fadrozol	50.0	87.4 ± 2.4	174.8
5	Fadrozol	100.0	114.6 ± 1.4	114.6
6	Pos. Kontrolle EE2	10.0ng/l	5.2 ± 1.9 ng/l	5.2

Es konnte keine Erklärung für die sehr hohen gemessenen Substanzkonzentrationen gefunden werden. Die Berechnung der Substanzmenge und deren Einwaage waren nachvollziehbar und korrekt.

3.6.6.2 Begutachtung der Fische über den Versuchszeitraum

Es kam während des Versuchs zu 5 Todesfällen, die toten Fische wurden sofort den Becken entnommen. Da in jeder Gruppe ein Fisch gestorben war, konnte keine Substanz- oder Zeitabhängigkeit festgestellt werden. Die restlichen Fische wiesen über den gesamten Versuchzeitraum keine Verhaltens- oder makroskopischen Veränderungen auf.

Tabelle 3.1. Mittleres Körpergewicht und Länge der Fadrozol exponierten Fische (definitiver Test), n = 32.

Gruppe	Tag 0 [mg/mm]	Tag 4 [mg/mm]	Tag 7 [mg/mm]	Tag 14 [mg/mm]	Tag 21 [mg/mm]
1	unbehandelte Fische 73.2 / 15.1	51.5 / 14.2	140.3 / 12.9	170.5 / 19.0	200.9 / 20.0
2		53.4 / 13.8	137.8 / 17.2	139.1 / 17.6	193.5 / 19.7
3		51.6 / 13.3	68.5 / 13.5	140.8 / 18.4	225.1 / 20.4
4		53.7 / 14.9	97.0 / 16.6	140.2 / 18.9	185.3 / 20.5
5		59.3 / 15.3	93.7 / 15.6	112.2 / 17.5	153.2 / 19.2

Die Fische haben über den gesamten Versuchzeitraum, in allen Gruppen kontinuierlich an Körpergewicht und -länge zugenommen.

3.6.6.3 Vitellogeninkonzentrationen im Ganzkörperhomogenat

Es wurden von jeder Gruppe und zu jedem Tötungszeitpunkt 32 Fische homogenisiert und zur Vitellogeninbestimmung mittels ELISA eingesetzt.

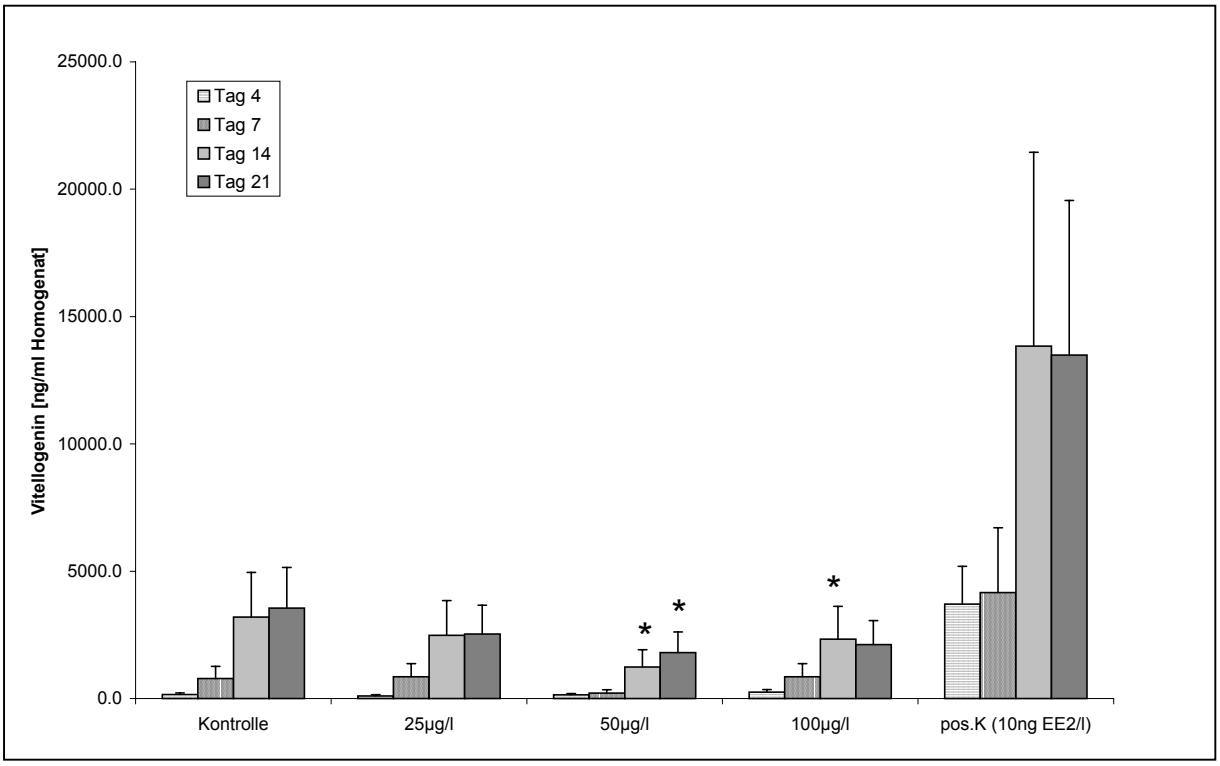

Abbildung 3.1. Vitellogeningehalt in juvenilen Fettkopfbrassen (Ganzkörperhomogenat) exponiert in Fadrozol über 21 Tage (definitiver Test), n = 32.

Durch die Exposition mit Fadrozol kam es zu einem leichten Abfall der Vitellogeninkonzentrationen im Vergleich zur Leitungswasserkontrolle. In Gruppe 3 war dieser Abfall an Tag 7 und 14 signifikant, ebenso in Gruppe 4 an Tag 14 ($p \leq 0.05$). Allerdings kam es bei diesem Versuch in den einzelnen Gruppen zu einer Vitellogenin-Akkumulation von Tag 4 zu Tag 21. Diese Akkumulation läßt sich durch eine verringerte Neusynthese des Vitellogenins erklären. Durch Fadrozol wird die Aromatase gehemmt, d.h. es wird kein Estradiol aus Testosteron neu synthetisiert. Das, bereits vor der Exposition, vorhandene Estradiol konnte daher zu diesem zeitabhängingen Vitellogeninanstieg führen.

Die Ethinylestradiol behandelten Fische reagierten mit einem signifikanten ($p \leq 0.05$) zeitabhängigen Anstieg auf die Exposition.

3.6.6.4 RT-PCR

Abbildung 3.1. RT-PCR der Fadrozol exponierten Fische zum Nachweis von Vitellogenin, Actin und Estrogen Rezeptor mRNA.

In Abbildung 3.10 ist zu erkennen, dass es in den Fadrozol exponierten Fischen zu keiner Vitellogenin mRNA Expression kam. In der Positivkontrolle war allerdings ebenfalls keine Bande zu erkennen, was aber hier durch eine Denaturierung der RNA bei der Isolation erklärt werden kann, da bei diesen Fischen auch nur eine sehr schwache, oder gar keine Actinbande zu erkennen war. Die Estrogen Rezeptor Expression schien auch hier nicht durch die Exposition beeinflusst zu werden, allerdings nahm die Bande mit der Güte der RNA bzw der cDNA ab.

3.6.7 Vergleich der definitiven Tests

Da es sich bei den für die definitiven Tests eingesetzten Tieren um unterschiedliche Populationen handelte, mussten einige interne Kontrollen eingeführt werden. Zum Teil wurden die Fische von Osage Catfisheries (Missouri, USA) geliefert, die anderen stammten aus der hauseigenen Zucht. Das Alter der Fische variierte von drei bis fünf Monaten und alle Fische stammten aus anderen Zuchtansätzen.

Es wurden die Geschlechtsverhältnisse der akklimatisierten Fische bestimmt, nicht exponierte Fische vor Versuchsbeginn (Tag 0) aus der Akklimatisation entnommen und die VTG-Werte bestimmt und bei jedem definitiven Test eine Positivkontrolle mit nominal 10ng EE2/l mitgeführt.

3.6.7.1 Geschlechtsverhältnis

Vor jedem Fischversuch wurden die eingesetzten Fische für 2 Wochen akklimatisiert, d.h. es wurden täglich die hydrographischen Parameter gemessen, die Fische begutachtet, eventuelle Todesfälle dokumentiert und die toten Fische entfernt. Aus dieser Akklimatisationsgruppe wurden nach dem Randomisieren der für den Versuch eingesetzten Fische, 40 weitere Fettkopfbrassen in ein separates Becken gesetzt und bis zur Geschlechtsreife (ca. 7 Monate) aufgezogen.

Die adulten Tiere wurden in MS 222 (150mg/l) getötet und auf Grund der sekundären Geschlechtsmerkmale das Geschlechterverhältnis bestimmt. Hierbei wurde vorallem auf die Färbung der Rückenflosse geachtet. Ein dunkler Fleck auf der Rückenflosse ist das erste erkennbare Zeichen, dass es sich bei einer Fettkopfbrasse um ein Männchen handelt. Etwas später bilden sich bei den Männchen Tuberkel auf der Mauloberseite und die Fetteinlagerung am Hinterkopf. Hat ein Männchen die Geschlechtsreife erreicht und kann durch agressives Revierverhalten eine eigene Laichhöhle verteidigen, kommt es zu einer weiteren Pigmentierung des Körpers. Zuerst färben sich die Kiemendeckel, anschließend wird der ganze Kopf schwarz. Zusätzlich ensteht ein dunkles Band von der Rücken- bis zur Bauchflosse, der Schwanzansatz und die Schwanzflosse werden ebenfalls dunkel. Die Weibchen zeigen diese Pigmentierung nicht, der Gesamteindruck eines Weibchens ist schlanker als beim Männchen und der Kopf insgesamt weniger rundlich.

Auf Grund dieser deutlichen, geschlechtsspezifischen Unterscheidungsmerkmale war es einfach, die Fische makroskopisch zu beurteilen.

Tabelle 3.1. Geschlechtsverhältnis der exponierten Fische vor der Exposition in Prozent.

Versuch	Substanz	Weibchen	Männchen	Verhältnis
TXST 19990053	Methyltestosteron	47.3	52.6	1 : 1.11
TXST 19990138	Ethinylestradiol	47.5	52.5	1 : 1.11
TXST 19990109	Fadrozol	48.5	51.5	1 : 1.06
	Mittelwert	47.8	52.2	1 : 1.09

Die obere Tabelle veranschautlich sehr deutlich, dass das Geschlechtsverhältnis ohne Exposition konstant bei ca. 1 : 1 lag.

3.6.7.2 Vitellogeninkonzentrationen der Tag 0 Fische

Für einen weiterer Vergleich zwischen den einzelnen definitiven Tests, kann die Vitellogeninbestimmung der an Tag 0 getöteten Fische herangezogen werden. Auch diese Fische wurden den Akklimatisationsbecken entnommen, getötet und homogenisiert in den ELISA eingesetzt.

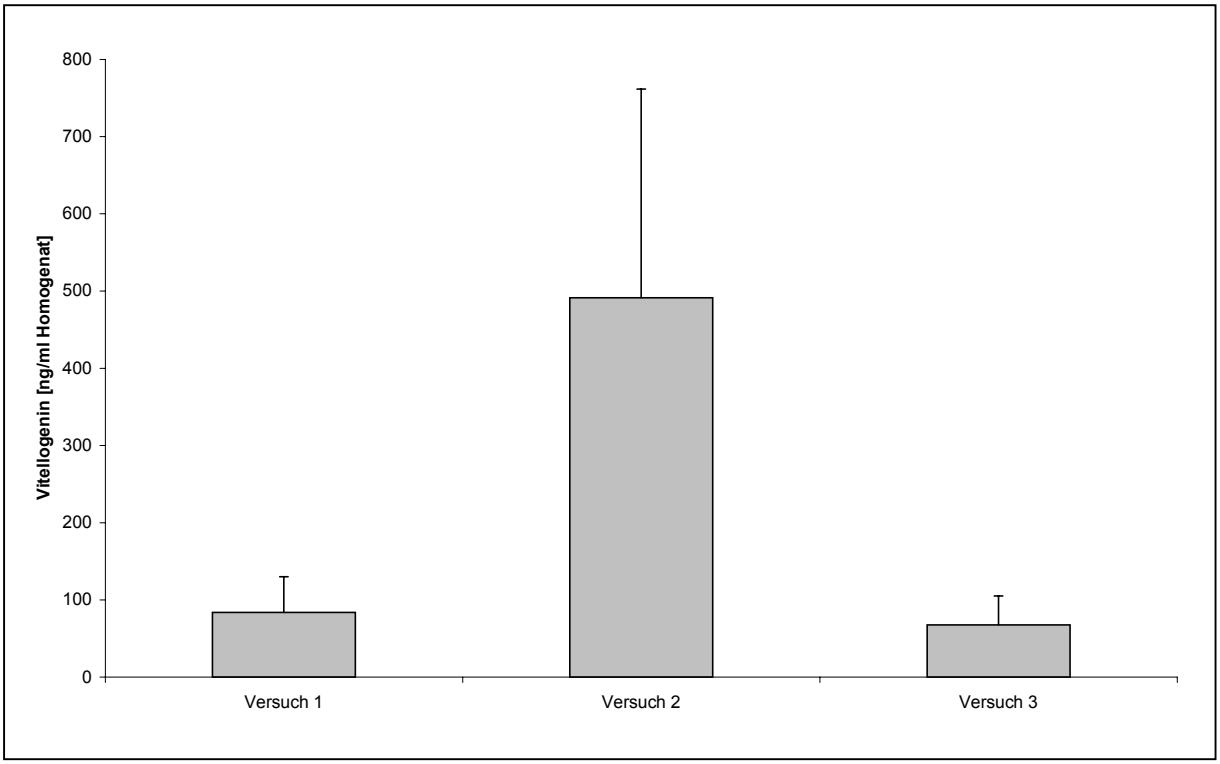

Abbildung 3.1. Vergleich der Vitellogeninkonzentrationen der Tag 0 Fische, Versuch 1 = Fadrozol definitiver Test, Versuch 2 = Ethinylestradiol definitiver Test, Versuch 3 = Methyltestosteron definitiver Test.

Die höhere Vitellogeninkonzentration der unbehandelten Fische für den Ethinylestradiol-Versuch, kann durch ein höheres Körpergewicht und damit mit einem späteren Entwicklungsstand erklärt werden. Diese Fische waren mit 107.9mg deutlich schwerer als die unbehandelten Fettkopfbrassen für den Methyltestosteron (80.4mg) oder Fadrozol (73.2mg) Versuch. Es waren bei diesen Fischen noch keine der oben beschriebenen, sekundären Geschlechtsmerkmale zu erkennen, daher wurden die Fische für den Versuch eingesetzt. Es war nicht möglich die Ergebnisse des Vitellogenen ELISAs auf das Körpergewicht der Fische zu normieren, was den direkten Vergleich der einzelnen Prüfungen erschwerte.

3.6.7.3 Vergleich der Positivkontrollen

Als zusätzlicher Vergleich konnten die Vitellogeninkonzentrationen der Positivkontrollen heran- gezogen werden. Bei jedem definitiven Test wurde eine Gruppe der Fische nominal 10.0ng EE2/l ausgesetzt und wie schon beschrieben, 21 Tage exponiert. Diese Kontrolle diente als interner Standard. Es sollte gezeigt werden, dass die Fische auf eine Estrogengabe mit einem Vitellogeninanstieg reagieren, der nach den Versuchen verglichen werden konnte.

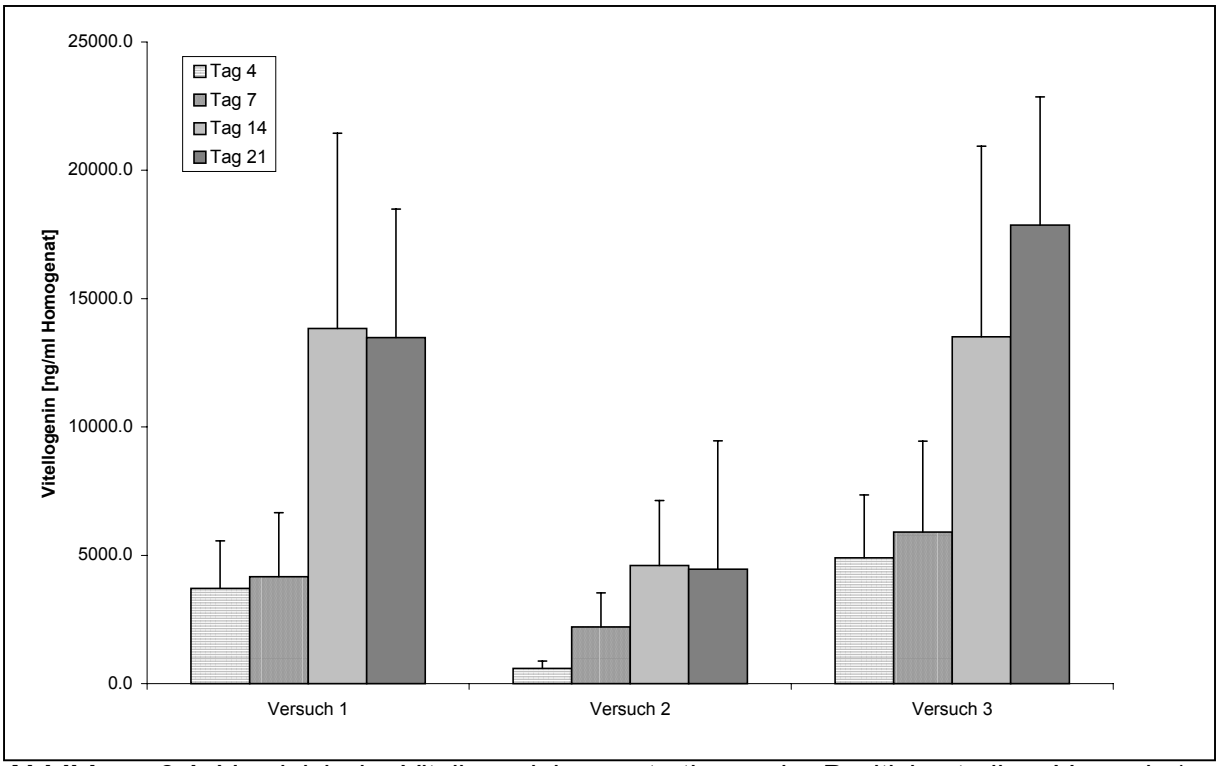

Abbildung 3.1. Vergleich der Vitellogeninkonzentrationen der Positivkontrollen, Versuch 1 = Fadrozol definitiver Test, Versuch 2 = Ethinylestradiol definitiver Test, Versuch 3 = Methyltestosteron definitiver Test.

Auch bei diesem Vergleich wird deutlich, dass die Fische des Ethinylestradiol Versuchs einen anderen Vitellogeninstatus als die Fische des Methyltestosteron oder Fadrozol Versuchs aufwiesen. Im Gegensatz zu den Tag 0 Fischen war hier die Vitellogeninkonzentration geringer. Es könnte möglich sein, dass diese Fische bereits mit der Differenzierung begonnen hatten, obwohl keine Pigmentierung der Rückenflosse oder andere sekundäre Geschlechtsmerkmale makroskopisch erkennbar waren (durchschnittliches Körpergewicht der eingesetzten Fische: EE2: 143.0mg, s. Tab. 3.11, F: 104.6mg, s. Tab. 3.19, MT: 67.2mg, s. Tab. 3.16). Falls die Tiere tatsächlich schon vor der Exposition mit der Differenzierung begonnen hatten, wäre es möglich, dass sie auf die Estrogengabe weniger stark, als die undifferenzierten Fische reagierten.

3.6.8 Kombinationsversuch (TXST 20000131)

Bei dem *Range-finding* Test und der definitiven Prüfung des Methyltestosterons kam es zu einem Vitellogeninanstieg und damit zu einer partiellen Verweiblichung der Jungfische, welche allerdings makroskopisch nicht sichtbar war. Für dieses unerwartete Ergebnis gab es zwei unterschiedlichen Hypothesen, welche durch einen zusätzlichen Versuch belegt werden sollten. Zum einen wäre es möglich, dass das Methyltestosteron in so großen Mengen von den Tieren aufgenommen wurde, dass es trotz der geringen Affinitiät, aber auf Grund der hohen Kapazität an den Estrogen Rezeptor bindet. Zum anderen kann das Methyltestosteron durch die endogene Aromatase zu einem Estrogen aromatisiert werden, welches dann die Verweiblichung hervorruft.

Da der CERBA im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgreich etabliert und damit die mögliche Bindung von Methyltestosteron an den ER nicht nachgewiesen werden konnte, sollte auf eine andere Weise eine der Hypothesen verifiziert werden.

Es wurde bei einer verkürzten Verträglichkeitsprüfung eine Kombination aus Methyltestosteron und Fadrozol eingesetzt. Wobei das Fadrozol hier eine mögliche Aromatisierung des Methyltestosterons durch die Aromatase verhindern sollte.

Der Versuch wurde auf 14 Tage verkürzt, da der Vitellogeninanstieg bei den Methyltestosteron exponierten Fischen schon ab Tag 7 deutlich zu erkennen war. Um Fische einzusparen wurden statt 32 Fische nur 10 pro Tötungszeitpunkt und Gruppe für den VTG-ELISA eingesetzt, plus 5 Zusatzfische, die im Anschluss an die Exposition in frisches Leitungswasser umgesetzt und bis zur Ausbildung sekundärer Geschlechtsmerkmale gehältert wurden. Auf eine Leitungswasserkontrolle wurde verzichtet, da eine Lösungsvermittlerkontrolle mitlief und in den vorangegangenen Versuchen kein Unterschied in den Vitellogeninwerten der beiden Kontrollen nachgewiesen werden konnte. Die Zahl der Fische zur mRNA Bestimmung wurde nicht geändert.

Es wurden Konzentrationen der Testsubstanzen gewählt, welche schon in den definitiven Prüfungen getestet wurden. Allerdings wurde in diesem Fall auch Fadrozol in einem Gemisch aus DMF und Wasser (1:4) als Stammlösung gelöst, um in allen Gruppen gleiche Bedingungen zu gewährleisten. Insgesamt bestand der Versuch aus 4 Gruppen, einer Lösungsvermittlerkontrolle (31mg DMF/l), 10µg MT/l, 50µg F/l und einer vierten Gruppe mit 10µg MT + 50µg F/l.

3.6.8.1 Begutachtung der Fische über den Versuchzeitraum

Die exponierten Fische wiesen über den gesamten Versuchzeitraum von 14 Tagen keine krankhaften makroskopischen Veränderungen auf. Es kam auch zu keinem einzigen Todesfall. Am Tag 13 der Exposition kam es zu einer sehr plötzlich eintretenden Verhaltensänderung. Die noch nicht getöteten Fische in Gruppe 4 (Kombination mit beiden Substanzen) zeigten ein sehr agressives Verhalten, es kam zu Revierkämpfen. Zudem war bei allen Fischen eine leichte Schwarzfärbung der Rückenflosse zu erkennen. Innerhalb eines Tages verstärkte sich die Agressivität noch, die Rückenflosse war bei allen Fischen aus dieser Gruppe komplett schwarz und die Kiemendeckel begannen sich ebenfalls schon schwarz zu färben. In Gruppe 2 (10µg MT/l) wurde ebenfalls bei einigen Fischen eine leichte Pigmentierung der Rückenflosse beobachtet, allerdings zeigten nur 2 größere Fische ein agressives Verhalten.

An Tag 14 wurden 12 Fische aus jeder Gruppe getötet und auf weitere sekundäre Geschlechtsmerkmale untersucht. Alle Fische aus Gruppe 4 zeigten die ersten Ansätze einer Tuberkelbildung auf der Nasenspitze (siehe Abb. 3.12). Diese Tuberkelbildung und ebenso die Schwarzfärbung der Kiemendeckel wird bei nicht exponierten Fischen erst ab ca. 7 Monaten, bei Eintritt in die Geschlechtsreife, sichtbar. Die eingesetzten Fische waren zu Beginn der Exposition <3 Monate alt.

Durch diese Verhaltens- und makroskopischen Veränderungen wurde deutlich, dass Methyltestosteron im Fisch aromatisiert werden kann. Wird diese Aromatisierung durch Zugabe eines Aromatasehemmers, wie z.B. Fadrozol verhindert kommt es zu einer sehr schnellen Vermännlichung der Fische.

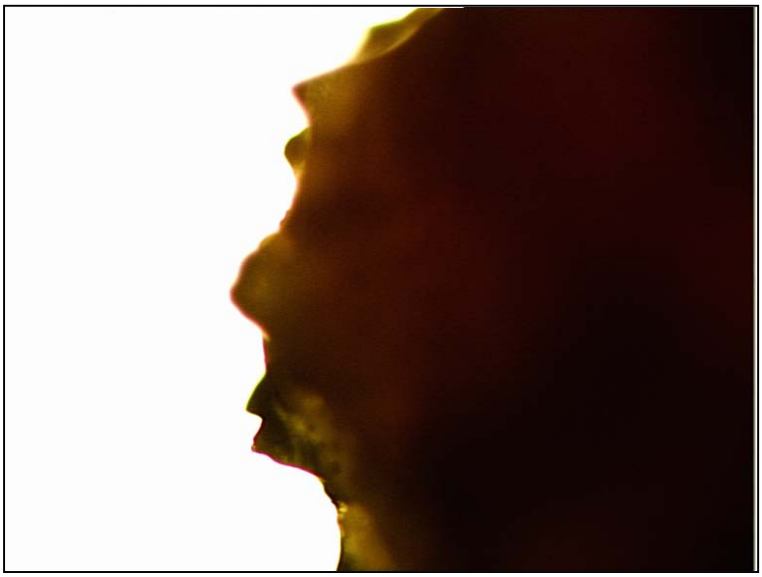

Abbildung 3.1. Kombinationsversuch mit Methyltestosteron und Fadrozol, Tuberkelbildung an der Nasenspitze von exponierten Jungfischen

Tabelle 3.1. Mittleres Körpergewicht und Länge der exponierten Fische (Kombinationsversuch), n = 10.

Gruppe	Tag 0 [mg/mm]	Tag 4 [mg/mm]	Tag 7 [mg/mm]	Tag 14 [mg/mm]
1	unbehandelte	45.1 / 12	175.5 / 19	162.6 / 19
2	Fische	176.9 / 17	154.1 / 18	127.2 / 16
3	84.8 / 14	57.9 / 14	80.9 / 15	139.1 / 17
4		35.7 / 12	77.8 / 14	201.8 / 21

3.6.8.2 Vitellogeninkonzentrationen im Ganzkörperhomogenat

Die aus den Becken entnommenen Fische wurden homogenisiert und der Vitellogeninlevel im Ganzkörperhomogenat bestimmt, um einen Vergleich mit den durchgeführten definitiven Tests zu erhalten.

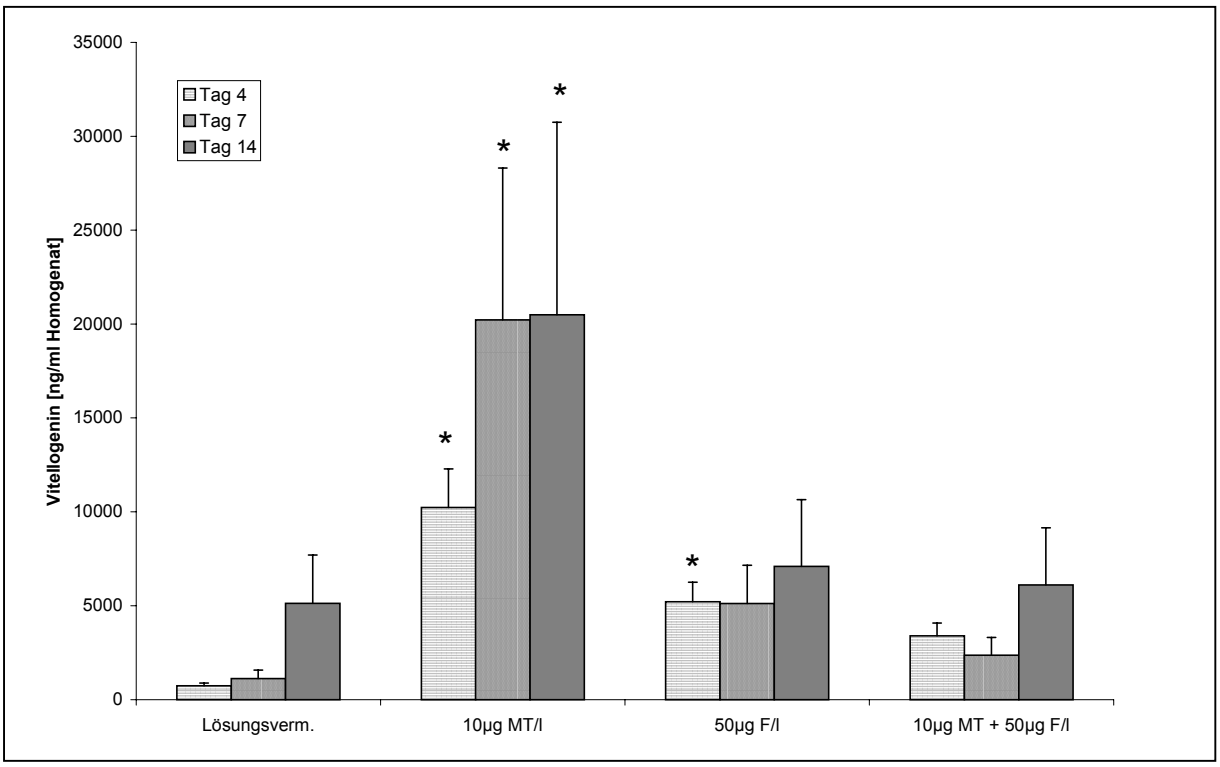

Abbildung 3.1. Kombinationsversuch mit Methyltestosteron und Fadrozol, Vitellogeninkonzentrationen im Ganzkörperhomogenat, n = 10.

Die Vitellogeninkonzentrationen des Ganzkörperhomogenats sind, wie in Abbildung 3.14 zu sehen ist, durch die Exposition mit Methyltestosteron signifikant angestiegen. In der Gruppe 3, bei einer Exposition mit Fadrozol alleine konnte kein Anstieg beobachtet werden und in Gruppe 4, bei der Exposition mit beiden Substanzen im Gemisch stieg der Vitellogeninlevel ebenfalls nicht an.

Dieses Ergebnis zeigt ebenso deutlich wie die Verhaltensänderungen, dass Fadrozol bei den Fischen als Aromataseinhibitor wirksam war. Zudem kann auf Grund dieser Ergebnisse die teilweise Verweiblichung der Methyltestosteron exponierten Fische erklärt werden. Das 17α-Methyltestosteron wird vermutlich durch die Aromatase zu 17α-Methylestradiol verstoffwechselt (D. Kime, pers. kom.). Durch die Methylierung am C17 wäre das Estrogen metabolisch stabiler als das endogene Estradiol. Die längere Verweildauer könnte so auch den sehr starken Vitellogeninanstieg erklären.

3.6.8.3 RT-PCR

Die RT-PCR diente einer weiteren Überprüfung der Ergebnisse und als zusätzliche Vergleichsmöglichkeit mit den durchgeführten definitiven Tests.

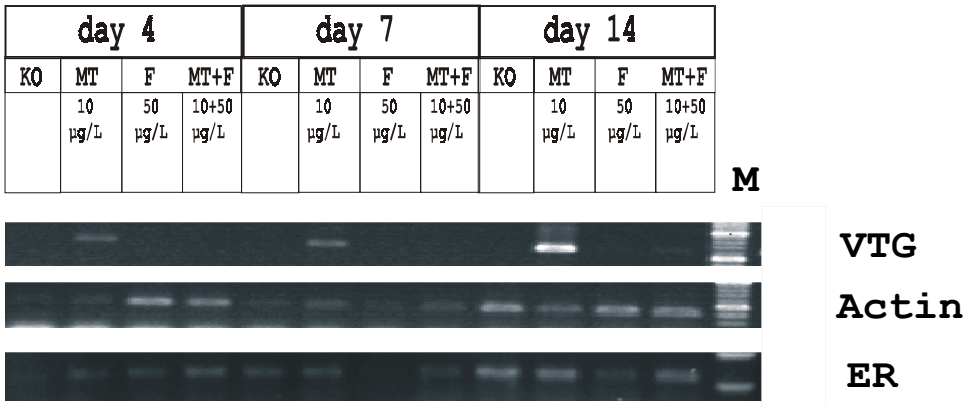

Abbildung 3.1. Kombinationsversuch mit Methyltestosteron und Fadrozol, RT-PCR zum Nachweis von Vitellogenin, Actin und Estrogen Rezeptor mRNA, n = 2.

Durch die RT-PCR konnte sehr deutlich gezeigt werden, dass es nur bei den Methyltestosteron exponierten Fischen zu einer Vitellogenin mRNA Expression kam. Weder bei der Lösungsvermittlerkontrolle, den Fadrozol exponierten Fischen, noch bei der Kombination der beiden Substanzen konnte Vitellogenin mRNA nachgewiesen werden.

Auch dieses Ergebnis stützt die Hypothese der Aromatisierung des Methyltestosterons zu einem Estrogen.

3.7 Early-Life Stage Test

3.7.1 Vorversuche ohne Substanz

Im ersten Vorversuch wurde Laich in Bechergläser verteilt und in einem temperierten Wasserbad inkubiert. Dieser Vorversuch musste abgebrochen werden, da sehr viele der Eier verpilzten. Im zweiten Vorversuch wurde bis zum Schlupf auf das Wasserbad verzichtet und erst die geschlüpften Larven in den Bechergläsern überführt. Durch die Reduktion der Temperatur bis zum Schlupf konnte das Verpilzen vermindert werden. Es wurden 30 Eier in 4 Gruppen eingesetzt.

Tabelle 3.1. Auswertung des zweiten ELS-Vorversuchs (30 = 100%)

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4
befruchtete Eier	100%	100%	100%	100%
verpilzte Eier	2	0	3	1
geschlüpfte Fische	29	24	23	21
Schlupfrate	96.7%	80.0%	76.7%	70.0%
gestorbene Fische	9	6	8	4
an Tag 32 getötete Fische	16	13	12	14
Prozent überlebende F.	53.3%	43.3%	40.0%	46.7%
Länge (28 Tage n. S.)	0.91	0.91	0.88	0.9
Gewicht (28 Tage n. S.)	9.43	9.86	8.96	9.71

Bei diesem Versuch wurde eine akzeptable Schlupfrate in allen 4 Gruppen erreicht, trotzdem überlebt nur sehr wenige Fisch bis zum Tag 28. Daher wurde ein weiterer Ansatz getestet, bei dem die Eier in Bechergläsern in einem temperierten Wasserbad stehen inkubiert wurden, allerdings wurde bei diesem Vorversuch eine Belüftung installiert. Auf diese Weise konnte eine geringfügige Wasserzirkulation gewährleistet werden.

Tabelle 3.2. Auswertung des dritten ELS-Vorversuchs (30= 100%)

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4
befruchtete Eier	100%	100%	100%	100%
verpilzte Eier	3	1	2	1
geschlüpfte Fische	24	29	26	29
Schlupfrate	80%	96.7%	86.7%	96.7%
gestorbene Fische	6	2	4	3
an Tag 32 getötete Fische	18	27	22	26
Prozent überlebende F.	60.0%	90.0%	73.3%	86.7%
Länge (28 Tage n. S.)	1.09	1.11	1.08	1.03
Gewicht (28 Tage n. S.)	18.67	18.70	20.27	14.69

Für diesen Vorversuch wurden die Fische bereits ab den Tag des Schlupfs gefüttert und nicht erst ab Tag 4 wenn der Dottersack verbraucht ist. Zudem wurde drei Mal am Tag gefüttert und nicht nur morgens und abends wie beim zweiten Vorversuch. Zwei Mal täglich wurden frisch geschlüpften Artemien und einmal am Tag Staubfutter verfüttert. Daher wiesen die Fische ein deutlich höheres Gewicht als beim zweiten Vorversuch auf.

Im letzten Vorversuch kam die bereits im Material und Methoden Teil beschriebene ELS Apparatur zum Einsatz. Mit Hilfe dieses Geräts konnte eine kontinuierliche Wasserbewegung erzielt werden, was den Larven den Schlupf erleichtern sollte.

Tabelle 3.3. Auswertung des vierten ELS-Vorversuchs (40= 100%)

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4
befruchtete Eier	100%	100%	100%	100%
verpilzte Eier	1	0	0	1
geschlüpfte Fische	39	40	40	39
Schlupfrate	97.5%	100.0%	100.0%	97.5%
gestorbene Fische	6	11	13	9
an Tag 32 getötete Fische	12	10	9	11
Prozent überlebende F.	40.0%	33.3%	30.0%	36.7%
Länge (28 Tage n. S.)	0.93	1.10	0.94	0.89
Gewicht (28 Tage n. S.)	10.46	18.50	11.60	9.08

Es war sehr auffällig, dass bei diesem Test nur eine geringe Anzahl an Fischen überlebten und bei diesen Fischen waren die Größenunterschiede sehr groß (%CV über alle Tiere: 43.34%). Diese große Verlustrate und der auffällige Größenunterschied wurden auf verstärkten Kanibalismus zurück geführt. Die Jungfische wurden über den gesamten Versuchszeitraum in den Plexiglaszylindern gehalten, d.h. sie hatten nur sehr beschränkten Platz zur Verfügung. Aus diesem Grund sollten die Fische für den definitiven Test mit Methyltestosteron am Tag 10 n. S. aus den Plexiglaszylindern entnommen und in ein 10l Aquarium überführt werden.

3.7.2 Methyltestosteron ELS

Es sollte ein definitiver Test mit Methyltestosteron in 4 verschiedenen Konzentrationen durchgeführt (10, 30, 90 und 180µg/l) werden. Im Laufe der Exposition kam es zu einem sehr starken Bakterienwachstum in den Testaquarien, noch vor Beginn des Schlupfs. Aufgrund dessen fiel der Sauerstoffgehalt in der Testlösung stark ab und alle Larven in den Methyltestosteron exponierten Gruppen verstarben noch in den Eiern. Auch in den beiden Kontrollen (Leitungswasser- und Lösungsvermitter-Kontrolle) überlebten nur 6 bzw. 10 von 40 eingesetzten Fischen.

Aus diesem Grund wurden im Weiteren zwei *Range-finding* Versuche durchgeführt. Für die erste Dosisfindungs-Studie wurden 4 Gruppen mit jeweils 8 Eiern in Bechergläsern in einem temperierten Wasserbad exponiert und bis Tag 7 n. S. gehältert. Es wurde dabei eine

Lösungsvermittlerkontrolle mitgeführt und die Substanzkonzentrationen 0.1, 1 und 10µg/l getestet. Im Laufe dieses Versuchs mussten 2 Eier entfernt werden, da sie verpilzten. Die restlichen Fische schlüpften an Tag 4. Alle Larven überlebten bis Tag 7 n. S. und wurden dann ohne weitere Aufarbeitung in MS222 getötet.

In einem weiteren Dosisfindungs-Test wurden höhere Substanzkonzentrationen getestet (30, 90 und 180µg/l). Bei diesem Vorversuch kam es zu einer Schlupfverzögerung in den Gruppen mit den höchsten Methyltestosteron Konzentrationen. Diese Larven schlüpften erst an Tag 6 der Exposition. Allerdings musste dieser Vorversuch vorzeitig, an Tag 8 abgebrochen werden, da es zu einem starken Bakterienwachstum in den Testgefäßen kam und sehr viele Fische, auch in der Kontrolle gestorben sind. Auch diese Jungfische wurden ohne weitere Aufarbeitung in MS222 getötet.

Im Anschluss an die beiden Vorversuche sollte erneut ein definitiver Test in der ELS-Apparatur durchgeführt werden. Allerdings sollte dieser semistatisch, d.h. ohne Lösungsvermittler stattfinden. Dazu sollte jeden Tag 1/3 der Testlösung aus dem Becken entnommen und durch frische Testlösung ersetzt werden. Durch diese Änderung wurde das Bakterienwachstum verhindert.

Auch dieser Versuch wurde vorzeitig abgebrochen, da die geschlüpften Larven auffällige Veränderungen aufwiesen. Sie waren sehr träge und blass und zeigten kaum normales Schwimm- und Fressverhalten. Allerdings konnte auch bei diesem Versuch der verzögerte Schlupfbeginn in den beiden höchsten Konzentrationen beobachtet werden. An Tag 12 waren alle Larven in den Gruppen 3 und 5 (30 und 180µg/l) tot und in Gruppe 4 (90µg/l) leben nur noch 4 von 40 Fischen. Daher wurde der Versuch sofort abgebrochen und die restlichen Larven getötet und verworfen. Im Laufe dieser Arbeit konnte der ELS mit Methyltestosteron nicht nochmals wiederholt werden.

4. Zusammenfassende Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Methoden evaluiert mit deren Hilfe die Wirkung von hormonell aktiven Substanzen an Fischen mit Hilfe von unterschiedlichen Endpunkten untersucht werden sollten. Dazu zählten ein ELISA zur Messung endogener Steroide, welcher für Plasmaproben und ein Vitellogenin ELISA zur Bestimmung des Vitellogeninlevels im Ganzkörperhomogenat und Plasma. Zudem wurde ein RIA zur Bestimmung des Testosteronspiegels im Ganzkörperhomogenat etabliert. Auf molekular-biologischer Ebene wurde eine Methode zum Nachweis von Vitellogenin und Estrogen Rezeptor mRNA entwickelt.

Diese Methoden kamen bei der Aufarbeitung von Proben, die in systemischen Verträglichkeitsprüfungen an juvenilen Fischen gewonnen wurden, zum Einsatz.

Bei diesen Versuchen wurden Substanzen mit einem bekannten, endokrinen Potential verwendet: 1.) Ethinylestradiol ein Estrogen Rezeptor-Agonist, 2.) Methyltestosteron ein Androgen Rezeptor-Agonist und 3.) Fadrozol ein Aromatase-Inhibitor. Zum Einsatz kamen dabei juvenile Fettkopfbrassen (*Pimephales promelas*), welche noch nicht geschlechtsdifferenziert waren bzw. keine sekundären Geschlechtsmerkmale auswiesen. Es sollte überprüft werden, ob sich juvenile Fettkopfbrassen als Testfische für diese speziellen Prüfungen eigneten und die zu messenden Endpunkte die Exposition mit einer hormonell aktiven Substanz wiederspiegelten.

4.1 Ethinylestradiol

Bei der ersten getesteten Substanz handelte es sich um Ethinylestradiol, einem potenten synthetischen Estrogen, mit einer stärkeren Affinitiät zum Estrogen Rezeptor als Estradiol (Nimrod und Benson, 1997)

EE2 kann durch humane Ausscheidungen über das Abwasser in die Umwelt gelangen und wurde dort bereits vereinzelt von verschiedenen Arbeitsgruppen nachgewiesen.

Es wird ein Schätzwert für die Konzentration von EE2 in Fließgewässern (*Predicted Environmental Concentration*, PEC) von 0.5ng/l angenommen. Dabei wird eine gleichmäßige Verteilung vorausgesetzt, die mittlere Konzentration in allen deutschen Abwässern innerhalb eines Jahres berechnet und mit einem Faktor für die Elimination bei der Klärung korrigiert (Schweinfurth *et al.*, 1997).

Die Berechnung erfolgte durch die Formel:

$$PEC = [A*(100-R)]/[365*P*V*D*100]$$

A (kg): Geschätzter Verbrauch von EE2 in Deutschland (ca. 50kg)
R (%): Eliminationsrate (ca. 50%)
P: Einwohnerzahl von Deutschland (ca. 80Mio.)
V (m³): Abwassermenge pro Kopf und Tag (ca. 0.15m³)
D: Verdünnung des Abwassers durch Fließgewässer (ca. 10)

$$PEC_{EE2} = [50kg*(100-50)]/[365*80*10^6*0.15m^3*10*100]$$
$$PEC_{EE2} = 5*10^{-10}kg/m^3 = 0.5ng/l$$

(Nach Note for Guidance III 5504/94 Draft 7, 10.01.1995)

Verglichen mit publizierten Meßwerten, konnte der geschätzte Wert verifiziert werden.
Kalbfus und Mitarbeiter konnten in Oberflächengewässern zwischen 0.1 und 2.5ng/l nachweisen (Kalbfus, 1998). Larson *et al.* (1998) fanden in schwedischen Kläranlagenabflüssen sogar bis zu 4.5ng/l. Die niedrigste, im Rahmen dieses Projekts getestete Konzentration lag mit 1.2ng/l (s. 3.6.2.1) unter diesen nachgewiesenen Wert.
Es wurden juvenile Fische, über 21 Tage in 3 verschiedenen Substanzkonzentrationen exponiert. An 4 Tötungszeitpunkten wurden Fische entnommen, im Ganzkörperhomogenat der Vitellogeningehalt bestimmt und die Menge an VTG mRNA überprüft.
Bei der Analytik der Testlösungsproben konnte gezeigt werden, dass nur zwischen 24.6 und 43.1% der Nominalkonzentration des eingesetzten Ethinylestradiols in der Testlösung vorhanden war. Da es sich um ein planares Steroid mit wenig hydrophilen Substituenten handelt, war es nur sehr schlecht wasserlöslich. Die eingesetzten Konzentrationen reichten aber aus um Effekte bei den juvenilen Fettkopfbrassen zu erzielen.
Es konnte kein negativer Effekt auf das Längenwachstum oder das Körpergewicht der exponierten Fische beobachtet werden. Auch kam es nur zu wenigen Todesfällen.
Schon bei den geringen eingesetzten Konzentrationen konnte ein signifikanter Vitellogeninanstieg der Proben von Tag 4 und Tag 14 nachgewiesen werden. In den höher dosierten Gruppen, mit 3.8 und 21.6ng/l (s. 3.6.2.1) waren im Mittel die VTG-Gehalte bei allen 4 Tötungszeitpunkten signifikant höher als in der Kontrolle (s. 3.6.2.3). Sheahan *et al.* konnten 1994 zeigen, dass es bei einer aquatischen Exposition mit 1ng EE2/l bei Regenbogenforellen ebenfalls zu einem starken Vitellogeninanstieg kam.
In einem vorangegangenen Dosisfindungsversuch, in dem die Fische über 14 Tage der Testsubstanz in nominalen Konzentrationen von 1.0 bis 100.0 ng/l ausgesetzt waren, wurde ein vergleichbarer Dosis-Wirkbeziehung gefunden (s. 3.6.1.3). Allerdings waren im Dosisfindungstest die gemessenen Vitellogeninkonzentrationen im Ganzkörperhomogenat höher als im definitiven Test. Was jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit auf das höhere Körpergewicht zurückzuführen ist. Möglicherweise war, bei den im Vorversuch eingesetzten Fischen die Geschlechtsdifferenzierung schon weiter fortgeschritten, als bei den in

Hauptversuch eingesetzten Fischen, obwohl noch keine sekundären Geschlechtsmerkmale sichtbar waren. Carlson konnte mit seiner Gruppe zeigen, dass Schwankungen im Vitellogeninlevel im Plasma oder in der Leber bei nicht-geschlechtsreifen Regenbogenforellen stark von der Größe und dem Alter (3-18 Monate) und damit dem Reifezustand sowie zusätzlich von genetischen Unterschieden abhängen (Carlson *et al.*, 1999).

Im Gegensatz zum Anstieg des VTG Proteins konnte bei diesem Versuch keine Zunahme der Vitellogenin mRNA nachgewiesen werden (s. 3.6.2.4). Denkbar ist, dass die Zeitpunkte der Probennahmen zu spät gewählt waren und die Vitellogenin mRNA schon destabilisiert und abgebaut war. Tenniswood *et al.* konnte 1983 an *Xenopus laevis* Hepatozyten-Kulturen nachweisen, dass bereits nach 16h Exposition mit EE2 ein Peak in der VTG mRNA erreicht ist und danach die mRNA Menge wieder abnimmt. Anhand von mit Estradiol behandelten Hepatozyten-Kulturen von männlichen Regenbogenforellen konnte Flouriot *et al.* 1997 zeigen, dass ein bestimmter Level an ER mRNA (1-1.5 pg/µg Gesamt-RNA) vorhanden sein muss, um die Induktion der VTG mRNA zu initiieren. In einer Arbeit von Ren *et al.* 1995 wurde beschrieben, dass eine VTG Vorläufer mRNA in ungesplißter Form immer vorliegt, d.h. bei männlichen oder weiblichen, ebenso wie auch bei unreifen Regenbogenforellen. Es wurde daher postuliert, dass durch Estradiol nicht die Transkription, sondern das posttranskriptionale Splicen der VTG mRNA reguliert wird. Aus diesem Grund wäre es möglich, dass die VTG mRNA durch die verwendeten Primer nicht in allen Fällen nachweisbar war. Allerdings spricht das Ergebnis der systemischen Verträglichkeitsprüfung mit Methyltestosteron gegen diese Hypothese, da hier in den Fischen der Positivkontrolle (10ng EE2/l) VTG mRNA nachweisbar war. Zudem ist es nicht zu erklären, wie es zu einer starken, zeitabhängigen Neuproduktion von VTG kommen kann, ohne stabile mRNA.

In der Veröffentlichung von Flouriot *et al.* 1997 wurde ebenfalls die Regulation ER mRNA untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass es durch Estradiolbehandlung zu einem Anstieg der ER mRNA kam. Dieser Anstieg konnte durch die Behandlung mit EE2 nicht reproduziert werden. Es wurde beobachtet, dass der ER mRNA Level zeitabhängig leicht abnahm. Allerdings war es kaum möglich die anfängliche mRNA Menge mit Hilfe eines auf einem Agarosegel aufgetrennten RT-PCR Ansatz zu quantifizieren. Zudem variierte die Qualität der isolierten RNA bei den Einzelfischen, was in den unterschiedlichen Actinbanden deutlich wurde.

Somit ist eine abschließende Klärung dieser Frage auf der Basis der vorliegenden Versuchsergebnisse nicht möglich.

4.2 Methyltestosteron

Bei der zweiten ausgewählten Substanz handelte es sich um Methyltestosteron, ein synthetisches Androgen, welches durch die Methylgruppe am C17 analytisch von endogen produzierten Testosteron unterschieden werden konnte. Methyltestosteron wird in der Fischzucht eingesetzt um eine Vermännlichung und damit den Aufbau von mehr Muskelfleisch zu erreichen (Hunter *et al.*, 1982, 1983; Feist *et al.*, 1995), in der Humanmedizin kommt es zur Behandlung des Klinefeltersyndroms zum Einsatz (Zuh, 1990). Da der Einsatz in der Humanmedizin nur auf einen sehr engen Personenkreis und der Einsatz in der Fischzucht meist auf küstennahe Meerwasserbereiche mit starker Stömung beschränkt ist, ist es unwarscheinlich die Substanz in Oberflächengewässern oder Kläranlagenabflüssen nachzuweisen.

Methyltestosteron ist durch die Ketogruppe am C3 noch schlechter wasserlöslich als Ethinylestradiol. Daher musste ein Lösungsvermittler eingesetzt werden. Für den Range-finding Test wurde Triethylenglykol : Aceton (1:2) verwendet, für den definitiven Test Dimethylformamid : Wasser (1:4), da bei diesem Lösungsvermittler das Bakterienwachstum deutlich vermindert wurde. Trotz der Verwendung eines Lösungsvermittlers waren nur zwischen 52% und 69% der eingesetzten Nominalkonzentration analytisch nachweisbar. Auch bei diesem Versuch reichten die eingesetzten Testkonzentrationen (6.9, 29.5 und 52.4µg/l) aus, um Effekte bei den juvenilen Tieren zu erzielen.

Die Körperlängen- und Gewichtsbestimmung lieferte keine eindeutigen Befunde (s. 3.6.4.2), da in einigen Gruppen an Tag 21 durchschnittlich kleinere Fische als an Tag 4 gefangen wurden. Es konnte hierfür aber keine Dosisabhängigkeit festgestellt werden. Auch die Tiere aus der Positivkontrolle (10 ng EE2/l) waren nach der 21 tägigen Exposition im Mittel kleiner als an Tag 4. Im definitiven Test mit EE2 trat dieses Phänomen in keiner Gruppe auf.

Es kam zu einigen Todesfällen im Verlauf der Exposition. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass einige davon substanzbedingt waren, denn es zeigte sich eine leichte Dosisabhängigkeit. Allerdings zeigten die restlichen Fische keine auffälligen Befunde.

Durch die Exposition mit MT kam es im Ganzkörperhomogenat der juvenilen Fettkopfbrassen zu einem sehr starken Vitellogeninanstieg (s. 3.6.3.3, Range-findig und 3.6.4.3 definitiver Test). Die Ergebnisse des Range-finding Tests konnten hier durch den definitiven Test bestätigt werden. Dieser Effekt wurde so nicht erwartet, da MT normalerweise zur Vermännlichung von verschiedenen Fischspezies eingesetzt wird (Varadaraj *et al.*, 1994; Blàzquez *et al.*, 1995). In der Literatur wurden allerdings auch schon verweiblichende Effekte des MT auf einige Fischspezies beschrieben. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass in kultivierten Regenbogenforellen Hepatozyten durch eine MT Exposition die Vitellogeninsynthese angeregt wird (Mori *et al.*, 1998). Ebenso wurde die Vitellogeninsynthese bei Goldfischen (*Carassius auratus*) induziert, nachdem sie mit einer

MT haltigen Diät gefüttert wurden (Hori *et al.*, 1979). Um diesen Anstieg zu erklären, kommen zwei mögliche Wirkmechanismen in Frage. Zum einen könnte MT an den ER binden und damit die Expression von estrogen abhängigen Genen induzieren, zum anderen könnte das MT von der Aromatase zu einem Estrogen umgewandelt worden sein.
Bei dem ER handelt es sich um einen *high affinity low capacity*-Rezeptor (Gustafsson, 1998). Dies bedeutet, dass der Rezeptor mit einer sehr hohen Affinität kleine Mengen an Ligand erkennt und bindet, im umgekehrten Fall kann aber auch ein Ligand der nicht "genau passt" mit einer geringen Affinität gebunden werden, wenn er in einer großen Menge vorliegt. Da die Expostition mit MT im µg-Bereich lag, war zu erwarten, dass relativ viel MT von den Fischen aufgenommen wurde und damit gegebenenfalls eine Bindung an den ER möglich wurde. Der ER des Katzenwelses (*Ictalurus punctatus*) bindet mit unterschiedlichen Affinitäten verschiedene Liganden (EE2 > E2 > T). Estradiol besitzt hier eine IC_{50} von 0.43nM, im Gegensatz dazu Testosteron 19.35nM, die Verdrängung des markierten Estradiols erfolgt aber bei beiden Substanzen gleich schnell (Nimrod und Benson, 1997). Es war nicht möglich, die Hypothese der Bindung des MT an den ER für die Fettkopfbrasse oder den Karpfen zu verifizieren, da der Estrogen Rezeptor Bindungsassay (CERBA) für diese Fischarten nicht etabliert werden konnte.
Im anderen Fall wäre es aber auch möglich, das Phänomen der Verweiblichung der Fische nach einer Androgenexposition durch eine Aromatisierung zu erklären. Hackmann (1974) postulierte, dass das exogene Androgen als Substrat für die Aromatase dient. Diese Hypothese erscheint logisch, da in Teleostei der natürliche Biosyntheseweg der Estrogene in den Ovarien die Aromatisierung des Testosterons zum Estradiol einschließt (Nagahama, 1987). Bei den Versuchen von Pifferer *et al.* konnte nachgewiesen werden, dass das aromatisierbare MT im Gegensatz zum nicht-aromatisierbaren Methyldihydrotestosteron (5α-Reduktion) zu einer Verweiblichung von behandelten Silber- und Königs-Lachsen (*Oncorhynchus kisutch* und *Oncorhynchus tshawytscha*) führt (Pifferer und Donaldson, 1990; Pifferer *et al.* 1993).
Mit Hilfe der RT-PCR konnte nachgewiesen werden, dass es zu einer Synthese der VTG mRNA durch die Androgenexposition kommt (s. 3.6.4.4). An Tag 4 war schon ab der niedrigesten MT-Konzentration (nominal 10 µg/l) eine starke Bande für das VTG Transskript nachweisbar. Im Gegensatz dazu konnte weder in der Leitungswasser- noch in der Lösungsvermittlerkontrolle VTG mRNA detektiert werden. Bei den an Tag 14 getöteten Fischen konnte lediglich bei einem Fisch der Positivkontrolle (nominal 10 ng EE2/l) VTG mRNA nachgewiesen werden, da bei den MT exponierten Fischen keine Actinbanden zu erkennen waren, ging man davon aus, dass die RNA bei der Isolation denaturiert wurde. An Tag 21 trat dasselbe Problem auf, wobei hier sehr schwache Banden in allen Proben, auch bei den Kontrollfischen, zu erkennen waren. Mori *et al.* (1998) beschrieb das Phänomen des

VTG-Anstiegs durch eine Androgenexposition bei Hepatozyten-Kulturen aus nicht-geschlechtsreifen Regenbogenforellen. Hier gelang es ebenfalls durch eine MT Exposition ($2x10^{-9}$M) eine VTG mRNA Induktion nachzuweisen.
Diese Induktion der VTG mRNA könnte ebenfalls auf die oben postulierte Aromatisierung des MT zu einem Estrogen zurückgeführt werden.
Bei dem definitiven Test mit MT konnte eine Induktion der VTG mRNA auch in der Positivkontrolle nachgewiesen werden, dies widersprach den Ergebnissen des EE2-Versuchs (s. 3.6.2.4). In beiden Prüfungen waren die Bedingungen identisch, d.h. die eingesetzten Fische hatten das gleiche Alter, annähernd gleiches Gewicht und es wurde selbst die selbe Charge EE2 eingesetzt. Aus diesem Grund war es nicht erklärbar, warum diese Induktion bei den Fettkopfbrassen der Kurzzeitprüfung mit EE2 nicht beobachtet wurde.
Bei der Expression des Estrogen Rezeptors konnte kein Zusammenhang mit der Exposition hergestellt werden. Flouriot *et al.* konnten in Hepatozytenkulturen von männlichen Regenbogen-forellen nachweisen, dass eine Exposition mit Estradiol nicht nur eine VTG mRNA Synthese induziert, sondern ebenso die ER mRNA Synthese (Flouriot *et al.*, 1997). Diese Korrelation zwischen VTG mRNA- und ER mRNA-Gehalt der Proben konnte ebenso wenig wie eine Zeit- oder Dosisabhängigkeit nachgewiesen werden.

4.3 Fadrozol

Die dritte Substanz, welche in einer systemischen Verträglichkeitsprüfung untersucht wurde, war der Aromatase-Inhibitor Fadrozol. Es handelte sich dabei um einen potenten Aromatase-Hemmer der Firma Novartis (CH), der bei der Behandlung von Brust- und Prostatakrebs eingesetzt wird. Da dieser Wirkstoff nur in geringen Mengen zum Einsatz kommt, konnte er bislang in der Umwelt noch nicht nachgewiesen werden.
Die Substanz war sehr gut wasserlöslich. Bei der Analytik der Testlösungen wurden bis zu 75% höhere Fadrozol Konzentrationen nachgewiesen, als eingesetzt wurden (s. 3.6.6.1). Diese hohen Werte konnten weder durch einen Berechnungsfehler der Stammlösung, noch durch einen Einwaagefehler erklärt werden.
Über den gesamten Versuchzeitraum von 21 Tagen nahmen die eingesetzten juvenilen Fische kontinuierlich an Gewicht und Körperlänge zu (s. 3.6.6.2). Es konnte kein negativer Effekt der Substanz auf diesen Parameter gezeigt werden. Im Verlauf der Prüfung kam es nur zu 5 Todesfällen, die weder zeit- noch dosisabhängig waren, aus diesem Grund wurde davon ausgegangen, dass das eingesetzte Fadrozol in subletalen Dosen vorlag.
In allen Fadrozol exponierten Fischen kam es zu einer leichten Abnahme des Vitellogeningehalts im Ganzkörperhomogenat im Vergleich zu den Kontrollfischen (s. 3.6.6.3). Diese Abnahme war allerdings nur an Tag 7 in Gruppe 3 und an Tag 14 in Gruppe 3

und 4 (50 und 100µg/l) signifikant ($p \leq 0.05$). Zeitabhängig kam es zu einem leichten VTG Anstieg in jeder Gruppe, der auch in der Kontrolle zu beobachten war. Dieser Anstieg konnte nur durch das bereits vorhandene Estradiol in den juvenilen Fischen erklärt werden, da durch die Exposition mit einem Aromatase Hemmer die Neusynthese des Estradiols unterbunden werden sollte. Alfonso *et al.* konnte diese Hemmung durch Fadrozol bereits bei Coho-Lachsen (*Oncorhynchus kisutch*) nachweisen (Alfonso *et al.*, 1999). Bei VTG handelt es sich um ein Speicherprotein mit einer sehr langen Halbwertszeit von bis zu 9 Tagen (Craik, 1977). Daher könnte die zeitabhängige Akkumulation auf eine geringe Neusynthese durch das noch vorhandene Estradiol und sehr langsamen Abbau, aufgrund der langen Halbwertszeit zurückzuführen sein. Bei dem zuvor durchgeführten Range-finding Test (s. 3.6.5.3) konnte diese Akkumulation nicht beobachtet werden. Ebenso kam es zu einem VTG Anstieg in den Substanz exponierten Fischen im Vergleich zur Kontrolle. Allerdings wurde bei diesem Versuch keine Leitungswasserkontrolle mitgeführt, sondern die an Tag 0 getöteten Fische wurden als Kontrolltiere gewertet. Zudem waren die beim Range-finding Test eingesetzten Tiere wesentlich größer und schwerer als die Jungfische des definitiven Test. Die möglicherweise schon fortgeschrittene Differenzierung könnte hier als Erklärung für den VTG Anstieg dienen.

Mit Hilfe der RT-PCR konnte gezeigt werden, dass es in den Fadrozol exponierten Fischen zu keiner Neuexpression der VTG mRNA kam. Auch bei diesen Proben konnte in der Positivkontrolle (nominal 10ng EE2/l) keine VTG mRNA Expression nachgewiesen werden. Allerdings war bei dieser Prüfung bei den Fischen der Positivkontrolle ebenfalls nur sehr wenig bzw. gar kein Actin nachweisbar. Dies deutete auf eine Denaturierung der RNA bei der Isolierung hin. Auch der ER war in allen Proben nur sehr wenig vorhanden. Die Exposition mit Fadrozol schien keine Auswirkung auf die ER mRNA Synthese zu haben. Allerdings war die Qualität der RNA in allen Proben nicht besonders hoch, daher war es sehr schwierig Aussagen über eine Veränderung der Expressionsmuster in den einzelnen Proben zu treffen.

4.4 Kombinationsversuch

Mit Hilfe dieses Versuchs sollte geklärt werden, ob der starke VTG Anstieg in den MT exponierten Fischen durch eine Aromatisierung des MT eingeleitet wurde. Es wurde eine verkürzte systemische Verträglichkeitsprüfung mit gleichzeitiger Dosierung von Methyltestosteron und Fadrozol durchgeführt, wobei erwartet wurde, dass das Fadrozol die Aromatisierung des Methyltestosterons verhindert. Beide Substanzen wurden in bereits getesteten Konzentrationen eingesetzt, MT mit nominal 10µg/l, F mit nominal 50µg/l. Beide Konzentrationen hatten bereits in den definitiven Tests einen Effekt nach spätestens 14 Tagen gezeigt. Zusätzlich wurde eine Gruppe in 10µg MT + 50µg F/l exponiert (s. 3.6.8).

Im Verlauf des Versuchs kam es zu keinen Todesfällen oder krankhaften Veränderungen. Allerdings wiesen die Fische gegen Ende der Exposition an Tag 13, eine sehr plötzlich auftretende Verhaltensänderung auf. Die Jungfische der Kombinationsgruppe zeigten ein agressives Verhalten und Revierkämpfe. Zudem konnten sekundäre, männliche Geschlechtsmerkmale, wie z.B. die Schwarzfärbung der Rückenflosse und der Kiemendeckel und Tuberkelbildung bei allen verbliebenen Jungfischen dieser Gruppe beobachtet werden. Lediglich in Gruppe 2 (10µg MT/l) konnten 2 weitere Männchen phänotypisch bestimmt werden. Sämtliche andere Fische wiesen keinerlei Verhaltensveränderungen auf. Diese phänotypische und Verhaltensänderung trat bei den behandelten Fischen schon im Alter von ~ 3 Monaten auf, bei unbehandelten Fischen kann eine phänotypische Geschlechtsbestimmung aufgrund der Pigmentierung der Rückenflosse frühestens im Alter von 5-6 Monaten durchgeführt werden. Eine Färbung der Kiemendeckel und die Tuberkelbildung treten bei Fettkopfbrassen erst im Alter von ca. 7 Monaten auf. Um zu untersuchen, ober die Veränderung des Geschlechterverhältnisses reversibel war wurden aus jeder Gruppe 4 Fische weitere 6 Monate in frischem Wasser gehalten. Die Fische aus der Kombinationsgruppe wiesen 6 Monate nach der Exposition immernoch ein verändertes Geschlechterverhältnis auf. Die Vermännlichung konnte nicht rückgängig gemacht werden. Im Gegensatz dazu entwickelten sich die Jungfische der Methyltestosterongruppe normal und begannen 4 Monaten nach der Exposition mit der Eiablage. Die Larven der F1-Generation entwickeln sich ebenfalls völlig normal weiter. Die Fadrozol exponierten Fische wiesen ein Geschlechterverhältnis von einem Weibchen zu 3 Männchen auf, bei dieser Gruppe kam es zu keinerlei Balzverhalten und keine Eiablage.

Die Vitellogeninmessung bestätigte die makroskopischen Befunde. In den MT exponierten Jungfischen kam es wiederum zu einem sehr starken VTG Anstieg, die Fadrozol exponierten Fische zeigten nur einen schwachen VTG Anstieg und in den mit beiden Substanzen exponierten Fischen war die Zunahme noch schwächer (s. 3.6.8.2, vgl. 3.6.4.3 und 3.6.6.3). Ebenso konnte mit Hilfe der RT-PCR die VTG mRNA nur in den MT exponierten Fischen nachgewiesen werden.

Durch diesen Versuch konnte gezeigt werden, dass die phänotypische und Verhaltensänderung parallel zu den gemessenen biochemischen und molekular-biologischen Parametern verlief und vergleichsweise empfindlich war.

Zusammenfassend bestätigt dieser Versuch die Hypothese, dass es sich bei MT um ein aromatisierbares Androgen handelt, dass von der endogenen Aromatase in den Fettkopfbrassen zu einem Estrogen umgewandelt wird, welches wiederum den VTG Anstieg hervorruft. In den Arbeiten von Piferrer *et al.* (1990, 1993) wurde dieses Phänomen bereits beschrieben.

Durch die Blockade der Aromatase durch Fadrozol wirkte das eingesetzte Methyltestosteron als Androgen und rief die Verhaltensänderung und eine irreversible Verschiebung des Geschlechterverhältnisses hervor.

4.5 Interne Kontrollen

Damit die drei systemischen Verträglichkeitsprüfungen untereinander verglichen werden konnten wurden einige interne Kontrollen mitgeführt.
Bei jedem Test wurden aus der Akklimatisation 40 juvenile Fettkopfbrassen in ein separates Becken gesetzt und bis zur Differenzierung gehältert. Bei diesen Fischen wurde anhand der sekundären Geschlechtsmerkmale das Geschlecht makroskopisch bestimmt (s. 3.6.7.1). Insgesamt wurden 120 Fische beurteilt und das Verhältnis lag konstant bei 1:1, unabhängig von der Herkunft der Fische. Anhand dieses Ergebnisses konnte davon ausgegangen werden, dass sich auch bei den exponierten Fische theoretisch dieses Verhältnis hätte einstellen müssen. Das Ergebnis des Kombinationsversuchs (s. 3.6.8.1) zeigt sehr deutlich, dass die Exposition mit hormonell wirksame Substanzen einen Einfluss auf die Geschlechtsdifferenzierung der Fische hat.
Als eine weitere Kontrolle dienten die am Tag 0 eines jeden Versuchs getöteten Fische. Hierzu wurden 32 juvenile Fettkopfbrassen aus dem Akklimatisationsbecken entnommen, in flüssigem Stickstoff getötet, nach dem Wiegen homogenisiert und der Vitellogeningehalt des Ganzkörper-homogenats bestimmt. Durch diese Messung sollte ein Vitellogenin-Basislevel der juvenilen Fische, ohne Exposition, bestimmt werden. Es zeigte sich, dass die für den Ethinylestradiol-Versuch eingesetzten Fische bereits zu Beginn einen höheren Vitellogeninlevel aufwiesen als die Tag 0-Fische der anderen Versuche (s. 3.6.7.2). Da diese Fische im Mittel ein deutlich höheres Körpergewicht hatten als die unbehandelten Fische in den beiden anderen Versuchen (EE2: 107.9mg, MT: 80.4mg, F: 73.2mg), wurde ein höherer Entwicklungsstand angenommen und für den erhöhten Vitellogeninlevel verantwortlich gemacht. Fitzpatrick *et al.* konnte nachweisen, dass von Tag 95 bis Tag 117 nach Fertilisation der Estradiolgehalt im Plasma unbehandelter juveniler Regenbogenforellen von 5pg/ml auf ~60pg/ml bei Weibchen und von 0 auf ~20pg/ml bei Männchen ansteigt. Vor dieser Zeitspanne war auch bei den Weibchen kein Estradiol im Plasma nachweisbar (Fitzpatrick *et al.*, 1993). Desweiteren waren bei diesen Regenbogenforellen keine sekundären Geschlechtsmerkmale sichtbar, die Geschlechtsbestimmung erfolgte daher histologisch. Die Vermutung liegt nahe, dass auch bei juvenilen Fettkopfbrassen innerhalb weniger Tage eine sehr starke Hormonproduktion kurz vor der Differenzierung einsetzt. Daher ist es durchaus möglich, dass die für den Ethinylestradiolversuch eingesetzten Jungfische bereits mit der Differenzierung begonnen hatten und so der etwas erhöhte Vitellogeningehalt erklärt werden kann.

Als zusätzliche Kontrolle wurde bei jedem Versuch eine Behandlung mit nominal 10ng EE2/l mitgeführt. Die entsprechenden Fische wurden ebenfalls über 21 Tage exponiert und an jedem Probennahmezeitpunkt die Vitellogeninkonzentrationen bestimmt. Diese Kontrolle diente als weiterer Inter- bzw. Intralaborvergleich, da sie auch in den beiden anderen beteiligten Laboren (AstraZeneca und Shell) mitgeführt wurde. Auch hier wiesen die Jungfische des Ethinylestradiolversuchs zu jedem Tötungszeitpunkt einen anderen Vitellogeninstatus als die Fische der beiden anderen Versuche auf (s. 3.6.7.3). Die exponierten Fische wiesen ebenfalls einen sehr großen Körpergewichtsunterschied auf (EE2: 143.0mg, MT: 67.2mg, F: 104.6mg). Als Erklärung für diese verminderte Vitellogeninsynthese könnte bei diesen Fischen ebenfalls eine beginnende Differenzierung dienen. Durch das Einsetzen der Geschlechtsdifferenzierung und die damit einhergehende hormonelle Umstellung (Fitzpatrick *et al.*, 1993) wurde möglicherweise der Effekt des Ethinylestradiols überlagert und kam daher weniger deutlich zum Tragen. Dieses Phänomen widerspricht der obigen Erklärung in diesem Fall nicht, da bei den Fischen der Positivkontrolle der Effekt des Ethinylestradiols reduziert wurde, der Basislevel der an Tag 0 getöteten Fische konnte aufgrund einer beginnenden Differenzierung ohne Exposition trotzallem erhöht gewesen sein.

4.6 Bewertung des Testsystems

Die Vorteile der Wahl der Fettkopfbrasse als Testspezies lagen in der Haltung und der einfachen Nachzüchtbarkeit. Zudem kann dieser Schwarmfisch in größerer Anzahl in gemeinsamen Becken gehalten werden und zeigte kaum aggressives Revierverhalten. Ein weiterer Vorteil dieser Fischart lag darin, dass die Fettkopfbrasse die "Standard"-Fischart der US FDA und der US EPA darstellt und aus diesem Grund viele Daten aus langfristigen Tests bezüglich Schlupf und Wachstum unter Einfluss verschiedener Substanzen bekannt waren. Darüber hinaus kann die Geschlechtsbestimmungen makroskopisch, anhand verschiedener sekundärer Geschlechtsmerkmale durchgeführt werden, sobald die Tiere ein gewisses Alter erreicht haben.

Der Vitellogenin ELISA wurde in den unterschiedlichen Laboren erfolgreich implementiert, allerdings zeigten sich bei zwei Ringtests große Abweichung zwischen den Laboren. Da in allen drei Laboren identische Proben in den Ringtests gemessen wurden, konnten diese Variationen nicht durch Matrixprobleme den Proben erklärt werden. Generell ist mit dem ELISA das Problem verbunden, dass abhängig von der Verdünnung der Homogenate große Abweichung im Messergebnis auftreten. Aus diesem Grund wurden sämtliche hier erhobenen Ergebnisse mit einer einheitlichen Verdünnung von 1:100 gemessen. Unter der Voraussetzung, dass der ELISA unter standardisierten Bedingungen durchgeführt wird,

waren die Ergebnisse reproduzierbar und boten einen guten Anhaltspunkt für eine Exposition vorallem mit einer estrogen wirksamen Substanz.

Insgesamt wurden in den drei verschiedenen Laboren neun endokrin aktive Substanzen getestet. Zusätzlich wurden zu den hier beschriebenen Substanzen noch Diethylstilbestrol, als weiteres potentes Estrogen; Flutamid, als Anti-Androgen; Genistein, als Phytoestrogen; Methoxychlor und 4-tert-pentylphenol beides schwache Estrogene und ZM 189.154, als Anti-Estrogen getestet. Alle Substanzen, bis auf Fadrozol und ZM 189.154 riefen einen signifikanten Vitellogeninanstieg hervor (Panter *et al.*, 2000).

Durch die durchgeführten Prüfungen konnte gezeigt werden, dass bereits eine 14 tägige *in vivo* Exposition mit endokrin aktiven Substanzen signifikante Änderungen der Vitellogeninlevel hervorruft. Durch eine Verkürzung der Prüfung wäre es möglich die Zahl der eingesetzten Fische deutlich zu verringern. Allerdings sollte auf keine der Kontrollen, wie z. B. Tag 0-Fische oder die Positivkontrolle mit EE2 verzichtet werden, da sie einen guten Intralaborvergleich darstellen und einen Hinweis auf die Reaktion der Fische gegenüber einer hormonell aktiven Substanz bieten. Wie bereits aufgeführt traten auch bei den Kontrollen Schwankungen im Vitellogeninstatus der Tiere auf, doch konnte mit Hilfe der Kontrollen zum einen ein Basislevel an Vitellogenin ermittelt werden und zweitens ein Vitellogeninanstieg reproduziert werden.

Neben der Untersuchung der estrogenen, bzw. anti-estrogenen Wirkung, die durch Vitellogenin als Indikator in gutem Maß abgebildet werden konnte, wären noch mehr Daten nötig um andere hormonelle Wirkmechanismen wie z.B. androgene oder anti-androgene Wirkungen aufzuklären.

Mit Hilfe der Steroidlevel könnten genauer Aussagen über den tatsächlichen Hormonstatus der Fische getroffen und damit die Wirkung der eingesetzten Substanzen beschrieben werden. Durch den Einsatz von sehr kleinen Jungfischen in den Prüfungen war es allerdings nicht möglich ausreichende Mengen an Plasma zu erhalten. Aus diesem Grund sollte ein Steroid ELISA mit Ganzkörperhomogenat etabliert werden. Dies gelang nicht, da das Ganzkörperhomogenat als Matrix zu stark mit dem Antikörper interferierte und damit eine reproduzierbare Messung verhinderte. Aller Wahrscheinlichkeit nach wurde dies durch die Fettmicellenbildung und die Adsorption der Steroide bedingt.

Routinemäßig wird in Langzeittoxizitätsstudien das Wachstum der Fische als Parameter für einen toxischen Effekt genutzt. Die gemessenen Werte ergaben keinen Hinweis auf allgemein-toxische Wirkungen. Allerdings ist das Wachstum der Fische noch von weiteren Faktoren abhängig, beispielsweise der Wassertemperatur und der Fütterung. Zudem war es fast unmöglich die Jungfische an den Tötungszeitpunkten, bei der Entnahme aus den Becken zu randomisieren, da die kleinsten Fische wesentlich einfacher zu fangen waren und manchmal sogar direkt in das Netz schwammen. Daher wurden die Fische an fast jedem

folgenden Tötungszeitpunkt immer deutlich größer, was aber möglicherweise nicht nur vom Wachstum der Fische abhing, sondern auch vom nicht-zufälligen Herausfangen.
Zusätzlich zum Vitellogenin-Proteinlevel wurde auch noch die VTG und ER mRNA mit Hilfe einer RT-PCR nachgewiesen. Dieser Endpunkt hat gegenüber dem ELISA den Vorteil, dass eine geringere Fischanzahl benötigt wird, um eine mRNA-Induktion nachzuweisen. Allerdings war es nicht möglich die Proben exakt zu quantifizieren. Zusammengenommen bilden beide Endpunkte, die Vitellogeninmessung sowohl auf biochemischer als auch auf molekular-biologischer Ebene einen sensitiven Nachweis eines estrogenen Effekts.
Zusammenfassend kann diese Prüfstrategie vorallem für estrogen aktive Substanzen positiv beurteilt werden. Im Gegensatz zu akuten Toxizitätsprüfungen (OECD Guideline 203) wird hier nicht nur der Endpunkt Mortalität untersucht, sondern auch biochemische und molekular-biologische Parameter. In der Umwelt werden akut toxische Mengen von Xenobiotika nur selten nach sehr schwerwiegenden Chemiekalienunfällen oder Tankerunglücken freigesetzt, z. B. 1976 die Dioxinwolke in Seveso, 1989 bei der Havarie der Exxon Valdez oder das extreme Fischsterben im Sommer 2000 nach der Quecksilbereinleitung in die Theiß. Der Eintrag von natürlichen oder synthetischen Xenohormonen liegt in Bereichen einer subletalen, dafür aber meist chronischen Exposition. Diese Exposition kann im Falle endokrin wirksamer Chemikalien zu einer Veränderung der Geschlechtsdifferenzierung bei den exponierten Fischen führen und sich durch eine Verminderung der Reproduktionsfähigkeit auf die gesamte Population auswirken (Kime, 1998). Zudem entspricht hier die Expositionsart, mit der Substanzzugabe direkt in das Umgebungswasser, der natürlichen Exposition. Die Fische nehmen bei dieser Art von Versuch die zu testende Substanz weder durch eine spezielle Diät auf, noch werden die Substanzen direkt in die Bauchhöhle injiziert. Dieses Prüfdesign macht es möglich, das Wasser aus einem Kläranlagenablauf oder belastetes Flusswasser im Labor zu testen.
Im Gegensatz zu verschiedenen *in vitro* Test Methoden wie beispielsweise *dem E-SCREEN assay*, bei welchem eine humane Brustkrebszellinie (MCF-7) eingesetzt wird, die nur unter Zugabe von einem Ligand für den ER proliferieren kann (Soto *et al.*, 1995), wird bei der hier beschriebenen *in vivo* Methode nicht nur ein möglicher Wirkmechanismus untersucht. Die *meisten Screening Tests* werden an Zellinien durchgeführt, wobei es sich meist um Leberzellen handelt (*Flouriot et al.*, 1995) oder es werden mit Reportergenen transfizierte Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*) eingesetzt (Petit *et al.*, 1997). Diese Zellkulturen sind nur noch bedingt zu einer Metabolisierung der geprüften Substanz fähig. Durch den Einsatz eines *in vitro* Testsystems wäre es gegebenenfalls nicht möglich gewesen die estrogene Wirkung des Methyltestosterons, nach der Aromatisierung in den Gonaden der Fische nachzuweisen.

Aus diesem Grund bietet der hier etablierte *in vivo* Kurzzeittest eine schnelle und sensitive Detektionsmöglichkeit für estrogene oder anti-estrogene Effekte, auch für Substanzen bei denen der genaue Wirkmechanismus noch nicht bekannt ist, da eine mögliche Metabolisierung nicht ausgeschlossen wird und nicht nur eine Wirkmöglichkeit, z.B. Bindung an den ER, getestet wird. Allerdings werden Stoffe mit androgener oder anti-androgener Wirkung nicht erfasst.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein *in vivo* Kurzzeittest entwickelt werden, welcher hormonell wirksame Substanzen und ihr Auswirkungen auf Fische mit Hilfe von verschiedenen Endpunkten detektieren kann.

Hierzu wurden juvenile Fettkopfbrassen (*Pimephales promelas*) über 21 Tage drei bereits bekannten endokrin aktiven Substanzen in unterschiedlichen Konzentrationen ausgesetzt. Bei diesen Substanzen handelte es sich um Ethinylestradiol, ein vor allem in Kontrazeptiva eingesetztes, synthetisches Estrogen; um Methyltestosteron, ein synthetisches Androgen, welches aufgrund der 17α-Methylgruppe vom endogenen Testosteron unterschieden werden konnte; und um Fadrozol, einen Aromatase-Inhibitor der Firma Novartis (Basel, CH), der vor allem in der Therapie von Brust- und Prostatakrebs zum Einsatz kommt. Die Substanzen wurden in jeweils drei verschiedenen Konzentrationen direkt in Wasser gelöst und die Jungfische in dieser Testlösung exponiert. Durch diesen Testansatz konnte eine natürliche Exposition nachgeahmt werden.

Bei den unterschiedlichen Endpunkten, welche die endokrine Aktivität detektieren sollten handelte es sich um Vitellogenin-Level im Ganzkörperhomogenat, ein Dotterprotein, das estrogen-abhängig nur von Weibchen produziert wird und die Vitellogenin und Estrogen Rezeptor mRNA Expression. Zusätzlich wurden die exponierten Fische auf makroskopische Veränderungen untersucht. Eine Messung der endogenen Steroid-Level in Ganzkörperhomogenat und Bindungsstudien mit dem cytosolischen Estrogen Rezeptor waren in Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

Bei der Exposition mit Ethinylestradiol zeigte sich, dass die Vitellogenin-Konzentrationen im Homogenat signifikant anstiegen, allerdings konnte keine *de novo* Synthese der mRNA nachgewiesen werden. Eine Fadrozol Exposition hatte nach 21 Tagen keine deutliche Auswirkung auf die Vitellogenin Synthese in den Jungfischen. Bei den Versuchen mit Methyltestosteron konnte eine überraschende Vitellogenin *de novo* Synthese gezeigt werden. Dieser Befund ließ sich auf eine Aromatisierung des Methyltestosterons in ein Estrogen, durch die endogene Aromatase in den Jungfischen zurückführen, was durch einen Kombinationsversuch mit Fadrozol und Methyltestosteron bewiesen werden konnte. Bei dem Kombinationsversuch konnte durch eine gemeinsame Exposition von Fadrozol und Methyltestosteron ein vermännlichender Effekt des Androgens auf die Jungfische gezeigt werden.

Zusammenfassend kann das hier etablierte Testsystem positiv beurteilt werden. Es war möglich estrogene Effekte anhand der Vitellogenin-Level aufzuzeigen und androgene Effekte konnten durch eine phänotypische Vermännlichung der Jungfische nachgewiesen werden. Insgesamt ist es durch diesen *in vivo* Kurzzeittest möglich Estrogene sicher zu detektieren.

Für Androgene und Aromatase-Inhibitoren sollte das System abgewandelt und zusätzliche Endpunkte integriert werden. Der große Vorteil dieser Testart zeigte sich vor allem bei den Methyltestosteron-Versuchen, da nur in einem *in vivo* Test Auswirkungen einer Substanz, auch nach der Metabolisierung, auf den gesamten Organismus gezeigt werden können.

5.1 Summary

The aim of this study, was to establish a short-term test to detect endocrine active substances and their effects in juvenile fish.
Juvenile fathead minnows (*Pimephales promelas*) were exposed in a flow-through system for 21 days in 3 water-borne concentrations of 3 different endocrine modulating substances. The substances were ethinylestradiol (EE2), a synthetic estrogen in oral contraceptives, methyltestosterone (MT) a synthetic androgen, and fadrozole (F) an aromatase-inhibitor.
The measured endpoints were the vitellogenin (VTG) level in the whole-body homogenate and the VTG and estrogen receptor mRNA expression. Additionally macroscopic effects of the substances in the fish were investigated.
During the EE2 exposure the VTG levels increased significantly, but there was no *de novo* synthesis of VTG mRNA. The Fadrozole exposure had no effect on the VTG concentrations in the exposed juveniles. Surprisingly the MT exposure led to a significant time and dose related increase of VTG protein and mRNA. This effect points to an aromatisation of the MT to an estrogen. A simultaneous exposure with MT and F had an androgenic effect in the juvenile fish because the aromatisation of MT was blocked. No macroscopic effects were observed in the experiments with the single substances. However, when the fish were exposed to MT and F simultaneously, a strong masculinization effect was observed.
The established short-term test makes it possible to detect estogens and their effects in juvenile fish. For the detection of androgens or aromatase-inhibitors it is necessary to establish additional endpoints.

6. Literaturverzeichnis

1. Alfonso L.O.B., Iwama G.K, Smith J., and Donaldson E.M. (1999): Effects of the aromatase inhibitor Fadrozole on plasma sex steroid and ovulation rate in female Coho Salmon, *Oncorhynchus kistuch*, close to final maturation. *Gen.Comp.Endocrin.*, 113:221-222.

2. Arai R. (1967): Androgenic Effects of 11-Ketotestosterone and some sexual Cahracteristics in the Teleost, *Oryzias latipes*. *Ann.Zoo.Japonenses*, 40:1-5.

3. BGB (1994): Deutsches Chemikaliengesetzt (ChemG). In: *Giftliste: Gifte, krebserregende, gesundheitsschädliche und reizende Stoffe*, edited by Roth, et al, ecomed, Landsber/Lech.

4. Blazquez M., Piferrer F., Zanuy S., Carrillo M., and Donaldson E.M. (1995): Development of sex control techniques for European sea bass (*Dicentarchus labrux* L.) aquaculture: effects of dietary 17α-methyltestosterone prior to sex differentiation. *Aquaculture*, 135:329-342.

5. Boehringer Mannheim (1995): *The DIG System User's Guide for Filter Hybridization.* typoPlus Föll + Schulz GmbH, Mannheim.

6. Boehringer Mannheim (1996): *Nonradioactive in Situ Hybridization Application Manual.* typoPlus Föll + Schulz GmbH, Mannheim.

7. Bradford M.M. (1976): A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Prinziple of Protein-Dye Binding. *Analyt.Biochem.*, 72:248-254.

8. Brouwer A., Reijnders P.H.J., and Koeman J.H. (1989): Polychlorinated biphenyl (PCB)-contaminated Fish induces Vitamin A and Thyroid Deficiency in the Common Seal (*Phoca vitulina*). *Aquatic Tox.*, 15:99-106.

9. Chomczynski P and Sacchi N. (1993): A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*, 15:532-534.

10. Christiansen T., Korsgaard B., and Jespersen Å. (1998): Effects of Nonylphenol and 17ß-Oestradiol on Vitellogenin Synthesis, Testicular Structure and Cytology in male Eelpout *Zoarces viviparus*. *J.Exp.Biol.*, 201:179-192.

11. Craik J.C.A. (1977): Kinetic studies of vitellogenin metabolism in the Elasmobranch *Scyliorhinus canicula L.* *Comp.Biochem.Physiol.*, 61A:355-361.

12. Crim L.W., Peter R.E., and Billard R. (1981): Onset of Gonadotropic Hormone Accumulation in the Immature Trout Pituitary Gland in Response to Estrogen or Aromatizable Androgen Steroid Hormones. *Gen.Comp.Endocrinol.*, 44:374-381.

13. Danzo B.J. (1997): Environmental Xenobiotics may disrupt normal Endorcrine Function by interferring with the Binding of Physiological Ligands to Steroid Receptors and Binding Proteins. *Environ.Health Persp.*, 105:294-301.

14. EPA Guidline fourth Edition. Methods for Measuring the Acute toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. EPA /600/4-90/027F, 1-293. 1993. Washington DC 20460.

15. Feist G., Yeoh C.-G., Fitzpatrick M.S., and Schreck C.B. (1995): The production of functional sex-reversed male rainbow trout with 17α-methyltestosterone and 11ß-hydroxyandrostenedione. *Aquaculture*, 131:145-152.

16. Fitzpatrick M.S., Pereira C.B., and Schreck C.B. (1993): *In Vitro* Steroid Secretion during early Development of Mono-sex Rainbow trout: Sex Differneces, Onset of Pituitary Control, and Effects of Dietary Steroid Treatment. *Gen.Comp.Endocrinol.*, 91:199-215.

17. Flouriot G., Pakdel F., Ducouret B., and Valotaire Y (1995): Influence of Xenobiotics on Rainbow trout Liver Estrogen Receptor and Vitellogenin Gene Expression. *J.Mol.Endocrinol.*, 15:143-151.

18. Flouriot G., Pakdel F., and Valotaire Y. (1996): Transcriptional and post-transcriptional regulation of rainbow trout liver estrogen receptor and vitellogenin gene expression. *Mol.Cell.Endocrin.*, 124:173-183.

19. Flouriot G., Pakdel F., Ducouret B., Lederean Y., and Valotaire Y. (1997): Differential Regulation of two Genes Implicated in Fish Reproduction: Vitellogenin and Estrogen Receptor Genes. *Mol.Reprod.Develop.*, 48:317-323.

20. Folmar L.C., Denslow N.D., Rao V., Chow M., Crain D.A., Enblom J., Marcino J., and Guillette Jr.L.J. (1996): Vitellogenin Induction and reduced Serum Testosterone Concentrations in feral male Carp (*Cyprinus carpio*) Captured near a Major Metropolitan Sewaage Treatment Plant. *Comp.Biochem.Physiol.*, 104:1096-1101.

21. Fostier A., Jalabert B., Billard R., Breton B., and Zohar Y. (1983): The Gonadal Steroids. In: *Fish Physiology*, edited by Hoar W.S., et al, pp. 277-346. Harcourt Brace Jovanovich, New York.

22. Fourney R.M., Miyakoshi J., Day R.S., and Paterson M.C. (1988): Northern blotting: efficient RNA staining and transfer. *Focus*, 10:5-6.

23. Fry D.M. and Toone C.K. (1981): DDT-feminization of gull embryos. *Science*, 231:919-924.

24. Fry D.M. (1995): Reproductive effects in birds exposed to pesticides and industrial chemicals. *Environ.Health Perspect.*, 103:165-171.

25. Guillette Jr.L.J., Gross T.S., Masson G.R., Matter J.M., Percival H.F., and Woodward A.R. (1994): Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environ.Health Perspect.* , 102:680-688.

26. Guillette Jr.L.J., Crain D.A., Rooney A.A, and Pickford D.B. (1995): Organization versus activation: The role of endocrine-disruption contaminants (EDCs) during embryonic development in wildlife. *Environ.Health Perspect.*, 103:157-164.

27. Guillette Jr.L.J., Pickford D.B., Crain D.A., Rooney A.A, and Percival H.F. (1996): Reduction in penis size and plasma testosterone concentrations in juvenile alligators living in a contaminated environment. *Gen.Comp.Endocrinol.*, 101:32-34.

28. Gustafsson J.-A. Receptor Mediated Toxicity. 1998. European Teratology .

29. Hackmann E. (1974): Einfluss von Androgenen auf die Geschlechtsdifferenzierung verschiedener Cichlieden (Teleostei). *Gen.Comp.Endocrinol.*, 24:42-53.

30. Harries J.E., Janbakhsh A., Jobling S., Matthiessen P., Sumpter J.P., and Tyler C.R. (1999): Estrogenic Potency of Effluent from two Sewage Treatment Works in the United Kingdom. *Envrion.Tox.Chem.*, 18:932-937.

31. Hautanen A. (2000): Synthesis and regulation of sex hormone-binding globuline in obesity. *Int.J.Obes.Relat.Metab.Disord.*, 24:64-70.

32. Hernández I., Poblete A., Amthauer R., Pessot R., and Krauskopf M. (1992): Effect of seasonal Acclimatization on Estrogen-induced Vitellogenesis and on the Hepatic Estrogen Receptors in the male Carp. *Biochem.Internat.*, 28:559-567.

33. Hodges E., Boddy S.M., Thomas S, and Smith J.L (1997): Modification of IgH PCR clonal analysis by the addition of sucrose and cresol red directly to PCR reaction mixes. *Mol.Pathol.(England)*, 50:164-166.

34. Holcombe G.W., Phipps G.L., Knuth M.L., and Felhaber T. (1984): The Acute Toxicity of Selected Substituted Phenol, Benzenes and Benzoic Acid Esters to Fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ.Poll.*, 35:367-381.

35. Hori S.H., Kodama T., and Tanahashi K. (1979): Induction of Vitellogenin Synthesis in Goldfish by Massive Doses of Androgens. *Gen.Comp.Endocrinol.*, 37:306-320.

36. Howell W.M., Black D.A., and Bortone S.A. (1980): Abnormal expression of secondary sex characterisics in a population of mosquitofish, *Gambusia affinis holbrooki*: Evidence for environmentally induced masculinization. *Copeia*, 4:676-681.

37. Hunter G.A., Donaldson E.M., Goetz F.W., and Edgell P.R. (1982): Production of all-female and sterile coho salmon (*Oncorhynchus kistuch*) and experimental evidence for male heterogamety. *Trans.Am.Fish.Soc.*, 111:367-372.

38. Hunter G.A., Donaldson E.M., Stoss J., and Baker I.J. (1983): Production of monosex female groups of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) by the fertilization of normal ova with sperm from sex-reversed females. *Aquaculture*, 33:355-364.

39. Hutchinson T.H. Protocol for the Evaluation of Endocrine Disruption in Juvenile Fathead minnows *(Pimephales promelas)*: Exposure Phase. EMSG/AQ/001, 1-7. 1998. (GENERIC)
Ref Type: Report

40. Hutchinson T.H. Protocol for the Homogenisation of Fathead minnow (*Pimephales promelas*) Tissues for biochemical Analysis. EMSG/AQ/002, 1-3. 1998.

41. Jobling S. and Sumpter J.P. (1993): Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: An *in vitro* study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Tox.*, 27:361-372.

42. Kalbfus W. Exposition und Wirkung endokriner Substanzen im aquatischen System. 153, 33-44. 1998. Wien, Umweltbundesamt Wien. Wiener Mitteilungen.

43. Katzenellenbogen B.S., Bhardwaj B., Fang H., Ince B.A., Pakdel F., Reese F., Schodin D., and Wrenn C.K. (1993): Hormone binding and transcription activation by estrogen receptors: analysis using mammalian and yeast systems. *J.Steroid Biochem.Methods*, 10:39-48.

44. Kelloff G.J., Lubet R.A., Liebermann R., Eisenhauer K., Steele V.E., Crowell J.A., Hawk E.T., Boone C.W., and Sigman C.C. (1998): Aromatase Inhibitors as Potential Cancer Chemopreventives. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 7:65-78.

45. Kime D.E. (1998): *Endocrine Disruption in Fish*. Kluwer Academic Publishers,

46. Kramer V.J., Miles-Richardson S., Pierens S.L., and Giesy J. (1998): Reproductive impairment an induction of alkaline-labile Phosphate, a Biomarker of Estrogen exposure, in Fathead minnow (*Pimephales promelas*) exposed to waterborne 17ß-Estradiol. *Aquatic Tox.*, 40:335-360.

47. Landel C.C., Kushner P.J., and Greene G.L. (1995): Estrogen receptor accessory proteins: effects on receptor-DNA interactions. *Environ.Health Persp.*, 103:23-28.

48. Langston W.J. (1996): Recent developments in TBT ecotoxicology. *Toxicol.Ecotoxicol.News*, 3:179-187.

49. Larsson D.G.J., Adolfsson-Erici M, Parkkonen J., Pettersson M., Berg A.H., Olsson P.-E., and Förlin L (1999): Ethinyloestradiol - an undesired fish contraceptive. *Aquatic Tox.*, 45:91-97.

50. Loughlin K.R. and O'Leary M.P. (1995): Oral androgens in the treatment of hypogonadal impotent male. *J.Urol.(US)*, 153:1645-1645.

51. Medcalf R.L., Richards R.I., Crawford R.J., and Hamilton J.A. (1986): Suppression of urokinase-type plasminogen activator mRNA levels in human fibrosarcoma cells and synovial fibroblasts by anti-inflammatory glucocorticoids. *EMBO J.*, 5:2217-2222.

52. Mori T., Matsumoto H., and Yokota H. (1998): Androgen-induced vitellogenin gene expression in primary cultures of rainbow trout hepatocytes. *J.Steroid Biochem.*, 67:133-141.

53. Munkittrick K.R., Portt C.B., van der Kraak G., Smith R.J.., and Rokosh D.A. (1991): Impact of bleached kraft mill effluent on population characteristics, liver MFO activity, and serum steroid levels of a Lake Superior white sucker (*Catostomus commersoni*) population. *Can.J.Fish.Aquat.Sci.*, 48:1371-1380.

54. Munkittrick K.R., van der Kraak G., McMaster M.E., and Portt C.B. (1992): Response of hepatic MFO activity and plasma sex steroids to secondary treatment of bleached kraft pulp mill effluent and mill shutdown. *Environ.Tox.Chem.*, 11:1439

55. Nagahama Y. (2000): Gonadotropin action on gametogenesis and steroidogenesis in teleost gonads. *Zool.Sci.*, 4:209-222.

56. Nimrod A.C. and Benson W.H. (1997): Xenobiotic Interaction with an Alteration of Channel Catfish Estrogen Receptor. *Tox.Appl.Pharm.*, 147:381-390.

57. OECD. Fish, Prolonged Toxicity Test: 14-Day -Study. Guidline 204. 1984.

58. OECD. Alga, Growth Inhibition Test. Guidline 201 . 1984.

59. OECD. Daphnia sp. Aucte Immobilisation test and Reproduction Test. Guidline 202 . 1984.

60. OECD. Fish, Acute Toxicity Test. Guidline 203 . 1992.

61. OECD. Fish, Early-Life Stage Toxicity Test. Guidline 210 . 1992.

62. OECD. Activated Sludge, Respiration Inhibition Test. Guidline 209 . 1992.

63. Oehlmann J., Stoben E., Schulte-Oehlmann U., Bauer B., Fioroni P., and Markert B. (1996): Tributyltin Biomonitoring using prosobranchs as sentinel organism. *Fresenius J.Anal.Chem.*, 354:540-545.

64. Oppen-Bernsten D.O., Arukwe, Yadetie F., Lorens J.B., and Male R. (1999): Salmon Eggshell Protein Expression: A Marker for Environmental Estrogens. *Mar.Biotechnol.*, 1:252-260.

65. Pakdel F., Le Gac F, Le Goff P., and Valotaire Y. (1990): Full-length sequence and *in vitro* expression of rainbow trout estrogen receptor. *Mol.Cell.Endocinol.*, 71:195-204.

66. Panter G.H. Protocol for Quantification of Vitellogenin in the Fathead minnow (*Pimephales promelas*), using an Enzyme linked Immunosorbent Assay (ELISA) method. EMSG/AQ/003 , 1-11. 1998.

67. 67. Panter G.H., Tyler C.R., Maddix S., Campbell P.M. , Hutchinson T.H., Länge R., Lye C.M., and Sumpter J.P. Application of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) to quantify Vitellogenin Concentrations in Fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to endorcrine disrupting Chemicals. EMSG/AQ/001 , 1-31. 1999.

68. Panter G.H., Campbell P.M., Hutchinson T.H., Kime D.E., Länge R., Lye C.M., McCahon P., Sumpter J.P., Tattersfield L., Tyler C.R., and Zerulla M. Development of an *in vivo* Fathead Minnow Screen for Evaluating Endocrine Active Substances. Third SETAC World Congress(Brighton, UK, 21-25 May 2000). 2000.

69. Paolucci M. and Di Fiore M.M: (1994): Sex steroid binding proteins in the plasma of the green frog, *Rana esculenta*: changes during the reproductive cycle and dependence on pituitary gland an gonads. *Gen.Comp.Endocrinol.*, 96:401-411.

70. Parks L.G., Cheek A.O., Denslow N.D., Heppell S.A., McLachlan J.A., LeBlanc G.A., and Sullivan G.V. (1999): Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compound. *Comp.Biochem.Physiol.*, 123:113-125.

71. Petit F., Le Goff P., Cravédi J.-P., Valotaire Y, and Pakdel F. (1997): Two complentary Bioassays for screening the estrogenic Potency of Xenobiotics: recombinant Yeast for Trout Estrogen Receptor and trout hepatocyte cultures. *19*, 335

72. Piferrer F. and Donaldson E.M. (1990): Dosage-dependent differences in the effect of aromatizable and nonaromatizable androgens on the resulting phenotyp of coho salmon (*Oncorhynchus kistuch*). *Fish Physio.Biochem.*, 9:145-150.

73. Piferrer F., Baker I.J., and Donaldson E.M. (1993): Effects of Natural, Synthetic, Aromatizable, and Nonaromatizable Androgens in Inducing Male Sex Differentiation in Genotypic Female Chinook Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Gen.Comp.Endocrinol.*, 91:59-65.

74. Purdom C.E., Hardiman P.A., Bye V.J., Eno N.C., Tyler C.R., and Sumpter J.P. (1994): Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem.Ecol.*, 8:275-285.

75. Reijnders P.H.J. (1986): Reproductive failure in common seals feeding on fish from polluted coastal waters. *Nature*, 324:456-457.

76. Ren L., Meldahl A., and Lech J.J. (1996): Dimethyl formamide (DMFA) and ethylene glycol (EG) are estrogenic in rainbow trout. *Chem.Biol.Interact.*, 102:63-67.

77. Ren L., Lewis S.K., and Lech J.J. (1996): Effects of estrogen and nonylphenol on the post-transcriptional regulation of vitellogenin gene expression. *Chemico-Biological Interactions*, 100:67-76.

78. Roche Molecular Biochemicals (1999): *PCR Applications Manual.* Mitterweger Medien GmbH, Mannheim.

79. Schweinfurth H., Länge R., Miklautz H., and Schauer G. (1997): Umweltverhalten und aquatische Toxizität von Ethinylestradiol. In: *Stoffe mit endokriner Wirkung im Wasser*, Anonymouspp. 39-54. R. Oldenbourg Verlag, München.

80. Sheanan D.A., Bucke D., Matthiessen P., Sumpter J.P., Kirby M.F., Neall P., and Waldock M. (1994): The effects of low levels of 17α-ethynylestradiol upon plasma vitellogenin levels in male and female rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, held at two acclimation temperatures. In: *Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish.*, edited by Muller R., et al, pp. 99-112. Oxford.

81. Silberhorn E.M., Robison W.A., Short T.M., Black J.A., and Birge W.J. (1993): Comparison of Artemia Feeding Regimens on Larval Growth in a Short-Term Fathead Minnow Toxicity Test. *Environ.Contam.Toxicol.*, 50:179-186.

82. Soto A.M., Sonnenschein C., Chung K.L., Fernadez M.F., Olea N., and Olea Serrano F. (1995): The E-SCREEN Assay as a Tool to Identify Estrogens: An Update on Estrogenic Environmental Pollutants. *Environ.Health Persp.*, 103:113-122.

83. Tenniswood M.P.R., Searle P.F., Wolffe A.P., and Tata J.R. (1983): Rapid Estrogen Metabolism and Vitellogenin Gene Expression in *Xenopus* Hepatocyte Cultures. *Mol.Cell.Endocrin.*, 30:329-345.

84. Thomas P.S. (1980): Hybridisation of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 77:5201-5205.

85. Tremblay L. and van der Kraak G. (1999): Comparison between the Effects of the Phytosterol ß-Sitosterol and Pulp and Paper Mill Effluents on sexually immature Rainbow trout. *Envrion.Tox.Chem.*, 18:329-336.

86. Tyler C.R. and Sumpter J.P. (1990): The purification and partial characterization of carp, *Cyprinus carpio*, vitellogenin. *Fish.Physiol.Biochem.*, 8:111-120.

87. Tyler C.R. (1999): An *in vivo* testing system for endocrine disruptors in fish early life stages using induction of vitellogenin. *Environ.Tox.Chem.*, 18:337-347.

88. Varadaraj K., Kumari S.S., and Pandian T.J. (1994): Comparison of conditions for hormonal sex reversal of mozambique tilapias. *The Progressive Fish Culturist*, 56:81-90.

89. Watabe S., HirayamaY., Imai J., Kikuchi K., and Yamashita M. (1995): Sequences of cDNA clones encoding alpha-actin of carp and goldfish skeletal muscels. *Fisheries Sci.*, 61:998-1003.

90. Weigel N.J. (1996): Steroid hormone recepors and their regulation by phosphorylation. *Biochem.J.*, 319:657-667.

91. Zhu B.H. (1990): Klinefelter's Syndrome: report of 35 cases. *Chung Hua Wai Ko Tsa Chih (China)*, 28:412-413.