

**UNTERSUCHUNG ZUR REPRODUKTIONS BIOLOGIE DES  
ROTEN THUNS (*Thunnus thynnus* L.) IM MITTELMEER**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Vito Susca**

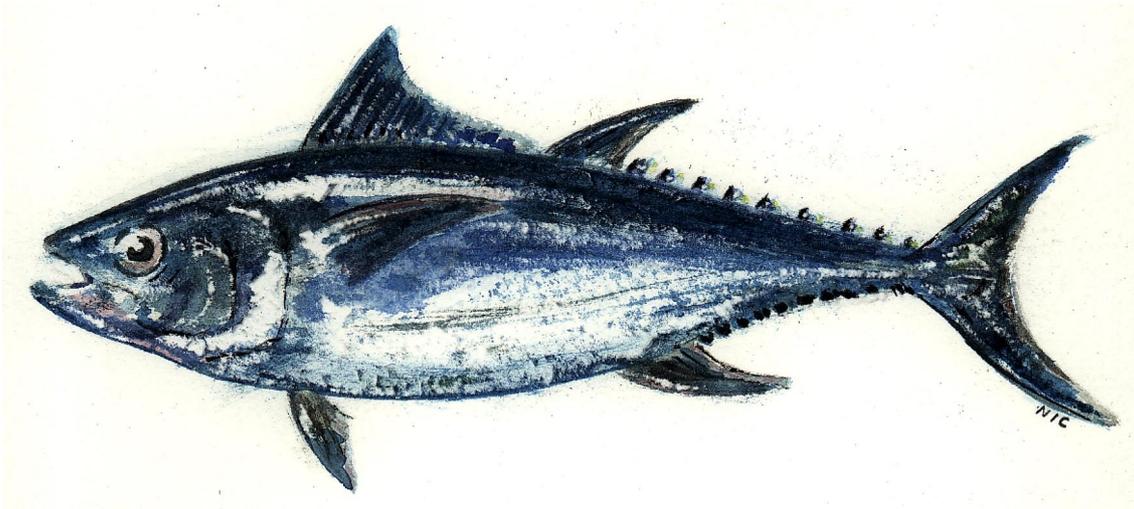
aus Triggiano (Italien)

Düsseldorf, 2001

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen-Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

1. Berichterstatter: Prof. Dr. C.R. Bridges
2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Grieshaber

Tag der mündlichen Prüfung: 06.07.2001



*Thunnus thynnus* L. (Aquarell von Nicole Maria Susca)

„... warum sie (das weibliche und das männliche Prinzip) in Erscheinung treten und existieren, und warum sich ein weibliches und männliches Individuum bilden, rührt von der Notwendigkeit, also von dem naheliegendsten Motor, der Materie her. ...

Das Schöne und das Göttliche sind immer notwendig aufgrund ihrer Natur, des Besseren in den möglichen Dingen. Das Nichtewige kann sein oder auch nicht sein und an dem Besseren sowohl auch als am Schlechteren beteiligt sein....Die Reproduktion der Tiere ist auf diese Gründe zurückzuführen.

Da es nicht möglich ist, dass die Natur eines Nachkommen ewig sei, ist das was geboren wird, ewig in der Welt, die ihm unmittelbar gegeben wurde.

Individuell ist es ihm also nicht möglich (ewig zu sein), wäre die Essenz der Dinge tatsächlich im Detail,..., wäre es ewig; auf die Spezies bezogen ist es ihm aber möglich (ewig zu sein). Deswegen gibt es immer Nachkommen der Menschen, der Tiere und der Pflanzen. Und da das Prinzip der Lebewesen, das Weibliche und das Männliche ist, bezogen auf die Reproduktion, muss das Weibchen und das Männchen existieren."

(Aristoteles, Die Reproduktion der Tiere 2. Buch)

<http://www.ulb.uni-duesseldorf.de/diss/mathnat/2001/susca/html>

**Inhaltsverzeichnis**

VORWORT .....	1
ABKÜRZUNGEN .....	2
1. EINLEITUNG .....	3
2. MATERIAL UND METHODEN .....	11
2.1. TIERBESCHAFFUNG UND PROBENNAHME .....	11
2.1.1. ORTE UND ZEIT DER PROBENNAHME .....	12
2.1.2. BEHANDLUNG UND TRANSPORT DER PROBEN .....	13
2.2. HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNG DER GONADEN .....	13
2.2.1. HISTOCHEMISCHE FÄRBUNG .....	13
2.2.2. IMMUNOHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN .....	13
2.2.3. KRITERIEN FÜR DIE BESTIMMUNG DES REIFEGRADES DER GONADEN .....	14
2.3. QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER STEROIDHORMONE .....	14
2.3.1. ANTISERA UND STEROIDKONJUGATE .....	15
2.3.2. STEROID ELISA PROZEDUR .....	15
2.3.3. CHARAKTERISIERUNG DER STEROID ELISA .....	16
2.3.4. STEROIDKONZENTRATION IM PLASMA .....	16
2.3.5. STEROIDKONZENTRATION IM GEWEBE .....	16
2.4. UNTERSUCHUNGEN ZUM THUNFISCH-VITELLOGENIN .....	17
2.4.1. IDENTIFIZIERUNG UND REINIGUNG DES VITELLOGENINS .....	17
2.4.1.1. CHARAKTERISIERUNG DES THUNFISCH-VITELLOGENINS .....	17
2.4.1.2. PRODUKTION VON ANTISERUM GEGEN THUNFISCH- VITELLOGENIN .....	18
2.4.1.3. WESTERN BLOT ANALYSE VON VITELLOGENIN .....	19
2.4.1.4. DOT BLOT ANALYSE VON VITELLOGENIN .....	19
2.4.1.5. PROBENVORBEREITUNG FÜR DIE VITELLOGENIN ANALYSEN .....	19
2.4.2. THUNFISCH-VITELLOGENIN ELISA PROZEDUR .....	20
2.5. STATISTISCHE ANALYSE .....	21
3. ERGEBNISSE .....	22
3.1. QUALITÄT DER PROBENNAHME .....	22
3.2. MESSUNG DER STEROIDHORMONE .....	22
3.3. PARTIELLE CHARAKTERISIERUNG VON <i>T. thynnus</i> VITELLOGENIN .....	23
3.4. QUALIFIZIERUNG DES VITELLOGENIN ELISA .....	25
3.4.1. QUANTITATIVE MESSUNG DER VITELLOGENIN KONZENTRATION .....	28

## INHALTSVERZEICHNIS

3.5.	QUALITATIVE DETEKTION DES VITELLOGENINS.....	28
3.6.	GONADENREIFE .....	30
3.7.	ERSTE SEXUELLE REIFE BEI WEIBCHEN .....	31
3.8.	DER REPRODUKTIONSZYKLUS DES BFT IM MITTELMEER .....	32
3.8.1.	DER REPRODUKTIONSZYKLUS IM ZENTRALEN MITTELMEER .....	33
3.8.1.1.	WEIBCHEN.....	33
3.8.1.2.	MÄNNCHEN.....	33
3.8.2.	DER REPRODUKTIONSZYKLUS IM WESTLICHEN MITTELMEER .....	37
3.8.2.1.	WEIBCHEN.....	37
3.8.2.2.	MÄNNCHEN.....	37
3.9.	KORRELATION DER STEROIDE UND DES Vtg IM PLASMA UND MUSKELGEWEBE.....	39
3.10.	DETERMINATION DES GESCHLECHTS UND REIFESTADIUMS.....	40
4.	DISKUSSION .....	46
4.1.	KRITISCHE BETRACHTUNG .....	46
4.2.	CHARAKTERISIERUNG DER ENDOKRINEN PARAMETER DES BFT.....	47
4.2.1.	CHARAKTERISIERUNG DES GEREINIGTEN BFT-Vtg .....	47
4.2.2.	BFT-Vtg ELISA.....	48
4.3.	DER REPRODUKTIVE ZYKLUS DES BFT IM MITTELMEER.....	49
4.4.	KORRELATION DER ENDOKRINEN PLASMA UNTERSUCHUNGEN MIT DEM MUSKELGEWEBE.....	54
4.5.	BESTIMMUNG DES GESCHLECHTS UND DES REPRODUKTIVEN STATUS.....	56
4.6.	AUSBLICK.....	57
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	59
	ANHANG 1.....	60
	ANHANG 2.....	65
	LITERATUR.....	67

## Vorwort

Die Atmungsphysiologie des Schwertfisches war Gegenstand meiner Diplomarbeit und in der vorliegenden Dissertation steht nun die Reproduktionsphysiologie eines weiteren großen pelagischen Fisches, dem Roten Thun, im Mittelpunkt.

Die intensive Auseinandersetzung mit der Biologie dieser beiden großartigen Meerestiere haben eine wahre Ehrfurcht vor der Weisheit der Natur in mir hervorgerufen. Deshalb gilt mein erster Dank den Naturgewalten, die das Meer und die Fische hervorgebracht haben.

Sicherlich wäre diese Arbeit nicht ohne die Unterstützung von Prof. Dr. C.R. Bridges möglich gewesen, der mir bei allen Schwierigkeiten hilfreich zur Seite gestanden hat. Nicht nur in zahlreichen Diskussionen, sondern auch bei der praktischen Arbeit hat mir sein Engagement sehr geholfen.

Ohne die enge Zusammenarbeit und Unterstützung von Prof. Dr. G. De Metro von der Universität Bari, wäre diese Arbeit nicht entstanden. Als Experte für den Mittelmeerraum, mit seinem Sachverständnis und den guten Kontakten zu den Fischern, hat er die Probenahme erst möglich gemacht.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. M. Grieshaber für die freundliche Aufnahme in seinem Institut, wo ich unter den günstigsten Bedingungen diese wissenschaftliche Arbeit durchführen konnte. An dieser Stelle möchte ich auch allen Mitarbeitern des Instituts für Zoo-physiologie danken, die mir stets mit gutem Rat zur Seite standen.

Eine Schlüsselfigur für diese Arbeit war sicherlich Dr. D. E. Kime von der Universität Sheffield, in dessen Labor ich die Grundlagen der Steroid-ELISA erlernen konnte. Auch während meiner Arbeit hatte er immer ein offenes Ohr für alle meine Probleme.

Mein besonderer Dank gilt der BTA Christel Castor, die mich vor allem bei der Laborarbeit sehr unterstützt hat und auch ein engagierter Gesprächspartner beim Diskutieren der methodischen Schwierigkeiten war.

Ohne die gute Zusammenarbeit mit Dr. A. Corriero, Dr. M. Deflorio (Universität Bari), Dr. F. Garibaldi (Universität Genua), Dr. R. Riehl, Dr. J. Schmidt, Z. Guo (Institut für Zoonormorphologie, Düsseldorf), M. de la Serna (IEO) und allen Fischern, die mir bei der Probenahme geholfen haben, wäre diese Arbeit nicht entstanden.

Weiterhin wurde diese Arbeit durch die finanzielle Förderung der Europäischen Gemeinschaft ermöglicht.

Ich möchte mich bei meiner Familie bedanken, die mich stets unterstützt hat, vor allem bei meinen Brüdern Michele und Antonio, die in mir das Interesse für die Naturwissenschaften geweckt haben.

Diese Arbeit war nicht nur eine Herausforderung für mich, sondern auch eine Belastungsprobe für meine Familie, der ich an dieser Stelle meinen ganz besonderen Dank ausspreche. Meine Frau Nicole hat nicht nur unser häusliches Leben oft allein gemeistert, sondern mir auch mit Rat und Tat immer hilfreich zur Seite gestanden.

**Abkürzungen**

Abb.	Abbildung
abBFT-Vtg	Antiserum gegen das Vitellogenin vom Roten Thun
17,20 $\beta$ -P	17,20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one
ABC	avidin-biotin-complex
BFT	Bluefin Tuna (englische Bezeichnung für den Roten Thun)
BSA	bovine serum albumin
[C]	Konzentration
CMO	Carboxymethoxylamine
CV	Varianzkoeffizient
DCM	Dichloromethan
DDT	Dichlorodiphenyltrichloroethan
df	Freiheitsgrade
E <sub>405 nm</sub>	Extinktion bei 405 nm
E <sub>280 nm</sub>	Extinktion bei 405 nm
E <sub>2</sub>	17 $\beta$ -Estradiol
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
F <sub>crit</sub>	kritischer F-Wert
F <sub>obs</sub>	beobachteter F-Wert
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography
GnRH	Gonadoliberin (gonadotropin releasing hormone)
GtH	Gonadotropin
M <sub>R</sub>	relatives Molekulargewicht
N oder n	Anzahl der Einzelmessungen
11-KT	11-Ketotestosteron
P	Irrtumswahrscheinlichkeit
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PAP	Peroxidase-anti Peroxidase
PMSF	Phenylmethylsulfonyl Fluoride
PPB	Potassium Phosphat Buffer
PPBS	Potassium Phosphat Buffer Saline
r	Korrelationskoeffizient
RIA	radioimmunoassay
RT	Raumtemperatur
$\pm$ S.E.	Standardabweichung der Mittelwerte
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SL	Standardlänge
T	Testosteron
TCL	Thin Chromatography Layer
V <sub>0</sub>	Ausschlussvolumen
V <sub>t</sub>	Gesamtvolumen

## 1. Einleitung

Bei Aristoteles findet man die frühesten wissenschaftlichen Aufzeichnungen zur Biologie des Roten Thun. Wie man schon in den frühen Kulturen des Mittelmeeres wusste, kam es schon immer zu einem großen Aufkommen dieses pelagischen Fisches zwischen April und Juli nahe den Küsten (Abb. 1, Sarà, 1998). Ganze wirtschaftliche Strukturen waren seit den Phöniziern bis in die heutigen Tage von dieser lebendigen Ressource abhängig. Bei den Phöniziern war der Fang des Roten Thun so wichtig, dass die Kontrolle des Reiches von der Beherrschung der Küstengebiete abhing, wo der Thun mit Hilfe von stationären Netzen gefangen werden konnte. Mit der Kontrolle dieser Gebiete verbreitete sich die phönizische Kultur über ganz Südeuropa und Nordafrika. Mit dem Fang des Thunfisches in bestimmte Küstengebiete ging eine frühe „industrialisierte“ Konservierung des hochwertigen Thunfischfleisches einher. Das Fleisch konnte nicht momentan verbraucht werden und wurde durch Trocknen und Salzen haltbar gemacht. Viele Menschen arbeiteten in diesen großen „Thunfischfabriken“ und Salinen wurden in der Nähe angelegt um Salz zu gewinnen. Das konservierte Fleisch der Thunfische, eine wichtige wirtschaftliche Handelsware (wie noch heute), wurde mit Schiffen und über Land in entfernte Gebiete geschafft. Den Seefahrern diente es auf ihre langen Fahrten als Proviant (Sarà, 1998). Durch das Aufkommen des saisonalen Thunfischfanges an den Küsten, wurden Arbeitskräfte gebraucht. Dadurch kam es zu der frühen Vermischung der Bauern, die im Frühling rekrutiert wurden, und den Fischern in den italienischen Küstengebieten (Rubino, 1994).

Das hochwertige Fleisch des Thunfisches wurde früher, wie erwähnt, durch Trocknen und Salzen haltbar gemacht. Man ging dann aber wegen des besseren Geschmacks dazu über, es in Öl zu konservieren aus denen die berühmten Thunfischdosen hervorgegangen sind.

Der Rote Thun im Atlantischen Ozean und im Mittelmeer gehört zu den wichtigsten Fischerei-Ressourcen dieser Region. Der Thunfisch wird mit „Purse Seiner“ (Rundnetzen), Stellnetzen und Langleinen gefangen (Susca, 1996). Im Mittelmeer und vor Gibraltar werden zusätzlich spezielle große Reusen die sog. „Tonnara“ (italienisch) oder „Almandraga“ (spanisch) eingesetzt, die auf die oben genannte, traditionelle Fangmethode zurück geht und seit altersher die wichtigste Methode für den Thunfischfang war (Abb. 2). Heute wird nur noch wenig auf diese Art gefangen, jedoch erzielt dieser Thunfisch die höchsten Marktpreise. Diese traditionelle Fangmethode wird heute noch in Kroatien, Italien, Spanien, Marokko, Algerien und Tunesien praktiziert, wobei die ergiebigsten und modernsten in Spanien zu finden sind. Dort, wie auch in einigen anderen Ländern, ist man dazu übergegangen, Thunfische in speziellen Käfigen das ganze Jahr gefangen zu halten. Sie werden gefüttert und kontrolliert geschlachtet (sog. „growing-up“). Von dem Thunfisch kann alles verwertet werden. In den Gebieten wo noch die traditionelle Fangmethode zuhause ist gibt es meist eine reiche kulinarische Thunfischkultur. Vom „Hodenfrikadellen“, der sog. Botarga (auf spezielle Art getrockneter Roggen, in Italien zu kaufen für 200 DM das Kilo!) zu gegrillter Kopfmuskulatur bis zur „Thunfisch-Trippa“ (Magen und Darm), oder getrocknetem Herzen. Reste werden zu Fischmehl verarbeitet.

Die intensive Nachfrage nach Rotem Thun (speziell aus Japan) und der Einsatz modernster Fangmethoden, haben dazu geführt, dass der Bestand stark gefährdet ist (Sissenwine *et al.*, 1998). Um eine Kontrolle der Thunfischfischerei bemüht sich die ICCAT (International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas). Jedes Mitgliedland erhält nach Beurteilung aller Fangdaten eine Empfehlung für die Fangquoten. Es ist klar, dass eine richtige Statistik und damit Quotenberechnung, auf die Richtigkeit der tatsächlichen Angaben über die Fänge basiert. Doch die Angaben der Fischereiindustrie können nicht nachgeprüft werden, da sie sehr komplex und durch eigene Interessen beeinflusst sind. Viel wäre gewonnen, wenn der Thunfischmarkt unabhängig kontrolliert werden könnte, um legislative Maßnahmen zu fundieren.

Der so genannte Rote Thun mit dem taxonomischen Namen *Thunnus thynnus* L., wird im Englischen, wegen den blau schimmernden Flossen, bluefin tuna (abgekürzt BFT) genannt. Er kommt im Atlantik zwischen den Breitengraden 60° N und 40° S einschließlich dem Mittelmeer vor. Im Pazifik existiert eine Unterart. Man nimmt an, dass der Atlantische Thun zwei getrennte Populationen bildet, den west- und ostatlantischen Roten Thun (Block *et al.*, 2000). Diese Thunfische erreichen auf der westatlantischen Seite Längen von bis zu 458 cm und ein Gewicht von 750 kg (Block *et al.*, 1998). Sie sind Jäger, die am Ende der Nahrungskette stehen und haben als adulte Tiere kaum Feinde zu fürchten.

Der Rote Thun ist ein pelagisch lebender Knochenfisch (Teleosteer) und gehört zur Familie der Scombroiden (Makrelenartige). Neben dem Roten Thun gibt es noch 7 kleinere Thunfische, die mehr oder minder als Speisefische sehr geschätzt werden. Die optimale Stromlinienform des Roten Thun erlaubt ihnen große Strecken (bis 200 km am Tag) mit minimaler Anstrengung zurückzulegen. Sie erreichen Spitzengeschwindigkeiten von bis zu 80 km/h (Sarà, 1998) und sind stets in Bewegung. Aufgrund ihrer großen schwimmerischen Aktivität sind die Muskeln stark ausgebildet (weswegen er auch als Speisefisch so stark geschätzt wird) und ihre Körpertemperatur ist immer mindestens 8° C über der umgebenden Wassertemperatur. Buttler (1978 & 1982) hat eine Körpertemperatur von 30° C in 8 bis 9° C Wassertemperatur gemessen. Im Gegensatz zu den meisten anderen Fischen ist ihr Fleisch rot (deswegen auch die Bezeichnung Roter Thun). Dies lässt sich auf eine starke Durchblutung zurückführen, welche für die hohe Muskelaktivität von großer Bedeutung ist. Die vielen Arterien und Venen, das sogenannte Wundernetz (Rete mirabile) im Körperkern, wirkt als Gegenstromwärmeaustauscher. Die Blutgefäße, die die roten Muskeln versorgen, verlaufen an der Seite, direkt unter der Haut. Von diesen gehen Hauptgefäße ab, die eine Art Scheibe bilden, in der die Arterien dicht zwischen entgegengesetzt verlaufenden Venen gestreut sind. Kaltes Blut, das in die innere Muskulatur fließt, nimmt die methabolisch erzeugte Wärme von dem Blut, das zur Haut und in die Kiemen fließt auf und konserviert sie im Körperkern (Schmidt-Nielsen, 1999). Der Rote Thun durchstreift die Meere in Schulen, die sich grob durch Größeklassen determinieren.

Zwischen dem west- und dem ostatlantischem Roten Thun scheint es kaum zu einem Vermischen der Populationen zu kommen. Obwohl es zurzeit zu dieser Frage viele Untersuchungen gibt, mittels Genetik (Graves *et al.*, 1995), Markierungsversuchen (Block *et al.*, 1998) und der Statistik (Nemerson *et al.*, 2000) ist diese These noch nicht ganz bewiesen. Wie sich aus den Markierungsversuchen mittels satellitübertragener Daten zeigt, scheint eine getrennte westatlantische Population zu existieren (Block *et al.*, 2000). Mittels der gleichen Technik sind Anzeichen gefunden worden für eine getrennte, ostatlantische Population (De Metrio *et al.*, 2000). Die Populationen scheinen getrennt zu laichen, die westatlantischen Roten Thunfische laichen im April bis Juni im warmen Golf von Mexiko und vor Florida (Baglin, 1982), die ostatlantischen in den Monaten Juni und Juli im warmen Wasser des Mittelmeeres (Rodríguez-Roda, 1964 & 1967). Zurzeit laufen Untersuchungen zu einem eventuellen dritten Laichgebiet mitten im Atlantik, als Vermischungszone beider Populationen (Lutcavage *et al.*, 1999).

Aus dem Atlantik wandern im März Thunfische in Schulen durch die Meerenge von Gibraltar ins Mittelmeer (gonodrome Wanderung). Dort befinden sich die Laichgründe, wobei die Thunfische viel an Gewicht verlieren, bedingt durch den reproduktiven Stress. Im Juli und im August wandern die Thunfische wieder in den Atlantik, um in den nährstoffreicheren Meeren an Gewicht zuzunehmen (throfische Wanderung). Es gibt aber Anzeichen, dass es im Mittelmeer eine endemische Population gibt, die nicht in den Atlantik wandert. Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden atlantischen Populationen scheint in der Größe der Fische der ersten sexuellen Reife zu liegen. Während Rodríguez-Roda, (1964 & 1967) eine minimale Standardlänge von 115 cm bei Weibchen und 100 cm bei Männchen für den

ostatlantischen Roten Thun angibt, berichtet Baglin (1982) von einer allgemeinen minimalen Länge von 170 cm. Als Standardlängen wird die Länge von der Maulspitze bis zum Schwanzflossenansatz bezeichnet.

Die Gebiete im Mittelmeer, mit der höchsten Konzentration an Larven, sind das Thyrrenische Meer und die Balearische See (Piccinetti *et al.*, 1977; Dicenta, 1977, 1983; Dicenta & Piccinetti, 1977; Dicenta *et al.*, 1975) (Abb. 1.1.). Auch im Ägäischen Meer und im Schwarzen Meer soll es Laichgebiete geben, was aber bis heute noch nicht bewiesen wurde. Das Laichen findet bei einer Wassertemperatur von 18 bis 25° C statt (Sarà, 1998).

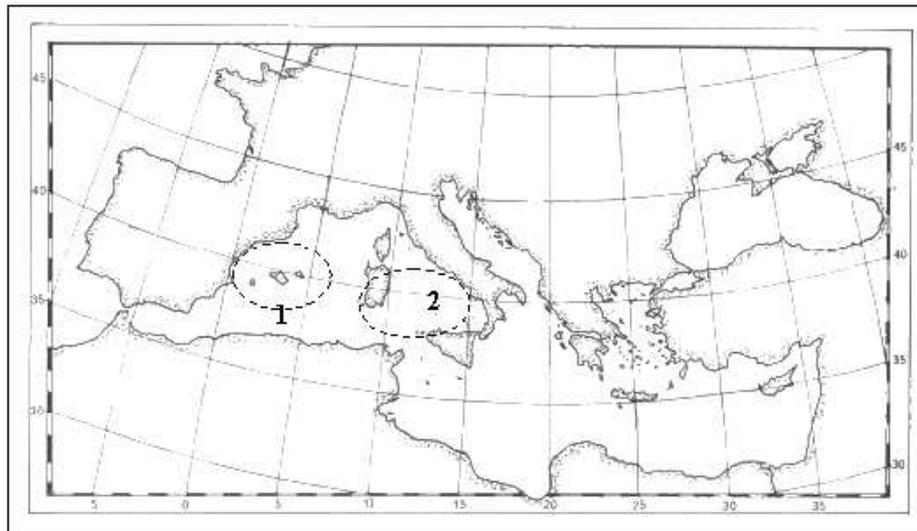


Abb. 1: Mittelmeer. Die umkreisten Gebiete geben die Areale wieder mit höchstem Larvenvorkommen (1 Balearen, 2 Thyrrenisches Meer), wo sich der Rote Thun fortpflanzt. Im Mai und Juni kommt es zum massiven Erscheinen von Thunfisch-Schulen im zentralen und westlichen Mittelmeer.

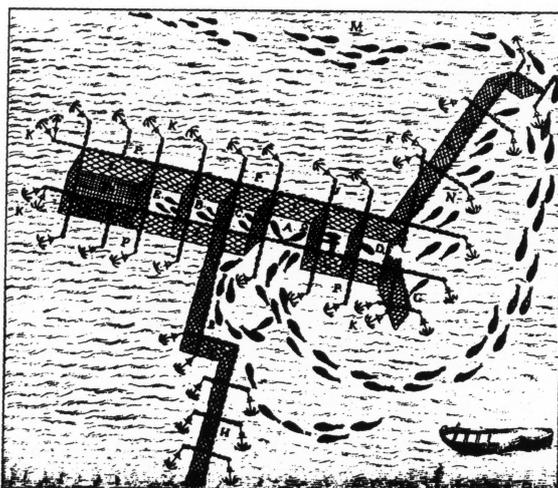


Abb. 2: Historische Abbildung eines Stellnetzes („Tonnara“) für den Thunfischfang in Küstennähe aus dem Jahre 1700. Aus Sarà, 1998. Die Thunfische schwimmen mit der Strömung in ein Kammersystem und gelangen in die letzte Kammer (sog. „Todeskammer“), die geschlossen wird. Diese Kammer kann verkleinert werden, damit die Thunfische gefangen werden können.

Wie sich aus dieser kurzen Erläuterung deuten lässt war der Rote Thun von jeher von großer wirtschaftlicher Bedeutung und ausschlaggebend für die Kulturgeschichte im Mittelmeer. Trotzdem ist die Kenntnis der Reproduktionsbiologie dieser Art beschränkt auf Untersuchungen, basierend auf die Verteilung der Eier und Larven (Piccinetti *et al.*, 1977, 1997; Cavallaro *et al.*, 1997; Nishida *et al.*, 1997), saisonale Veränderung im Gonadosomatischen Index, das ist das prozentuale Verhältnis des Gonadengewichtes am Gesamtgewicht des Tieres (de la Serna & Alot, 1992), und makroskopische Klassifizierung der verschiedenen Reifestadien der Gonaden (Rodríguez-Roda, 1964, 1967). Lediglich über den westatlantischen Roten Thun gibt es genauere histologische Untersuchung der Gonaden (Baglin, 1982). Es existiert nur eine vollständig dokumentierte Untersuchung zur Reproduktionsbiologie auf histologischer Basis der Gonaden bei einer verwandten Art, dem *Thunnus albacares* (Gelbflossenthunfisch, eng. Yellowfin Tuna) (Schaefer, 1998).

Es liegen keine Kenntnisse über den Zusammenhang der Lebensweise der Roten Thunfische und deren gonadosomatischen Wachstums vor. In den letzten Jahren gab die der IC-CAT eine Empfehlung heraus, unter anderem neue Erkenntnisse über die Reproduktionsbiologie auf endokrinologischer Basis zu sammeln und diese für die Möglichkeit der Bestimmung des reproduktiven Status zu verwenden. Dabei sollte untersucht werden, ob die Möglichkeit besteht, diese Untersuchung mit der Analyse von einer Muskelprobe durchzuführen. Für eine groß angelegte Kontrolle des Thunfischmarktes könnte nur Muskelfleisch als Probe dienen, Plasma oder Gonaden (welche natürlich für diese Art von Untersuchungen am besten geeignet sind) sind schwer zu beschaffen und deren Handhabung nicht einfach. Ausgehend von dieser Empfehlung, ist die hier vorliegende Arbeit entstanden. Sie war Teil eines von der Europäischen Union geförderten, wissenschaftlichen Projektes zur Fischerei und Reproduktionsbiologie des Roten Thun (Major improvement in our knowledge of eastern Atlantic bluefin tuna in the Mediterranean, Projekt BFTMED 97/029).

Die Reproduktion bei Teleostern ist von verschiedenen endokrinen Prozessen bestimmt, die unter hormoneller Kontrolle stehen (Abb. 3). Der Hypothalamus sekretiert auf einen endogenen und/oder exogenen Reiz hin Gonadoliberin (GnRH, vom Englischen Gonadotropin Releasing Hormone), das in dem Adenohypophyse die Freisetzung von Gonadotropinen (GtH) bewirkt. Diese leiten die Gonadogenese, also Wachstum und Reifung der Reproduktionsorgane ein (Redding & Patino, 1993; Jobling, 1995; Heath 1995). Die Oogenese (die Bildung der Eizellen) in den Ovarien ist durch drei Phasen gekennzeichnet: 1. Vermehrungsphase, 2. Wachstumsphase und 3. Reifungsphase. Während der 1. Phase teilen sich die Oogonien mitotisch (Zwischenlaichzeit, Perinucleus-Phase). Sobald die Oogonien von einem Follikel epithel umgeben sind hört die Teilung auf. Während der 2. Phase wächst die Oogonie und differenziert sich zur Oocyte. Dieses Wachstum, das auf die Einlagerung von Dotter zurückzuführen ist, ist von den drei Phasen die Längste. Es werden verschiedene Dottervesikel eingelagert, wobei Lipidvesikel früher und Proteinvesikel (in die 3. Phase hinein) später eingelagert werden. Während der 3. Phase macht die Oocyte die Meiose durch, damit ist das reife Ei bereit zur Befruchtung (Vorlaichzeit). Nach außen wird die Eizelle durch das Oolemma und Follikel epithel abgeschlossen. Das Oolemma besteht aus einer sehr dünnen Biomembran und der Eihülle, die auch als Zona radiata bezeichnet wird. Sie bleibt nach der Ovulation erhalten (Riel, 1995). Das Follikel epithel der Oocyten besteht aus zwei Schichten der inneren Tunica granulosa („Granulosa“) und der äußeren Theca folliculi („Theca“). Erstere ist ein Epithel, das bei Teleostern immer einschichtig ist, Letztere besteht aus Fibrinocyten, Fibrinoblasten, kollagenen Bindegewebsfasern, Blutkapillaren und speziellen Thecazellen. Die Granulosa und die Theca sind endokrine Komponente des Fischovariums (Blüm, 1995).

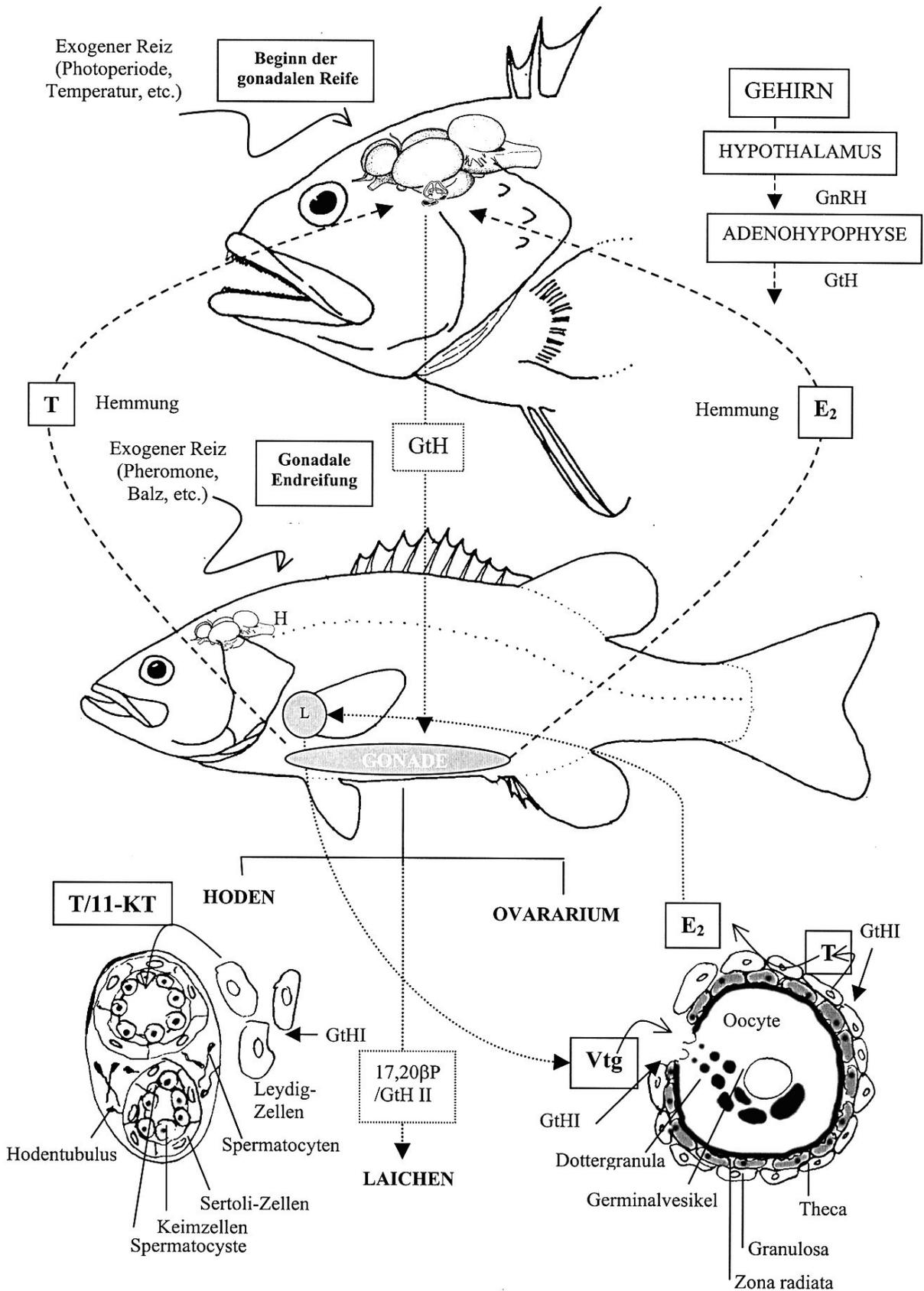


Abb. 3: Schematische Darstellung des für die Fortpflanzung wichtigsten endokrinen Systems bei Fischen. H Gehirn und L Leber. Genaue Erläuterung siehe Text. In den durchgehend eingerahmten Kästchen sind die für die vorliegende Untersuchung wichtige Schlüsselsubstanzen gekennzeichnet.

Die meisten Fischeier sind sphärisch geformt und zentral befindet sich ein großer Kern mit einer Reihe von Kernkörperchen (Nucleoli) und Chromosomen. Umgeben wird der Kern von Cytoplasma, in dem große Mengen von Dotter eingelagert werden, der für die spätere Ernährung des Embryos benötigt wird. An der Peripherie der Oocyten treten die Rindenvakuolen auf. Nach der Besamung sind sie auch beteiligt an der Bildung eines Raumes zwischen Dotter und Eihülle.

In den Hoden vollzieht sich die Spermatogenese in den Hodentubuli oder Hodenampullen (Cysten). Diese sind von Sertoli-Zellen umgeben. Als endokrine Bestandteile der Hoden fungieren die Sertoli-Zellen und Leydig-Zellen. Die Spermatogonien entwickeln sich in der Vorlaichzeit zu den Spermatocyten. Durch meiotische Teilung entstehen aus diese Spermatiden. Am Ende der Vorlaichzeit haben sich diese zu Spermatozoen umgewandelt. Sie gelangen dann über Samentubuli in den Samenleiter, wo sie noch eine letzte Reifung durchmachen und gelagert werden bis zum Laichen (Patzner & Lahnsteiner, 1995). Die hormonbildenden Zellen des Hodens, die Leydig-Zellen, liegen zwischen den Tubuli oder Ampullen im interstitiellen Gewebe, das außer diesen noch Fibrinoblasten, kollagene Bindegewebefasern, Blutkapillaren und Nerven enthält (Blüm, 1995).

GtH stimuliert in der Theca der Ovarien die Produktion des Steroidhormons Testosteron (T), welches in der Granulosa zu  $17\beta$ -Estradiol ( $E_2$ ) enzymatisch aromatisiert wird (Nagahama, 1994).  $E_2$  gelangt mit dem Blutstrom in die Leber und regt die Produktion von einem energiereichen Protein, dem Vitellogenin (Vtg), an. Damit ist die Vitellogenese in den weiblichen Fischen eingeleitet (Ng & Idler, 1983; Kwon *et al.*, 1993; Sumpster, 1995). Durch den Beginn der Vitellogenese nimmt die Leber an Masse zu, der Hepatosomatische Index (prozentuales Verhältnis des Lebergewichtes am Gesamtgewicht des Tieres) steigt (Kime, 1998). Das Vtg bei Teleostern ist ein Glycophosphorlipoprotein mit einem relativen Molekulargewicht, der zwischen 300 und 550 kDa liegt (Roubal, 1997). Es ist ein Dimer, welches in zwei fast gleichgroße Untereinheiten, dem Lipovitellin und dem Phosvitin. Die letztere Untereinheit zerfällt in weitere Untereinheiten, von denen die sogenannte  $\beta$ -Komponente kein Phosphor und keine Lipide mehr besitzt (Hiramatsu, 1996). Über das Blut gelangt Vtg zu den Oocyten, wo es über einem Rezeptor ins Zytoplasma aufgenommen wird. Dies wird durch ein Gonadotropin (GtH I) verstärkt. Im Zytoplasma wird das Vtg enzymatisch abgebaut und bildet ein Teil des Dotters. Der Gonadosomatische Index nimmt stetig zu. Mit der fortschreitenden Vitellogenese kommt es zur Ausschüttung von GtH II, eines zusätzlichen Gonadotropins ins Plasma, das zu einem Abfall des  $E_2$  Plasmalevels führt. Dadurch kommt es zur Steigerung an T. Diese Phase ist dadurch gekennzeichnet, dass in der Oocyte die germinalen Vesikel zur Zellmembran migrieren. Zusätzlich kommt es auch zu einer dramatischen Erhöhung der Konzentration an Maturationalhormone, welche für die Endreifung der Oocyten verantwortlich sind (Nagahama, 1994; Nagahama *et al.*, 1994; Peter & Yu, 1997). Die häufigsten Maturation induzierende Steroide sind  $17,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one ( $17,20\beta$ -P) und  $17,20\beta,21$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one ( $17,20\beta,21$ -P). Es ist auch gezeigt worden, dass GtH II und der Insulin ähnliche Wachstumsfaktor I (IGF-I) die Endmaturation mit beeinflussen (Kime, 1998). In den Hoden stimuliert GtH die Leydig-Zellen zur Biosynthese und Ausschüttung von T und 11-Ketotestosteron (11-KT). Diese gelangen mit dem Blut in den Körper und wirkt dort fördernd auf die Proteinbiosynthese und auf das männliche Sexualverhalten, wie ebenfalls T und  $E_2$  bei den Weibchen. In den Hoden selbst wirkt T und 11-KT synergistisch mit GtH fördernd auf die Spermatogenese. Die Endreifung wird auch bei den Männchen durch die erwähnten Maturationalhormone eingeleitet (Blüm, 1995). Auch bei den Männchen steigt der Gonadosomatische Index dramatisch an.

Das Laichen, also die Abgabe der Eier und der Spermien, wird durch exogene Reize, wie zum Beispiel Pheromonen oder Verhalten bestimmt und koordiniert. Bei den Thunfischen vollzieht sich das Laichen in einer Art Reigentanz im offenen Meer: Eine Schule von meh-

renen hunderter Fischen fängt an schnell im Kreis zu schwimmen, indem sie einen Zylinder bilden. Dann bricht aus der unteren Hälfte des Zylinders ein Weibchen aus und schwimmt sehr schnell zum Zentrum des Zylinders nach oben während es mehrere Tausende Eier abgibt. Die Weibchen werden bei dieser Aktion von einen oder mehreren Männchen gefolgt, die beim Hochschwimmen auch ihr Sperma entlassen. Durch das Kreisen der anderen Thunfische um genau einer Achse, hat sich im Zentrum, also dort wo es zum Ablachen kommt, ein kräftiger Wirbel gebildet, das die Eier und das Sperma heftig mischt. Hier kommt es zur Befruchtung. Dies wiederholt sich mehrere Male (Sarà, 1998).

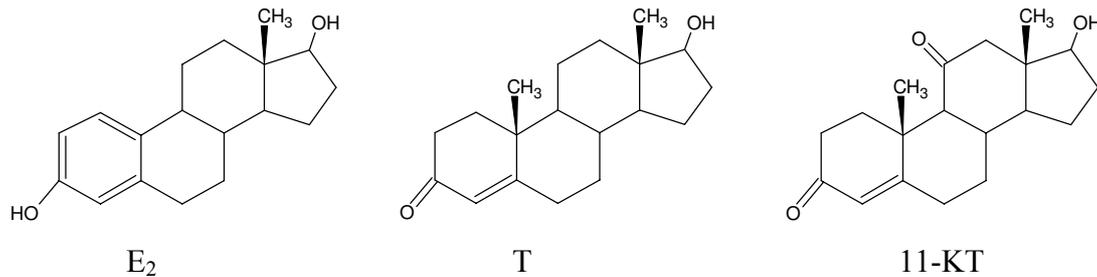


Abb. 4: Für die Reproduktion der Fische wichtigste Sexsteroid: (E<sub>2</sub>) 17β-Estradiol (1,3,5(10)-Estratrien-3,17β-diol), (T) Testosteron (4-Androsten-17β-ol-3-one) und (11-KT) 11-Ketotestosteron (4-Androsten-17β-ol-3,11-dione).

Nach dem Laichen sinken die Plasmakonzentrationen der Sexsteroiden und Vtg auf Minimalwerte. Auch der Gonadosomatische und Hepatosomatische Index sinkt stetig.

Der reproduktive Zyklus bei Teleostern ist stets durch makroskopische Untersuchungen der Gonaden beschrieben worden, wie es bisher auch für den Roten Thun zutrifft. In den letzten Jahren ist die Reproduktionsbiologie jedoch durch die Analyse des Plasmalevels von Vtg und den Sexsteroidhormonen E<sub>2</sub>, T und 11-KT bei vielen Arten studiert worden (Ng & Idler, 1983; Kwon *et al.*, 1993; Cuisset, *et al.* 1994; Sumpter, 1995; Nash *et al.* 2000), da es genauere Ergebnisse lieferte. Wie oben erläutert, korreliert mit einem steigenden Vtg Level im Plasma auch die Zunahme an T und E<sub>2</sub> bei den Weibchen. Bei den Männchen kommt es zu einer Erhöhung von T und 11-KT Level im Plasma. Nach der reproduktiven Phase sinken die Levels auf Minimalkonzentrationen (Tyler *et al.*, 1988; Kime, 1993; Reis-Henriques *et al.*, 2000). Diese Sexsteroiden sind sensitiv in Immuno-Assays im Plasma detektiert worden.

Die Vtg Plasmakonzentration bei verschiedenen Teleostern ist mit Radio Immuno Assay (RIA) (So *et al.*, 1985; Copeland *et al.*, 1986; Benfey *et al.*, 1989) oder mit Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) bestimmt worden (Bon *et al.*, 1997; Mosconi *et al.*, 1998; Heppell & Sullivan, 1999b). Die Sensitivität beider Methoden ist ähnlich, jedoch ist der RIA, wegen der Benutzung von radioaktiven Isotopen, umständlicher. Für die Entwicklung eines Immuno-Assays für Vtg, ist die Reinigung des artspezifischen Vtg Bedingung. Bei verschiedenen Teleostern, die in Gefangenschaft gehalten werden (wie bei den meisten Aquakulturfische oder schlechthin Aquariumsfische), ist die Reinigung von Vtg beschrieben worden, wobei die Vitellogenese durch Behandlung mit E<sub>2</sub> induziert wurde, um große Mengen des Proteins zu gewinnen (Mañanos *et al.*, 1994a; Bon *et al.*, 1997; Mosconi *et al.*, 1998). Bei wildlebenden Fischen ist bisher keine Arbeit bekannt, in welcher Vtg gereinigt wurde. Vermutlich liegt der Grund bei der schwierigen Gewinnung von Vtg-reichem Plasma und der schwierigen Feldbedingungen. Auch Beschreibungen des reproduktiven Zyklus durch die Charakterisierung des Vtg und Sexsteroidprofils im Habitat sind nicht gemacht worden. In der vorliegenden Arbeit ist die erstmalige Reinigung von Vtg bei ei-

nem wildlebenden Teleosteer beschrieben, wobei viel Aufmerksamkeit auf einer erfolgreichen Probensammlung gerichtet wurde.

Die vorliegende Dissertation, ist eine erstmalige Beschreibung der Reproduktionsbiologie des ostatlantischen Roten Thunfisches, basierend auf endokrinologische Untersuchungen. Folgende Ziele liegen dieser Untersuchung zugrunde:

- Entwicklung und Etablierung eines spezifischen Vitellogenin ELISA.
- Partielle Charakterisierung der reproduktiven Physiologie.
- Die Beschreibung des saisonalen reproduktiven Zyklus im Mittelmeer.
- Charakterisierung endokriner sexspezifischer Unterschiede.
- Korrelation der Messung von Sexsteroiden und Vtg im Plasma mit denen im Gewebe.
- Determinierung des Geschlechts und reproduktiven Status durch einen Immuno-Assay mit Plasma und Gewebe.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Tierbeschaffung und Probennahme

Das gesamte biologische Material wurde vor Ort gesammelt, also dort wo es zum Fang des Roten Thuns durch die örtliche Fischerei kam. Nachdem ein Protokoll zum Sammeln und Behandeln der Proben zusammengestellt wurde (Anhang 1), konnte es im Ionischen Meer, in Sardinien und im Golf von Cadiz verbessert und den verschiedenen Bedingungen angepasst werden. Viele Proben wurden von dem Verfasser dieser Arbeit nicht selbst genommen, da gleichzeitig und über eine längere Periode, an verschiedenen Orten gesammelt wurde. Die Proben wurden innerhalb des erwähnten Projektes von folgenden Organisationen für diese Arbeit zur Verfügung gestellt:

- Marine Biology Department, Universität von Athen (Griechenland)  
→ Östliches Mittelmeer
- Dipartimento di Sanità e Benessere Animale, Universität von Bari (Italien)  
→ Zentrales Mittelmeer
- Istituto di Biologia, Universität von Genua (Italien)  
→ Zentrales Mittelmeer
- Instituto Espanol de Oceanografia (IEO), Malaga (Spanien)  
→ Westliches Mittelmeer

Direkt nach dem Fang der Thunfische wurde die Standardlänge gemessen und das Geschlecht durch makroskopische Untersuchung der Gonaden (wenn möglich) festgestellt. Das Blut wurde direkt aus dem Herzen mit Spritze und Nadel entnommen. Bei Fischen, die bei der „Tonnara“ während der „Mattanza“ (Abb. 5) gefangen wurden und noch bei der Probennahme lebten, wurde das Blut direkt in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt. Die Mattanza ist der Akt des Hochhiebens der Fische an Bord (wörtlich vom Italienischen übersetzt: „Wahn“). Die starke Blutung wurde durch einen lateralen Messerstich in Höhe der Brustflosse, der von den Fischern vorgenommen wurde, um die Tiere schnell ausbluten zu lassen, verursacht. Spritzen, Nadeln und Zentrifugenröhrchen wurden zuvor mit einer Lösung von 200 mM NaCl, 8,6 KCl, 8000 I.U. ml<sup>-1</sup> Natriumheparin und 1 mM Phenylmethylsulphonylfluorid (PMSF, Sigma) pH 7,3 gespült. Das Blut wurde bis zur Zentrifugation bei 5000 x g für 15 min auf Eis gehalten (in der Regel weniger als 4 h). Das Plasma wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen und in einem Eppendorf- oder NUNC-Röhrchen bei -20°C eingefroren.

Ein bis zwei Gramm Muskelgewebe wurden entweder vom Schwanzabschnitt oder vom Nacken entnommen, sobald die Fischer die Thunfische nach dem Fang zu verarbeiten begannen (Tonnara) oder von der Bauchseite (Langleine und Driftnetze). Zusätzlich wurde eine Probe (ca. 1 cm) Gonade entnommen und mit der Muskelprobe auf Eis gelagert. An Land wurde das Muskelgewebe bei -20°C eingefroren. Die Gonadenproben wurden entweder in gepuffertem Formalin oder in Lösung von Bouin fixiert.

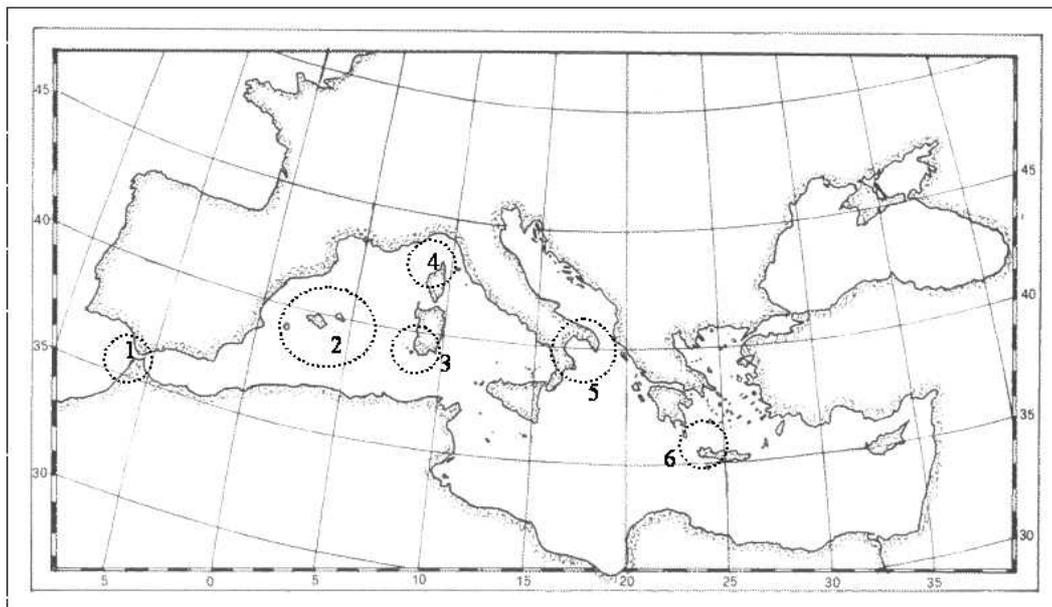
Es wurden Proben von Jungfischen (Juvenile) und geschlechtreifen Fischen (Adulte) genommen. Als adulte Fische wurden nach Rodríguez-Roda (1967) Tiere mit einer Standardlänge über 120 cm angesehen.

### 2.1.1. Orte und Zeit der Probennahme

Abbildung 5c zeigt die Orte der Probennahme und das Areal, wo die Fische gefangen wurden. In der südlichen Adria, im Ionischen Meer (Golf von Tarent), in der Ägäis, im Golf von Genua und den Balearen wurden die Fische mit Langleine und Driftnetz gefangen. Im zentralen Mittelmeer (Tyrrehnisches Meer im Süden von Sardinien, Carloforte) und im Golf von Cadiz (Barbate) wurden die Fische in der Tonnara gefangen.



**Abb. 5:** Szenen aus der „Mattanza“ in einer Tonnara. (a) Die sogenannte Todeskammer wird zugezogen, um die Thunfische an Bord zu hieven. (b) Direkt an Bord werden die Thunfische lebendig ausgeblutet, was Gelegenheit zur frischen Blutentnahme gab.



**Abb. 5c:** Orte der Probennahmen im Mittelmeer. (1) Golf von Cadiz, (2) Balearische Inseln /Südfrankreich, (3) Sardinien, (4) Golf von Genua, (5) Süd Adria und Golf von Tarent und (6) Ägäis. Aus dem Golf von Cadiz (1) und Sardinien (3) stammen die Proben, die in der Tonnara (5a & b) genommen wurden.

Es sollte westliches, zentrales und östliches Mittelmeer abgedeckt werden. Um die saisonale Veränderung der geschlechtlichen Reife (saisonaler Zyklus) zu untersuchen, wurde vom ersten Erscheinen des Roten Thun im Mittelmeer im März gesammelt bis September, wenn kaum noch große Exemplare gefunden wurden. Dies entsprach Beginn und Ende der Roten Thunfisch Fangsaison. Die Proben wurden von März 1998 bis September 2001 gesammelt.

### **2.1.2. Behandlung und Transport der Proben**

Die Plasmaproben und die Muskelproben wurden zunächst bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren und in Trockeneis mit dem Flugzeug nach Düsseldorf transportiert. Dort wurden die Proben bis zur Analyse bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die fixierten Gonadenproben wurden in einer Kühlbox (ca.  $15^{\circ}\text{C}$ ) nach Bari transportiert und dort direkt weiterverarbeitet.

## **2.2. Histologische Untersuchung der Gonaden**

Die fixierten Gonadenproben wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert (je 10 min in 50%, 70%, 80%, 95% und 100% Ethanol) und in Paraffin eingebettet. 5  $\mu\text{m}$  dicke Sektionen wurden an einem Mikrotom geschnitten und auf Objektträgern aufgetragen. Die histologische Klassifizierung des Reifezustandes der Gonaden wurde in Zusammenarbeit mit Prof. G. De Metrio und Dr. A. Corriero von der oben genannten Organisation vorgenommen. Weitere Sektionen wurden in Düsseldorf immunohistochemisch analysiert.

### **2.2.1. Histochemische Färbung**

Die Sektionen wurden in Hämatoxylin-Eosin und /oder in Trichrom nach Mallory gefärbt. Vor der Färbung wurden die Sektionen zwei Mal 5 min in Xylol (Fluka) entparaffiniert und in absteigender Alkoholreihe rehydriert. Nach der Inkubation mit dem Farbstoff wurden die Sektionen wieder dehydriert und eingebettet.

### **2.2.2. Immunohistochemische Untersuchungen**

Immunohistochemische Untersuchungen wurden an Ovarsektionen durchgeführt, wobei versucht wurde Vtg-ähnliche Proteine zu detektieren, um die Vitellogenese zu analysieren. Vtg-ähnliche Proteine in den Sektionen wurden nach Susca *et al.* (2001) mit der Avid-Biotin-Perxidase-Technik (Hsu *et al.*, 1981) detektiert. Um eine differenziertere Untersuchung machen zu können, wurde zusätzlich die PAP-Methode (Peroxidase-Antiperoxidase-Methode) angewendet. Die Sektionen wurden hierzu entparaffiniert und in absteigender Alkoholreihe rehydriert. Um die endogene Peroxidaseaktivität zu inhibieren, wurde mit 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  5 min inkubiert und anschließend 20 min in normalem Schweineserum (Dako, Dänemark). Die Inkubation mit dem 1. Antikörper gegen Vtg vom Roten Thun (abBFT-Vtg) wurde in einer Verdünnung von 1/400 20 min vorgenommen. Danach wurde die Sektion in einer 1/60 verdünnten Lösung von Schweineantikörpern (2. Antikörper) gegen Kaninchenimmunoglobine (Dako, Dänemark) 20 min inkubiert. Die Sektionen wurden anschließend 20 min mit dem PAP-Komplex (Dako, Dänemark) inkubiert. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Sektionen in Phosphatpuffer 10 min gewaschen (der Phosphatpuffer war folgendermaßen zusammengesetzt: 137 mM NaCl, 8 mM  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ , 1,4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  and 6,6 mM KCl pH 7,5, für diesen Puffer wurden im Folgenden die englische Abkürzung PPB, Potassium Phosphat Buffer, verwendet). Als Substrat für die Peroxidase diente 3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB, Dako, Dänemark), welches einen dunkelbraunen, unlöslichen Niederschlag bildet. Die Sektionen wurden kurz mit hochreinem  $\text{H}_2\text{O}$  (destilliertes und entionisiertes  $\text{H}_2\text{O}$  mit Millipore Filter, durchweg im Folgenden benutzt) gespült und entweder direkt eingedeckt oder gegengefärbt. Als Gegenfärbung diente Hämatoxylin (Dako, Dänemark). Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt.

Als Kontrolle der Spezifität der Immunreaktion wurden folgende Analysen durchgeführt: 1) Austausch des 1. Antikörpers mit normalem Schweineserum, 2) Austausch des 1. Antikörpers mit dem entsprechenden Präimmenserum und 3) Adsorption des 1. Antikörpers durch das Antigen (Roter Thun Vtg, BFT-Vtg).

### 2.2.3. Kriterien für die Bestimmung des Reifegrades der Gonaden

Das Reifestadium der Gonaden und deren Klassifizierung wurden am Dipartimento di Sanità e Benessere Animale in Bari von Prof. G. De Metrio und Dr. A. Corriero vorgenommen und zum Vergleich mit den endokrinologischen Daten zur Verfügung gestellt. Alle anderen Untersuchungen, vor allem die Untersuchung der Vitellogenese mit der PAP-Methode wurden vom Autor in Düsseldorf durchgeführt.

In Tabelle 1 sind die Kriterien für die Stadien der Gonadenreife zusammengefasst. Hauptsächlich wurde bei den weiblichen Gonaden (Ovarien) der Reifezustand der Oocyten nach ihren morphologischen Charakteristiken, ihrer Größe und der Affinität zu den Färbelösungen bestimmt. Der Reifezustand der männlichen Gonade wurde auf der Basis der verschiedenen Typen der Spermatozysten und der subjektiven Dichte an Spermatozyten im Hodentubulus und Samenleiter.

Als Basis für die Klassifizierung diente die Arbeit von Matsuyama *et al.* (1988) an *Pagrus major*.

Stadium	Reifezustand	Charakterisierung
1	Unreif oder Ruhephase	Juveniler Fisch oder Unreifer adulter Fisch (Zwischenlaichzeit) mit Oocyten in Prenucleus-Phase
2	Frühe Reife	Weibchen mit Oocyten mit Lipiddotter (Lipid-Phase); Männchen in früher Spermatogenese
3	Vorlaichzeit	Weibchen mit Dotter in Oocyten (Dotter-Phase); Männchen in später Spermatogenese
4	Laichen	Weibchen mit fast reifen oder ganz reifen Oocyten; Männchen mit großen Mengen an Spermatozyten
5	Abgelaicht	Weibchen und Männchen mit abgelaichten Gonaden (Nachlaichzeit)

**Tabelle 1:** Klassifizierungskriterien für die Bestimmung des Reifestadiums der Gonaden nach Prof. G. De Metrio und Dr. A. Corriero (Universität Bari).

### 2.3. Quantitative Bestimmung der Steroidhormone

Die Konzentration des Östrogens 17 $\beta$ -Estradiol (E<sub>2</sub>, 1,3,5(10)-Estratriene-3,17 $\beta$ -diol), und der Androgene Testosteron (T, 4-Androsten-17 $\beta$ -ol-3-one) und 11-Ketotestosteron (11-KT, 4-Androsten-17 $\beta$ -ol-3,11-dione) wurden im Plasma und im Gewebe mittels eines adaptierten Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) nach Cuisset *et al.*, (1994) und Nash *et al.*, (2000) gemessen. Es handelte sich dabei um einen kompetitiven ELISA, wobei das betreffende mit dem Enzym markierte Standardsteroid, das Steroidkonjugat mit dem unmarkierten Steroid (aus der Probe oder Standard) um den spezifischen 1. Antikörper kompetitieren.

### 2.3.1. Antisera und Steroidkonjugate

Das Antiserum gegen die Sexsteroid T und 11-KT wurden freundlicherweise von Dr. D. E. Kime (Fish Lab, University of Sheffield, Sheffield, U.K.) gegeben. Das Antiserum gegen 17 $\beta$ -Estradiol wurde von Prof. Z. Yaron (Department of Zoology, Tel-Aviv University, Tel Aviv, Israel) zur Verfügung gestellt.

Die Steroidkonjugate wurden nach Cuisset *et al.*, (1994) hergestellt. Für die Konjugation wurde von Steroiden ausgegangen, die eine Carboxymethoxylamine (CMO) Gruppe zum Koppeln des Enzyms hatten. E<sub>2</sub>- und T-CMO wurden von Sigma (Deutschland) bezogen, 11-KT-CMO wurde hergestellt, da nicht erhältlich. Für die Herstellung von 11-KT-CMO wurden 1 mg 11-KT, 1,1 mg Carboxymethoxylamine- Hemihydrochlorid (Sigma) und 3 mg Natriumacetat (Grüssing) mit 100  $\mu$ l Methanol gemischt, 40 sec im Ultraschallbad gelöst und bei 4°C über Nacht inkubiert. Es wurde dann 250  $\mu$ l saures, H<sub>2</sub>O hinzugefügt, gut gemischt und 10 min stehengelassen. Das 11-KT-CMO wurde dann mit 3 ml Ethylacetat extrahiert. Zur Überprüfung wurde auf einer TCL Platte (Merck) 10  $\mu$ l der Ethylacetat-Phase und 10  $\mu$ l 11-KT Standard (1 mg ml<sup>-1</sup>) an einem Ende gegeben und eine Chromatographie für 50 min durchgeführt. Als Laufmittel diente 95% Chlorform und 5% Methanol (v/v). Erfolgreich war die CMO-Konjugation wenn es sich bei der Betrachtung unter einer UV Lampe von der Startlinie im Gegensatz zum Standard nicht fortbewegt hatte. Das Ethylacetat wurde anschließend evaporiert. 1 mg des Enzymes Acetylcholinesterase (A-ChE, Sigma) wurde zur Konjugation durch Spaltung mit Trypsin (Sigma) und Entsalzung durch Dialyse (Sigma) in Boratpuffer pH 8 vorbereitet. Zur Aktivierung wurde 75,4  $\mu$ g 11-KT-CMO, E<sub>2</sub>-CMO (Sigma) und 72  $\mu$ g T-CMO (Sigma) je mit 38  $\mu$ l 1 mg ml<sup>-1</sup> N-Hydroxysuccinimid (Sigma) in Dimethylformamid (DMF) und 32  $\mu$ l 2 mg ml<sup>-1</sup> N-N'-Dicyclohexylcarbodiimid (Sigma) in DMF. Nach Inkubation über Nacht bei RT wurde zu 30  $\mu$ l aktiviertem Steroid-CMO 200  $\mu$ l Enzymlösung gegeben, gemischt und 2 h bei RT inkubiert. Zur Reinigung des enzymkonjugierten Steroids wurde das Konjugat über eine Chromatographiesäule mit Biogel A (Biorad) mit 1 cm Durchmesser und 1 m Länge eluiert. Als Elutionspuffer diente 10 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 0,15 mM NaN<sub>3</sub> pH 7,4. Die Flussrate betrug 300  $\mu$ l min<sup>-1</sup> und es wurden 0,5 ml Fraktionen gesammelt. Die Fraktionsröhrchen waren zur Stabilisierung des Konjugats zuvor mit 1 ml salinem 100 mM PPB (PPBS) pH 7,4 mit 0,1% BSA, 1 mM EDTA und 0,15 mM NaN<sub>3</sub> (Steroid-ELISA Puffer) bestückt worden. Zur Auswahl der richtigen Fraktionen wurden 5  $\mu$ l jeder Fraktion zu 200  $\mu$ l 0,5 mM 5,5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoe Säure (DTNB, Sigma), 0,75 mM Acetylthiocholin Iodid (Sigma) in 20 mM PPBS pH 7,4 („Reagenz von Ellman“) in Mikrotiterplatten (Corning-Costa) gegeben und die Absorbtion bei 405 nm an einem Mikrotiterplatten Photometer (Sunrise, TECAN, Österreich) gemessen. Die ausgewählten Fraktionen wurden als fertiges Steroid-AChE-Konjugat vereinigt und für den ELISA eingesetzt.

Die optimale Verdünnung des Antiserums und des Konjugats wurden durch eine Schachbrett titration bestimmt.

### 2.3.2. Steroid ELISA Prozedur

Mikrotiterplatten (High Binding, Corning-Costa) wurden mit 100  $\mu$ l Ziegenimmunoglobine gegen Kaninchenimmunoglobine (Sigma) mit einer Verdünnung von 1/2000 in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 (PPB) über Nacht bei RT inkubiert. Unspezifische Bindingplätze wurden durch Inkubation mit 3% BSA (Bovine Serum Albumine, Sigma) in salinem 100 mM PPB (PPBS) über Nacht gesättigt. Die Platten wurden mit 20 mM PPB pH 7,4 mit 0,05% Tween-20 (Waschpuffer) mit einem automatischen Mikrotiterplatten Washer (Columbus, TECAN, Österreich) gewaschen. Nach dem Waschen der Platten, wurden Proben und Standards eingesetzt. Die aus dem Plasma oder Gewebe extrahierten

Steroide wurden mit Steroid-ELISA Puffer, resuspendiert und in die vorbereiteten Mikrotiterplatten pipettiert (10 bis 50  $\mu\text{l}$ ). Zusätzlich zur Probe wurde eine Standardreihe von 400 bis 0,19  $\text{pg ml}^{-1}$  mitgemessen. Dann wurde je 25  $\mu\text{l}$  des Antiserums und des konjugierten Steroid-Alkalienphosphatase entsprechend dem zu untersuchendem Steroid zugegeben und das Gesamtvolumen in jedem Well wurde mit Steroid-ELISA Puffer auf 150  $\mu\text{l}$  eingestellt. Der Ansatz wurde dann 2 h bei RT inkubiert. Die Platten wurden anschließend 3 Mal mit Waschpuffer gewaschen und mit 200  $\mu\text{l}$  Substratlösung für die Alkalienphosphatase über Nacht bei RT im Dunkeln stehen gelassen. Als Substrat wurde das Reagenz von Ellman verwendet. Zwischen den verschiedenen Schritten wurde die Platten mit einem Film (plate sealers, Corning-Costa) verschlossen, um der Verdunstung entgegen zu wirken. Die Stärke der Farbentwicklung wurde bei 405 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm gemessen an einem Mikrotiterplatte Photometer. Es wurde bis zu einer maximalen Absorption von 1,5 O.D. (optical density) bei maximaler Bindung des Konjugats gewartet. Die Standardkurve und die resultierenden Konzentrationen der Proben wurden mit einer Software für die Auswertung von ELISA berechnet (Magellan, Österreich). Zu jeder Messung wurde die maximale Bindung (Steroidkonjugat und 1. Antikörper aber kein Probe), einen Leerwert (Steroidkonjugat aber kein 1. Antikörper und keine Probe) und eine Kontrolle (Standard des zu bestimmenden Steroids statt Probe) mitgemessen. Der Leerwert wurde von allen anderen Messungen abgezogen.

### 2.3.3. Charakterisierung der Steroid ELISA

Für die Bestimmung der Empfindlichkeit und der Detektierbarkeit der Steroid ELISA wurden Standards mit Puffer, mit Plasma oder homogenisiertem Gewebe versetzt und die Rückgewinnung gemessen. Für die Stabilität der Steroide im Plasma oder Gewebe, wurden Plasma und homogenisiertes Gewebe mit 40  $\text{ng ml}^{-1}$  mit den drei Steroiden eingestellt, bei 4°C gelagert und nach bestimmten Zeitabständen gemessen.

### 2.3.4. Steroidkonzentration im Plasma

Um die Steroide aus dem Plasma zu extrahieren wurde 200  $\mu\text{l}$  Probe zu 5 ml Dichlormethan (DCM, Baker) in einem Extraktionszentrifugenröhrchen (Glaswerkstadt, Universität Düsseldorf) gegeben und 10 sec kräftig geschüttelt. Das Röhrchen wurde dann bei 2500 x g bei RT zentrifugiert und der Überstand (hydrophobe Phase), in welchem die Steroide übergangen in einem Rollrandgläschen transferiert. Die untere, wässrige Phase wurde nochmals extrahiert und transferiert. Das DCM wurde aus dem Rollrandgläsern bei 37°C unter einer Abzugshaube evaporiert, 400  $\mu\text{l}$  Ethanol hinzugegeben und geschüttelt. Die Steroide wurden somit in Ethanol wiedergelöst und in Mikrotiterplatten transferiert, die eine schwache Bindungsfähigkeit aufwiesen (Low Attachment Cluster, Corning-Costar). Das Ethanol wurde ebenfalls unter den gleichen Bedingungen wie oben evaporiert. Das Lösen in Ethanol und das Transferieren wurde weitere 2 Mal wiederholt. Schließlich wurde für die Messung die Probe in den Mikrotiterplatte wieder in 300  $\mu\text{l}$  Ethanol gelöst, eine bestimmte Menge (10 bis 50  $\mu\text{l}$ ) in eine weitere Mikrotiterplatte (für die Messung von T und 11-KT wurden Serocluster und für E<sub>2</sub> Low Attachment Cluster verwendet) und evaporiert. Anschließend wurden die Steroide in 110  $\mu\text{l}$  PPBS pH 7,4 resuspendiert und je 50  $\mu\text{l}$  (Doppelbestimmung) in den ELISA als Probe eingesetzt.

### 2.3.5. Steroidkonzentration im Gewebe

Um die Steroide aus dem Gewebe zu extrahieren wurde 200 mg Muskelgewebe in einem Mikropotter aus Glas (Glaswerkstadt, Universität Düsseldorf) mit 400  $\mu\text{l}$  Steroid-ELISA Puffer gepottert. Das Homogenat wurde geschüttelt und 30 min bei 12000 x g bei 4°C zentrifugiert. 300  $\mu\text{l}$  vom Überstand wurden wie das Plasma extrahiert, wobei die Extraktion 3 Mal wiederholt und die Probe in den Rollrandgläsern belassen wurde. Vor der

Messung wurde in einem weitere Rollrandglas wie oben die Probe vorbereitet. Dies war zwar umständlicher als die Aufbereitung von Plasma für die Messung, da vom Transferieren in die Mikrotiterplatte verzichtet wurde, garantierte aber einen geringeren Verlust, da die Steroidkonzentration im Gewebe viel geringer war.

Um die Wiedergewinnungsrate und Stabilität der Steroide im Gewebe zu untersuchen, wurde 200 mg Muskelgewebe gepottert und mit bekanntem Standard versetzt. Das Homogenat wurde bei 4°C über Wochen inkubiert, wobei direkt nach dem Mischen eine Probe extrahiert wurde (Zeitpunkt 0, entspricht Wiedergewinnung), dann je nach einer Woche bis zur zweiten Woche und abschließend nach 7 Wochen. Es wurde jeweils 200 µl des Homogenatüberstands extrahiert, wobei in der siebenten Woche das ganze Gewebe (Pellet) zusätzlich extrahiert wurde.

## 2.4. Untersuchungen zum Thunfisch-Vitellogenin

### 2.4.1. Identifizierung und Reinigung des Vitellogenins

Verschiedene Plasmaproben vom weiblichen Roten Thun (BFT), die von Ende Mai bis Anfang Juni stammten (mit sehr reifen Ovarien), wurden zu einem Gesamtvolumen von 7 ml vereinigt. Mit der Methode von Hara *et al.* (1993) wurde das hydrophobe Vtg aus dem Plasma mit Ausfällung in kaltem, H<sub>2</sub>O extrahiert. Das Pellet wurde resuspendiert, vereinigt und in 500 ml Puffer (Eluent A: 20 mM Tris-HCl, 70 mM NaCl, 0,02% NaN<sub>3</sub>, 1mM PMSF pH 8) über Nacht mit ein Mal Wechseln bei 4°C dialysiert (Dialyseschlauch Poren < 10000 kDa, MEDICELL, U.K.). Die gleiche Prozedur wurde mit Plasma von sexuell unreifen Weibchen vom März und sexuell reifen Männchen aus demselben Zeitraum wie die reifen Weibchen (Kontrolltiere) vorgenommen. Nach der Dialyse wurde ein Aliquot von 2 ml an einem Äkta Explorer FPLC System (Amersham Pharmacia Biotech, Germany) auf eine Anionenaustauscher-Chromatographie-Säule Resource Q (1 ml Bettvolumen) gegeben. Die Säule wurde äquilibriert mit Eluent A und mit einer Flussrate von 4 ml min<sup>-1</sup> wurde die Probe in einem linearen Gradienten mit Eluent B (Eluent A plus 0,5 M NaCl) eluiert. Die Pufferreservoirs wurden auf Eis gekühlt, dadurch war das System stets unter einer Temperatur von 10 °C. Fraktionen von 0,5 ml wurden gesammelt und die Eluierung war nach 15 min beendet.

Die Elutionsprofile des männlichen Plasmas und unreifen und reifen, weiblichen Plasmas wurden verglichen (Fig. 2.4.1.) und spezifische Fraktionen, die nur im sexuell reifen Weibchen vorhanden waren und nicht bei den Kontrolltieren, wurden vereinigt und mit einem Ultra-Free 100 kDa Filter (Millipore) eingengt. Die Proteinkonzentration wurde mit der Bradford Methode (Bradford, 1976) bestimmt. Für die weiteren Analysen wurde die Proteinlösung auf Eis gelagert.

Eine Probe der konzentrierten Fraktionen mit dem spezifischen Protein für sexuell reife Weibchen nach der Ionenchromatographie wurden auf eine Gelfiltration-Chromatographie-Säule Superose 6 HR 10/30 (Amersham Pharmacia Biotech, Germany) gegeben. Die Säule wurde mit Eluent B äquilibriert. Das Elutionsprofil wurde mit Plasma von sexuell reifen Weibchen und der Kontrollgruppe verglichen (Fig. 8f,d,e). Die Flussrate betrug 0,3 ml min<sup>-1</sup>.

#### 2.4.1.1. Charakterisierung des Thunfisch-Vitellogenins

Das BFT spezifisch weibliche Protein, das nach der Ionenchromatographie erhalten wurde, konnte durch Gelfiltrationschromatographie und durch Elektrophorese charakterisiert und als das gereinigte BFT Vitellogenin (BFT-Vtg) identifiziert werden. Das Molekulargewicht durch Gelfiltration wurde mit einer Superose 6 HR 10/30 Säule (siehe oben) bestimmt. Sie wurde zuvor kalibriert mit den Standardproteinen Aldolase (158 kDa), Katalase (232 kDa), Ferritin (440 kDa) und Thyroglobulin (669 kDa) und der Logarithmus

lase (232 kDa), Ferritin (440 kDa) und Thyroglobulin (669 kDa) und der Logarithmus des Molekulargewichtes gegen  $K_{av}$  aufgetragen.  $K_{av}$  ist definiert als

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

und  $V_e$  ist das Elutionsvolumen der Proben,  $V_o$  ist das Ausschlussvolumen und  $V_t$  ist das Gesamtvolumen (Roubal *et al.*, 1997).

Es wurden native, diskontinuierliche Gradienten Polyacrylamid Gelelektrophoresen (PAGE) mit einem 5% Sammelgel und einem 6% bis 15% Trenngel auf einer horizontalen Apparatur (Amersham Pharmacia Biotech, Germany) bei 5°C durchgeführt. Zum Kathodenpuffer wurden 0,02 % Coomassie Blue zugegeben, wie von Schrägger (1994) beschrieben worden ist. Diese führte zu einer Färbung der Proteinbanden bereits während der elektrophoretischen Auftrennung und erlaubte eine bessere Schätzung des Molekulargewichtes im nativen Zustand der Proteine. Bei dieser Methode wird die elektrophoretische Mobilität der Proteine dadurch beeinflusst, dass negativ geladene Coomassie Moleküle an die Proteine binden und somit die Migration durch das Gel nur noch von der Größe abhängig ist und nicht von der Ladung. Dodecylsulfat (SDS) diskontinuierlicher Gradienten PAGE mit der gleichen Zusammensetzung des nativen Gels und lineare SDS PAGE mit einem 4% Sammelgel und einem 7% Trenngel wurden nach Laemmli (1970) durchgeführt. Die verschiedenen PAGE wurden mit Coomassie Blue oder mit dem Lipoprotein sensitiven Sudan Black B (Maurer, 1971) gefärbt. Die letztere Färbung wurde durchgeführt nachdem die Coomassie Blue Färbung entfernt wurde.

Die Schätzung des Molekulargewichtes des nativen und denaturiertem (unter nicht reduzierenden Bedingungen und unter reduzierenden Bedingungen mit 2-Merkaptoethanol) BFT-Vtg wurde durch die Bestimmung der relativen Migrationsstrecke (Rf) durchgeführt und mit der Rf von hochmolekularen Standardproteinen verglichen. Als Standards dienten die gleichen Proteine wie bei der Kalibrierung der Superose 6 H/R 10/30, außer dass L-Dehydrogenase (140 kDa) statt Aldolase benutzt wurde.

#### 2.4.1.2. Produktion von Antiserum gegen Thunfisch-Vitellogenin

BFT-Vtg, wie oben beschrieben gereinigt, wurde nochmals dialysiert. Zum Dialysepuffer wurde aber kein PMSF und kein  $\text{NaN}_3$  hinzugefügt, da beide Substanzen giftig sind. Das Antiserum wurde in drei Neuseeland Kaninchen gebildet. Dies wurde in einem kommerziellen Labor (Antikörper-Service, Berlin) durchgeführt. Jedes der Tiere wurden 300 µg BFT-Vtg in inkomplettes Freuds Adjuvans (Sigma) emulgiert eingepflegt (1. Immunisierung). Nach 20 Tagen wurden die Tiere mit derselben Antigendosis in inkomplettes Freuds Adjuvans subkutan gespritzt (2. Immunisierung). Nach 30 Tagen wurde die erste Immunisierung mit kompletten Freuds Adjuvans wiederholt und 40 Tage nach der ersten Immunisierung wurde diese nochmals mit inkompletten Freuds Adjuvans wiederholt. Die Immunisierung wurde nach 61 Tagen mit der gleichen Antigendosis intramuskulär in inkomplettes Freuds Adjuvans verstärkt. 90 Tage nach der ersten Immunisierung wurden die Tiere ausgeblutet und Serum wurde durch Koagulation des Blutes auf Eis über Nacht gewonnen. Um die unspezifischen Bindungen des Antiserums zu unterdrücken wurde ein Aliquot von 200 µl des Serums nach der Methode von Heppell & Sullivan (1999b) mit dem gleichen Volumen an Plasma von sexuell unreifen Weibchen und Männchen gemischt, inkubiert und zentrifugiert. Zusätzlich wurden für die Haltbarkeit des Serums 5 mM  $\text{NaN}_3$  und 1% Aprotinin (Sigma) hinzugegeben. Das präabsorbierte Serum im Überstand wurde separiert und als das Antiserum gegen BFT-Vtg (abBFT-Vtg) eingesetzt. Es wurden Aliquots von 50 µl eingefroren und später 1 Aliquot für die verschiedenen Analysen nur ein Mal aufgetaut und bei 4°C bis zu vier Wochen aufbewahrt.

#### 2.4.1.3. Western Blot Analyse von Vitellogenin

Die Proteine wurden elektrotransferiert von einer SDS PAGE auf eine nitrocellulose Membran (Parablot, Macherey-Nagel) mit einer Blotting Apparatur (Bio-Rad Mini-PROTEAN 3 Cell). Der Transfer wurde bei einer konstanten Spannung von 200 mV für eine Stunde durchgeführt. Der Transferpuffer enthielt 25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin und 20% (v/v) Methanol. Nach dem Transfer wurde die Membran eine Stunde in Rotiblock (Roth, Deutschland) inkubiert, um freigebliebene Bindungsstellen zu sättigen. Dann wurde die Membran kurz mit PPB gespült und mit dem 1. Antikörper (abBFT-Vtg) 1/5000 in PPB über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Membran wurde anschließend mit PPB und 0,1 % Tween-20 (Roth), 0,05 % Triton-X100 (Roth) zwei Mal 5 min gewaschen. Anschließend wurde sie mit dem 2. Antikörper 2 h inkubiert. Als 2. Antikörper wurde entweder Anti-Kaninchen IgG Alkalienphosphatase Konjugat (Sigma) 1/75000 verwendet oder Anti-Kaninchen IgG Meerrettichperoxidase Konjugat (Bio-Rad, Deutschland) 1/50000 in PPB und 0,1% Tween-20. Als Substrat für die Visualisierung wurde für die Alkalienphosphatase Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat ( $50 \text{ mg ml}^{-1}$ ) und Dimethylformamid-Nitrobluetetrazolium-Chlorid ( $100 \text{ mg ml}^{-1}$ ) in 100 mM Tris-HCl, 100 mM  $\text{MgCl}_2$  und 100 mM NaCl pH 9,5 verwendet. Die Membran wurde anschließend in  $\text{H}_2\text{O}$  kurz gespült und an der Luft getrocknet. Für die Meerrettichperoxidase wurde die ECL Methode zur Visualisierung verwendet. Hierbei wird Luminol (Amersham Pharmacia Biotech, Deutschland) durch die Meerrettichperoxidase oxidiert und es entsteht Chemilumineszenz. Mit der so behandelten Membran konnte daher ein Film (Hyperfilm<sup>TM</sup> ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Deutschland) belichtet werden. Der Film wurde mit D19 (Kodak, Deutschland) entwickelt und mit Superfix (Tetenal, Deutschland) fixiert.

Alle Inkubationen wurden unter ständigem Schütteln vorgenommen. Bis auf die Reaktion mit dem 1. Antikörper wurden alle anderen bei RT durchgeführt.

Die Membranen, wo die ECL Methode angewendet wurden, konnten danach mit der Alkalienphosphatase ebenfalls analysiert werden. Hierbei wurde die Membran vom 1. und 2. Antikörper durch Waschen in 100 mM 2-Merkaptoethanol, 2% SDS, 62,5 mM Tris-HCl pH 6,7 für 30 min bei 50°C unter gelegentlichem Schütteln befreit (nach Amersham Pharmacia Biotech, Deutschland).

#### 2.4.1.4. Dot Blot Analyse von Vitellogenin

Für die Dot Blots wurde die gleiche Membran und die gleichen Bedingungen wie für die Western Blots verwendet. Die Plasma- und Gewebeprobe wurden in einem Volumen von 0,5 bis 10  $\mu\text{l}$  direkt auf die Membran aufgetragen und dann wie bei 2.4.1.3. beschrieben behandelt.

#### 2.4.1.5. Probenvorbereitung für die Vitellogenin Analysen

Plasmaproben wurden für den Western und Dot Blot in 100 mM Tris-HCl Puffer pH 6,8 mindestens 1/10 verdünnt. Für die Analyse von Vtg im Gewebe wurde 200 mg Muskelgewebe in einem Glas Mikropotter in 200  $\mu\text{l}$  mit oben genanntem Puffer plus 1% Aprotinin und 5 mM  $\text{NaN}_3$  homogenisiert und bei 12000 x g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Blots verwendet. Als Negativkontrolle wurde BSA und Proben von männlichen BFT verwendet. Als Positivkontrolle diente gereinigtes BFT-Vtg. Das Gewebe für die ELISA Untersuchung wurde in 0,1 M PPB pH 7,4 mit 27 mM NaCl, 0,05 Tween-20, 0,2 % BSA, 5 mM  $\text{NaN}_3$  und 1% Aprotinin (Vtg-Konservierungspuffer) gepottert.

Um die Wiedergewinnungsrate und Stabilität von Vtg im Gewebe zu untersuchen, wurde 200 mg Muskelgewebe gepottert und mit bekanntem Vtg-Standard versetzt. Das Homogenat wurde bei 4°C über 1 Wochen inkubiert, wobei direkt nach dem Mischen eine Probe

des Überstandes genommen wurde (Zeitpunkt 0, entspricht Wiedergewinnung) und dann je nach 2 Tagen, wobei die momentane Vtg Konzentration gemessen wurde.

#### 2.4.2. Thunfisch-Vitellogenin ELISA Prozedur

Der ELISA wurde etabliert, indem verschiedene Methoden für Vtg ELISA verschiedener Fischarten kombiniert und ergänzt wurden (Núñez Rodriguez *et al.*, 1989; Kwon *et al.*, 1990; Perez & Callard, 1992; Kishida *et al.*, 1992; Goodwin *et al.*, 1992; Specker & Anderson, 1994; Mourot & Lebail, 1995; Bon *et al.*, 1997; Mosconi *et al.*, 1998; Heppell & Sullivan, 1999b). Es wurde ein ELISA entwickelt, indem an den Mikrotiterplatte gebundenes Standard Vtg mit gelöstem Vtg (Probe oder Standard) um den 1. Antikörper kompetitiert. Hochbindende Mikrotiterplatten (Corning-Costa) wurden mit 100 µl 500 ng ml<sup>-1</sup> gereinigtem BFT-Vtg in 50 mM Carbonatpuffer pH 9,6 gebunden. Für die Bestimmung von Nicht-Spezifischer-Bindung wurde 500 ng ml<sup>-1</sup> BSA verwendet. Die Platten wurden dann 1 h bei RT inkubiert und anschließend über Nacht bei 4°C. Dann wurden sie ein Mal mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Nicht-spezifische Bindungsplätze wurden mit 2% BSA in 0,5 mM PPB pH 7,4 gesättigt. Die gebundenen und gesättigten Platten wurden mit Waschpuffer (siehe Kapitel 2.3.) gewaschen. Eine serielle Konzentrationsreihe von gereinigtem BFT-Vtg Standard wurde separat hergestellt und auf die Platte gegeben. Die zu messenden Plasmaproben wurden mindestens 1/200 in 0,1 M PPB pH 7,4 mit 27 mM NaCl, 0,05 Tween-20, 0,1 % BSA und 0,15 mM NaN<sub>3</sub> (Vtg-ELISA Puffer) verdünnt. Die Gewebeproben wurden wie unter Kapitel 2.4.1.5. vorbereitet und mindestens 1/20 in Vtg-ELISA Puffer verdünnt. Als interner Standard (direkt auf die Platte angewendet) und externer Standard (zuvor in Plasma gemischt) wurde BFT-Vtg mit bekannter Konzentration mitgemessen. Zur Typenähnlichkeitsfindung („similarity analysis“) wurden Plasma Verdünnungsreihen von weiblichen und männlichen BFT, Maus und weiblicher BFT Gonaden Extrakt (ein Gonadenstück von einem Fisch vom Monat Mai wurde mit dem gleichen Volumen Puffer v/w homogenisiert) vorbereitet und zum ELISA gegeben. Der 1. Antikörper (abBFT-Vtg) wurde in einer Endverdünnung von 1/7500 eingesetzt (Gesamtvolumen 150 µl in der Platte) und 2 h unter ständigem leichtem Schütteln auf einem Titramax 100 (Heidolph, Deutschland) bei RT inkubiert. Für die Berechnung der Maximalbindung (Bo) und der Nicht-Spezifischen-Bindung wurde keine Probe und kein Standard verwendet. Die Platten wurden danach mit Waschpuffer gewaschen und 110 µl 2. Antikörper (Anti-Kaninchen IgG Alkalienphosphatase Konjugat, Sigma) in einer Verdünnung von 1/15000 zugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Platten wurden danach erneut ein Mal mit Waschpuffer und zwei Mal mit 500 mM Diethanolamin pH 9,8 plus 0,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Substratpuffer) gewaschen. Anschließend wurde 150 µl frisch hergestellter 4-Nitrophenylphosphate (1 mg ml<sup>-1</sup>, pNPP, Boehringer Mannheim) in Substratpuffer zur Platte gegeben und 3 bis 4 h im Dunklen bei RT inkubiert. Zwischen den verschiedenen Schritten wurde die Platten mit einem Platesealer (Corning-Costa) verschlossen. Die Absorption bei 405 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm wurde gemessen, wenn die Maximalbindung 1,5 O.D. erreicht hatte. Die Nicht-Spezifisch-Bindung wurde als Leerwert abgezogen. Um die Wiederfindungsrate von BFT-Vtg aus dem Plasma zu untersuchen, wurde eine definierte Menge BFT-Vtg Standard zu 1/200 verdünntem Plasma von Männchen gemischt (als externer Standard). Um den Parallelismus von BFT-Vtg Standard zu den seriellen Verdünnungen von vitellogenetischem weiblichen Plasma zu zeigen wurde folgende Logit-Transformation angewendet:

$$E_{405 \text{ nm}} = -\ln \frac{(Bo-Bi)}{Bi}$$

(Bo = Maximalbindung und Bi = Binding von BFT-Vtg).

Um die Proben und den Standard längere Zeiten aufzubewahren, wurden sie in Vtg-Konservierungspuffer verdünnt.

## 2.5. Statistische Analyse

Alle Bestimmungen der ELISA Bindungs-Experimente und alle Messungen der Konzentrationen wurden 5 Mal wiederholt und einen Varianzkoeffizienten (CV) unter 10% akzeptiert (kalkuliert mit der ELISA-Auswerte-Software *Magellan*, TECAN, Österreich). Die ELISA Standardkurven wurden nach einer Hillfunktion 4 Parameter sigmoid gefittet:

$$y = y_0 + \frac{ax^b}{c^b + x^b}$$

Sie beschreibt optimal die kompetitive Bindung einer Immunoreaktion in Lösung (Christopoulos & Diamandis, 1996). Alle Konzentrationen und Berechnungen wurden als Mittelwerte mit statistischem Fehler ( $\pm$  S.E., Standard Error of the Mean) dargestellt und signifikante Unterschiede wurden durch den Student t-Test und F-Test untersucht. Alle statistischen Untersuchungen wurden mit der Software Sigma Stat (Jandel Scientific, Erkrath, Germany) durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde bei  $P < 0,05$  akzeptiert. Der statistische Vergleich zweier Regressionsgeraden (Abb. 21 & 22) wurde mittels einem F-Test untersucht, mit der dafür geeigneten Formel (Glantz, 1998):

$$F = \frac{S^2_{y-x \text{ verb}}}{S^2_{y-x p}}$$

$S^2_{y-x \text{ verb}}$  = Differenz der Summe der Quadrate der Residuen um die Regressionsgeraden;

$S^2_{y-x p}$  = gepoolter Schätzwert der Varianz um die beiden Regressionsgeraden.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Qualität der Probennahme

Es wurden insgesamt 340 partiell verwendbare Plasmaproben gesammelt (Tabelle 2). Weitere Proben waren nicht brauchbar, da es sich um koaguliertes Blut oder Plasma ohne biometrische Daten handelte. Für die Analysen der Steroide, im Plasma, standen also 340 Proben zur Verfügung. Für die quantitative Vtg Analyse im Plasma konnten allerdings nur 68 Proben von adulten Weibchen verwendet werden, da der Hämolysegrad teilweise sehr stark war, was, wie sich methodisch herausstellte, problematisch war (siehe Kapitel 3.4.1.). Für die Korrelation der Steroidkonzentrationen und Vtg Analysen mit denen im Gewebe, und den histologischen Daten, standen 67 Proben von adulten Tieren zur Verfügung. Die Gründe für die Sammlung von unvollständigen Proben lag darin, dass die Umstände für die Probennahme auf dem Feld von Ort zu Ort sehr verschieden waren und oft durch Willkür Dritter beeinflusst wurden.

Partner Ort	Anzahl der Plasmaproben
UNI Bari Zentrales Mittelmeer	171
UNI Genua Zentrales Mittelmeer	84
UNI Athen Östliches Mittelmeer	18
IEO Malaga Westliches Mittelmeer	67

**Tabelle 2:** Anzahl der Plasmaproben aus den verschiedenen Regionen (siehe auch Abb. 5c).

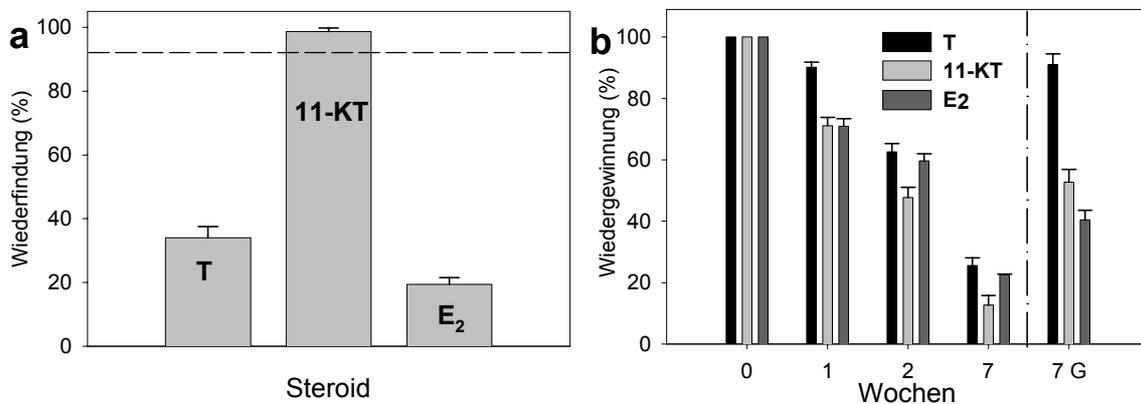
Die Proben aus dem zentralen Mittelmeer (255) waren am Stärksten vertreten und deckten eine Periode von März bis Oktober ab. Davon waren 84 Proben von juvenilen Fischen ohne Gewebe und nur einige davon mit histologischer Analyse. Die brauchbaren Proben (18) aus dem östlichen Mittelmeer waren von dem einzigen Monat März. Die Proben (67) aus dem westlichen Mittelmeer waren von April bis Juli. Auch bei dem westlichen Mittelmeer gelang es nicht, eine histologische Analyse zu erhalten.

#### 3.2. Messung der Steroidhormone

Es wurde eine Sensivität von  $1 \text{ pg ml}^{-1}$  für die Steroide T und 11-KT und  $3 \text{ pg ml}^{-1}$  für  $E_2$  im ELISA erreicht. Für den 11-KT ELISA ergab sich eine 8% Kreuzreaktion mit T, die bei der Messung berücksichtigt wurde.

Die Wiederfindung der Steroide aus dem Plasma wurde bereits von Nash *et al.*, 2000 untersucht und eine Rückgewinnung von über 90% gefunden. Im Muskelgewebe war die Rückgewinnungsrate für T 34%, für 11-KT 98% und für  $E_2$  19% (Abb. 6). Wie die direkte Extraktion des Gewebes zeigte, gelang die Extraktion von  $E_2$  mit der angewandten Methode nicht so gut wie für die anderen beiden Steroide. Die untersuchten Steroide waren im Plasma mehrere Wochen bei  $4^\circ\text{C}$  nahezu unverändert stabil, beim Gewebe zeigte sich jedoch mit der Zeit ein Abbau der Steroide (Abb. 7). Es war aber trotzdem möglich nach 7 Wochen  $17 \pm 2,5 \%$  T,  $11 \pm 3,1 \%$  11-KT und  $4 \pm 0,2 \%$   $E_2$  der Anfangskonzentration zu messen.

Das Verhältnis der Konzentration im Plasma und Gewebe entsprach bei T 4 zu 1 (25% im Gewebe) bei Weibchen und Männchen. Für E<sub>2</sub> wurde ein Verhältnis von 13 zu 1 (7,7% im Gewebe) bei den Weibchen und für 11-KT von 5 zu 1 (20% im Gewebe) bei den Männchen berechnet. Auf eine Korrektur der apparenten Messungen auf Absolutwerte wurde verzichtet, da vermieden werden sollte, dass die Konzentrationen durch enzymatische Umsetzungen der einzelnen Steroide und durch die unterschiedliche Wiedergewinnungsrate verfälscht sein würde.

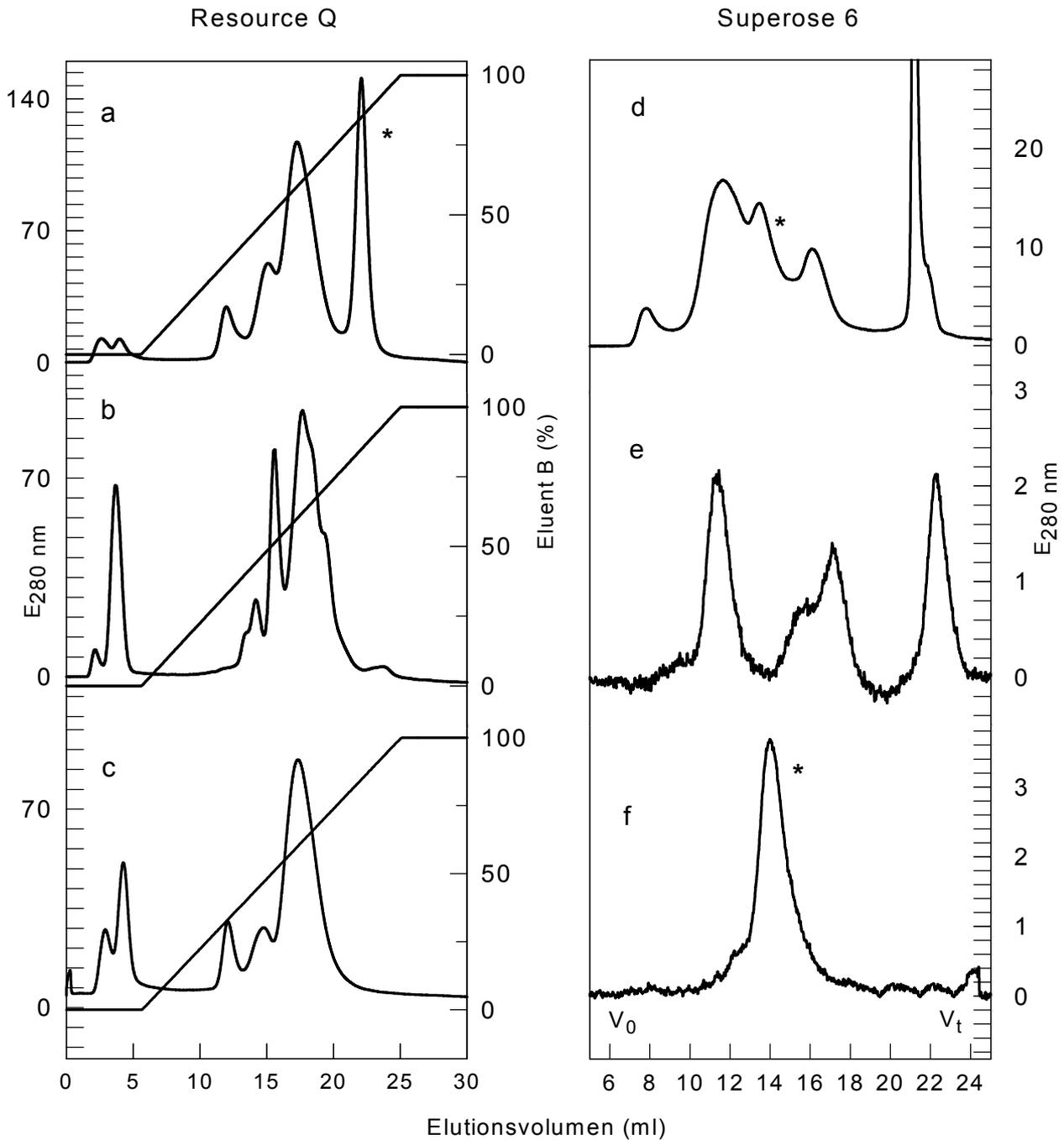


**Abb. 6:** a) Die Wiederfindung (%) der Steroidextraktion aus dem Gewebe war für 11-KT am Größten über 95%, für T und E<sub>2</sub> allerdings wurde nur eine Rückgewinnung von unter 50% erreicht, die gestrichelte Linie deutet die Wiederfindung im Plasma an. b) Trotz eines kontinuierlichen Abbaus der Steroide bei 4°C, war nach 7 Wochen Inkubation eine Messung noch möglich. Die direkte Extraktion des Pellets nach 7 Wochen (7G) ergab noch für T 90%, für 11-KT über 50% und für E<sub>2</sub> über 30% Wiederfindung; (N = 5).

### 3.3. Partielle Charakterisierung von *T. thynnus* Vitellogenin

Ein spezifisch bei sexuell reifen Weibchen auftretendes Protein konnte mit der Ressource Q bei 23 ml nach 13 min (17 ml Eluent B) eluiert werden (Abb. 7a). Dieses Protein eluierte auf der Superose 6 bei 13,9 ml (Abb. 7d,f). Es wurde nicht im Plasma von Männchen und sexuell unreifen Weibchen gefunden (Abb. 7b,c,e). Das gereinigte Protein erschien auf der Superose 6 als einzelner relativ symmetrischer Peak (Abb. 7f). Dieses spezifische Protein zeigte auf der Superose ein apparentes Molekulargewicht (M<sub>R</sub>) von 545 kDa. Auf dem nativen, diskontinuierlichen Gradienten PAGE nach Schrägger (1994) erschien das gereinigte Protein als einzelne Bande mit einem M<sub>R</sub> von 330 kDa und konnte nur im Plasma von sexuell reifen Weibchen gefunden werden (Abb. 8a).

Das identifizierte Protein zeigte eine größere Bande bei ca. 195 kDa und zwei kleinere, niedermolekulare Banden auf dem diskontinuierlichen Gradienten SDS PAGE (Abb. 9a). Die mit 2-Merkaptoethanol reduzierten Proben erlaubten auf dem SDS PAGE eine eindeutigere Identifizierung des spezifischen Proteins, da es sich im Laufverhalten gegenüber anderen Plasmaproteinen nicht veränderte (Abb. 9a).



**Abb. 7:** Elutionsprofile von BFT Plasma nach Präzipitation und Resuspendieren und von gereinigtem BFT-Vtg. a) Adultes, reifes Weibchen (Mai), b) adultes, unreifes Weibchen (März) und c) adultes Männchen (Mai) ionenchromatographische Profile. d) Adultes, reifes Weibchen (Mai), e) adultes Männchen (Mai) und f) BFT-Vtg gefiltrationschromatographische Profile. Mit \* ist das Protein gekennzeichnet, das nur bei adulten, sexuell reifen Weibchen gefunden wurde und als Vtg identifiziert wurde. Dieses Protein wurde effizient mit der Resource Q getrennt und eluierte nach 23 ml (a), dasselbe Protein eluierte mit der Superose 6 bei 13,9 ml (f) als das spezifische Plasmaprotein bei reifen Weibchen (d). Der Salzgradient für die Resource Q war von 0,07 mM NaCl (0 %) bis 0,5 mM NaCl (100 %) mit Eluent B.  $V_0$  ist das Ausschlußvolumen und  $V_t$  ist das Gesamtvolumen. E280 nm wurde in Optischer Dichte (milli O.D.) gemessen.

Dieses spezifische Protein wurde als das Vitellogenin (Vtg) identifiziert und erschien bei chromatographischer (Abb. 7f) und elektrophoretischer (Abb. 8 und 9a) Überprüfung ausreichend rein, um es für die Produktion von Antiserum zu verwenden.

Eine Reinigungsprozedur erbrachte 6 bis 10 mg *T. thynnus* Vtg (BFT-Vtg). Das konzentrierte BFT-Vtg war stabil, wenn es in einem 20 mM Tris-HCl Puffer pH 8 mit 0,1 mM PMSF und 0,02% NaN<sub>3</sub> auf Eis für maximal 7 Tage gehalten wurde. Einfrieren und Auftauen führte zu einer starken Degradation des Proteins. Um das gereinigte BFT-Vtg als Standard für eine längere Zeit haltbar zu machen, wurde es in verschiedenen Konzentrationen in Vtg-Konservierungspuffer gelöst und eingefroren.

In der Western Blot Analyse zeigte das produzierte Antiserum (abBFT-Vtg) hohe Spezifität für das BFT-Vtg im vitellogenetischen, weiblichen Plasma und keine Reaktion mit männlichem Plasma (Abb. 9c). Es zeigte sich eine positive Reaktion zu einer Proteinbande bei 195 kDa und zu zwei weiteren, niedermolekularen Proteinen (von ca. 90 und 80 kDa), die auf den korrespondierenden SDS PAGE alle als Degradationsprodukte des BFT-Vtg identifiziert wurden.

### 3.4. Qualifizierung des Vitellogenin ELISA

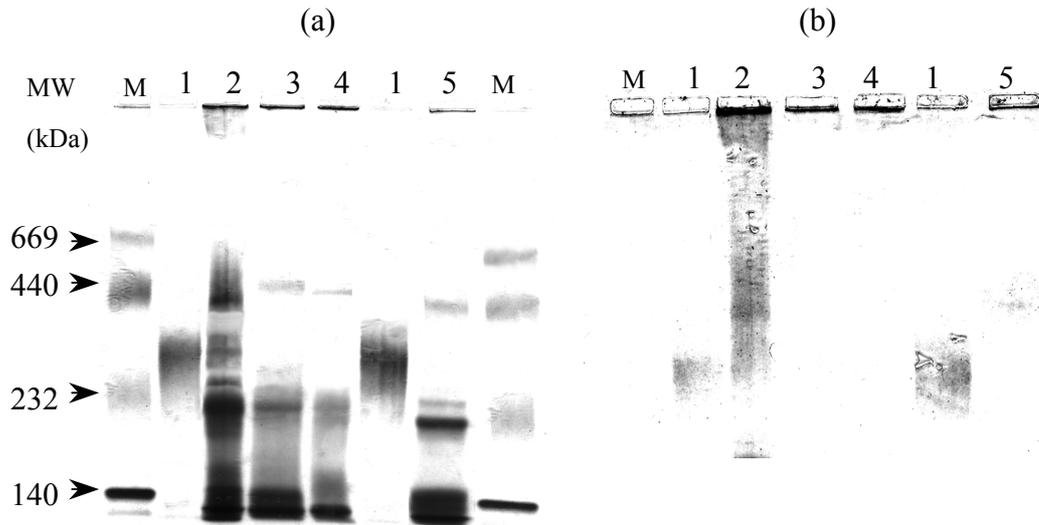
Der BFT-Vtg ELISA zeigte eine kompetitive Bindung für vitellogenetisches, weibliches Plasma und Vtg Standard (Abb. 10a). Es gelang eine Standardkurve im Konzentrationsbereich von 1250 ng ml<sup>-1</sup> bis 2,4 ng ml<sup>-1</sup> zu konstruieren. Es wurde kein statistischer Unterschied zwischen 5 verschiedenen Regressionsgeraden festgestellt (F-Test für mittlere Quadrate,  $F_{\text{obs}} = 3,366 < F_{\text{crit}} = 6,38$  für 4 df,  $P > 0,05$ ). Plasma von Männchen und Maus zeigten eine Kreuzreaktion bei niedrigen Verdünnungen, jedoch waren diese Kreuzreaktionen nicht bei der Verdünnung vorhanden, bei der die Proben für den ELISA verwendet wurden. Dieses Plasma zeigte im Gegensatz zum Vtg keinen kompetitiven Zusammenhang (Abb. 10a). Durch die Logit/log Transformation (Abb. 10b) konnte die Ähnlichkeit der kompetitiven Reaktion („similarity“) des Antikörpers mit dem Antigen im vitellogenetischen, weiblichen Plasma und dem Standard Vtg gezeigt werden. Die Steigung beider Regressionsgeraden war fast identisch und eine statistische Überprüfung mit dem F-Test für Mittlere Quadrate ( $F_{\text{obs}} = 1,594 < F_{\text{crit}} = 3,678$  für 1,9 df,  $P > 0,05$ ) zeigte, dass das produzierte Antiserum in gleicher Weise das Antigen im Plasma wie auch im Standard erkannte (Abb. 10b).

Die kompetitive Kurve mit dem Gonadenextrakt zeigte andere Charakteristiken als das vitellogenetische, weibliche Plasma und BFT-Vtg. Die Kurve zeigte keine Bindung unter 30% (Abb. 10a). Die Steigung in der logit/log Transformation war ebenfalls abweichend und eine statistische Überprüfung ( $F_{\text{obs}} = 4,564 > F_{\text{crit}} = 3,388$  für 1,9 df,  $P > 0,05$ ) bestätigte keinen Parallelismus zur Standardkurve (Abb. 10b).

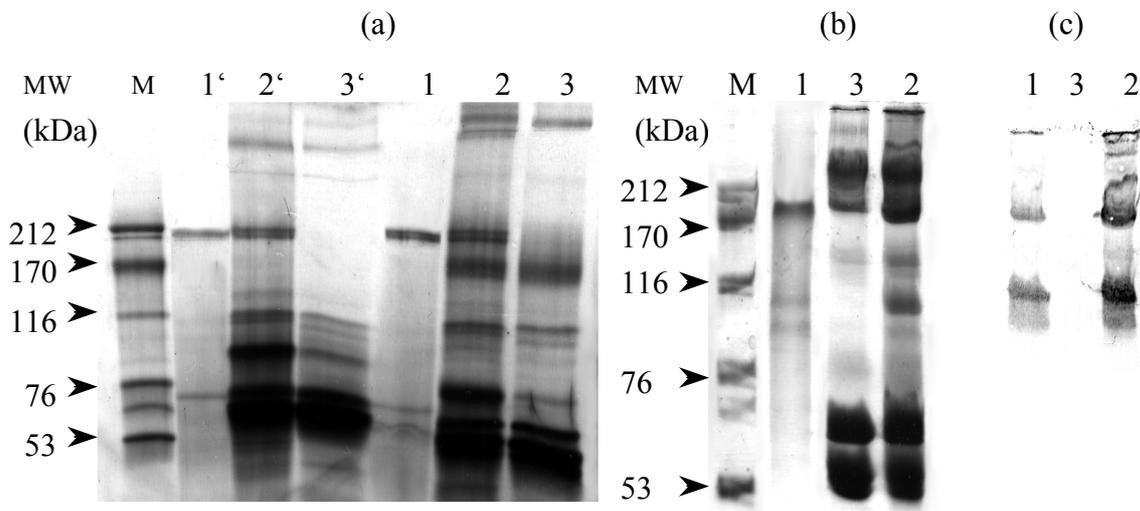
Es wurde eine Wiedergewinnungsrate von 100% BFT-Vtg (5 µg ml<sup>-1</sup> BFT-Vtg in Plasma von Männchen) im ELISA gemessen. Bei 50% Bindung zeigte der interne Standard einen Variationskoeffizienten (CV) von 5,29% (n = 6) und der Externe 7,99 % (n = 6).

Eine Sensivität von 8 ng ml<sup>-1</sup> Vtg konnte bei 90% Bindung bestimmt werden.

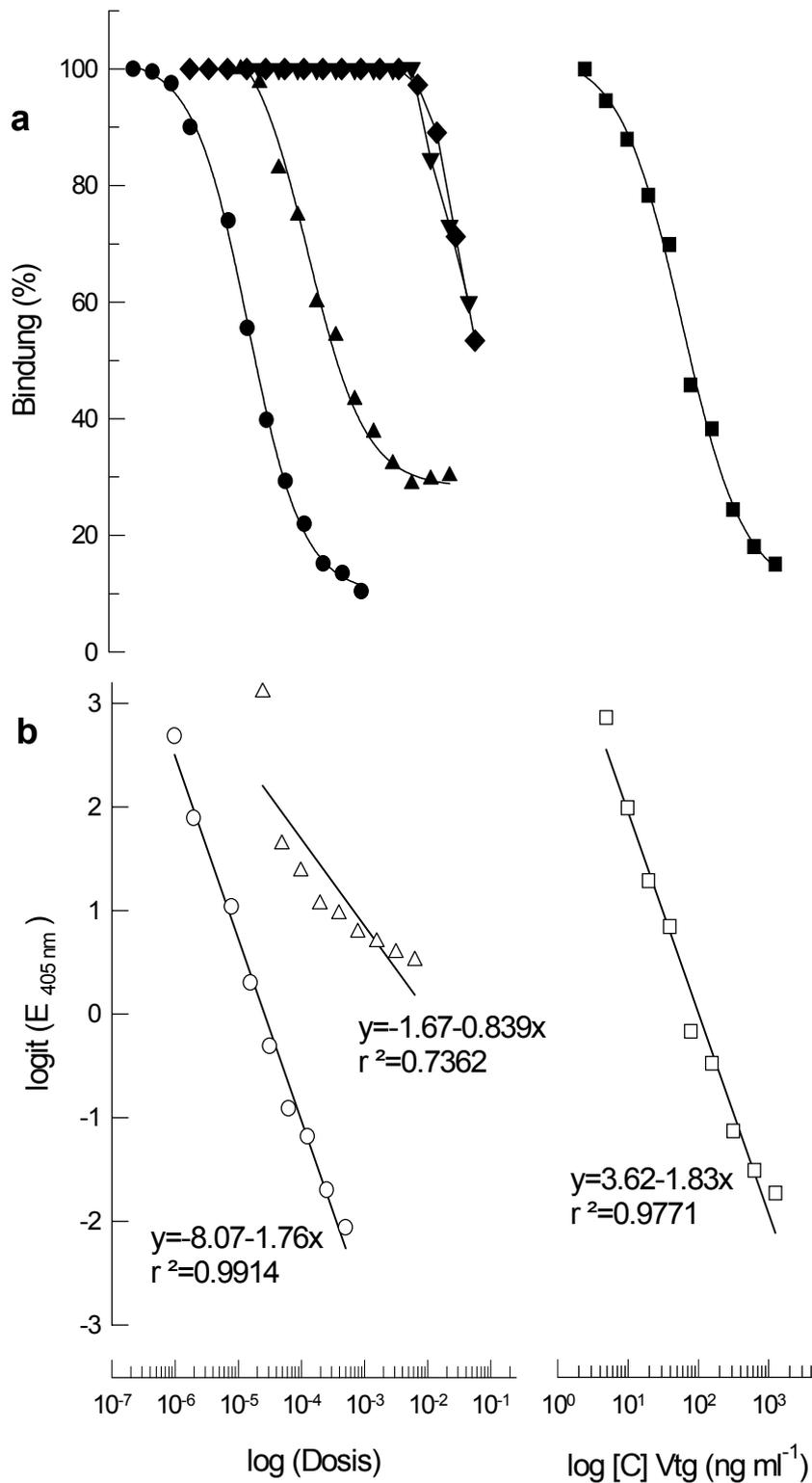
Das Antiserum (abBFT-Vtg) wurde bei -20°C aufbewahrt und nur einmal aufgetaut. Das aufgetaute Antiserum konnte für mindestens vier Wochen bei 4°C als Arbeits-Stock aufbewahrt werden.



**Abb. 8:** Natives PAGE von (M) Markerproteinen, (1) gereinigtem BFT-Vtg, BFT Plasma von (2) reifem Weibchen, (3) unreifem Weibchen, (4) juvenilem Fisch und (5) Männchen. Gefärbt mit Coomassie blue (a) eine korrespondierende Proteinbande von 330 kDa zum gereinigten BFT-Vtg konnte nur im Plasma von reifen Weibchen nachgewiesen werden. Gefärbt mit dem Lipoprotein und Lipid sensitiven Sudan black (b), wurde die BFT-Vtg Bande bei 330 kDa sichtbar und es kam zur totalen Anfärbung von den meisten Proteinen vom reifen Weibchen, da es einen hohen Anteil an Fett hat. Die Trennung des Vtg im nativen Gel erwies sich allgemein als problematisch wegen der Lipideigenschaften. Als Markerproteine wurden verwendet: L-Dehydrogenase (140 kDa), Katalase (232 kDa), Ferritin (440 kDa) und Thyroglobulin (669 kDa).



**Abb. 9:** Elektrophoretische Eigenschaften im SDS PAGE und Western Blot von (1) gereinigtem BFT-Vtg und Plasma von (2) reifem Weibchen, (3) Männchen und (M) Markerproteinen. (a) Im gradienten SDS PAGE erscheint das gereinigte BFT-Vtg als eine größere Bande von 195 kDa und zwei Banden von niedriger MW anwesend nur im reifen weiblichen Plasma. Die Trennung der Proteine ist eindeutiger unter reduzierenden Bedingungen mit 2-Mercaptoethanol (Ziffern mit Apostroph). b) SDS PAGE und korrespondierender Western Blot (c), BFT-Vtg und korrespondierende Proteine vom reifen Weibchen reagieren positiv mit abBFT-Vtg. Keine weitere, unspezifische Reaktion konnte detektiert werden. Als Markerproteine wurden verwendet: L-Dehydrogenase (140 kDa), Katalase (232 kDa), Ferritin (440 kDa) und Thyroglobulin (669 kDa).



**Abb. 10:** Kompetitive Bindungskurven des gereinigten BFT-Vtg, Plasma und Ovarienextrakt. a) Bindung (Bi/Bo %, Bo = maximale Bindung und Bi = Bindung von BFT-Vtg) mit verschiedenen Konzentrationen des gereinigten BFT-Vtg (■) und serielle Plasmaverdünnungen (Dosis) von vitellogenetischen Weibchen (●), reifen Ovarienextrakt (▲), Männchen (◆) und Maus (▼). b) Korrespondierende logit/log Transformation ( $\text{logit}(E_{450\text{ nm}}) = -\ln(\text{Bi}/\text{Bo})/\text{Bi}$ ) der kompetitiven Kurven von gereinigtem BFT-Vtg (□), Plasma vom Weibchen (○) und Ovarienextrakt (Δ). Die statistische Überprüfung der Steigungen der Regressiongeraden ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen Plasma von vitellogenetischen Weibchen und gereinigtem BFT-Vtg. Der Ovarienextrakt zeigt kein Parallelismus mit Standard-BFT-Vtg. Wegen der Übersicht wurden die Transformationen des männlichen BFT- und Mausplasma nicht dargestellt. Sie waren im logit-Bereich von 4 mit einer Steigung um 0.

### 3.4.1. Quantitative Messung der Vitellogenin Konzentration

Bei adulten Weibchen vom Mai und Juni wurden Konzentrationen von bis zu 40 mg ml<sup>-1</sup> im Plasma gemessen. Anfang April und September konnte bei adulten Weibchen ein Plasmalevel von bis zu 3 mg ml<sup>-1</sup> gemessen werden. Bei adulten Weibchen aus dem zentralen Mittelmeer konnte im März Vtg im Plasma nicht quantifiziert werden. Trotz der hohen Sensivität des ELISA konnte bei vielen Proben vom März, Anfang April, September und Oktober auf Grund des Plasmaeffektes nicht empfindlich genug gemessen werden, da eine niedrige Verdünnung notwendig gewesen wäre. Es wurde stets eine Minimalverdünnung von 1/200 angewendet, so dass sich ein Limit von 1 mg ml<sup>-1</sup> Vtg im Plasma als quantitativ messbar ergab. Bei Kontrollmessungen konnte im Plasma von juvenilen Fischen und Männchen kein Vtg gemessen werden.

Im Gewebe von adulten Weibchen war der Gehalt an Vtg 70% von der Konzentration im Plasma. Bei der Inkubation von Vtg mit homogenisiertem Gewebe war nach 2 Tagen 95%, nach 4 Tagen 66% und nach 7 Tagen noch 61% des Standards messbar. Längere Inkubationen ergaben Einzelmessungen mit hohem (> 20%) Variationskoeffizienten (CV), die bei wiederholtem Messen statistisch stark abwichen.

### 3.5. Qualitative Detektion des Vitellogenins

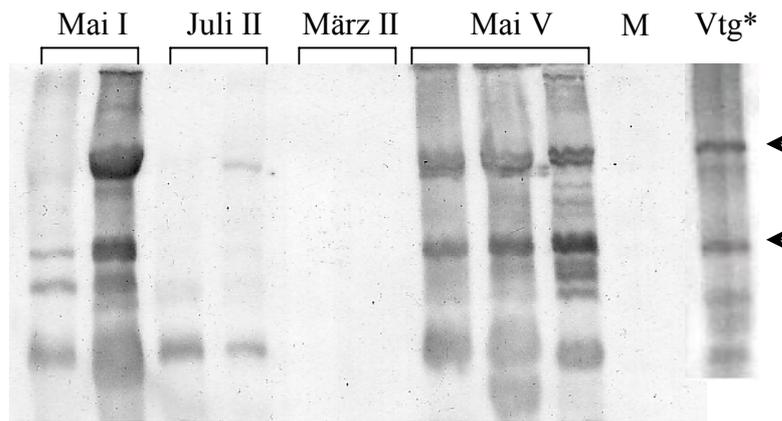
Eine qualitative Detektion von Vtg im Plasma und im Gewebe gelang durch die elektrophoretische Auftrennung der Proteine in einem SDS PAGE und der Verwendung des abBFT-Vtg, um die Vtg assoziierten Proteine zu lokalisieren. Es gelang eine Vtg Konzentration von 20,6 µg ml<sup>-1</sup> zu detektieren. Mit der ECL-Methode konnte die Sensivität auf 1,3 µg ml<sup>-1</sup> gesteigert werden. Diese Mengen beziehen sich auf die eindeutige Detektion der größeren Proteinbande (195 kDa), wobei die niedermolekularen Vtg assoziierten Proteine in geringeren Mengen detektiert werden konnten.

Bei dem relativ simpleren Dot Blot konnte eine Detektion von 31,3 ng ml<sup>-1</sup> Vtg erreicht werden.

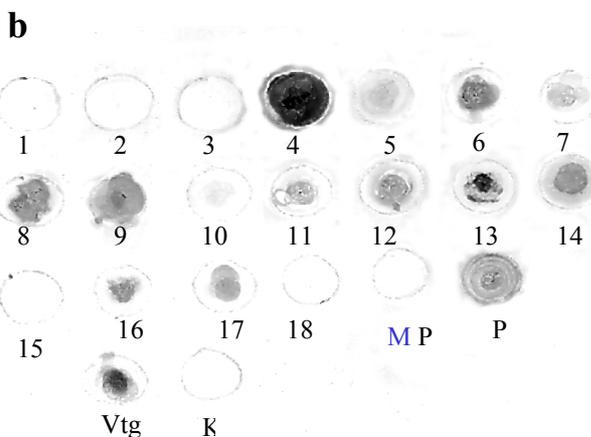
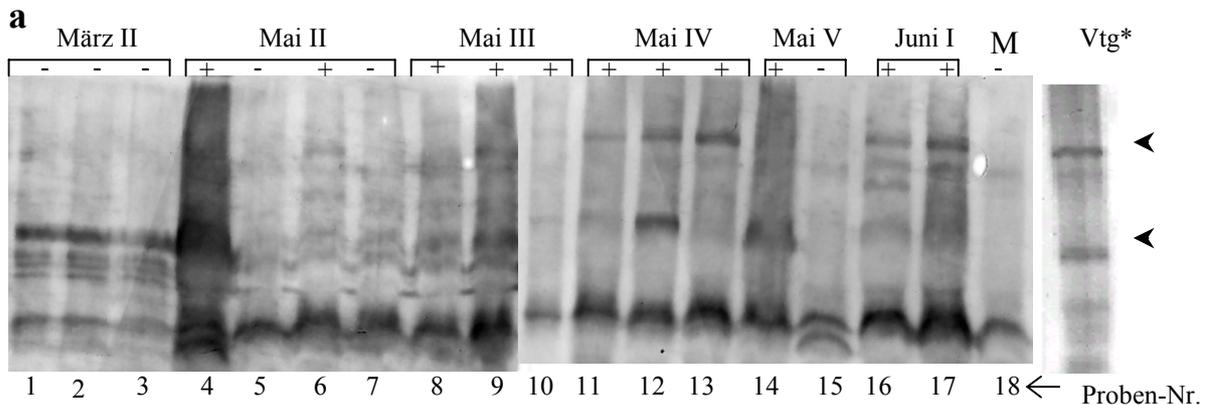
Wie in Abbildung 11 zu erkennen, werden im Western Blot die Vtg assoziierten Proteine (mit dem Pfeil gekennzeichnet) mit dem fortschreitenden, sexuellen Reifezustand deutlicher detektiert. Die anderen abBFT-Vtg positiven Banden wurden für die Analyse nicht mit berücksichtigt, da sie verschiedene, andere Abbauprodukte darstellen. Der Nachweis der saisonalen Änderung des Vtg gelang auch in 200 mg Muskelgewebe (Abb. 12a). Die Western Blot Analyse erwies sich in der Gegenkontrolle (Steroidkonzentration und Reifezustand des Ovariums) als 100% übereinstimmend. In hämoglobinreichem Plasma konnte im Gegensatz zur quantitativen Analyse Vtg eindeutig nachgewiesen werden. Eine unspezifische, positive Reaktion von niedermolekularen Molekülen im Gewebe, wie auch schwächer im Plasma war auf den verwendeten 2. Antikörper zurückzuführen, was aber die eindeutige Zuordnung durch die M<sub>R</sub> nicht störte.

Auch die Dot Blot Analyse von Plasma (nicht gezeigt) und Muskelgewebe (Abb. 12b) konnte Vtg detektieren. Die ECL-Methode für den Dot Blot erwies sich, wegen der großen Hintergrundfärbung, als nicht eindeutig.

In Kontrollanalysen von Plasma und Muskelgewebe von juvenilen Fischen und Männchen konnte in den untersuchten Proben kein Vtg nachgewiesen werden (Abb. 11 und 12).



**Abb. 11:** Western Blot Analyse von adulten BFT Plasma und Detektion mit ECL-Methode. Im reproduktiven Monat Mai ist Vtg nachweisbar (Pfeile). In der Nachlaichzeit ist Vtg noch nachweisbar (Juli) und kann in der Vorlaichzeit (März) nicht mehr nachgewiesen werden. Beim Kontrollmännchen (M) war das Ergebnis negativ. \* Vtg-Standard, 2,6 µg ml<sup>-1</sup>. Die untersuchten Monate wurden in 6 Tage Clusters geteilt, damit die Saison genau untersucht werden konnte. Die Clusters sind mit römischen Ziffern bezeichnet.



**Abb. 12:** Nachweis von Vtg im Muskelgewebe. a) Western Blot Analyse von Proben aus verschiedenen Phasen der Reproduktion. Die Pfeile kennzeichnen die Lage von Vtg, + eine positive Detektion. (M) Muskel vom Männchen. ECL-Methode. b) Dot Blot Analyse der selben Proben wie in (a) gekennzeichnet mit gleichen Zahlen. Es ergab sich als sehr sensitiv durch histologische Überprüfung der Gonade. Im März konnte kein Vtg nachgewiesen werden, Probe 15 war ein unreifes adultes Weibchen aus der Laichzeit und ist negativ in a) und b). M P = Plasma von Männchen, P = Plasma vom vitellogenetischen Weibchen und K = Kontrolle (BSA). \* Vtg-Standard, 2,6 µg ml<sup>-1</sup>. Die untersuchten Monate wurden in 6 Tage Clusters geteilt, damit die Saison genau untersucht werden konnte. Die Clusters sind mit römischen Ziffern bezeichnet.

### 3.6. Gonadenreife

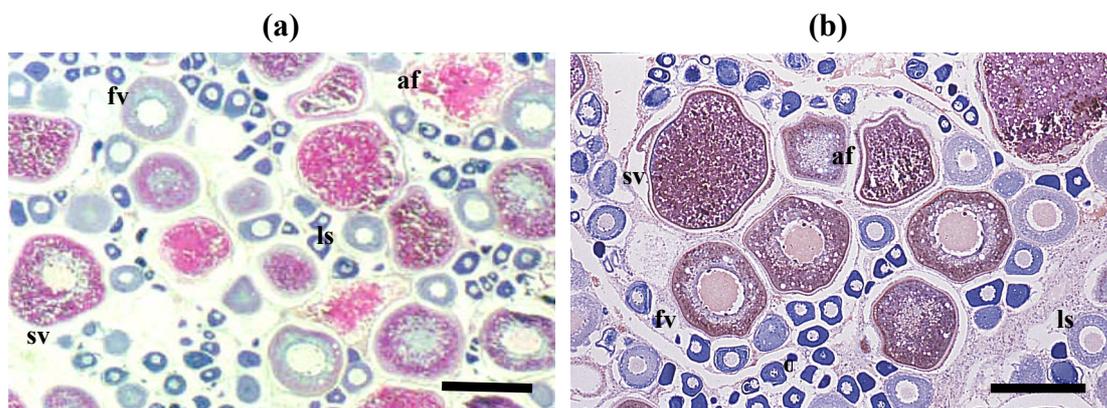
Die histologische Analyse der zur Verfügung stehenden Gonadenproben zeigte eine saisonal bedingte Veränderung des Ovariums und der Hoden (Anhang 2).

Im Ovarium konnte zu jedem Reifestadium bestimmte Charakteristiken der Oocyten festgestellt werden. Im März waren die Ovarien im Reifestadium 1 mit Oocyten (in Prenucleus-Phase) von einem maximalen Durchmesser um 110  $\mu\text{m}$ . Vom April zum Mai vergrößerte sich der Durchmesser auf 500  $\mu\text{m}$ , wobei das Reifestadium 2 und 3 erreicht wurde. Neben Oocyten im Prenucleus-Phase kam es zur Anreicherung an Oocyten in Lipid-, früher und später Dotterphase (Abb. 13a&b). In der unmittelbaren Vorlaichzeit (Juni) war der maximale Durchmesser der Oocyten auf 650  $\mu\text{m}$  angewachsen (spätes Stadium 3), es waren aber keine Weibchen mit dem Reifestadium 4 (Laichende Tiere) unter den untersuchten Tieren. Im August (Nachlaichzeit, Stadium 5) waren in den Ovarien nur noch Oocyten in der Prenucleus-Phase.

Wie sich aus Abbildung 13 erkennen lässt, waren in den Ovarien gleichzeitig Oocyten mit unterschiedlicher Reife zu beobachten, was auf ein Portionslaichen zurückschließen lässt. In den meisten reifenden Ovarien (Mai und Juni) wurden stets vitellogenetische Oocyten in Atresie beobachtet (Abb. 13 und Anhang 2,VI).

Die immunohistochemische Färbung der Ovarien Vtg-assoziierter Proteine zeigte eine positive Reaktion bei Weibchen von Mai und Juni (Anhang 2, IV & V), dabei hatten die Oocyten einen minimalen Durchmesser von 220  $\mu\text{m}$ . Histologisch waren diese Oocyten in der frühen Dotter-Phase. Positiv war auch die Reaktion des Follikelepithels (Anhang 2, VI) mit der ABC-Methode. Die Einlagerung Vtg-assoziierter Proteine ließ sich durch die PAP-Methode in der frühen Dotter-Phase, von der Peripherie der Oocyte her zum Inneren hin in der späten Dotter-Phase, nachweisen, wobei bei dieser Methode das Follikelepithel nicht Vtg positiv, wie bei der ABC-Methode, erschien (Anhang 2, V). Mit der PAP-Methode, in Verbindung mit der Hämatoxylin-Färbung, konnte der Zeitpunkt der Bildung vitellogenetischer Oocyten genau bestimmt werden.

Keine der durchgeführten Kontrollen (siehe Kapitel 2.2.2.) zur immunohistochemischen Färbung war positiv.



**Abb. 13:** Mikrophotographien von Ovariensektionen von einem Weibchen von Anfang Juni mit eine LS von 140 cm. Bei diesem Tier, im Reifestadium 3, wurden 6,48  $\text{ng ml}^{-1}$  T, 12,6  $\text{ng ml}^{-1}$  E<sub>2</sub> und 20,08  $\text{mg ml}^{-1}$  Vtg im Plasma gemessen. Es sind Oocyten in verschiedenen Reifestadien vorhanden, was charakteristisch für Portionslaicher ist.

a) Hämatoxylin-Eosin-Färbung, die Dottereinlagerung erscheint rötlich. Balken = 350  $\mu\text{m}$ .

b) Immunohistochemische Färbung mit abBFT-Vtg und Gegenfärbung durch Hämatoxylin. Der Grad der Dottereinlagerung (Reifezustand) in der Oocyte ist an der braunen Färbung erkennbar. Balken = 250  $\mu\text{m}$ .

fv = Oocyte in früher Vitellogenese, sv = Oocyte in später Vitellogenese, ls = Oocyte in Lipidstadium und af = atretischer Follikel.

Die Männchen zeigten von April bis Anfang März unreife Gonaden in früher Spermatogenese (Anhang 2, I). Bis Mitte Mai waren alle Hoden der adulten Männchen in später Spermatogenese und nach diesem Zeitpunkt waren die Hoden reif (Mitte Juni) (Anhang 2, I). Nach Juli wurden nur noch abgelaichte Gonaden gefunden.

### 3.7. Erste sexuelle Reife bei Weibchen

In Abbildung 14 sind die Ergebnisse der endokrinen und histologischen Analyse von Weibchen unterschiedlicher Standardlängen (SL) Klassen von April (späte Ruhephase) zum Mai (frühe Reifephase) gezeigt:

#### Ruhephase (April, Abb. 14a & b)

Weibchen mit einer SL von 90 bis 100 cm zeigten fast undetektierbare Plasmalevel an  $E_2$  (unter  $0,15 \text{ ng ml}^{-1}$ ) und Vtg ( $0,16 \text{ mg ml}^{-1}$ ). Die Ovarien waren unreif mit Oocyten im Prenucleus-Stadium. Der durchschnittliche Oocytendurchmesser war um die  $55 \text{ }\mu\text{m}$ .

Weibchen mit SL zwischen 100 und 110 cm hatten Plasmalevels von  $1,04 \text{ ng ml}^{-1} E_2$  und  $0,93 \text{ mg ml}^{-1}$ . Histologisch waren die Ovarien im gleichen Zustand wie die vorangegangene Klasse und hatten zusätzlich Oocyten in der Lipidphase. Der durchschnittliche Oocytendurchmesser stieg nur leicht um die  $60 \text{ }\mu\text{m}$ .

Bei Weibchen mit einer SL von 110 bis 120 cm wurde ein Plasmalevel von  $1,44 \text{ ng ml}^{-1} E_2$  und  $1,74 \text{ mg ml}^{-1}$  Vtg gemessen. Es gab keine histologischen Unterschiede in den Ovarien zur vorigen Klasse.

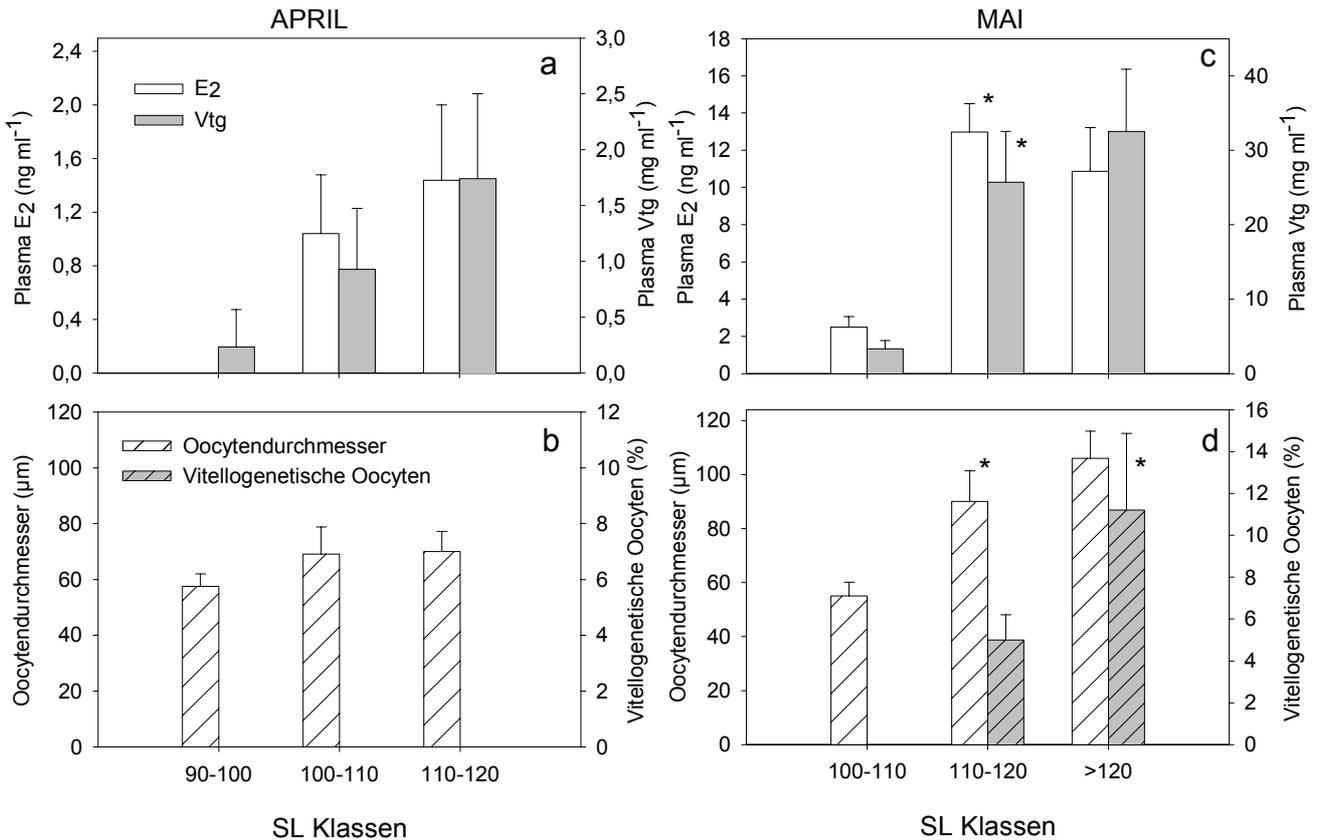
#### Frühe Reifephase (Mai, Abb. 14 c & d)

Weibchen mit einer SL von 100 bis 110 cm zeigten einen leichten Anstieg an  $E_2$  und Vtg im Plasma gegenüber der Ruhephase ( $2,5 \text{ ng ml}^{-1} E_2$  und  $3,33 \text{ mg ml}^{-1}$  Vtg), aber keine Veränderung der Reife des Ovariums.

Bei Weibchen mit einer SL zwischen 110 und 120 wurde eine signifikante Erhöhung des  $E_2$  und des Vtg Plasmalevels festgestellt ( $12,98 \text{ ng ml}^{-1} E_2$  und  $25,70 \text{ mg ml}^{-1}$  Vtg). Der durchschnittliche Oocytendurchmesser vergrößerte sich in dieser SL Klasse ebenfalls signifikant von  $50$  auf  $90 \text{ }\mu\text{m}$  und die histologische Analyse ergab die Anwesenheit von Oocyten in später Vitellogenese.

Weibchen mit einer SL größer als 120 cm zeigten einen Anstieg des Vtg Plasmalevels auf  $32,53 \text{ mg ml}^{-1}$  und einen Anstieg der mittleren Durchmesser der Oocyten auf  $106 \text{ }\mu\text{m}$ . Ebenfalls vergrößerte sich signifikant der Anteil an vitellogenetischen Oocyten von 5% der kleineren SL Klasse auf 11,20% bei dieser Klasse.

Die immunohistochemische Färbung zeigte eine positive Reaktion nur in Ovarien von Weibchen, die im Mai mit einer SL größer als 110 cm gefangen wurden.



**Abb. 14:** Die Standardlänge (SL) der ersten sexuellen Reife bei BFT Weibchen wurde durch Vergleich des Plasma E<sub>2</sub> und Vtg Level (a & c), des durchschnittlichen Oocytendurchmessers und des Anteils an vitellogenetischen Oocyten (b & d) bei verschiedenen SL Klassen in der Vorlaichzeit (a & b, April) und in der Laichzeit (c & d, Mai) untersucht. Eine signifikante Änderung (\*) in der Laichzeit Mai, der untersuchten Parameter, kam es ab den SL Klassen von 110 cm (c & d); N = 7.

### 3.8. Der Reproduktionszyklus des BFT im Mittelmeer

Die Bestimmung des saisonalen, reproduktiven Zyklus der vorliegenden Arbeit gelang nur für den zentralen und partiell für den westlichen Mittelmeerraum. Die Proben aus dem östlichen Mittelmeer erlaubten keine Beschreibung einer Veränderung des reproduktiven Stadiums.

Die beschriebenen Monate wurden in 6 Tage Clusters geteilt, damit die Saison genau untersucht werden konnte. Die Clusters sind mit römischen Ziffern bezeichnet.

Vom April zum Mai stieg der Plasmalevel des T bei den adulten Weibchen auf individuelle Maximalkonzentrationen von 33 ng ml<sup>-1</sup>. E<sub>2</sub> folgt dem T Level bis zu Konzentrationen von 22 ng ml<sup>-1</sup>. Beide Konzentrationen fielen nach der Laichzeit, Ende Juni bis Mitte Juli, dramatisch ab. Die Konzentration des 11-KT in dieser Phase war niedrig bei 0,68 ± 0,1 ng ml<sup>-1</sup> (N=38).

Bei den adulten Männchen jedoch stieg der 11-KT Plasmalevel auf Individuallkonzentrationen von 70 ng ml<sup>-1</sup> in der analysierten Saison an. Auch bei den Männchen stieg zuerst der T Level bis zu Konzentrationen von 24 ng ml<sup>-1</sup>. Auch hier fallen die Konzentrationen nach der Laichzeit dramatisch ab. Der E<sub>2</sub> Plasmalevel bei adulten Männchen war keiner signifikanten Veränderung ausgesetzt und lag bei einer relativ niedrigen Konzentration von 0,56 ± 0,11 ng ml<sup>-1</sup> (N=60).

In der reproduktiven Phase sind adulte Männchen mit Maximalkonzentrationen im Plasma von  $3 \text{ ng ml}^{-1} \text{ E}_2$  gemessen worden. Bei adulten Weibchen wurden 11-KT Maximalkonzentration von  $1,7 \text{ ng ml}^{-1}$  gemessen. Bei einem Weibchen vom Mai wurde eine abnormale Plasmakonzentration von  $23 \text{ ng ml}^{-1}$  11-KT gemessen. Das Ovarium von diesem Weibchen erschien aber histologisch nicht abnormal.

Bei sexuell unreifen und juvenilen Tieren wurden Plasmakonzentrationen der Steroide T und 11-KT bis  $1 \text{ ng ml}^{-1}$  gemessen.  $\text{E}_2$  erreichte Konzentrationen von  $2 \text{ ng ml}^{-1}$ .

### 3.8.1. Der Reproduktionszyklus im zentralen Mittelmeer

#### 3.8.1.1 Weibchen

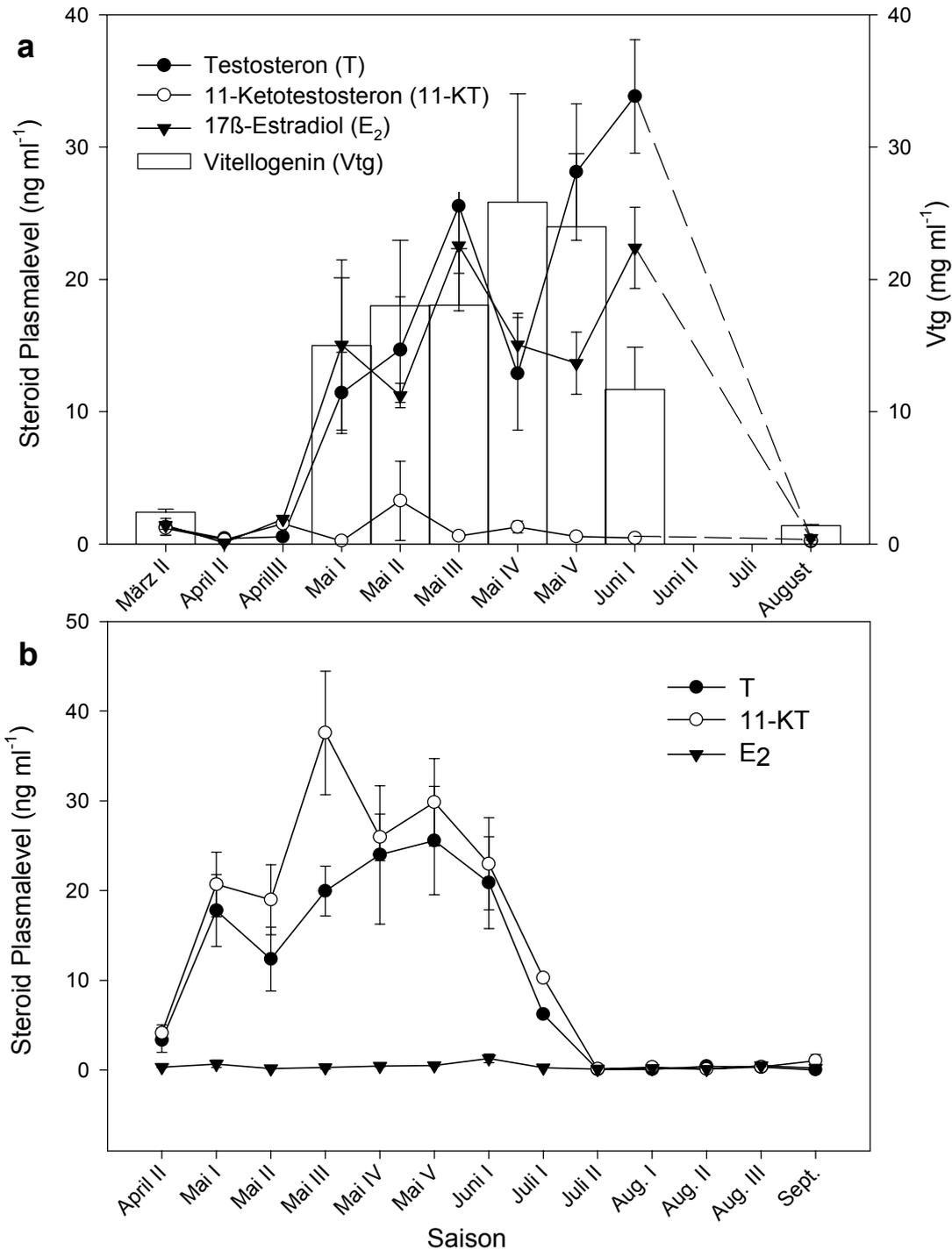
Bei den Weibchen kam es zu einem beginnenden Anstieg der Sexsteroiden T,  $\text{E}_2$  und des Vtg im Plasma Mitte April und erreichte Maximalwerte während Mai und Anfang Juni, wobei die höchste Vtg Konzentration in der zweiten Hälfte von Mai (Mai IV) gemessen wurde (Abb. 15a). Die Plasmakonzentration von T überstieg Ende Mai und Anfang Juni die  $\text{E}_2$  Konzentration, während Anfang Juni die Vtg Plasmakonzentration signifikant abnahm. Der reproduktive Zyklus ist in dieser Zeit auf einer maximalen, endokrinen Aktivität. Der Zyklus wird durch Messungen im September geschlossen, in diesem Monat fallen die Plasmakonzentrationen der Sexsteroiden und Vtg auf minimale Werte. Es konnten keine adulten Weibchen ab Mitte Juni bis Ende August untersucht werden, daher kann für diese Periode keine Aussage gemacht werden (in Abb. 15a ist dies mit einer gestrichelten Linie angedeutet). Das Androgen 11-KT zeigte keine signifikante Veränderung im Zyklus.

Die Korrelation von dem  $\text{E}_2$  und dem Vtg Plasmalevel mit dem Stadium der Ovarien zeigte eine klare Abhängigkeit voneinander (Abb. 16). Die endokrinen Parameter sind eindeutig an den Veränderungen des Reifezustandes der Ovarien gekoppelt, was sich auch dadurch bemerkbar macht, dass die Standardabweichung kleiner ist, als wenn der Zyklus ohne Berücksichtigung der Gonadenreife dargestellt wird (vergleiche Abb. 15a und 16a). Ab Mai bis Juni befanden sich die  $\text{E}_2$  und Vtg Plasmawerte bei Maximalkonzentrationen und die Ovarien sind in dieser Periode im Reifestadium 3 (Abb. 16a). Vom ersten Reifestadium zum Zweiten stiegen  $\text{E}_2$  ( $0,27 \pm 0,03 \text{ ng ml}^{-1}$ ) und Vtg ( $0,70 \pm 0,70 \text{ mg ml}^{-1}$ ) nicht signifikant auf  $1,48 \pm 0,41 \text{ ng ml}^{-1} \text{ E}_2$  und  $1,05 \pm 1,05 \text{ mg ml}^{-1} \text{ Vtg}$ . Vom zweitem zum drittem Reifestadium kommt es zu einer dramatischen Erhöhung auf  $16,5 \pm 2,16 \text{ ng ml}^{-1} \text{ E}_2$  und  $22,8 \pm 2,8 \text{ ng ml}^{-1} \text{ Vtg}$  (Abb. 16b).

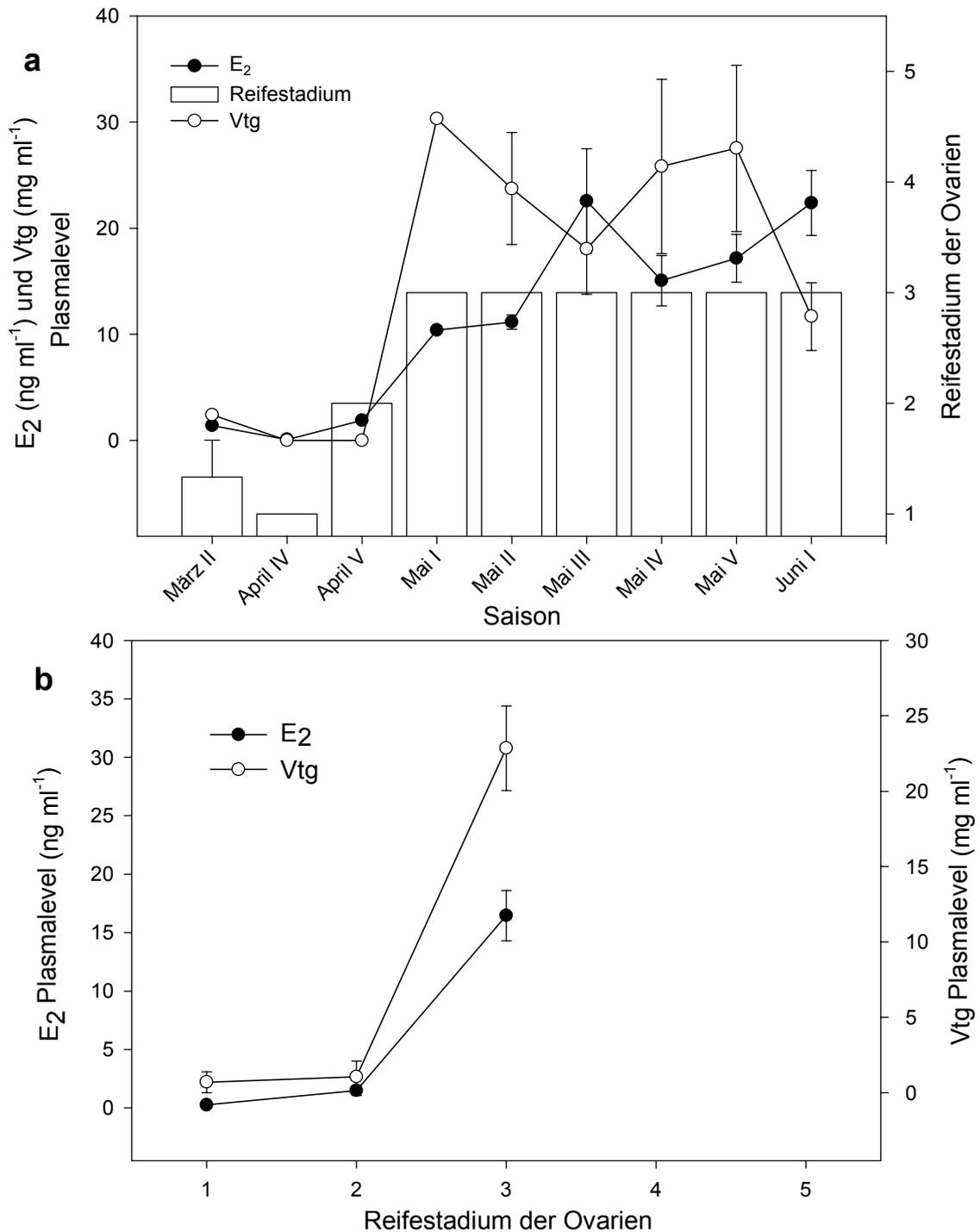
#### 3.8.1.2 Männchen

Wie bei den Weibchen beginnt der Plasmalevel der Sexsteroiden vom April zum Mai an zu steigen, wobei hier 11-KT und T die wesentlichen Steroide sind, die für die Reproduktion wichtig erscheinen (Abb. 15b). Die Konzentration des Östrogens  $\text{E}_2$  verändert sich im Verlauf der Saison nicht und bleibt auf Minimalwerten.

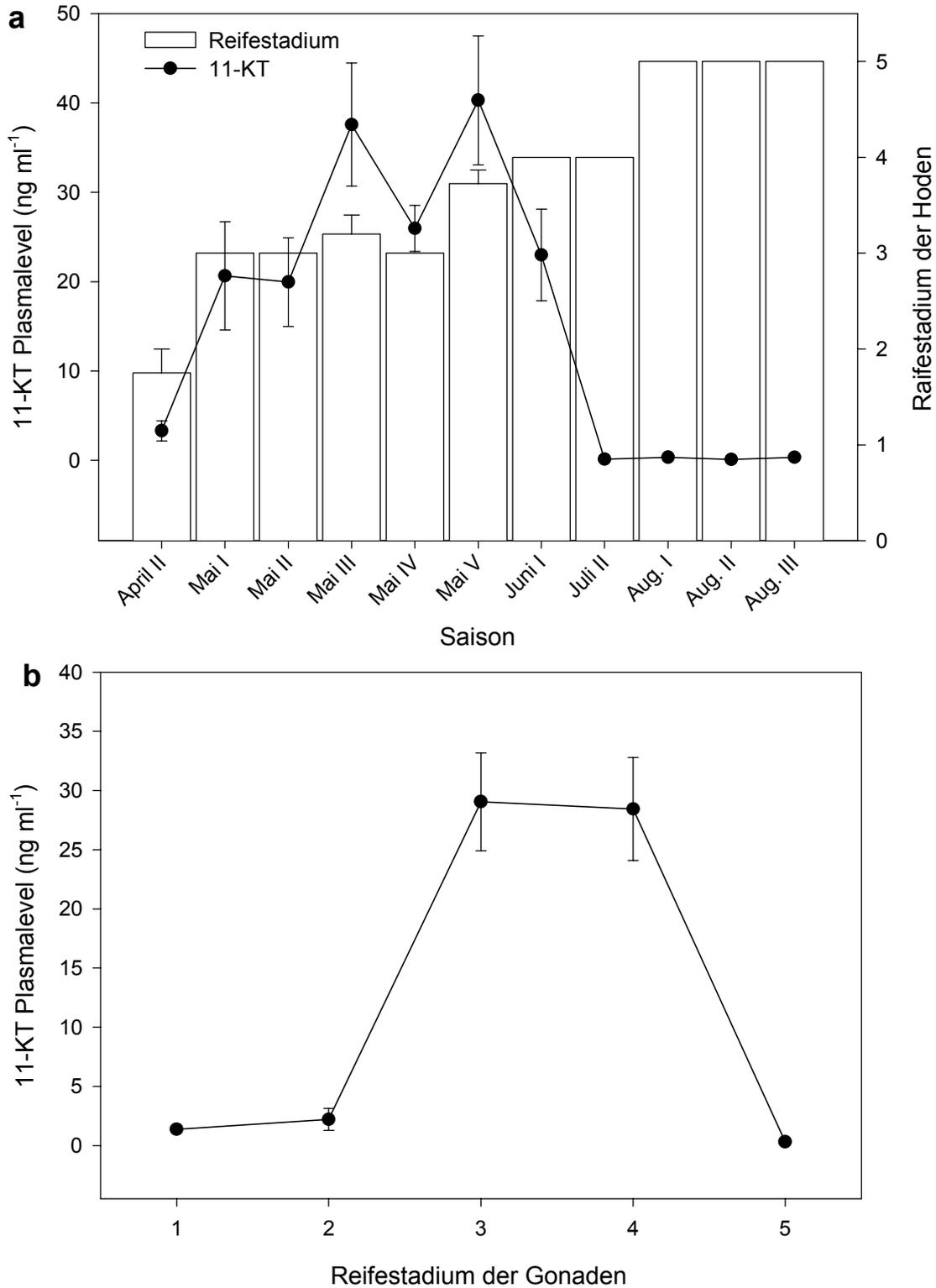
Bei den Männchen ist bereits Mitte Mai (Mai III) ein Maximum der 11-KT Plasmakonzentration erreicht. Das T Maximum wurde Ende Mai erreicht, wobei die Konzentration stets niedriger war als die von 11-KT. Ab Anfang Juni kam es zu einem kontinuierlichen Abnehmen der 11-KT und T Plasmakonzentration und erreichte in der zweiten Juliwoche bis September Minimalwerte. Der saisonale männliche Zyklus entspricht dem der Weibchen.



**Abb. 15:** Saisonale Veränderung der sexspezifischen Steroide. a) Bei den Weibchen ist Ende Mai eine maximale Konzentration von Vtg erreicht, wobei E<sub>2</sub> und T zum Juni wieder steigen. Daten vom Juli fehlen (gestrichelte Linie). N = 64, wobei für jede Periode 5 bis 10 Proben zur Verfügung standen. b) Bei den Männchen zeigen sich über dem ganzen Mai Maximalkonzentrationen von T und 11-KT, die im Juni wieder sinken. N = 66, wobei für jede Periode 5 bis 10 Proben zur Verfügung standen, außer für Juli I, wo nur 1 Tier gemessen wurde. 11-KT bei den Weibchen und E<sub>2</sub> bei den Männchen bleiben im Zyklus unverändert auf Minimalwerten. Die T Konzentration ist bei beiden Geschlechtern einer saisonalen Veränderung ausgesetzt. Die untersuchten Monate wurden in 6 Tage Clusters geteilt, damit die Saison genau untersucht werden konnte. Die Clusters sind mit römischen Ziffern bezeichnet.



**Abb. 16:** Korrelation der sexspezifischen Steroide mit dem Reifestadium der Ovarien beim Weibchen in der saisonalen Veränderung (a) und im direkten Zusammenhang (b). Eine dramatische Erhöhung der Steroidkonzentration findet vom 2. zum 3. Reifestadium statt. Es lagen für diese Untersuchung keine Tiere im Reifestadium 4 und 5 vor. Die untersuchten Monate wurden in 6 Tage Clusters geteilt, damit die Saison genau untersucht werden konnte. Die Clusters sind mit römischen Ziffern bezeichnet.



**Abb. 17:** Korrelation der sexspezifischen Steroide mit dem Reifestadium der Hoden beim Männchen in der saisonalen Veränderung (a) und im direkten Zusammenhang (b). Ein Peak der Steroide ist im Reifestadium 3 und 4 erreicht. Die untersuchten Monate wurden in 6 Tage Clusters geteilt, damit die Saison genau untersucht werden konnte. Die Clusters sind mit römischen Ziffern bezeichnet.

Der männlich-spezifische 11-KT Plasmalevel erschien in einem eindeutigen Zusammenhang mit dem Reifezustand der Hoden (Abb. 17a). Diese Abhängigkeit zeigt sich wie bei den Weibchen auch dadurch, dass die Standardabweichung kleiner wird, wenn die Steroidkonzentration in direktem Bezug zum Reifestadium gesetzt wird (Abb. 17b).

Vom ersten Reifestadium zum Zweiten stieg die 11-KT Konzentration von  $1,37 \pm 0,27 \text{ ng ml}^{-1}$  auf  $2,21 \pm 0,93 \text{ ng ml}^{-1}$ . Ein dramatischer Anstieg wurde zwischen dem Reifestadium 2 und 3 festgestellt ( $29,05 \pm 4,14 \text{ ng ml}^{-1}$ ) und fiel leicht zum Reifestadium 4 wieder ab auf  $28,4 \pm 4,4 \text{ ng ml}^{-1}$ . Im Reifestadium 5 wurden Minimalkonzentrationen von  $0,29 \pm 0,13 \text{ ng ml}^{-1}$  gemessen.

Wie bei den Weibchen ergab die Zuordnung der Steroidplasmakonzentrationen, der spezifischen Hormone zu einem bestimmten Reifestadium, ein genaueres Beschreiben der endokrinen Veränderung im reproduktiven Zyklus (Abb. 16b und 17b).

### 3.8.2. Der Reproduktionszyklus im westlichen Mittelmeer

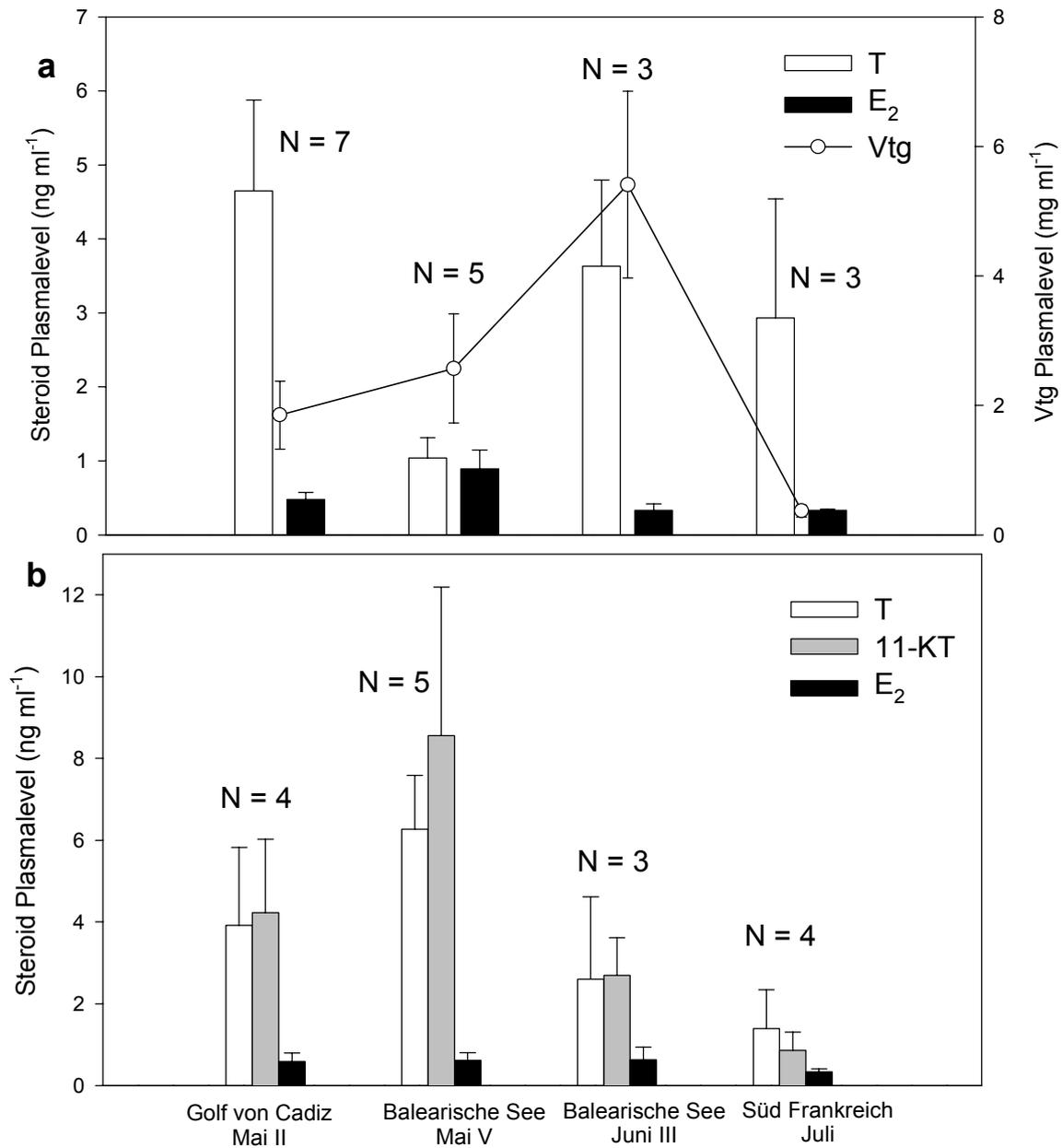
Die analysierten Proben stammen aus dem Golf von Cadiz (Atlantik), der Balearischen See und Südfrankreich. Bei den Tieren aus dem Golf von Cadiz handelte es sich um ins Mittelmeer migrierende Tiere, so dass diese eine wichtige Information liefern über den reproduktiven, endokrinen Zustand vom Anfang des Zyklus. Für diese Analyse war keine Untersuchung der Gonaden möglich und die Anzahl der untersuchten Tiere ( $N = 34$ ) war weit geringer als im zentralen Mittelmeer.

#### 3.8.2.1. Weibchen

Abbildung 18a zeigt den weiblichen Zyklus im westlichen Mittelmeer. In der zweiten Maiwoche (Mai II) wurde bei den Weibchen im Golf von Cadiz bereits ein T Plasmalevel von  $4,65 \pm 1,23 \text{ ng ml}^{-1}$  gemessen. Die  $E_2$  Konzentration betrug  $0,48 \pm 0,1 \text{ ng ml}^{-1}$  und die Vtg  $1,85 \pm 0,53 \text{ mg ml}^{-1}$ . In der zweiten Maihälfte (Mai V) kam es zu einem Absinken der T Plasmakonzentration auf  $1,04 \pm 0,28 \text{ ng ml}^{-1}$ , aber zu einem Anstieg des  $E_2$  ( $1,58 \pm 0,32 \text{ ng ml}^{-1}$ ) und Vtg ( $2,37 \pm 0,84 \text{ mg ml}^{-1}$ ) Plasmakonzentration in der Balearischen See. Mitte Juni (Juni III) wurde ein dramatischer Anstieg von T auf  $3,63 \pm 1,17 \text{ ng ml}^{-1}$  und von Vtg auf  $5,41 \pm 1,44 \text{ mg ml}^{-1}$  gemessen, wobei  $E_2$  wieder auf  $0,33 \pm 0,09 \text{ ng ml}^{-1}$  sank. Im Juli sank in Südfrankreich die Vtg Plasmakonzentration auf Minimalwerte von  $0,37 \pm 0,09 \text{ ng ml}^{-1}$ . Auch T ( $2,93 \pm 1,61 \text{ ng ml}^{-1}$ ) sank leicht und  $E_2$  ( $0,33 \pm 0,02 \text{ ng ml}^{-1}$ ) blieb bis zum Juli kaum verändert. 11-KT spielt auch hier keine Rolle für den reproduktiven Zyklus und wurde wegen der Übersicht in der Abbildung 18 nicht mitdargestellt.

#### 3.8.2.2. Männchen

Abbildung 18b zeigt den männlichen Zyklus.  $E_2$  erfährt keine saisonale Veränderung, bleibt bei Minimalkonzentrationen und spielt somit keine Rolle für den reproduktiven Zyklus. Im Golf von Cadiz (Mai II) wurden Konzentrationen für T  $3,92 \pm 1,9 \text{ ng ml}^{-1}$  und für 11-KT  $4,23 \pm 1,8 \text{ ng ml}^{-1}$  gemessen. Diese beiden Androgene erreichen in der zweiten Maihälfte in der Balearischen See einen Peak mit Maximalkonzentrationen von T  $6,27 \pm 1,31 \text{ ng ml}^{-1}$  und 11-KT  $8,58 \pm 3,62 \text{ ng ml}^{-1}$ . In der zweiten Junihälfte (Juni III) sanken die Steroidkonzentrationen stark auf  $2,6 \pm 2,01 \text{ ng ml}^{-1}$  T und  $2,7 \pm 0,92 \text{ ng ml}^{-1}$  11-KT und zum Juli in Südfrankreich weiter leicht auf  $1,39 \pm 0,96 \text{ ng ml}^{-1}$  T und  $0,86 \pm 0,45 \text{ ng ml}^{-1}$  11-KT.



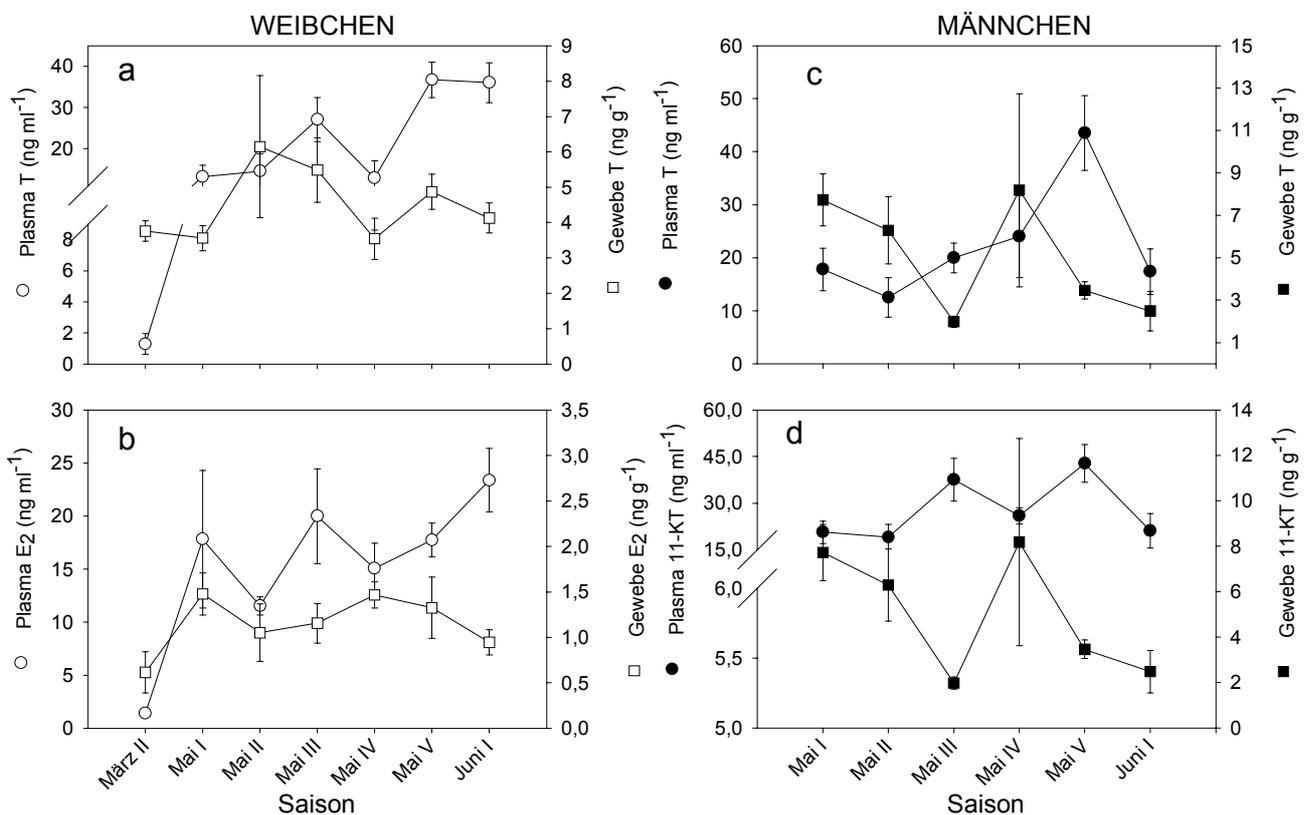
**Abb. 18:** Reproduktiver Zyklus im westlichen Mittelmeer. a) Bei den Weibchen zeigt sich ein Peak des Vtg im Plasma in der zweiten Hälfte vom Juni (Juni III), wobei das Vtg-induzierende E<sub>2</sub> einen Peak Ende Mai (Mai V) zeigt. T zeigt eine relativ hohe Konzentration bereits im Golf von Cadiz (Mai II), fällt wieder (Mai V) und hat einen Peak zur gleichen Zeit wie das Vtg. b) Bei den Männchen zeigt sich der Peak der sexspezifischen Steroide T und 11-KT Ende Mai (Mai V). Wie durch die Anzahl der Proben ersichtlich, gelang es im westlichen Mittelmeer nur wenige Proben zu analysieren mit bekanntem Geschlecht. Die untersuchten Monate wurden in 6 Tage Clusters geteilt, damit die Saison genau untersucht werden konnte. Die Clusters sind mit römischen Ziffern bezeichnet.

### 3.9. Korrelation der Steroide und des Vtg im Plasma und im Muskelgewebe

Für die Weibchen zeigte sich eine gute Korrelation der spezifischen Steroide T und E<sub>2</sub> zwischen Plasma und Gewebe (Abb. 19 a & b). Die saisonalen Schwankungen der Plasmakonzentrationen im Gewebe entsprachen weitgehend denen im Plasma, wobei beim T das Profil fast identisch war.

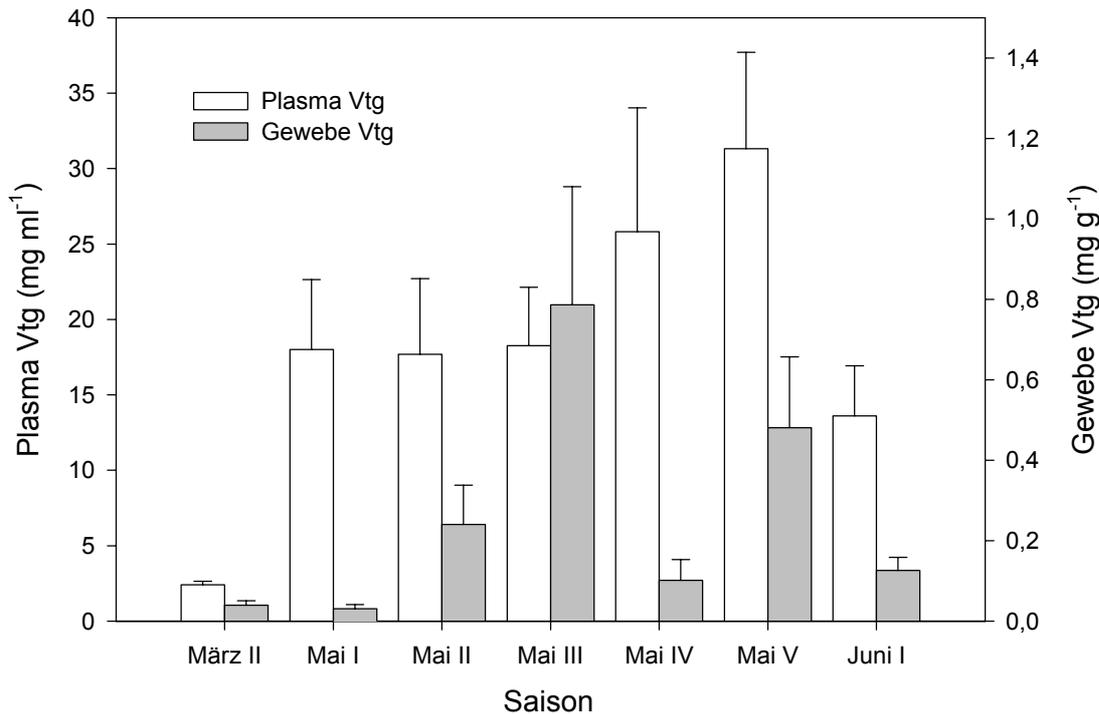
Bei den Männchen erschien die Korrelation der Konzentration von T im Gewebe zum Plasma etwas versetzt, die Relation ist jedoch im Mai III entgegengesetzt (Abb. 19c). Für 11-KT konnte keine Korrelation der saisonalen Veränderung zur Plasmakonzentration festgestellt werden, wobei aber die gemessenen Konzentrationen im Gewebe in der analysierten reproduktiven Saison (Abb. 19d) signifikant messbar waren zum Gewebe von juvenilen Tieren, deren 11-KT Gewebekonzentration nicht detektierbar waren.

Die quantitative Messung des Vtg im Gewebe zeigte keine direkte Korrelation mit dem Plasma (Abb. 20). Es konnte aber bis auf die Periode Mai IV eine saisonale Veränderung des Vtg Gehaltes im Gewebe gezeigt werden, die dem reproduktiven Zyklus entspricht.



**Abb. 19:** Korrelation der sexspezifischen Steroidkonzentrationen im Plasma und Gewebe.

Bei den Weibchen zeigte sich eine gute Übereinstimmung mit T (a) und auch für E<sub>2</sub> (b) waren die Profile annähernd gleicher Tendenz. Bei den Männchen erschien das T Profil im Gewebe zum Plasma um eine Periode versetzt (c), bei 11-KT konnte allerdings keine Korrelation festgestellt werden (d). Für die Männchen standen nur über einem kurzen Zeitraum Plasma mit korrespondierendem Gewebe zur Verfügung. Zu beachten ist, dass die Konzentrationen im Gewebe um eine Potenz niedriger sind. Die untersuchten Monate wurden in 6 Tage Clusters geteilt, damit die Saison genau untersucht werden konnte. Die Clusters sind mit römischen Ziffern bezeichnet.



**Abb. 20:** Die Vtg Konzentration im Plasma korreliert nicht direkt mit der Konzentration im Gewebe. Eine saisonale Veränderung ist aber auch im Gewebe bis auf Mai IV deutlich erkennbar, wobei hier die Qualität des Gewebes schlechter war als für die übrigen Perioden; N = 6. Die untersuchten Monate wurden in 6 Tage Clusters geteilt, damit die Saison genau untersucht werden konnte. Die Clusters sind mit römischen Ziffern bezeichnet.

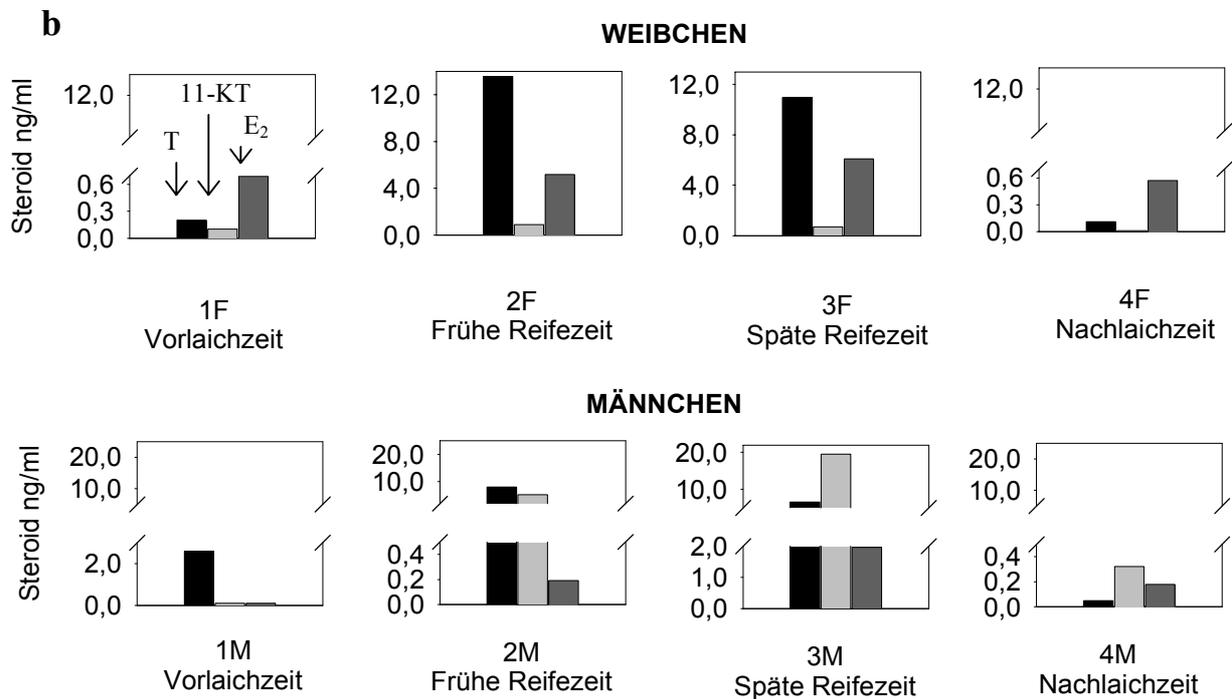
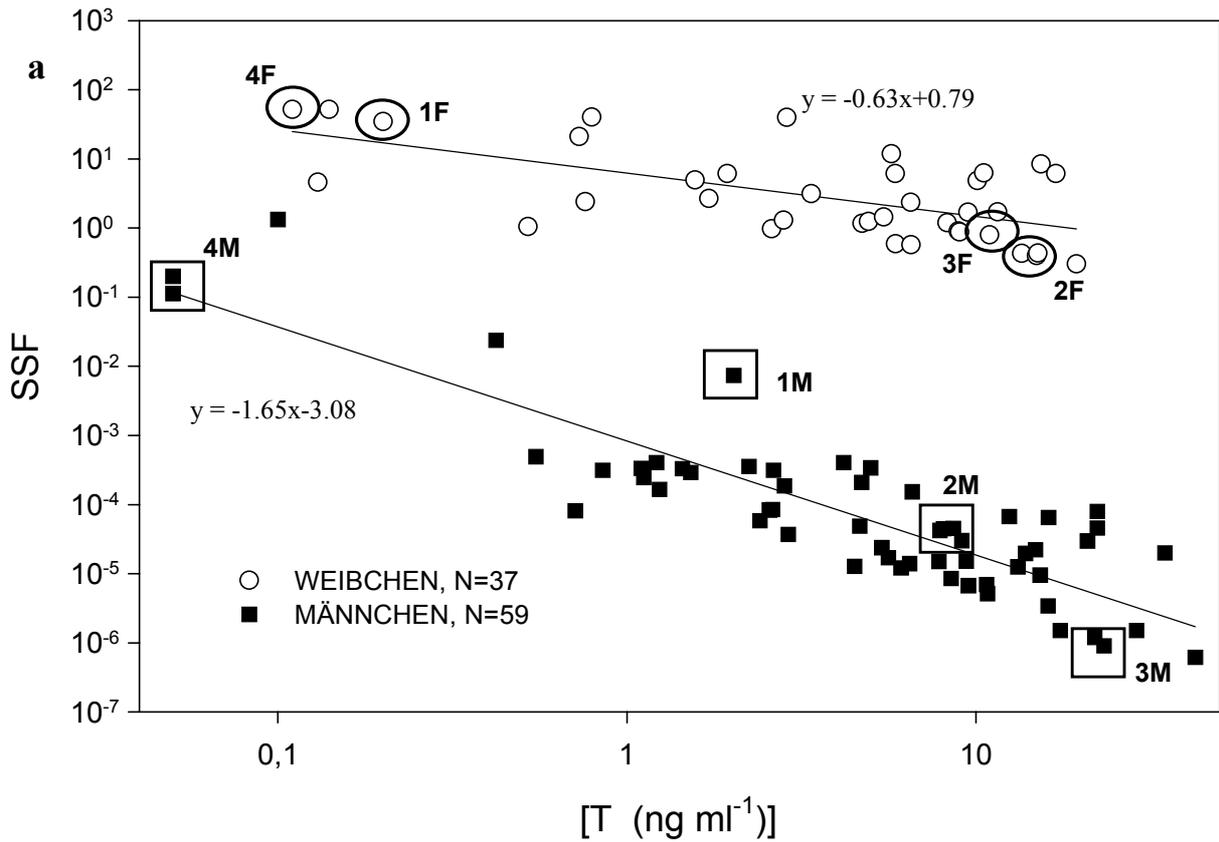
### 3.10. Determination des Geschlechts und Reifestadiums

Für die Bestimmung des Geschlechts wurden geschlechtsspezifische Steroide verwendet, wobei die drei erwähnten Sexsteroiden untersucht wurden. Es wurde nach der Bedeutung dieser Steroide im reproduktiven Zyklus gesucht. Das Verhältnis der Konzentrationen zwischen den einzelnen Sexsteroiden wurde untersucht und einem bestimmten Geschlecht zugeordnet. Ergänzend wurde die Analyse von Vtg verwendet. Zur Kontrolle dieser Analysen wurden die histologischen Daten hinzugezogen.

Durch die sexspezifischen, saisonalen Charakteristiken der Steroidhormone im reproduktiven Zyklus (siehe Kapitel 3.8.), konnten die Konzentrationen der drei untersuchten Sexsteroiden in Relation gesetzt werden und eine sexspezifische Ratio determiniert werden. Die Steroid Sexratio Formel (SSF) wurde berechnet durch

$$SSF = \frac{([E_2]/[11-KT])}{[T]}$$

In Abbildung 21 wurde die SSF in Bezug auf die reproduktive Reife durch T (Abb. 21a) und durch das gesamte saisonale Steroidprofil mit histologischer Reife der Gonaden (Abb. 21b) in einer doppeltlogarithmischen Auftragung dargestellt. Bestimmte Steroidprofile bei einer bestimmten reproduktiven Reife (Abb. 21b) wurden mit der korrespondierenden SSF



**Abb. 21:** a) Doppelt logarithmische Auftragung der SSF  $[(E_2/11-KT)/T]$  gegen die T Konzentration im Plasma. Es ergibt sich eine Regressionsgerade für Weibchen mit höheren SSF und eine mit niedrigeren SSF für Männchen. Die T Konzentration spiegelt die reproduktive Reife wieder, was eine Erniedrigung des SSF zur Folge hat. b) Steroidprofile ausgewählter Tiere mit korrespondierendem SSF in verschiedenen reproduktiven Phasen, die in a) durch Kreise (W = Weibchen) und Quadrate (M = Männchen) hervorgehoben sind. Die Ziffern beziehen sich auf den Reifegrad, 1 bis 4 = Vor- bis Nachlaichzeit.

im Plot (Abb. 21a) verglichen, um einen Zusammenhang zwischen reproduktivem Reifezustand und Geschlecht mit SSF zu untersuchen. Es zeigte sich eine sexspezifische SSF, durch die Weibchen und Männchen auseinander gehalten werden konnten und eine Evolution je nach reproduktiver Reife nachweisbar wurde. Bestimmte Steroidprofile und Reifezustände (in Abb. 21b gekennzeichnet durch Ziffer für Reifegrad und M/F für Geschlecht) konnten bestimmten SSF zugeordnet werden und somit konnte eine Aussage nicht nur über das Geschlecht sondern auch über den reproduktiven Status gemacht werden. Es wurden zwei Regressionsgeraden gefunden, die sich statistisch signifikant unterschieden ( $p < 0,001$ , F-Test für den Vergleich zweier Regressionsgeraden). Die SSF resultierte von dem unterschiedlichen sex- und reifespezifischen Steroidprofil. Höhere SSF wurden für Weibchen berechnet ( $> 0,34$ ) und niedrigere SSF für Männchen ( $< 0,34$ ). Mit steigender T Konzentration wurden SSF sowohl bei den Weibchen, wie bei den Männchen, niedriger, wobei bei den Männchen dieser Zusammenhang deutlicher war, das sich durch die größere Steigung ( $\Delta \log \text{SSF} / \Delta \log T$ ) bei den Männchen zeigte (Weibchen  $-0,63$ ; Männchen  $-1,65$ ). Dieser Zusammenhang konnte auch für die Analyse von Muskelgewebe nachgewiesen werden (Abb. 22), wobei hier die SSF, bedingt durch die niedrigeren Konzentrationen, alle unter 1 und bei beiden Geschlechtern enger beieinander lagen. Für Männchen wurde ein charakteristischer SSF unter 0,27 und für Weibchen von über 0,24 determiniert. Auch für den Muskel wurden niedrigere SSF mit steigender T Konzentration bei Männchen berechnet, was nicht für Weibchen nachgewiesen werden konnte. Die Steigung der Regressionsgeraden im Plasma waren von denen im Gewebe (Weibchen  $-0,18$ ; Männchen  $-1,33$ ), außer für die Männchen, nicht signifikant vergleichbar.

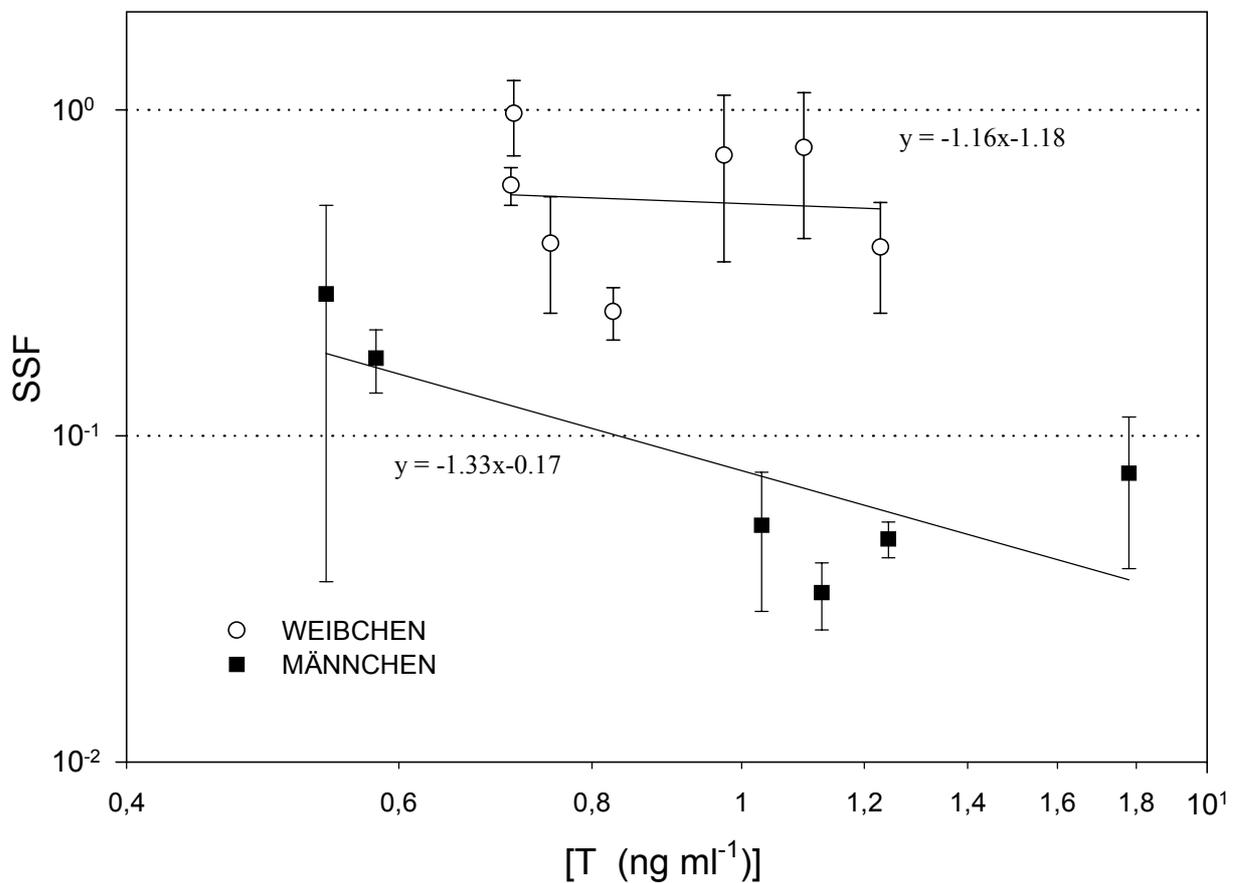
Das Limit mit dem SSF das Geschlecht und der reproduktive Status determiniert werden konnte, war bei juvenilen, sexuell unreifen und abgelaichten Fischen erreicht. Bei diesen Fischen waren teilweise die verschiedenen Steroide kaum messbar.

Die saisonale Veränderung des SSF resultierte auch in ein sexspezifisches Profil (Abb. 23). Wie in Abbildung 24 gezeigt, wurde eine direkte Korrelation des SSF mit dem Reifestadium der Gonaden gefunden, so dass die Evolution des SSF im reproduktiven Zyklus darauf zurückzuführen ist (Abb. 23). Hier zeigte sich, dass das SSF in den untersuchten Monaten März, August und September eine kritische Zeit für die Bestimmung von Geschlecht und Reifestadium waren. Diese Monate sind mit dem Reifestadium 1, 2 und 5 assoziiert (Abb. 24, siehe auch Kapitel 3.8.).

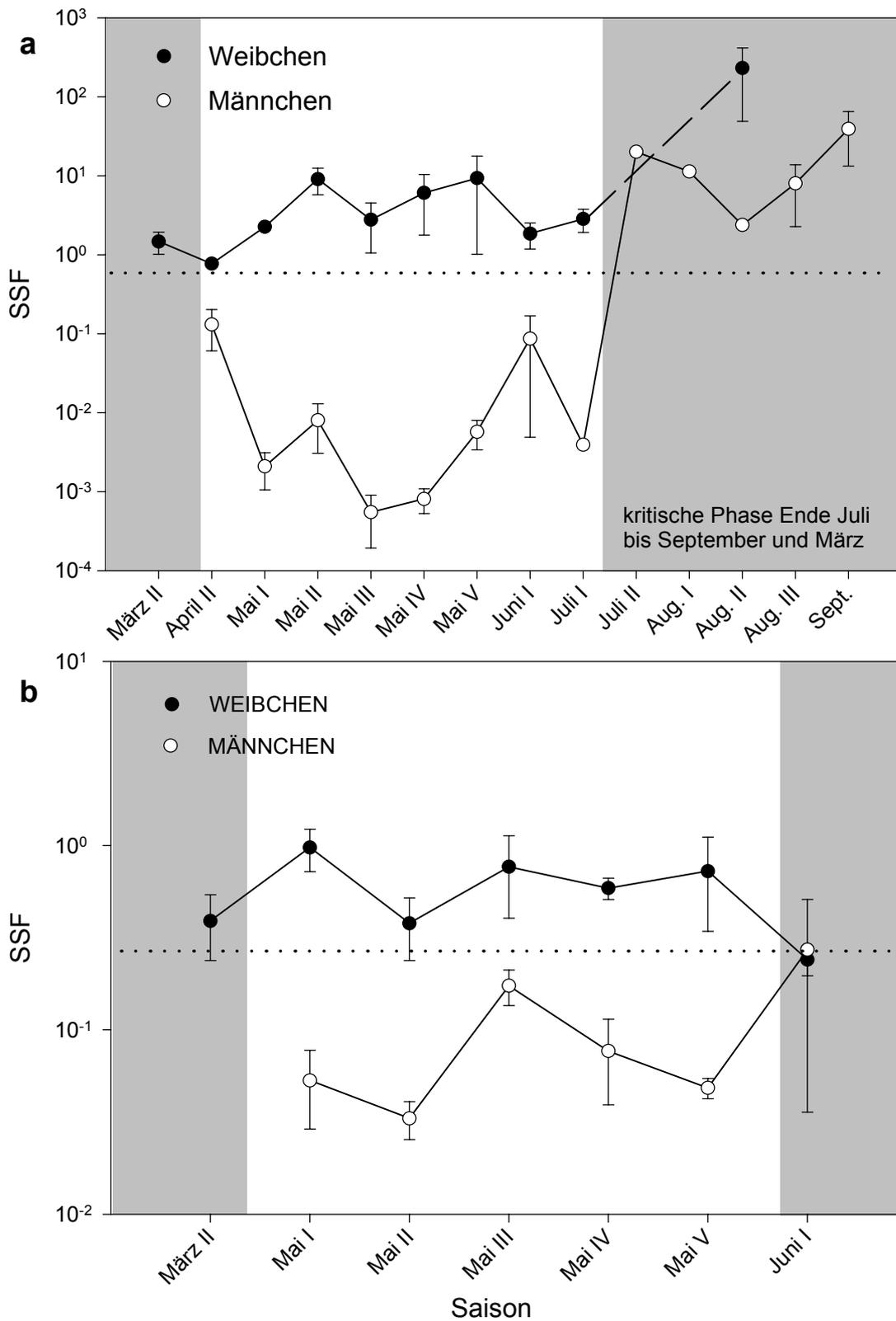
Die Bestimmung des Geschlechts und des Reifestadiums konnte weiterhin durch die Analyse des Vtg näher untersucht werden. Zum SSF konnte die quantitative (siehe Kapitel 3.4.2.) und qualitative (siehe Kapitel 3.5.) Bestimmung von Vtg hinzugezogen werden. Dadurch konnten Proben, die keinen spezifischen SSF aufwiesen, einem Geschlecht und einem Reifestadium zugeordnet werden. Aber auch hier erwiesen sich von der untersuchten Periode März, August und September als kritische Monate.

Von 106 BFT Proben (Plasma und Gewebe), von denen eine sichere Überprüfung des Geschlechts möglich war, wurde, wie oben erläutert, blind eine Geschlechtsbestimmung durchgeführt. Die Proben stammen aus der gesamten untersuchten Saison. Der SSF lieferte eine 85%ige Übereinstimmung mit der histologischen Klassifizierung. In den kritischen Monaten März, August und September oder bei Tieren im kritischen Reifestadium 1,2 und 5 wurde nur eine 40%ige Übereinstimmung gefunden. Wurde bei diesen Tieren die Vtg Analyse hinzugezogen konnte die Übereinstimmung auf 70% gesteigert werden, so dass über die ganze Saison die Geschlechtsbestimmung in 93% richtig erfolgte. Im Gewebe wurde allerdings eine geringere Übereinstimmung von 66% mit dem SSF erreicht und konnte mit der Vtg Analyse auf 71% korrigiert werden.

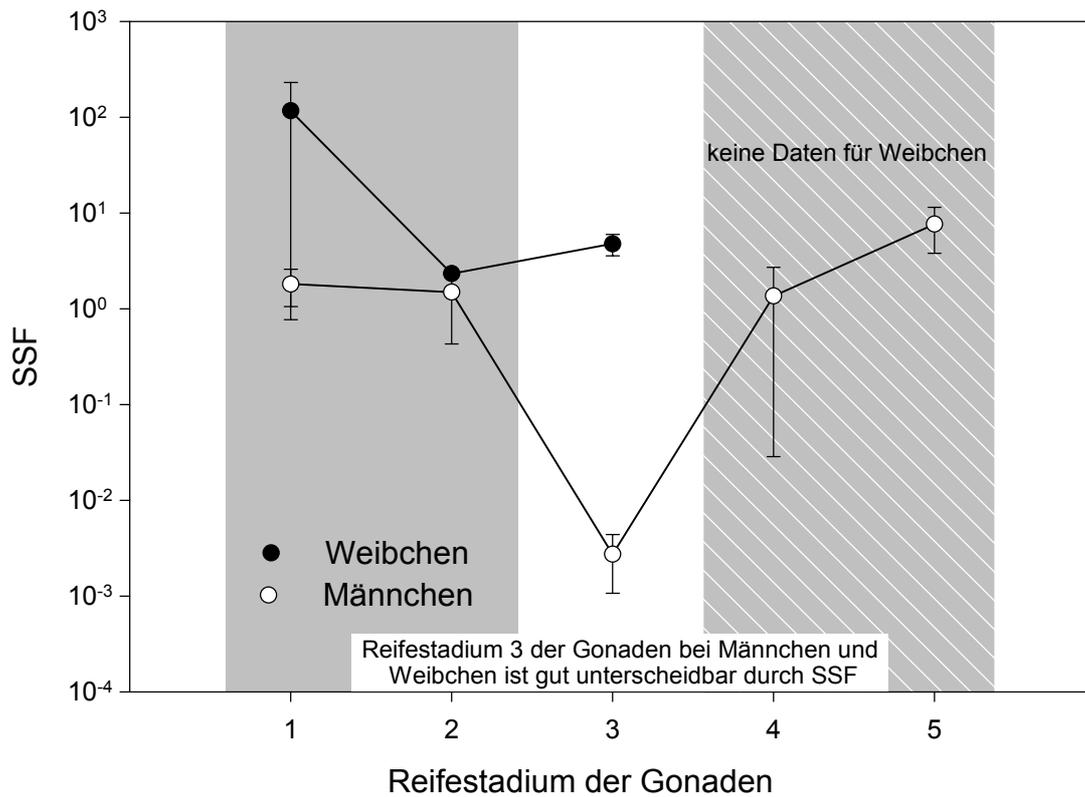
Die Untersuchung des Reifestadiums ist, wie oben beschrieben, auch durch die Größe des SSF, durch die Konzentration von T oder/und Vtg bei diesen Tieren möglich gewesen. Es entsprach gleichzeitig der Übereinstimmung mit der Geschlechtsbestimmung.



**Abb. 22:** Doppelt logarithmische Auftragung des SSF ( $[(E_2/11-KT)/T]$ ) gegen der T Konzentration im Gewebe. Es ergibt sich eine Regressionsgerade für Weibchen mit höheren SSF und eine mit niedrigeren SSF für Männchen. Die T Konzentration spiegelt die reproduktive Reife wieder, was eine Verkleinerung des SSF bei den Männchen aber nicht bei den Weibchen zur Folge hat.



**Abb. 23:** Die saisonale Veränderung des SSF ( $[(E_2/11-KT)/T]$ ) im Plasma (a) und Gewebe (b). Beide Geschlechter können bis auf die Grauzonen gut unterschieden werden. Die untersuchten Monate wurden in 6 Tage Clusters geteilt, damit die Saison genau untersucht werden konnte. Die Clusters sind mit römischen Ziffern bezeichnet.



**Abb. 24:** Die SSF ( $[(E_2/11-KT)/T]$ ) ist bei Männchen und Weibchen mit dem Reifestadium der Gonaden korreliert, wobei das Reifestadium 3 bei beiden Geschlechtern am deutlichsten unterscheidbar ist. Die graue Zone im 1. und 2. Reifestadium zeigt eine kritische Phase für eine sexspezifische SSF Berechnung an. Die gestreifte graue Zone stellen Reifestadien dar, bei denen keine genaue sexspezifische Analyse gemacht werden konnte, da keine vollständigen Daten für diese Analyse für Weibchen mit Gonaden im Reifestadium 4 und 5 zur Verfügung standen.

#### 4. Diskussion

Die Reproduktionsbiologie eines faszinierenden und ökonomisch so wichtigen Fisches, wie der in dieser Arbeit untersuchte Rote Thun (BFT), kann viel zum Verständnis der allgemeinen Biologie und der ökologischen Rolle der Spezies beitragen. Es hat sich in der Biologie immer wieder bestätigt, dass das Einzelne („mikroskopische Biologie“) immer wieder zum Ganzen („makroskopische Biologie“) und umgekehrt führt.

Die Bestimmung des reproduktiven Status ist eine Notwendigkeit für jegliches Vorhaben im Management der Fischressource und die Verwendung des Vitellogenins (Vtg), zum Beispiel als Indikator, ist bereits eine weitverbreitete Standardmethode bei vielen Fischen (Mañanos *et al.*, 1994a ; Bon *et al.*, 1997; Mosconi *et al.*, 1998). In der vorliegenden Arbeit ist nun eine Basis gelegt worden, um Methoden zu entwickeln, die das Verstehen der Reproduktionsbiologie des BFT besser erfassen können und ein besseres Management der Fischressource ermöglichen könnten.

##### 4.1. Kritische Betrachtung

Bei vielen Fischpopulationen in der Wildbahn, wie bei dem großen und pelagisch lebenden BFT, ist das Studium der Reproduktionsbiologie auf endokriner Basis kein leichtes Unternehmen. Wie schon geschildert wurde, ist es ein Problem, Plasmaproben zu bekommen. Dies war um so schwieriger hinsichtlich der Reinigung des Vtg, die nur aus frischem Plasma von sexuell reifen Weibchen (in Vitellogenese) möglich ist. Um genaue Analysen der Steroidhormone, des Vtg und der Gonaden durchzuführen, war es äußerst wichtig qualitativ gute Proben zu bekommen. Aufgrund dieser Schwierigkeiten und trotz eines Interesses für diese Thunfischart (Heppell & Sullivan, 1999a), beschränkte man sich bislang auf histologische und makroskopische Untersuchungen der Reproduktionsbiologie des BFT (Rodríguez-Roda, 1964 & 1967 und Baglin, 1982). Deswegen wurde für die Realisierung der vorliegenden Arbeit viel Energie für eine möglichst gute und komplette Probennahme verwendet. Dies aber konnte nicht verhindern, dass es nicht gelang, im östlichen Mittelmeer eine Untersuchung durchzuführen. Auch im westlichen Mittelmeer gelang die Probennahme nicht vollständig und die endokrinen Parameter konnten nicht mit dem Stadium der Gonadenreife korreliert und somit verifiziert werden. Nur im zentralen Mittelmeer gelang eine weitgehend qualitativ gute und vollständige Probennahme. Auch hier aber kam es bei den Weibchen zu einer Lücke im Juli und August, so dass keine genaue Untersuchung des Reifestadiums 4 und 5 (Laichen und Nachlaichzeit) möglich war.

Unter Berücksichtigung dieser Schwierigkeiten bei Arbeitsbeginn, war eines der Ziele eine Methode zu erarbeiten, welche die endokrine Analyse zukünftig durch die Verwendung von Muskelgewebe erleichtern könnte, wobei dabei die Probennahme viel einfacher ist als die von Plasma oder Gonade. Nach vier bis fünf Stunden koaguliert das Blut im Tier (eigene Beobachtung) und es kann kein Plasma oder Serum gewonnen werden. Die Tiere werden bei der Langlein- oder Netzfischerei für den lokalen Markt nicht ausgenommen, so dass es unmöglich ist, die Gonaden von den Fischen zu bekommen. Auch in den „Tonnare“ ist dies kaum möglich. Die Thunfische werden dort zwar sofort ausgenommen, aber die Gonaden haben einen so hohen Wert, dass es oft nicht erwünscht ist, dass ein Stück davon entnommen wird. Meist ist Muskelgewebe die einzige zur Verfügung stehende Probe. Im Ganzen aber gelang es, eine ausreichende Anzahl an brauchbaren Proben zu bekommen, um viele der Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit zu verwirklichen oder zumindest Wege vorzubereiten für nachfolgende Studien.

## 4.2. Charakterisierung der endokrinen Parameter des BFT

In dieser Arbeit wurde der reproduktive Status des BFT durch die Analyse der spezifischen endokrinen Parameter, der quantitativen Untersuchung der Steroidhormone Testosteron (T), 11-Ketotestosteron (11-KT),  $17\beta$ -Estradiol ( $E_2$ ) und Vtg bestimmt. Die adaptierten ELISA für die Steroidhormone erwiesen sich als sehr leistungsfähig, zuverlässig und sind in früheren Arbeiten validiert worden (Cuisset *et al.*, 1994 und Nash *et al.*, 2000).

Für die Entwicklung des Vtg-ELISA wurde das Vtg erfolgreich spezifisch und effizient gereinigt, wobei die hier verwendete Methode relativ schnell war (zwei Tage) und somit der Proteinverlust geringer. Das Vitellogenin von verschiedenen Fischarten ist während der Reinigung relativ instabil, so dass hohe Verluste in Kauf genommen wurden (So *et al.*, 1985; Copeland *et al.*, 1986; Benfey *et al.*, 1989; Bon *et al.*, 1997; Mosconi *et al.*, 1998; Heppell & Sullivan, 1999b). Eine hohe Ladungskapazität an Protein der in dieser Arbeit verwendeten Ionenaustauschersäule Ressource Q (bis zu  $25 \text{ mg ml}^{-1}$ ) und eine hohe Flussgeschwindigkeit ( $4 \text{ ml min}^{-1}$ ) waren ausschlaggebend, dass von einer relativ kleinen Plasmamenge eine hohe Ausbeute an gereinigtem Protein erlangt werden konnte. Auch das verwendete, kleine Bettvolumen (1 ml) trug dazu bei, da die Verdünnung der Probe sehr gering war. Da bisher eine solche schnelle Reinigung von Vtg nicht möglich war, gibt es auch keine dem Verfasser bekannten Reinigungen dieses Proteins bei Wildfischen. Mit den bisher verwendeten Methoden wurde eine große Menge von Vtg-reichem Plasma erlangt, indem in Gefangenschaft gehaltenen Fischen die Vitellogenese durch Behandeln mit  $E_2$  induziert wurde (So *et al.*, 1985; Copeland *et al.*, 1986; Benfey *et al.*, 1989; Bon *et al.*, 1997; Heppell & Sullivan, 1999a). Es zeigte sich auch, dass die Verwendung von Gelfiltrationschromatographie, was auch die Standardmethode der meisten erwähnten Arbeiten war (Bon *et al.*, 1997; Mosconi *et al.*, 1998; Heppell & Sullivan, 1999), einen großen Verlust an Vtg verursachte. Ursache hierfür war wahrscheinlich die relativ lange Elutionszeit. Ein weiterer, ungünstiger Punkt war das zwingende Verwenden relativ großer Mengen an Proben, verursacht durch das große Bettvolumen der präparativen Gelfiltrationssäulen.

### 4.2.1. Charakterisierung des gereinigten BFT-Vtg

Vtg von verschiedenen Fischarten erscheint im SDS PAGE als eine größere Proteinbande von etwa 150 bis 250 kDa und zusätzlich noch, als meist zwei niedermolekulare Banden, welche durch  $E_2$  induzierbar sind (Hiramatsu & Hara, 1996; Roubal *et al.*, 1997; Mosconi *et al.*, 1998; Heppell & Sullivan, 1999a). BFT-Vtg im SDS PAGE zeigte die gleichen Charakteristiken wie  $E_2$  induzierbare spezifische weibliche Proteine, wie bei anderen Fischarten beschrieben worden ist (Kishida *et al.*, 1992; Tao *et al.*, 1993; Mañanos *et al.*, 1994a; Matsubara *et al.*, 1994; Mosconi *et al.*, 1998; Heppell & Sullivan, 1999) und es scheint evident, dass es sich bei dem in dieser Arbeit gereinigten Protein um Vtg handelt. Das relative Molekulargewicht ( $M_R$ ) von Vtg ist bei den meisten Teleostern in nativer Elektrophorese in einem Range von 300 bis 550 kDa geschätzt worden (Roubal *et al.*, 1997). Das  $M_R$  von BFT-Vtg im nativen PAGE auf etwa 330 kDa geschätzt. Dieser  $M_R$  für BFT-Vtg ist sehr ähnlich dem, der für Flunder (*Pleuronectes vetulus*) Vtg von Roubal *et al.* (1997) im nativen PAGE bestimmt wurde. Mit der Gelfiltration (Superose 6) wurde ein  $M_R$  von 545 kDa des BFT-Vtg bestimmt, was mit der Bestimmung vom Vtg des Seebarsches (*Dicentrarchus labrax*) mit dem Medium 6B Sepharose (Mañanos *et al.*, 1994a) genau übereinstimmt. Dies kommt auch dem Vtg  $M_R$  vom Donaulachs (*Hucho perryi*) (Hiramatsu & Hara, 1996) nahe und auch dem vom Pazifiklachs (*Oncorhynchus kisutch*) von 540 kDa bei Hara *et al.* (1993) bestimmt mit der Superose 6. Im Vergleich mit der  $M_R$  Bestimmung durch Gelfiltrationschromatographie erscheinen die elektrophoretischen Bestimmungen viel niedriger. Es ist aber bekannt, dass die Gelfiltration zu einer Überschätzung und die Elektrophorese zu einer Unterschätzung des  $M_R$  führen. Die Elektrophorese und die Gelfiltration geben Informationen über das apparente  $M_R$ , welches ja bestimmt

wird von den Trennkriterien, die relevant sind für die verschiedenen Methoden. Während die Bestimmung durch Elektrophorese von der Bindung von SDS oder wie in dieser Arbeit von Coomassie Blue an den Proteinen (was von Protein zu Protein unterschiedlich sein kann) abhängig ist, basiert die Bestimmung durch Gelfiltration auf Trennung durch den unterschiedlichen Stokeschen Radius der Proteine (Rehm, 2000). Der Stokesche Radius seinerseits ist abhängig von der Quartärstruktur der Proteine, so dass es zu einer Determinierung eines höheren  $M_R$  kommen kann (Rehm, 2000). An dieser Stelle kann man auch die Tatsache diskutieren, dass sich unter verschiedenen Salzkonzentrationen der verwendeten Puffer bei den beiden Techniken, unterschiedliche Aggregationen der Vtg Monomere zusammenfinden. In dieser Arbeit wurde dieser Aspekt außer Acht gelassen, da es sich hier nicht um eine Strukturanalyse des Vtg handelte. Hier ist Raum für zukünftige Forschung gelassen.

Ein weiterer Beweis, dass es sich bei dem hier gereinigten Protein um Vtg handelte, war mit der Tatsache gegeben, dass es Lidoproteineigenschaften besaß, wie die Sudan Schwarz Färbung im nativen PAGE zeigte (Abb. 8b). Diese Eigenschaft wurde in anderen Arbeiten durch die Messung von Phospholipiden nachgewiesen (Tao *et al.*, 1993).

#### 4.2.2. BFT-Vtg ELISA

Das poliklonale Antiserum (abBFT-Vtg), das aus dem gereinigten BFT-Vtg produziert wurde, zeigte hohe Spezifität, was ja eine Bestätigung dafür ist, dass die Reinigung erfolgreich war.

In den Bindungsexperimenten mit dem abBFT-Vtg (Abb. 10) zeigte sich eine unspezifische Reaktion zum männlichen BFT Plasma in niedrigen Verdünnungen. Dies wurde aber auch für das artfremde Mausplasma festgestellt, wie auch Bon *et al.*, (1997) für das Vtg-ELISA der Forelle für Schweineplasma ebenfalls feststellte. Diese Störung ist sicherlich auf einen Plasmaeffekt zurückzuführen, wobei es zur Absorption der spezifischen Antikörper durch die hohe Konzentration an Proteinen kommt. Es ist ja aus Erfahrung mit ELISA bekannt, dass Antiserum, Antigen oder Probe in relativ hohen Verdünnungen (von der 2. bis zur 6. Potenz) eingesetzt werden. Dieses Prinzip wurde auch in dieser Arbeit bei den adaptierten Steroid-ELISA und dem entwickelten Vtg-ELISA bestätigt.

Der Vtg-ELISA, der hier erarbeitet wurde, zeigte sich als sehr robust und relativ einfach praktikabel. Die Empfindlichkeit des ELISA von  $8 \text{ ng ml}^{-1}$  Vtg und die Variation der internen und externen Kontrolle ist mit vielen anderen Vtg-ELISA, von verschiedenen Fischarten vergleichbar (Mañanos *et al.*, 1994b; Mosconi *et al.*, 1998).

Die kompetitive Kurve des Gonaden-Extraktes vom vitellogenetischen BFT Weibchen war nicht parallel zu der des Vtg-Standards. Dies weist darauf hin, dass die Antigene, die sich im Extrakt befinden, nicht auf der gleichen Weise gebunden werden wie das Vtg. Da in diesem Extrakt davon auszugehen ist, dass die meisten Proteine Abbauprodukte des Vtg waren, also Proteindotter, kann die Bindung von abBFT-Vtg andersartig sein. Es ist auf jeden Fall eindeutig, dass das Proteindotter eine große Kreuzreaktion zum Antiserum hatte, da es ein Abbauprodukt von Vtg ist. Dies ist einsichtig, da es sich bei dem produzierten Antiserum gegen Vtg-BFT um poliklonale Antikörper handelt. Dies bedeutet, dass eine Vielzahl von Antikörpern gegen eine eben so großen Zahl von Epitopen (antigene Determinante), der verschiedenen BFT-Vtg-Einheiten, gebildet wurden.

Der Nicht-Parallelismus des Gonadenextraktes zum BFT-Vtg kann auch dadurch erklärt werden, dass der Extrakt durch den großen Anteil an Lipiddotter sehr reich an Fetten war, welches zu einer Störung bei der Bindung des Antikörpers führen kann.

### 4.3. Der reproduktive Zyklus des BFT im Mittelmeer

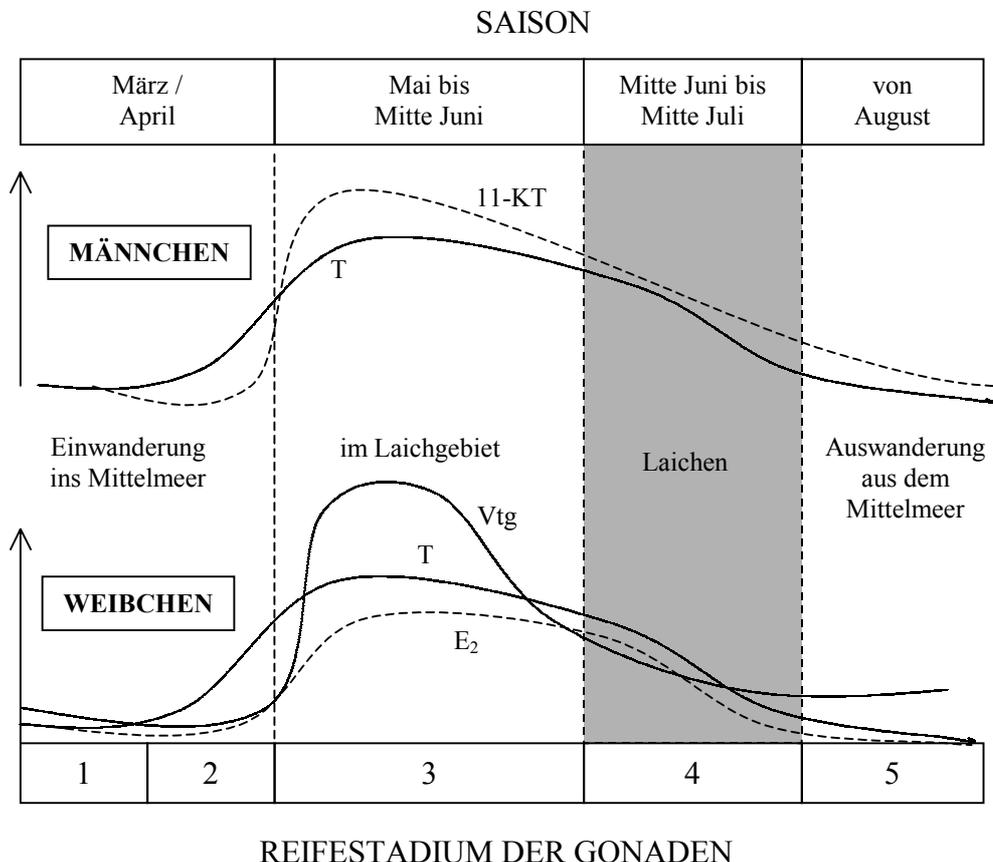
Der in dieser Arbeit entwickelte BFT-Vtg-ELISA wurde validiert durch die Untersuchung von Plasma der verschiedenen Weibchen in unterschiedlichen reproduktiven Phasen und durch die Korrelation zu  $E_2$  und T, welche ja die Vitellogenese induzieren. Die gemessenen Vtg Konzentrationen korrelierten auch mit dem Ovarienstadium. Wenn der T und  $E_2$  Plasmalevel in der Vorlaichzeit anfang zu steigen, stieg geringfügig auch der Vtg-Gehalt. Wenn die Konzentration der beiden Steroide Maximalwerte erreichte, sind auch die größten Vtg Plasmakonzentrationen gemessen worden. In der Nachlaichzeit kam es bei den Weibchen zum dramatischen Sinken der Steroidkonzentration im Plasma und auch die Vtg-Konzentration war auf minimale Werte gesunken.

Die T-Konzentration blieb auch nach der Laichzeit etwas höher als die  $E_2$ -Konzentration. Dies ist auch von vielen anderen Fischarten bekannt, da am Ende der Vitellogenese die Granulosa weiter T produziert, fällt die Aromathase-Aktivität in den Follikelzellen, d.h. es kann weniger  $E_2$  aus T synthetisiert werden (Young *et al.*, 1983; Kagawa *et al.*, 1983; Kime, 1993; Reis-Henriques *et al.*, 2000). Die Plasmakonzentrationen der Steroide während der Vitellogenese bei BFT Weibchen, sind nur im westlichen Mittelmeer ähnlich denen von vielen anderen Fischarten, der meisten hier erwähnten Arbeiten. Im zentralen Mittelmeer waren allerdings alle Steroidkonzentrationen um einen Faktor von 2 bis 3 höher, lagen aber unterhalb denen von der Forelle (*Onchorhynchus mykiss*) (Bon *et al.*, 1997). Der Vtg Plasmalevel, der in dieser Arbeit für BFT Weibchen gemessen wurde (Maximalwerte um 40 mg) kommt allerdings dem Wert für die Forelle nahe (Maximum um 60 mg). Die hohen Standardabweichungen, die im saisonalen Zusammenhang bei den Steroiden und beim Vtg gemessen wurden, sind darauf zurückzuführen, dass es sich beim BFT um einen Portionslaicher (Englisch: Multispawner) handelt. Dies wird auch durch die Untersuchung der Ovarien bestätigt (Abb. 13 & Anhang 2). Auch die Untersuchung von Baglin (1982) an den Ovarien des Westatlantischen BFT lässt einen Rückschluss auf Portionslaicher zu. Dies wurde auch für eine weitere Thunfischart, den Gelbflossenthunfisch (*Thunnus albacares*), von Schaefer (1998) beschrieben.

Die maximalen 11-KT Plasmalevel (um  $70 \text{ ng ml}^{-1}$ ) bei den BFT Männchen sind mit denen vom Stör vergleichbar (Cuisset *et al.*, 1994). Der maximale T Plasmalevel ist jedoch nicht wesentlich verschieden von dem bei den BFT Weibchen gemessenen.  $E_2$  spielt bei den Männchen keine Rolle und kann vernachlässigt werden. Dies gilt auch für die meisten Männchen der verschiedenen Fischarten. Eine erhöhte  $E_2$  Konzentration ist in der Regel bei Männchen zu finden, die eine Geschlechtsumwandlung durchmachen können, oder es handelt sich um eine endokrine Störung (Kime, 1998). Endokrine Störungen sind bei einigen Fischarten in Binnengewässern und in Ästuaren beschrieben worden (Sumter, 1995 und Scott *et al.*, 2000). Durch Umweltbelastung der Gewässer, durch anthropogene Steroide oder durch chemische Substanzen, die Steroidwirkung haben (wie DDT oder Lindan) kann es zu massiven Störung der Reproduktion kommen (Kime, 1998). Durch östrogenwirkende Chemikalien wie DDT kommt es zur Vitellogenese bei Männchen und bedingt dadurch zur Unreife der Hoden. Bei diesen Männchen kann dann Vtg als Indikator einer endokrinen Störung verwendet werden (Sumpter, 1995). In Zukunft kann dieses Problem auch bei pelagischen Räubern im Meer, die am Ende der Nahrungskette Fremdstoffe akkumulieren, untersucht werden.

Da das Laichen kurz nach dem Erreichen der maximalen Werte für die spezifischen Steroide und Vtg erfolgt (Kime, 1993), ist davon auszugehen, dass es im zentralen Mittelmeer bei den ostatlantischen BFT zwischen Mitte Juni und Mitte Juli stattfindet (Abb. 25). Dies gilt auch für das westliche Mittelmeer. Der Zyklus für männliche und weibliche BFT korreliert in der Saison, was einleuchtend ist, da die Abgabe von Eiern und Sperma synchronisiert sein muss. Ein Individuum laicht wahrscheinlich innerhalb dieser vier Wochen mehre-

re Male. Ein solches Laichverhalten (Portionslaichen) garantiert die Besamung der Eier eines einzelnen Weibchens durch verschiedene Männchen und das Laichen in verschiedenen geographischen Gebieten. Dies kann dazu beitragen, eine größere genetische Varianz zu schaffen und eine höhere Überlebenschance der Larven in verschiedenen Orten mit unterschiedlichen Umweltfaktoren.



**Abb. 25:** Schematische Darstellung des reproduktiven Zyklus des BFT im Mittelmeer. Diese Darstellung ergibt sich aus der Zusammenfassung der Abb. 15-18, durch die Kombination der sexspezifischen Steroide, der Gonadenreife und des Vtg. Es ergibt sich eine Laichzeit vom Mitte Juni bis Mitte Juli (graues Feld).  $E_2$  =  $17\beta$ -Estradiol, 11-KT = 11-Ketotestosteron, T = Testosteron, Vtg = Vitellogenin, die Pfeile (linke Achsen) weisen auf deren Konzentrationserhöhung im Plasma hin.

Bei den Weibchen wurde für die sexuelle Reife keine Bedeutung des Steroids 11-KT festgestellt, welches der typische Fall ist. Bis auf ein einziges Weibchen, das einen 11-KT Plasmalevel ( $24 \text{ ng ml}^{-1}$ ) aufwies wie Männchen in sexueller reproduktiver Phase, hatten alle anderen Weibchen Plasmalevels unter  $2 \text{ ng ml}^{-1}$ . Bei diesem abnormalen Weibchen konnten in der Ovarienprobe bei 10 seriellen histologischen Schnitten keine Besonderheiten festgestellt werden und es wurde ein Reifestadium von 3 determiniert. Ein Fehler in der Zuordnung der Proben konnte es nicht sein, da diese Probe einen  $E_2$  Plasmalevel aufwies, der charakteristisch war für sexuelle reife Weibchen und eine Blindkontrolle durchgeführt am SEFAS in Lowestoft (U.K.) von Dr. A. P. Scott mit RIA, ergab fast dieselbe 11-KT Konzentration. Die relevanten Rollen in der reproduktiven Phase haben bei den Weibchen T und  $E_2$ . Die Konzentration von T ist fast immer höher als die von  $E_2$ , wobei der Unterschied kurz vor dem Laichen am Größten ist.  $E_2$  wird, wie oben erwähnt, durch die Aromatisierung von T synthetisiert. Vermutlich wirkt aber nur  $E_2$  hemmend auf die weitere Ausschüttung von GtH I, was zur Abnahme der  $E_2$  Konzentration im Plasma führt und somit zu einem Überwiegen von T.

Bei den Männchen spielt  $E_2$  keine Rolle. Die relevanten Steroide sind hier T und 11-KT, wobei unklar ist, wie die Synthese von 11-KT geschieht (Kime, 1998). Es ist davon auszugehen, dass 11-KT die weitere Ausschüttung von GtH I hemmt. Die 11-KT Plasmakonzentration ist stets höher, wie bei vielen anderen Fischarten (Kime, 1993). Dies ist auch ein Hinweis, dass T bei Männchen eine gesonderte Rolle spielen muss und kann nicht wie bei den Weibchen als Vorläufersteroid angesehen werden, das vermutlich selbst eine geringere Rolle als  $E_2$  spielt (Abb. 25).

Einige Plasmaproben von männlichen, weiblichen und juvenilen BFT wurden freundlicherweise von Dr. A. P. Scott nicht nur auf 11-KT mit dem RIA analysiert, sondern auch auf das Östrogen  $E_2$  und dem maturational Steroidhormon 17,20 $\beta$ -P (17,20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one). Ein Vergleich von den in dieser Arbeit untersuchten gleichen Proben ergab, dass während die gemessenen 11-KT Plasmakonzentrationen fast genau übereinstimmten, die Ergebnisse für  $E_2$  um 2 Potenzen niedriger waren als die gemessenen Konzentrationen in dieser Arbeit. Da aber die Tendenz gleich war, kann es an der verschiedenen Methodik der Extraktion, dem verschiedenen Antiserum oder/und an der Messmethodik liegen. Dr. A.P. Scott verwendete eine Chloroform/Ethanol Extraktion, ein anderes Antiserum und er benutzte ein RIA. Dies zeigt, dass eine Messung der absoluten Werte oft eine apparente sein kann, die von der Methodik abhängt. Leider machte er keine Überprüfung mit einem internen Standard, da kein Plasma mehr zur Verfügung stand. Bei der Messung von 17,20 $\beta$ -P wurden nur relativ niedrige Konzentrationen gemessen. Da die analysierten Proben von März bis Anfang Juni stammten, kann dies ein Indiz für eine Bestätigung sein, dass es bis zu diesem Zeitpunkt zu keinem Ablaichen gekommen ist. Eine Möglichkeit ist auch, dass dieses maturational Hormon nicht die wesentlichste Rolle in der Endphase des Laichens beim BFT spielt.

Eine weitere Untersuchung von dem Östrogen  $E_2$ , dem Cortikosteroid Cortisol (11 $\beta$ ,17,21-Trihydroxy-4-pregnene-3,20-dione) und verschiedener Androgene Androstenedion, 11 $\beta$ -Hydroxyandrostenedione und 11 $\beta$ -Hydroxytestosteron (Tab. 3), ist an der Universität von Otago (Neuseeland) von Dr. P.M. Lokman an 4 Plasmaproben von vitellogenetischen BFT Weibchen vorgenommen worden. Bei einigen migratorischen Weibchen verschiedener Fischarten wie dem Aal (Lokman *et al.*, 1998) ist eine Erhöhung vieler Androgene zusätzlich zu T in vitellogenetischer Phase gezeigt worden. Dies konnte für den BFT nicht bestätigt werden. Auch in diesem Fall waren wie oben die 11-KT Konzentrationen mit denen in dieser Arbeit vergleichbar, die T Konzentrationen erschienen um einen Faktor von 2 unterschiedlich aber mit gleicher Tendenz und die Werte für  $E_2$  unterschieden sich, wie bei der Untersuchung von Dr. A. P. Scott um 2 Potenzen. Beide haben die gleiche Methode verwendet und es können hier ähnliche Gründe wie oben erwähnt vorliegen, die zu dieser Diskrepanz führen. Auch die Messung von Cortisol ergab relative hohe Konzentrationen. Es ist bekannt, dass die Plasmakonzentration an Cortisol bei Fischen durch reproduktiven Stress steigt (Kime, 1993), da es in der Aktivierung der Gluconeogenese eine große Rolle spielt. Es leitet also mit die Bildung von Glukose aus nicht kohlenhydrathaltigen Substanzen. Doch Cortisol kann auch durch exogenen Stress weiter steigen und die  $E_2$  Konzentration kann sinken, was zu einer Störung der reproduktiven Reifung führen kann (Pankhurst, 1998; Morgan *et al.*, 1999 and Pottinger *et al.*, 1999).

Die direkte Korrelation der endokrinen Parameter vom BFT ergaben einen direkten Zusammenhang mit der Gonadenreife. Eine dramatische Änderung in den endokrinen Parametern wurde erst nachgewiesen vom zweiten zum dritten Reifestadium der Gonaden (Abb. 16b & 17b). Wobei für die Männchen das Reifestadium 4 weiterhin eine sexuell endokrine Aktivität darstellt und beim Reifestadium 5 die endokrinen Parameter sich wieder auf Minimalwerten befinden. Leider konnte diesbezüglich bei den Weibchen Reifesta-

dium 4 und 5 nicht untersucht werden. Es kann festgehalten werden, dass massive sexuell endokrine, physiologische, evidente Veränderung im Reifestadium 3 und 4 der Gonaden stattfinden (Abb. 25). Eine Aussage über den reproduktiven Status der Tiere mit Hilfe der in dieser Arbeit gemessenen endokrinen Parameter, ist durchaus möglich. Dies wird später noch weiter diskutiert.

Durch die in dieser Arbeit entwickelte Sexsteroid Formel (SSF), bei welcher T, E<sub>2</sub> und 11-KT in Beziehung gesetzt werden, konnte ebenfalls eine saisonale und eine gonadale Evolution des reproduktiven Status nachgewiesen werden. Wie weiter unten ausgeführt werden soll, erwies sich dies als relevant für eine Bestimmung des Geschlechts und reproduktiven Status.

Steroid	IB 133	IB 208	IB 215	IB 216
Cortisol	289	310	564	152
Androstenedion	1,76	2,46	1,76	1,6
T	11,49	33,48	34,12	20,91
11 $\beta$ -Hydroxyandrostenedione	3,54	0,53	n.d.	1,06
11 $\beta$ -Hydroxytestosteron	2,01	0,563	0,43	0,36
11-KT	1,56	3,13	1,84	1,51
E <sub>2</sub>	0,13	0,17	0,27	1,34
T*	7,02	36,5	51,05	23,6
11-KT*	1,75	0,7	0,35	0,84
E <sub>2</sub> *	11,43	20,27	29,6	23,2

**Tabelle 3:** Untersuchung von 4 Plasmaproben des Östrogens E<sub>2</sub>, von Cortisol und der Androgene Androstenedion, 17 $\beta$ -Hydroxyandrostenedione, 11 $\beta$ -Hydroxytestosteron und 11-KT von P. M. Lokman, mit RIA gemessen. \* In dieser Arbeit mit ELISA gemessen. Alle Konzentrationen in ng ml<sup>-1</sup>; n.d. = nicht detektierbar.

Der reproduktive Zyklus des ostatlantischen BFT wurde erstmals von Rodrigues-Roda (1964; 1967) durch makroskopische Untersuchung beschrieben. Er berichtet von einer Laichzeit zwischen Mai und August. In der vorliegenden Arbeit kann eine Laichzeit erst nach Anfang Juni angenommen werden, die im August auf jeden Fall beendet ist (Abb. 15 & 18).

Weiterhin ist die Messung von Vtg im Plasma in der Nachlaichzeit, wenn die E<sub>2</sub> Konzentration kaum noch messbar ist, darauf zurückzuführen, dass im Plasma Proteine aus dem Dotter gemessen wurden, die ja Abbauprodukte von Vtg sind. In der Nachlaichzeit werden viele Follikel atretisch (Anhang 2, VI.), das bedeutet, dass die vitellogenetischen Oocyten, die nicht bis zur Endreife gekommen sind, abgebaut werden, indem Dotter rückresorbiert wird, um verstoffwechselt zu werden (Hunter & Macewicz, 1985 und Bon *et al.*, 1997). Atresie der Oocyten kann aber auch auf Stress zurückgeführt werden, wie oben erläutert (Kime, 1998). Pottinger *et al.* (1999) zeigte beim Rotaug (Rutilus rutilus), dass das Einwirken von Stress, welches durch einen dramatischen Anstieg des Steroidhormons Cortisol im Plasma gekennzeichnet ist, in der reproduktiven Phase eine Suppression von E<sub>2</sub> zur Folge hat. Dadurch kommt es zur Unterbrechung der Reifeprozesse in den Ovarien und Atresie setzt ein (Morgan *et al.*, 1999). Es ist zu vermuten, dass bei der hier vorliegenden Studie die relativ konstante Beobachtung von atretischen Oocyten in den Ovarien des BFT auf die Stress-Situation in den „Tonnare“ zurückzuführen ist. Die Tiere sind hier in den Netzsystem bis zu mehreren Tagen, was für ein Einsetzen der Atresie ausreicht. In zukünftigen Studien könnte untersucht werden, ob es einen signifikanten Unterschied zwischen den Tieren gefangen in der „Tonnara“ oder mit Langleine/Stellnetze, wo die Tiere einem Stress von nur einigen Stunden ausgesetzt sind (Susca, 1996).

Für den westatlantischen BFT gibt Baglin (1982) die Ablaizeit im Golf von Mexiko und vor der Küste Floridas im Mai an. Dies steht im klaren Kontrast zu der Laichzeit des ostatlantischen BFT. Das wäre ein weiteres Indiz, dass sich diese beiden Populationen sehr unterscheiden und eine Vermischung kaum vorkommt. Bestärkt wird diese These dadurch, dass die erste sexuelle Reife bei den BFT Weibchen im Ost Atlantik, wie in dieser Arbeit gezeigt, bei einer Standardlänge (SL) von 110 cm einsetzt. Bei den Weibchen im West Atlantik beträgt die SL der ersten sexuellen Reife 170 cm (Baglin, 1982). Diese physiologische Verschiedenheit deutet auf einen genetischen Unterschied beider Populationen hin. Diese These wird zur Zeit stark diskutiert. Es wird vor allen Dingen durch Markierungsexperimente versucht nachzuweisen, ob es zum Laichen von Individuen vom Ost Atlantik im West Atlantik kommt (Lutcavage *et al.*, 1999). Nemerson *et al.* (2000) berichtet, dass BFT unter einer SL von 170 cm im Golf von Mexiko (wichtiges West Atlantisches Laichgebiet) kaum gefunden werden. Es ist fraglich, ob abhängig von der geographischen Lage, die Tiere in unterschiedlichem Alter sexuell reifen ohne sich genetisch zu differenzieren. Ein höherer Fischereidruck im Mittelmeer, der zu einer früheren reproduktiven Reife führen könnte, würde vielleicht zu diesem Unterschied in der Fortpflanzungsstrategie führen. Hierzu gibt es aber keine Untersuchungen.

Bei der Untersuchung zur ersten sexuellen Reife der BFT Weibchen war noch bei den Tieren kurz vor dem adult werden (SL Klasse von 100 bis 110 cm) Anzeichen einer leichten Reifung der Ovarien, durch die Präsenz von Oocyten im Lipidstadium (Abb. 14). Auch ein leichter Anstieg an E<sub>2</sub> und Vtg Plasmakonzentration war feststellbar, aber ohne dass es zu einer sexuellen Reife kam. Diese Simulation der Gonadenreifung wurde auch von Baglin (1982) bei unreifen West Atlantischen BFT Weibchen beschrieben.

Das ab-BFT-Vtg wurde erfolgreich verwendet, um die Ovarien durch immunohistochemische Technik zu untersuchen (Abb. 13 & Anhang 2). Es gelang somit die Identifizierung der vitellogenetischen Oocyten, wobei in Verbindung mit der Gegenfärbung eine genauere Untersuchung möglich war, als mit den herkömmlichen Färbemethoden. Vtg-assoziierte Proteine wurden in der Oocyte und vor dem Follikelepithel mit der PAP-Methode detektiert (Anhang 2, IV. & V.). Mit zunehmendem Reifegrad der Oocyte werden immer mehr Vtg-assoziierte (Dotterproteine) angereichert. Das Follikelepithel ist dabei nicht beteiligt (Anhang 2, V.c). Es wurde auch von Abraham *et al.* (1984) mit elektronenmikroskopischer Untersuchung gezeigt. Dieses steht aber im Gegensatz dazu, wenn die ABC-Methode verwendet wird. Hier kommt es zu einer positiven Reaktion des Follikelepithels (Anhang 2, V.b). Es muss sich hier um eine unspezifische Reaktion handeln, die durch diese Methode verursacht wird, da mit der PAP-Methode dieses nicht bestätigt werden konnte. Im Allgemeinen zeigte sich die PAP-Methode als geeigneter. Für die Studie der verschiedenen Ovarienstadien zeigte sich die hier entwickelte immunohistochemische Technik als sehr brauchbar und kann für zukünftige Studien bessere Ergebnisse liefern als die herkömmlichen Färbemethoden.

Es konnten auch rein qualitative Aussagen über die saisonal bedingte sexuelle Reifung bei Weibchen durch die immunochemische Analyse von Vtg gemacht werden. In der Western Blot Analyse von Plasmaproben zeigte sich die Anwesenheit von Vtg in den verschiedenen saisonalen Reproduktionsphasen (Abb. 11), was durch die Dot Blot Analyse bestätigt werden konnte. Mit diesen Methoden war es möglich schon geringe Mengen Vtg (31,3 ng ml<sup>-1</sup>) relativ einfach nachzuweisen, was mit dem Vtg-ELISA wegen dem Plasmaeffekt nicht möglich war. Die Ergebnisse wurden gestützt durch die Verifizierung mit Reifestadium der Gonaden und Messung des E<sub>2</sub> Plasmalevels. Alle immunochemischen Analysen erwiesen sich als extrem spezifisch, da weder bei männlichen, juvenilen oder unreifen weiblichen BFT, Vtg nachgewiesen werden konnte.

Der saisonale Zyklus des BFT wurde in dieser Arbeit von März bis Oktober beschrieben, da sich nur in dieser Saison im westlichen und im zentralen Mittelmeer das massive Vorkommen durch die genetische Migration beschränkt. Man findet außerhalb dieser Saison nur juvenile BFT in diesen Teilen des Mittelmeeres, bis auf einige Ausnahmen. Im östlichen Mittelmeer soll aber eine Population adulter BFT vorhanden sein, die im Sommer am Ende der reproduktiven Saison nicht aus dem Mittelmeer wandert. Leider gelang es nicht, ausreichende Proben zu bekommen, um auch in diesem Teil des Mittelmeeres den reproduktiven Zyklus zu beschreiben.

In den beiden Laichgebieten, im zentralen Mittelmeer und in der Balearischen See kommt es nach den Ergebnissen dieser Arbeit etwa zur gleichen Zeit zum Laichen. Ausschlaggebend ist wahrscheinlich die Photoperiode und die obere Wassertemperatur (de la Serna & Alot, 1992 und Suquet *et al.*, 1992). Unerklärlich bleibt die Diskrepanz in den gemessenen Konzentrationen von Vtg und Sexsteroiden in den beiden Laichgebieten. Im westlichen Mittelmeer lagen die Konzentrationen bei 90% von denen im zentralen Mittelmeer. Da die Methodik der Analyse für alle gleich war, aber die Proben von zwei unterschiedlichen Gruppen gesammelt wurden, stellt sich hier die Frage, ob eine unterschiedliche Behandlung der Proben diese Auswirkung haben kann. Auch war die Anzahl der untersuchten Proben geringer als im zentralen Mittelmeer, was die Hauptursache sein könnte. Aufklärung könnte eine erneute Untersuchung des westlichen Mittelmeeres bringen, wobei eine größere Probenzahl, eine genaue Protokollierung und eine histologische Untersuchung notwendig wäre.

#### **4.4. Korrelation der endokrinen Plasma Untersuchung mit dem Muskelgewebe**

Die Analyse von Vtg und den Sexsteroiden konnte mit dem Muskelgewebe korreliert werden (Abb. 19 & 20), wobei trotz einiger nicht linearer Verhältnisse, wie für einige Phasen beim Vtg und 11-KT, eine klare Zuordnung und Interpretation möglich war. Obwohl die Extraktion aus dem Gewebe nur für 11-KT gleichwertig mit dem Plasma erreicht werden konnte (Abb. 6a), war das Ergebnis mit der hier verwendeten Methode ausreichend, um nach 7 Wochen immer noch messen zu können (Abb. 6b). Auch die direkte Extraktion des Gewebes nach 7 Wochen ergab eine größere Wiedergewinnung. Da dies methodisch aufwendiger war, wurde darauf verzichtet und die einfachere Methode der Extraktion des Überstandes vorgezogen, was völlig ausreichte. Hiermit ist eine Möglichkeit eröffnet, zukünftige, reproduktionsbiologische Studien mit 200 mg Muskelgewebe durchzuführen. Dabei kann das Gewebe auch nach längerer Zeit nach dem Tod des Fisches analysiert werden. Zum Beispiel kann es durchaus möglich sein bei BFT, die auf großen Fangschiffen bereits ausgenommen worden sind und mehrere Tage bis zur Landung bei 4°C gelagert werden, eine Messung der Sexsteroiden durchzuführen (Abb. 6b). Wird der Fisch nicht eingefroren, muss wie in dieser Arbeit gezeigt, die Messung für Vtg im Muskelgewebe, bei Lagerung im Kühlraum, spätestens vor dem siebten Tag geschehen (Kapitel 3.4.1.). Vtg ist höchstwahrscheinlich einer starken, proteolytischen Zersetzung ausgesetzt, sodass eine Analyse so schnell wie möglich geschehen muss, wenn das Gewebe nicht eingefroren wird (Mañanos *et al.*, 1994a & 1994b). Auch bei den Steroiden sollte eine Messung schnell erfolgen, da nicht auszuschließen ist, dass die Aktivität von Aromatasen und Hydroxylasen im Gewebe zur Umwandlung der Steroide führen kann. T kann wie in der Granulosa der Follikel zu E<sub>2</sub> aromatisiert werden und es kann zu einer relativ hohen Messung an E<sub>2</sub> und zu einer niedrigeren an T kommen. T kann aber durch die Hydrolyse über 11β-Hydroxytestosteron zu 11-KT umgewandelt werden (Kime, 1993). Im Extremfall kommt es dadurch zur Fehlinterpretation. Aus diesem Grunde wurde in dieser Arbeit darauf verzichtet, die gemessenen Konzentrationen im Gewebe mit dem Wiederfindungsfaktor zu

korrigieren. Es wurde also keine Angabe über Absolutwerte bei den Steroiden und Vtg gemacht. Dies erwies sich auch als nicht notwendig, da die gemessenen Werte schon alleine gut interpretiert werden konnten. Eine weitere Gefahr bei einer Korrektur durch die Wiederfindungsrate ist durch die Qualität des Muskelgewebes gegeben. Es hat sich gezeigt, dass bei einer Extraktion der Steroide aus relativ fettreichem Gewebe die Ausbeute minimal war, weil die lipophilen Steroide in der Fettphase blieben. Auch der Anteil an Blut zeigte sich als relevant, da bei gut durchblutetem Gewebe wie Herz oder Kernmuskulatur mehr gemessen werden konnte als vergleichsweise in Gewebe, das weniger durchblutet ist (Bridges *et al.*, 2000). Vtg zirkuliert ausschließlich im Blut, da Rezeptoren nur bei den Zielzellen, den Oocyten, vorhanden sind. Es sind zwar beim weißen Zackenbarsch Vtg-Rezeptoren bei Muskelzellen beschrieben worden (Tao *et al.*, 1996), ein Beweis für die Einlagerung von Vtg in die Muskelzellen blieb jedoch aus. Immunohistochemische Untersuchungen könnten diese Unklarheit beseitigen. Bei den Steroiden kommt es, durch die für sie freie Passierbarkeit durch die Zellmembran, zum Vorkommen auch innerhalb der verschiedenen Zellen.

Vtg ist bislang außer im Plasma auch im Mucus von der Brassenart *Morone saxatilis* während der Vitellogenese nachgewiesen worden (Kishida *et al.*, 1992), wobei kein Zusammenhang mit der Vtg-Konzentration im Plasma gefunden wurde. Es gibt nur eine Arbeit von Heppell & Sullivan (2000), die das Verhältnis von Vtg- und Sexsteroidkonzentrationen im Muskelgewebe und im Plasma beim Zackenbarsch (*Mycteroperca micropolis*) beschreibt. Bei dieser Untersuchung wurden die gleichen Sexsteroide wie bei der vorliegenden Arbeit beschrieben, wobei für die Messung ein RIA verwendet wurde. Heppell & Sullivan (2000) fanden ebenfalls eine strenge Korrelation zu den Plasmawerten im saisonalen Profil, das Verhältnis aber zwischen Plasma- und Gewebekonzentration war unter 10 zu 1 (10%). Bei der vorliegenden Arbeit ist beim BFT im Muskelgewebe außer für E<sub>2</sub> (7,7%) mehr gefunden worden (für T 25% und 11-KT 20%). Dies kann an der größeren Durchblutung des Thunfisches oder an der Extraktionsmethode liegen. Während in dieser Arbeit die Extraktion mit Dichlormethan durchgeführt wurde, verwendeten Heppell & Sullivan (2000) Ethanol. Leider fehlt bei diesen Autoren eine Studie über die Wiederfindung im Gewebe und Plasma. Auch die Messung von Vtg im Muskelgewebe durch ein ELISA im Picogramm-Messbereich war bei dieser Arbeit über dem Zackenbarsch um ein Vielfaches geringer als im Plasma (Milligramm-Messbereich, in der neunten Potenz!). Beim BFT wurden Konzentrationen im Mikrogramm-Messbereich im Muskelgewebe und im Milligramm-Messbereich im Plasma gemessen, also eine Differenz von 3 Potenzen. Trotz der ähnlichen Vorbereitung des Muskelgewebes für die Messung und der ähnlichen Messmethode gelang wie bei den Steroiden, auch beim Vtg in der vorliegenden Arbeit eine höhere Wiederfindung im Gewebe. Die Gründe sind hier wahrscheinlich ebenfalls in der größeren Durchblutung des Thunfischmuskels zu suchen.

Auch im Gewebe, wie oben für Plasma beschrieben, konnte die quantitative Analyse eine genaue Aussage der saisonalen bedingten sexuellen Reifung beim Weibchen gemacht werden. Mit der Western Blot Analyse (Abb. 12a) und der Dot Blot Analyse (Abb. 12b) war es möglich, schon geringe Mengen Vtg im Muskelgewebe relativ einfach nachzuweisen. Die Ergebnisse wurden gestützt durch die Verifizierung mit Reifestadium der Gonaden und E<sub>2</sub> Level. Es gab einige adulte Weibchen, die im Mai einen ungewöhnlich niedrigen E<sub>2</sub> Level (um die 3 ng ml<sup>-1</sup>) und Ovarien im Reifestadium 2 aufwiesen. Diese Tiere zeigten in der qualitativen Vtg Analyse keine positive Reaktion (siehe als Beispiel in Abb. 12 Probe 15) und auch die immunohistochemische Untersuchung gab keinen Hinweis auf Vitellogenese. Das deutet auf die Zuverlässigkeit der in dieser Arbeit entwickelten Methoden für die Detektion von Vtg hin.

Auch Kishida *et al.*, (1992) konnte durch den Western Blot Vtg im Mucus nachweisen. Wie beim Muskel BFT-Vtg wurde auch bei diesem Autor im Mucus bei dem Brassen-Vtg eine große unspezifische Detektion mit niedermolekularen Proteinen festgestellt. Es ist davon auszugehen, dass große Zellbestandteile oder eine bestimmte Art von Proteinen die im Muskel und im Mucus vorkommen, zu dieser Störung führen. Durch die Auftrennung der Proteine bei der Western Blot Analyse ist jedoch eine genaue Identifizierung möglich. Die Dot Blot Analyse war stets spezifisch und eindeutig.

#### **4.5. Bestimmung des Geschlechts und des reproduktiven Status**

Durch die hochempfindlichen, quantitativen Messungen der Sexsteroiden und des Vtg, konnte durch sexspezifische Charakteristiken eine Aussage über das Geschlecht und den reproduktiven Status gemacht werden. Wie oben ausgeführt, wurde eine relevante Vtg Konzentration nur im Reifestadium 3 festgestellt, es fehlte völlig bei den Männchen. In einigen Fällen konnte die qualitative Analyse Vtg im Reifestadium 2 detektieren. Hierzu wurde dann die E<sub>2</sub> Konzentration in Verhältnis gesetzt, um bei Weibchen eine genaue Aussage über den Reifegrad zu machen. Das nicht Vorhandensein von Vtg und eine relevante Konzentration von 11-KT zeigte sich als charakteristisch für männliche BFT. Durch die T Konzentration konnte für beide Geschlechter eine Aussage über den reproduktiven Status gemacht werden. Diese Befunde sind in dem in dieser Arbeit entwickelten SSF zusammengefasst (Abb. 21). Über den SSF in Kombination mit der Analyse von Vtg konnte in den meisten Fällen eine genaue Geschlechtsbestimmung gemacht werden.

Die Bestimmung des Geschlechts und des reproduktiven Status beim BFT mit dem Plasma in der untersuchten Saison von März bis Oktober stimmte in 93% und im Gewebe in 71% der Fälle. Hier ist allerdings nicht berücksichtigt, dass bei der makroskopischen Beurteilung der Gonaden auf dem Feld, vor allem bei wenig reifen Tieren, Fehler gemacht wurden. Eine weitere Fehlerquelle war die richtige Zuordnung der Proben unter den schwierigen Arbeitsbedingungen. Wenn die kritischen Monate, in denen nur wenige Fische gefangen werden, im März, April, August, September und Oktober nicht berücksichtigt werden, ist die Bestimmung im Plasma und im Muskelgewebe nahezu 100%ig richtig. Es öffnet sich somit ein „Fenster“ von Ende April bis Ende Juli, indem das Geschlecht und der reproduktive Status sicher bestimmt werden konnten. Für eine praktische Anwendung, um zum Beispiel die Sexratio in einem bestimmten Fanggebiet mittels einer Probe Muskelgewebe zu untersuchen, ist die Methode ausreichend, da im Mittelmeer ja nur in diesem zeitlich definierten „Fenster“ die Fangsaison ist. Aber auch eine Analyse auf dem Fischmarkt könnte mit der hier dargestellten Methode viele Informationen bringen, denn es lässt sich ja, wie gezeigt, über die verschiedenen endokrinen Parameter nicht nur das Geschlecht oder der reproduktive Status, sondern auch die Herkunftsregion oder die Saison, indem der Fisch gefangen wurde, nachvollziehen. Sollte zum Beispiel auf dem Markt im November ein BFT Exemplar gefunden werden, das Spuren an Vtg und eine erhöhte E<sub>2</sub> Konzentration aufweist, ist davon auszugehen, dass dieser Thunfisch 6 bis 7 Monate eingefroren war und keineswegs frisch ist. Sollte der Bestand weiter fallen und Fangverbote in der reproduktiven Phase des BFT in den Laichgebieten verhängt werden, wie es bereits im West Atlantik der Fall ist, könnte wiederum mit den hier erarbeiteten Methoden eine Einhaltung des Verbotes kontrolliert werden.

Eine genetische Analyse des Geschlechts ist methodisch viel teurer und umständlicher als die in dieser Arbeit vorgestellten endokrinen Methoden. Es ist auch bislang ungewiss, ob eine genetische Untersuchung, Auskunft über den reproduktiven Status geben könnte, wie es in dieser Arbeit möglich war.

#### 4.6. Ausblick

Die hier gelegten Fundamente im Verständnis der Reproduktionsbiologie des ostatlantischen BFT können in zukünftiger Erforschung und Management der Fischressource wichtige Informationen bringen. Auch eine vergleichende Forschung der reproduktiven Endokrinologie beim westatlantischen BFT könnte viele Fragen der Reproduktionsbiologie bei dieser Population beantworten (Nemerson *et al.*, 2000). Die Bestimmung der Standardlänge der ersten sexuellen Reife, die bei der westatlantischen Population völlig unklar ist, könnte dazu dienen, diese beiden Populationen klar zu trennen, oder zu klären, ob es überhaupt Unterschiede gibt in der Reproduktionsbiologie. Mit den hier entwickelten Methoden könnten bei BFT, die in Käfigen in Gefangenschaft gehalten werden, Störungen der Endokrinologie festgestellt werden. Es könnten aber auch Störungen die durch Umweltverschmutzung auftreten könnten, wie oben erläutert, untersucht werden. Wenn bei Männchen physiologisch kein Vtg gebildet wird, wie in dieser Arbeit dargelegt, könnte eine Abweichung von dieser Regel auf die Einwirkung von östrogenwirkenden Substanzen deuten.

Weitere endokrine Untersuchungen könnten zu den hier vorgestellten Ergebnissen noch wichtige Informationen der Reproduktionsbiologie das Wissen ergänzen. Eine Detektion des GtH I könnte eine genauere Bestimmung des Beginnes des reproduktiven Zyklus möglich machen, denn es induziert die gonadale Steroidgenese (Kime, 1998) und ist somit schon messbar bevor die Sexsteroiden oder das Vtg gemessen werden können. Auch die Untersuchung von GtH II und den maturationalen Hormonen könnte Informationen über den genauen Zeitpunkt eines Abblaus geben, da diese Hormone nur wenige Stunden vor dem Abblaus in relativ hohen Konzentrationen messbar sind (Kime, 1998).

Die hier entwickelten Methoden der Bestimmung des Geschlechts und des reproduktiven Status können gut für eine mögliche Aquakultur des BFT verwendet werden, da man nicht nur die Sexratio feststellen könnte, sondern auch, ob die Tiere in den Käfigen eine Reifung beginnen oder ob sie gestresst sind (Untersuchung von Cortisol) und sich deswegen nicht fortpflanzen können. Hierzu wird es notwendig sein mittels einer geeigneten Biopsienadel vom lebenden Fisch eine Gewebeprobe zu nehmen (Bridges *et al.*, 2000). Die Biopsie könnte sich auch in der Wildbahn bewähren. Wenn bei Markierungen, zum Studium der Migration von Fischen, gleichzeitig eine Biopsieprobe genommen werden könnte, würde man auch gegebenenfalls Informationen über das Geschlecht des Tieres, mit Bestimmtheit aber über den reproduktiven Status bekommen. Man wäre in der Lage neue Erkenntnisse über die Migration zu erlangen. Auch eine genauere Untersuchung der Ovarien, mit der hier entwickelten immunohistochemischen Technik, beim toten Tier oder wenn es möglich sein wird durch Biopsieprobe der Gonade, beim lebenden Tier, kann für eine Studie der Vitellogenese oder des Stresszustandes (Atresie der Oocyten) nützlich sein.

Die Dot Blot Analyse des Vtg, die in dieser Arbeit entwickelt wurde, ist methodisch relativ einfach und zuverlässig. Sie kann ausgebaut werden zu einem einfachen Streifentest vergleichbar mit den Schwangerschaftstests. Hierzu wäre es günstig monoklonale Antikörper wegen der höheren Spezifität zu produzieren, wobei, wie sich aus der vorliegenden Untersuchung ergibt, als Antigen auch die niedermolekularen Dotterproteine aus den Ovarien in Frage kommen. Die Verwendung von Dotterproteinen hat Vorteile, da eine reife Gonade leichter zu bekommen ist als vitellogeninreiches Plasma und es würde gleichzeitig auch eine unbegrenzte Antigenmenge sein (eine Reife Ovarie kann über 5 kg wiegen). Die Verwendung von Plasma setzt das Sammeln einer großen Menge voraus, die nicht nur von einem Fisch gesammelt werden kann und auch die Handhabung der Probennahme und Aufbewahrung ist schwieriger als bei der Gonade.

## DISKUSSION

Die monoklonalen Antikörper sollten gereinigt werden und direkt an einem Enzym wie Meerrettichperoxidase gekoppelt werden, um den Test zu vereinfachen. Ein solcher Streifen-Test oder ein Vtg-ELISA Kit könnte eine standardmäßige Verwendung finden.

Es ist zu hoffen, dass die in dieser Arbeit entwickelten Methoden nicht nur dazu dienen könnten, im kommerziellen Bereich Verwendung zu finden, sondern auch wesentlich dazu beitragen würden, den Roten Thun in unseren Meeren zu bewahren.

Ergebnisse dieser Arbeit sind in folgenden Publikationen teilweise enthalten:

Susca, V., Deflorio, M., Corriero, A., Bridges, C.R. & De Metrio, G. (2000). Sexual maturation in the bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) from the central Mediterranean Sea. In *Proceeding of the 6<sup>th</sup> International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*, (Noberg, B., Kjesbu, O.S., Taranger, G.L., Andersson, E. & Stefansson, S.O., eds), pp. 105, Bergen: FishSymp.99.

Susca, V., Corriero, A., Deflorio, M. Bridges, C.R. & De Metrio, G. (2000). New results on the reproductive biology of the bluefin tuna (*Tunnus thynnus*) in the Mediterranean. *ICCAT SCRS/00/91*.

Bridges, C.R., Schröder, P., Susca, V., Corriero, A. Deflorio, M. & De Metrio, G. (2000). A new muscle biopsy technique for sex and sexual maturity determination in large pelagic fishes. *ICCAT SCRS/00/92*.

Susca, V., Corriero, A., M. Bridges, C.R. & De Metrio, G. (2001). Study of the sexual maturity of female bluefin tuna: purification and partial characterization of vitellogenin and its use in an enzyme-linked-immunosorbent assay. *Journal of Fish Biology* **58**, 815-831.

## 5. Zusammenfassung

Im Frühjahr wandert der Rote Thun (*Thunnus thynnus*) aus dem Atlantik durch die Meerenge von Gibraltar in das Mittelmeer, wobei es im Sommer wieder zum vermehrten Abwandern zurück in den Atlantik kommt. In dieser Zeit laicht der Rote Thun in der Balearischen und Tyrrenischen See. Gleichzeitig ist er einem starken, kommerziellen Fang ausgesetzt, was zu einer starken Dezimierung der Gründe führt.

Der reproduktive Zyklus während des Aufenthaltes im Mittelmeer sollte mit Hilfe endokriner und histologischer Veränderungen geklärt werden. Die Möglichkeit einer Bestimmung des Geschlechtes und die Beschreibung des reproduktiven Status anhand der endokrinen, sexuellen Charakteristiken im Muskelgewebe sollte untersucht werden.

Die Sexsteroid Testosteron (T), 11-Ketotestosteron (11-KT) und 17 $\beta$ -Estradiol (E<sub>2</sub>) wurden im Plasma und im Muskelgewebe mittels adaptierter ELISA quantitativ bestimmt. Für die Analyse des Vorläufers des Proteindotters, dem Vitellogenin (Vtg), wurde dieses Protein aus dem Plasma von reproduktiven, reifen Weibchen gereinigt, charakterisiert und ein Antiserum gegen das Vtg produziert. Anschließend wurde ein ELISA etabliert und immunochemische Methoden entwickelt, um Vtg quantitativ und qualitativ im Plasma und Muskelgewebe zu messen und die Reifung der Ovarien zu beschreiben.

Das Vtg hatte ein apparentes M<sub>R</sub> von 545 kDa und zerfiel im SDS PAGE in ein Protein von 195 kDa und zwei weitere niedermolekulare Proteine (um 80 und 90 kDa).

Für die reproduktive Maturation der Thunfisch Männchen war eine Erhöhung der Konzentration von T und 11-KT charakteristisch, wobei E<sub>2</sub> keine Rolle spielte. Bei den Weibchen hatte E<sub>2</sub> und T eine wichtige Rolle im reproduktiven Zyklus, hier war die Konzentration von 11-KT niedrig und keiner saisonalen Veränderung ausgesetzt. Die Männchen zeigten einen Peak in der Konzentration der sexspezifischen Steroide Ende Mai. Die Korrelation mit dem Reifezustand der Gonaden, deutete auf ein Abbläichen der Männchen zwischen Mitte Juni und Mitte Juli hin. Diese Laichzeit korrelierte mit dem der Weibchen. Bei diesen wurde ein Erhöhung der Konzentration der sexspezifischen Steroide im ganzen Mai festgestellt und korrelierte mit der Reifung der Gonaden. Die Vtg Konzentration stieg mit der E<sub>2</sub> Konzentration.

Bei den Weibchen wurden Standardlängen von 110 cm für die erste sexuelle Reife bestimmt.

Die dramatischste Erhöhung der sexuellen, endokrinen Parameter war ab dem Reifestadium 3 der Gonaden feststellbar.

Die histologische Untersuchung der Ovarien ergab alle Charakteristiken eines Portionslaichers, was durch den saisonalen endokrinen, reproduktiven Zyklus bestätigt werden konnte. Die Reifung der Oocyten konnte durch immunohistochemische Methoden genau untersucht werden durch die Anreicherung Vtg-assoziiierter Proteine (Dotter). Dadurch wurde eine Minimalgröße von 220  $\mu$ m für vitellogenetische Oocyten determiniert.

Durch die charakteristischen Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen und der Veränderung der endokrinen Parameter im saisonalen reproduktiven Zyklus, konnte eine Sexsteroid Formel (SSF) gebildet werden, was die Verhältnisse der einzelnen Konzentrationen der Sexsteroid beschreibt. Eine zusätzliche quantitative und qualitative Analyse von Vtg ergab eine 93% Sicherheit mit Plasma in der Bestimmung des Geschlechtes in einem Zeitraum von März bis September. Mit Muskelgewebe war die Bestimmung zu 71% erfolgreich. Eine 100% richtige Bestimmung mit Plasma und Gewebe gelang in den Monaten von Anfang Mai bis Ende Juli. Auch der reproduktive Status lies sich aus den kombinierten Analysen ableiten.

## Anhang 1

### SAMPLING PROTOCOL FOR PLASMA AND MUSCLE (short)

#### Preparation before sampling:

Fill a Styrofoam container with ice.

Prepare the heparin/PMSF solution: take a small amount of heparin powder with a spatula and place it in the 25 ml bottle full with ringer (or 1.5 % sodium chloride in distilled water). Place about 5 drops of PMSF stock with a pipette in the bottle and shake vigorously. This solution can be used for 3 to 5 days if kept in refrigerator. (Syringes, canula and tubes should be rinsed in advanced with this solution.)

Label tubes and rinse the tube and syringes with the heparin/ PMSF solution. Store the solution (in case needed later) and the rinsed tubes and syringes in a cool box (with freeze packs).

#### On board:

1. Note GPS and surface temperature of sampling site.
2. Measure fork length of fish and open the body of the fish with a sharp knife on ventral site so that you can reach heart, liver and gonad. Weigh the gonad and tag the fish for later identification and weight determination (→ GSI, weight determination can also be done later). Note the sex if possible.
3. Take with a prepared syringe blood from the heart (about 10 ml) and put the blood in a labeled centrifuge tube (rinsed with heparin/PMSF solution) on ice. Take 2 muscle samples of about 3 ccm\* from the position posterior to the anus and put it in different labeled tubes with screw caps (Sheffield and Düsseldorf). Keep the tissue samples on ice.

#### On land:

4. Store the muscle samples in the freezer (at about -20°C).
5. Centrifuge the blood until plasma is completely separated from the erythrocytes. The centrifugation condition depends from the centrifuge and rotor. Aspirate the plasma (upper layer) with a pipette and distribute it to different labeled appropriate tubes Store the plasma at about -20°C in freezer like muscle samples.

If you have no centrifuge to get plasma: this is not to prefer if centrifugation is possible, it should be done only in special situations, when there is no way to get plasma!

- a. Put in the solution to rinse syringes and tubes no heparin and proceed as described by point 3. Use instead of large tubes directly smaller tubes. Leave the blood in these tubes for about 12 h on ice.
- b. After about 12 h (the next day!) the blood is coagulated and you should get serum. You can freeze the tubes with the coagulated blood and serum as mentioned above by -20°C for plasma and tissue.

**Please do not freeze whole blood; it will be not usable for the analyses!  
The fish should be fresh and the dead not more than 3 h from sampling.**

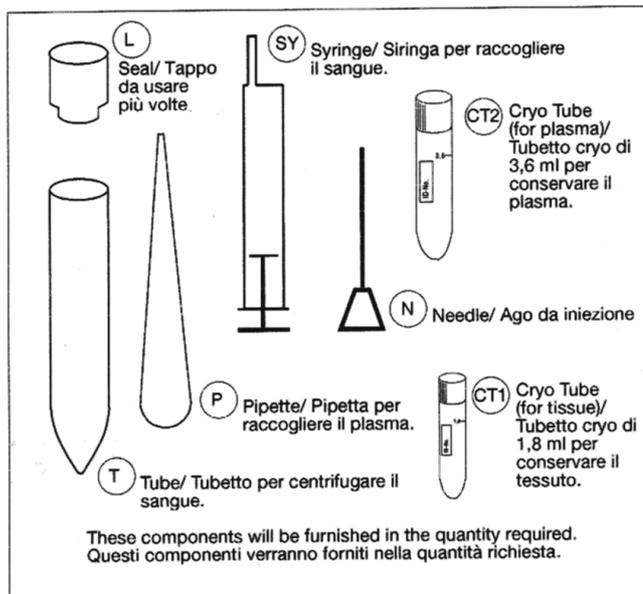
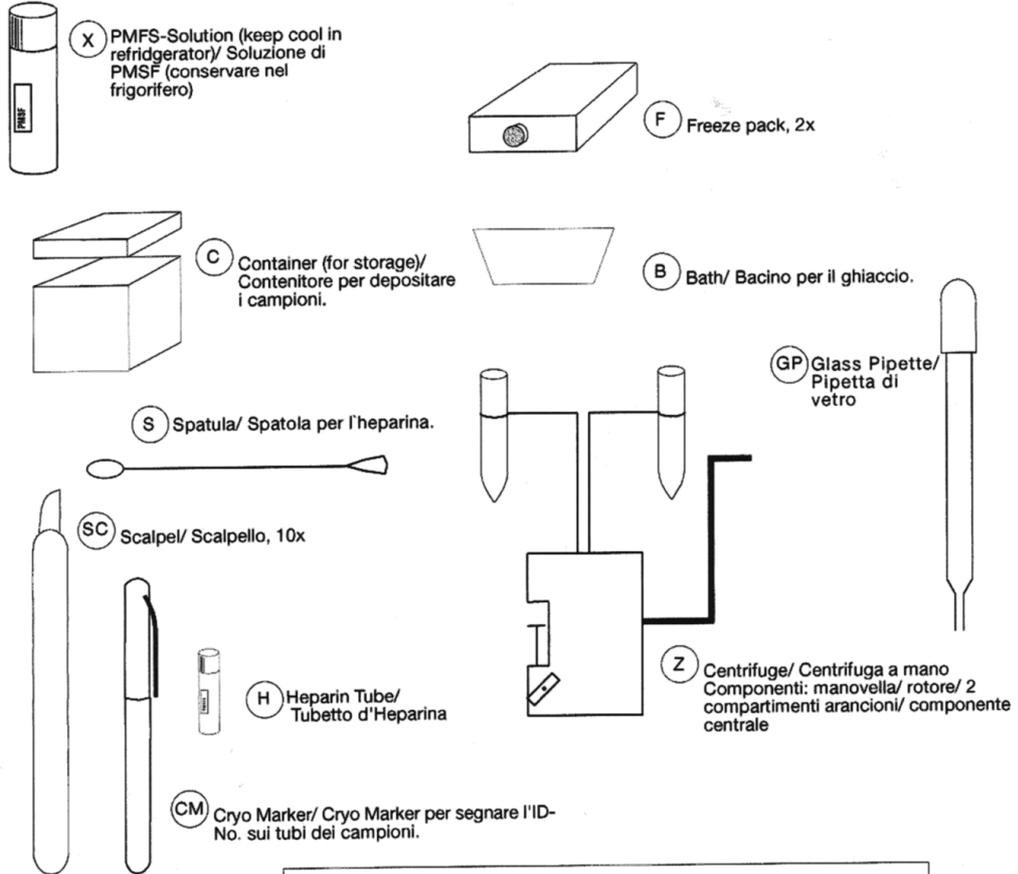
**Note the time of sampling from fish and that of freezing the samples.**

\* If you are going to use the biopsy needle take 4 – 5 samples for Sheffield and 4 –5 for Düsseldorf per fish from the same area (from the position posterior to the anus). If it is not possible to take any samples from this position, then take 2 muscle samples of about 5 cm stiffen from the ventral site paying attention to take specimen with muscle tissue and not only fat or skin!

Please contact Vito Susca if you have difficulties or questions regarding the sampling protocol:  
susca@uni-duesseldorf.de

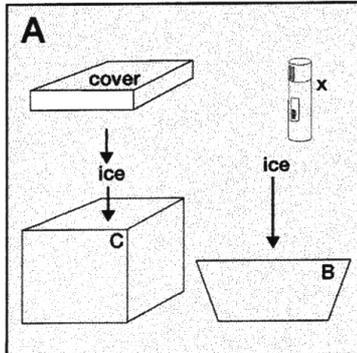
# Kit for sampling plasma and tissue

## List of components/ Lista dei componenti



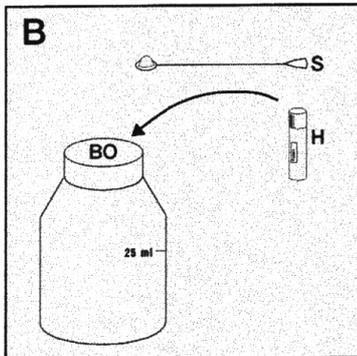
### Instruction part I

Preparation at the laboratory before sampling/  
Preparazioni al laboratorio prima del campionario



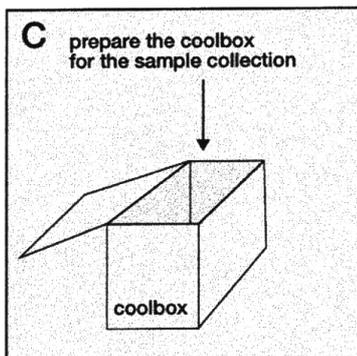
E: Fill the styrofoam container (C) with ice and close the container with the cover. Place ice in the bath (B). Store the PMFS-solution (X) in the bath with ice.

I: Riempite il contenitore (C) con ghiaccio e chiudetelo con il coperchio. Mettete del ghiaccio nel bacino (B). Posate la soluzione di PMSF (X) nel bacino col ghiaccio.



E: Prepare the heparin-solution: take a **SMALL** quantity of heparin powder from the heparin tube (H) with the spatula (S) and place it in the bottle (BO) filled with 25 ml cooled distilled water. Seal the bottle with the solution and shake vigorously. Put the bottle in the bath (B) with ice. The heparin-solution must be prepared fresh for every new sampling day.

I: Prepara la soluzione di heparina: prendete **POCA** polvere di heparina dal tubetto (H) con la spatola (S) e mischiate con 25 ml di acqua distillata fredda nella bottiglia (BO). Chiedete la bottiglia e agitatala vigorosamente. Appoggiate la bottiglia nel bacino (B) col ghiaccio. La soluzione di heparina deve essere preparata fresca per ogni giornata di campionario.



E: Prepare the coolbox for the sampling: instruction/ 2 frozen freeze packs (F) / container (C) with the ice/ bath (B) with ice and the bottle (BO) with the heparin-solution and the tube (X) with the PMSF-solution/ cryo marker (CM) / the scalpels (SC) /the required number of: tubes (T) for centrifugation and seals (L) - syringes (SY) for taking blood - cryo tubes (CT) to store the tissue - Needles (N) - Sampling Protocol.

I: Prepara il coolbox per il campionario: istruzione/ 2 freeze packs congelati (F)/ contenitore (C) col ghiaccio / bacino (B) con ghiaccio e con la bottiglia (BO) contenente la soluzione di heparina e con il tubetto (X) con la soluzione di PMSF / cryo marker (CM)/ dei scalpelli (SC)/ la quantità necessaria di: tubetti (T) per la centrifugazione con coperchi (L) - siringhe (SY) per raccogliere il sangue - tubetti cryo (CT1) per conservare il tessuto- aghi da iniezione (N) - Sampling Protocol.

If you have any questions contact:

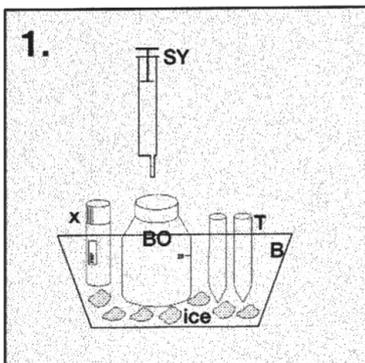
Vito Susca  
Phone: +49/ 211/ 811 4982  
e-mail: susca @uni-duesseldorf.de

C.R. Bridges  
Fax: +49/ 211/ 811 4991  
e-mail: bridges @uni-duesseldorf.de

Se avete domande contattate:

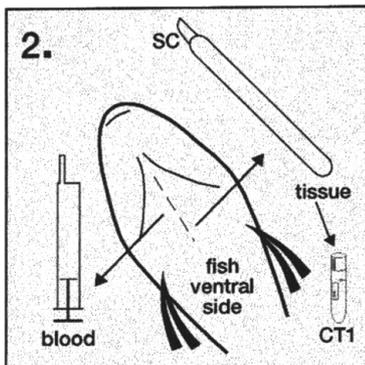
## Instruction part II

Sampling instructions/ istruzioni per il campionario



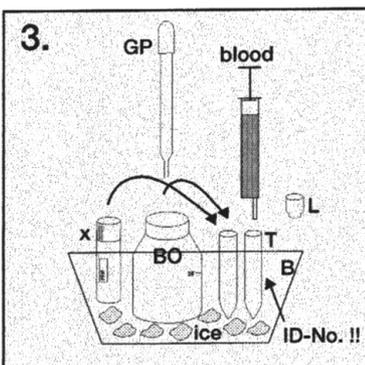
**E:** Place some tubes (T) in the bath (B) with ice. Wash (fill and empty in the bottle) one syringe (SY) with the heparin-solution and leave on the ice.

**I:** Mettete dei tubetti (T) nel bacino (B) col ghiaccio. Sciaquate (riempire e svuotare nella bottiglia) una siringa (SY) con la soluzione di heparina e lasciatela sul ghiaccio



**E:** Make a ventral cut with the scalpel (S) and take from here about 2 cm of muscle. Put the tissue into a cryo tube (CT1) and write on the tube the ID-No. with the cryo marker (CM) (use only this pen). Close the cryo tube and place in the container (C) with the ice. To take blood with the syringe washed with heparin-solution make a small incision in the heart or a cut through the Bulbus arteriosus and collect about 10 ml of blood. Use needle if you want. **You can take the samples in an other way of course, protocol it.**

**I:** Fate un taglio alla parte ventrale con lo scalpello (SC) e tagliate da qui circa 2 cm di muscolo. Mettete il tessuto in un tubetto cryo (CT1) e segnate l' ID-No. sulla parte bianca del tubetto con il cryo marker (CM) (usate solamente questa penna). Chiudete il tubetto cryo e mettetelo nel contenitore (C) col ghiaccio. Per raccogliere il sangue con la siringa sciacquata con la soluzione di heparina fate un piccolo taglio nel cuore o tagliate il Bulbus arteriosus, prendete circa 10 ml di sangue. Usate un'ago da iniezione se volete. **Potete prelevare il sangue e il tessuto in un'altra maniera se volete, protoccolatelo.**



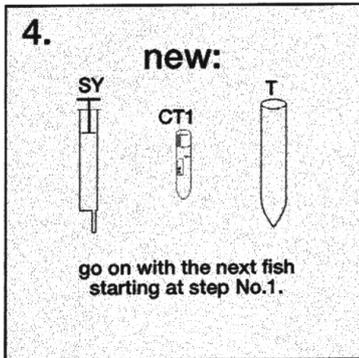
**E:** Place the collected blood in the cooled tube (T), add to the tube one drop of the heparin-solution and one of the PMSF-solution with the glas pipette (GP). Close the tube with the seal (L) and shake it carefully. Write with the cryo marker the ID-No. on it. Store the tube in the container (C) with the ice.

**I:** Versate il sangue raccolto nel tubetto (T) raffreddato, mettete con la pipetta di vetro (GP) una goccia di soluzione di heparina e di PMSF. Chiudete il tubetto di centrifugazione col tappo (L) e agitatelo leggermente. Segnate col cryo marker l'IDNo. sul tubetto. Posizionatelo nel contenitore (C) col ghiaccio.

If you have any questions contact:  
Se avete domande contattate

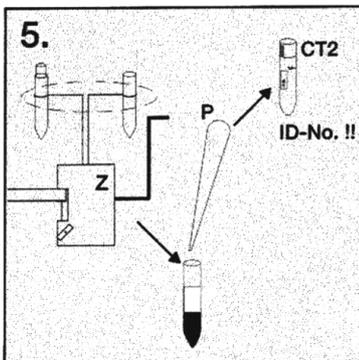
Vito Susca  
Phone: +49/ 211/ 811 4982  
e-mail: susca @uni-duesseldorf.de

C.R. Bridges  
Fax: +49/ 211/ 811 4991  
e-mail: bridges @uni-duesseldorf.de



E: For a new sample you need one new syringe (SY), (one new needle (N)), and tube (T). You need also one new cryo tube (CT1) for tissue.

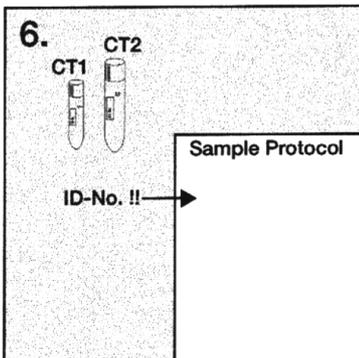
I: Per un nuovo campione avete bisogno di: una nuova siringa (SY), (un nuovo ago (N)) e un nuovo tubetto (T). Avete bisogno anche di un nuovo tubetto cryo (CT1) per il tessuto.



At the laboratory/ al laboratorio: mettete il tessuto nel congelatore

E: Attach the centrifuge (Z) to a table or something similar. Put 2 tubes with collected blood without seal in the centrifuge and centrifuge the blood until the plasma is completely separated from the erythrocytes. Aspirate the plasma with a pipette (P) (use always a new pipette), and add about 3,6 ml (see the mark on the tube) in the cryo tube (CT2). Write with the cryo marker the same ID-No. on the tubes as for the tissue. Store the tube with the plasma in the freezer (-20°C).

I: Fissate la centrifuga (Z) a un tavolo o qualcosa di simile. Mettete 2 tubetti col sangue raccolto nella centrifuga e centrifugate il sangue sino a separare completamente il plasma dagli eritrociti. Aspirate il plasma con una pipetta (P) (usa sempre una nuova pipetta) e versate circa 3,6 ml tubetto cryo (CT2) (vedi il marchio sul tubetto). Scrivete col cryo marker lo stesso ID-No. come sul tubetto con il tessuto. Posizionate il tubetto col plasma nel congelatore (-20°C).



E: Note the ID-No. in the Sample Protocol with all other data (Date, Length, Weight, Location, Remarks). On the Sample Protocol you can note your own sample number (ID-own) if you wish.

I: Notate l' ID-No. sul Sample Protocol con tutti gli altri dati (Date=Data, Length=Lunghezza, Weight=Peso, Località, Commenti). Nel Sample Protocol potete notare anche una vostra numerazione (ID-own) dei campioni se volete.

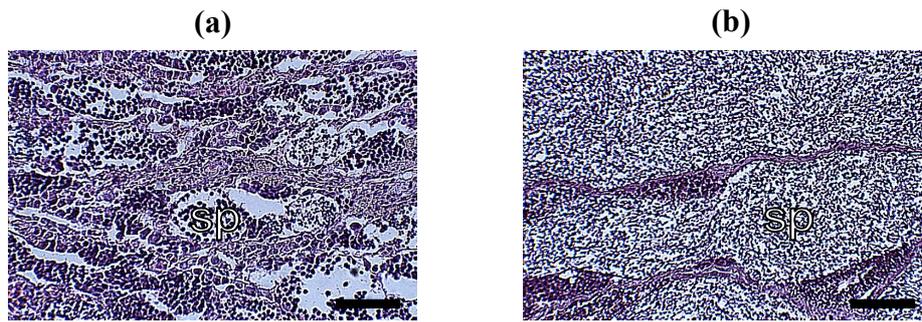
**7.**

E: Store all samples at -20°C in the freezer since you will send them to the laboratory of Düsseldorf on **dry ice** with a copy of the completed Sample Protocol.

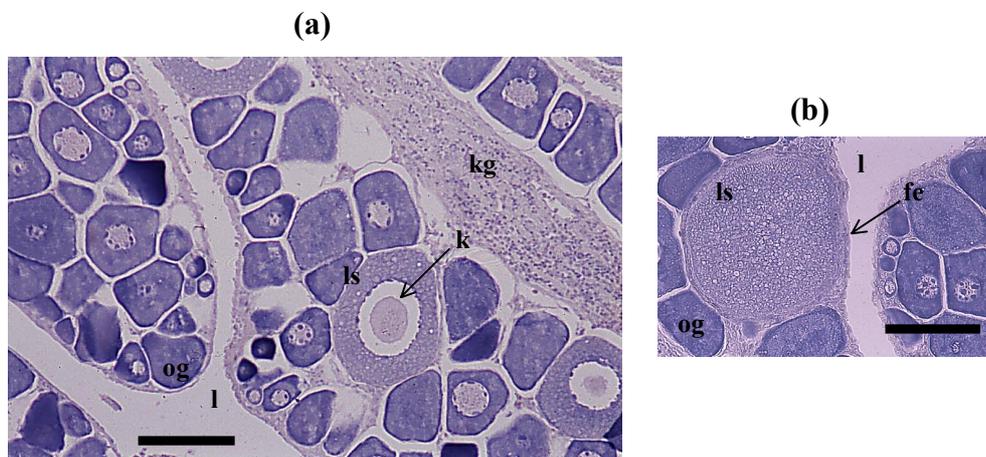
I: Mettete le prove nel congelatore a -20° C fino alla spedizione al laboratorio di Düsseldorf in **ghiaccio secco** con una copia completa del Sample Protocol.

<p>If you have any questions contact:</p> <p>Se avete domande contattate:</p>	<p>Vito Susca Phone: +49/ 211/ 811 4982 e-mail: susca @uni-duesseldorf.de</p>	<p>C.R. Bridges Fax: +49/ 211/ 811 4991 e-mail: bridges @uni-duesseldorf.de</p>
---	---	---

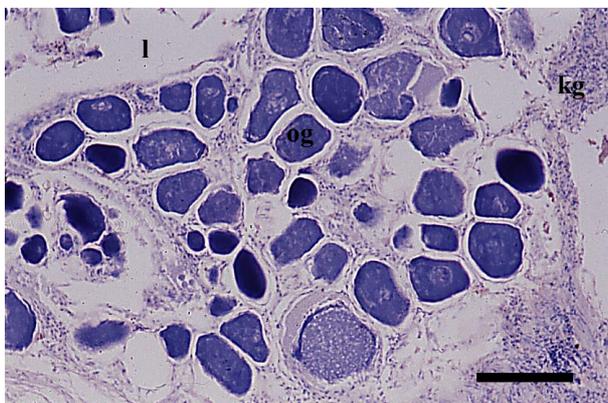
## Anhang 2



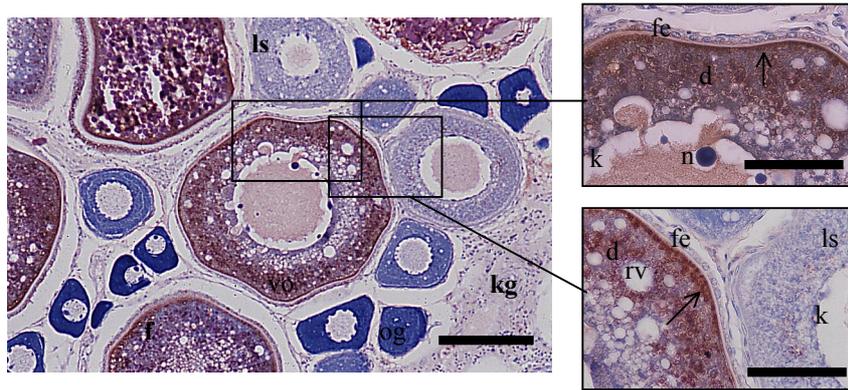
**Anhang 2, I.:** Querschnitte durch Hoden von *Thunnus thynnus*. a) Die Tubuli sind bei unreifen Hoden (April) wenig mit Spermatocyten (sp) gefüllt. b) Bei reifen Männchen (Mai) sind die Tubuli der Hoden voll mit Spermatocyten. Hämatoxylin-Eosin Färbung; Balken = 250  $\mu\text{m}$ .



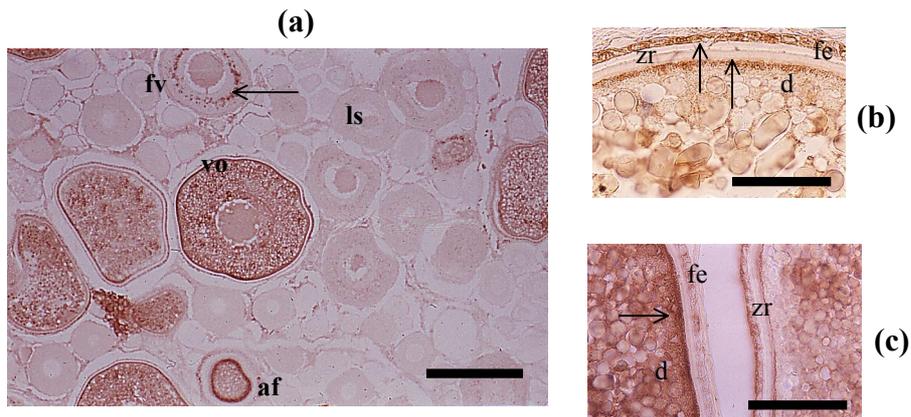
**Anhang 2, II.:** Querschnitt durch ein Ovarium von *Thunnus thynnus* mit der  $L_S$  von 102 cm vom Mai. In der immunohistochemischen Färbung mit der PAP-Methode und mit Hämatoxylin gegengefärbt sind keine vitellogenetischen Oocyten erkennbar. Die am meisten entwickelten Oocyten sind im Lipidstadium (ls). a) Balken = 500  $\mu\text{m}$ . b) Balken = 100  $\mu\text{m}$ , das Follikel epithel ist gut erkennbar. n = Nucleus, l = Lumen; ls = Lipidstadium, kg = Konnektivgewebe, fe = Follikel epithel, og = Oogonie.



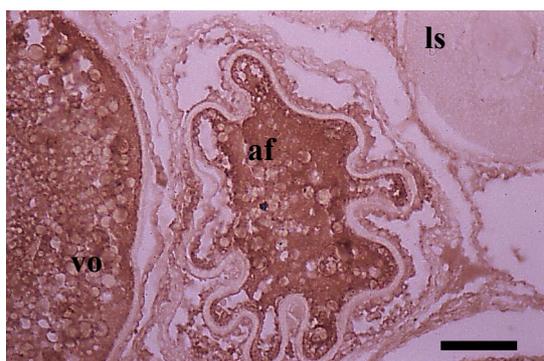
**Anhang 2, III.:** Querschnitt von einem abgelaichten Ovarium von einem adulten Weibchen vom September. Färbung mit der PAP-Methode und mit Hämatoxylin gegengefärbt sind keine vitellogenetischen Oocyten erkennbar. Balken = 500  $\mu\text{m}$ ; l = Lumen, kg = Konnektivgewebe, og = Oogonie.



**Anhang 2, IV.:** Querschnitt durch ein Ovarium von *Thunnus thynnus* von einem reifen Weibchen (Mai). In der immunohistochemischen Färbung mit der PAP-Methode und mit Hämatoxylin gegengefärbt sind vitellogenetische Oocyte gut erkennbar an der dunkelbraunen Einlagerung. Die Oocyten in verschiedenen Reifestadien sind charakteristisch für Portionslaicher. Balken = 500 µm. Extursionen von Zellkernmaterial ist gut erkennbar. In den vergrößerten Ausschnitten sind die Nucleoli gut zu erkennen und die Einlagerung von Vtg (Pfeile). Balken = 50 µm. n = Nucleus, l = Lumen; ls = Lipidstadium, kg = Konnektivgewebe, fe = Follikel­epithel, og = Oogonie, rv = Rindenvakuole, vo = vitellogenetische Oocyte.



**Anhang 2, V.:** Gleiches Ovarium wie in Anhang 2, IV ohne Gegenfärbung. a) Die Einlagerung von Dotter ist gut sichtbar an der dunkelbraunen Färbung. Der Pfeil deutet auf die frühe Vitellogenese hin. Balken = 250 µm. In der Vergrößerung von (a) ist das Follikel­epithel nicht Vtg-positiv (c), eine positive Reaktion ist nur in der Oocyte erkennbar (Pfeil). Balken = 50 µm. Mit der ABC-Methode wird nicht nur Vtg in der Oocyte (Pfeil) detektiert, sondern auch im Follikel­epithel (Pfeil). Balken = 25 µm. ls = Lipidstadium, fe = Follikel­epithel, fv = frühe vitellogenetische Oocyte, vo = vitellogenetische Oocyte, d = Dotter, zr = Zona radiata.



**Anhang 2, VI.:** Atretischer Follikel (af). Die Oocyte schrumpft, da der Dotter rückresorbiert wird. Immunohistochemisch gefärbt mit der PAP-Methode. Balken = 50 µm. ls = Lipidstadium, vo = vitellogenetische Oocyte.

## Literatur

- Abraham, M., Hilge, V., Lison, S. & Tibika, H. (1984). The cellular envelope of oocyte in teleosts. *Cell and Tissue Research* **235**, 403-410.
- Baglin, R.E. Jr. (1982). Reproductive biology of Western Atlantic Bluefin tuna. *Fishery Bulletin* **80**, 121-134.
- Benfey, T.J., Donaldson, E.M. & Owen, T.G. (1989). A homologous radioimmunoassay for coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) vitellogenin, with general applicability to other Pacific salmonids. *General and Comparative Endocrinology* **75**, 78-82.
- Block, B., Dewar, H., Farwell, C. & Prince, E.D. (1998). A new satellite technology for tracking the movements of Atlantic bluefin tuna. *Poc. Natinal Academy of Sciences* **95**, 9384-9389.
- Block, B., Dewar, H., Blackwell, S., Williams, T.D., Boustany, A., Prince, E.D. & Farwell, C. (2000). A Report to ICCAT on Archival and Pop-Up Satellite Tagging of Bluefin tuna in the Western North Atlantic. *GFCM-ICCAT/INFO/1*
- Blüm, V. (1995). Die hormonale Regulation der Gonadenreifung bei Knochenfischen. Im Symposiumsband: *Fortpflanzungsbiologie der Aquarienfische*, (Greven, H.& Riehl, eds), pp. 181-202, Bornheim: Schmettkamp.
- Bon, E., Barbe, U., Núñez Rodrigues, J., Cuisset, B., Pelissero, C., Sumpter, J.P. & Le Menn, F. (1997). Plasma vitellogenin levels during the annual reproductive cycle of the female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): establishment and validation of an ELISA. *Comparative Biochemistry* **117B**, 75-84.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid method for the quantification microgram quantities of proteine utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, pp. 248.
- Bridges, C.R., Schröder, P., Susca, V., Corriero, A. Deflorio, M. & De Metrio, G. (2000). A new muscle biopsy technique for sex and sexual maturity determination in large pelagic fishes. *ICCAT SCRS/00/92*.
- Buttler, M.J.A. (1978). St. Margaret's Bay blui fin research program, a progress report. *ICCAT/SCRS/77/89*, 7 (2), 371/4.
- Buttler, M.J.A. (1982). Pight of the Bluefin Tuna. *National Geographic*, August, 220-239.
- Cavallaro, G., Manfrin, G., Lo Duca, G. & Cavallaro, M. (1997). The presence of tuna larvae in the straits of Messina. *ICCAT. Collective Volume of Scientific Papers XLVI*, 222-224.
- Copeland, P.A., Sumpter, J.P., Walker, T.K. & Croft, M. (1986). Vitellogenin levels in male and female rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) at various stages of reproductive cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology* **83B**, 487-493.
- Cuisset, B., Pradelles, P., Kime, D.E., Kühn E.R., Babin, P., Davail, S. & Le Menn F. (1994). Enzyme immunoassay for 11-Ketotestosterone using acetylcholinesterase as label: application to the measurement of 11-Ketotestosterone in plasma of Siberian sturgeon. *Comparative Biochemistry and Physiology* **108C**, 229-241.
- de la Serna, J.M. & Alot, E. (1992). Análisis del sex-ratio por clase de talla y otros datos sobre la madurez sexual del atún rojo (*Thunnus thynnus*) en el área del Mediterráneo Occidental durante el periodo 1988-1991. *ICCAT. Collective Volume of Scientific Papers XXXIX*, 704-709.
- De Metrio, G., Arnold, G., de la Serna, J.M., Yannopoulos, C., Megalofonou, P., Buckley, A.A. & Pappalopore, M. (2000). Further Results of Tagging Mediterranean Bluefin Tuna with Pop-Up Satellite-Detected Tags. *ICCAT. SCRS/00/109*.
- Glantz, A.G. (1998). Biostatistik (von Heinecke, A. & Köpcke, W. eds). pp. 224-231. McGraw-Hill International (UK) Ltd.

- Goodwin, A.E., Grizzle, J.M., Brandley, J.T. & Estridge, B.H. (1992). Monoclonal antibody-based immunoassay of vitellogenin in the blood of male channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology* **101B**, 441-446.
- Graves, J.E., Gold, J.R., Ely, B., Quattro, J.M., Woodlley, C. & Dean, J.M. (1995) Population genetic structure of bluefin tuna in the north Atlantic ocean. I. Identification of variable genetic markers. *ICCAT Collective Volume of Scientific Papers* **45** (2): 155-157.
- Hara, A., Sullivan, C.V. & Dickhoff, W.W. (1993). Isolation and some characterization of vitellogenin and its related egg yolk proteins from coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Zoological Science* **10**, 245-256.
- Heppell, S.A. & Sullivan, C. (1999a). Gag (*Mycteroperca microlepis*) vitellogenin: purification, characterization and use for enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of female maturity in three species of grouper. *Fish Physiology and Biochemistry* **20**, 361-374.
- Heppell, S.A. & Sullivan, C. (1999b). Reproduction of bluefin tuna: assessing maturity using sex specific compounds present in muscle. *ICCAT Working Document*, SCRS/99/106.
- Heppell, S.A. & Sullivan, C. (2000). Identification of gender and reproductive maturity in the absence of gonads: muscle tissue levels of sex steroids and vitellogenin in gag (*Mycteroperca microlepis*). *Canadian Journal of Fisheries and aquatic sciences* **57**, 148-159.
- Hiramatsu, N. & Hara, A. (1996). Relationship between vitellogenin and its related egg yolk proteins in Sakhalin taimen (*Hucho perryi*). *Comparative Biochemistry and Physiology* **115A**, 243-251.
- Hunter, J.R. & Macewicz, B.J. (1985). Rates of atresia in ovary of captive and wild northern Anchovy, *Engraulis mordax*. *Fishery Bulletin* **83** (2), 119-136.
- Hsu S.M., Raine L. & Fanger H. (1981). The use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **29**, 577-580.
- Johnson, A.K., Thomas, P. & Wilson JR, R.R. (1998). Seasonal cycles of gonadal development and plasma sex steroid levels in *Epinephelus morio*, a protogynous grouper in the eastern Gulf of Mexico. *Journal of Fish Biology* **52**, 502-518.
- Kagawa, H., Young, G. & Nagahama, Y. (1983). Relationship between seasonal plasma 17 $\beta$ -estradiol and testosterone levels and *in vitro* production by ovarian follicles of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). *Biology of Reproduction* **29**, 301-309.
- Kime, D.E. (1993). 'Classical' and 'non-classical' reproductive steroids in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. **3**, pp. 160-180.
- Kime, D.E. (1998). Endocrine disruption in fish. Kluwer Academic Publishers, pp. 81-107.
- Kishida, M., Anderson, T.R. & Specker, J.L. (1992). Induction by beta-estradiol of vitellogenin in striped bass (*Morone saxatilis*): Characterization and quantification in plasma and mucus. *General and Comparative Endocrinology* **88**, 29-39.
- Kwon, H.C., Hara, A. & Mugiya, J. (1990). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of vitellogenin in whitespotted charr, *Salvelinus leucomaenis*. *Bulletin of the Faculty of Fisheries Hokkaido University* **41**, 162-180.
- Kwon, H.C., Hayashi, S. & Mugiya, Y. (1993). Vitellogenin induction by estradiol-17 $\beta$  in primary hepatocyte culture in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comparative Biochemistry and Physiology* **104B**, 381-386.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lokman, P.M., Vermeulen, G.J., Lambert, J.G.D. & Young, G. (1998). Gonad histology and plasma steroid profiles in wild New Zealand freshwater eels (*Anguilla*

- dieffenbachia* and *A. australis*) before and at the onset of the natural spawning migration. I. Females. *Fish Physiology and Biochemistry* **19**, 325-338.
- Lutcavage, M.E., Brill, R.W., Skomal, G.B., Chase, B. & Howey, P. (1999). Results of pop-up satellite tagging of spawning size class fish in the Gulf of Main: do North Atlantic bluefin tuna spawn in the mid-Atlantic? *Canadian Journal of Fishery and Aquatic Sciences* **56**: 173-177.
- Mañanos, E., Zanuy, S., Le Menn, F, Carrillo, M. & Núñez, J. (1994a). Sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) vitellogenin. I-Induction, purification and partial characterisation. *Comparative Biochemistry and Physiology* **107B**, 205-216.
- Mañanos, E., Núñez, J., Zanuy, S., Carrillo, M. & Le Menn, F. (1994b). Sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) vitellogenin. II-Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Comparative Biochemistry and Physiology* **107B**, 217-223.
- Matsubara, T., Wada, T. & Hara, A. (1994). Purification and establishment of ELISA for vitellogenin in Japanese sardine (*Sardinops melanostictus*). *Comparative Biochemistry and Physiology* **107B**, 217-233.
- Matsuyama, M., Adachi, S., Nagahama, Y. & Matsuura, S. (1988) – Diurnal rhythm of oocyte development and plasma steroid hormone levels in the female red sea bream, *Pagrus major*, during the spawning season. *Aquaculture* **73**, 357-372.
- Maurer, H.R. (1971). Disc Electrophoresis. p. 76, Berlin W. : de Gruyter.
- Morgan, M.J., Wilson, C.E. & Crim, L.W. (1999). The effect of stress on reproduction in Atlantic cod. *Journal of Fish Biology* **54**, 477-488.
- Mosconi, G., Carnevali, O., Carletta, R., Nabissi, M. & Polzonetti-Magni, A.M. (1998). Gilthead seabream (*Sparus aurata*) vitellogenin: purification, partial characterization, and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *General and Comparative Endocrinology* **110**, 252-261.
- Mourot, B. & Lebail, P.Y. (1995). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) vitellogenin. *Journal of Immunoassay* **16**, 365-377.
- Nash, J. P., Davail-Cuisset, B., Bhattacharyya, S., Suter, H., Le Menn, F. & Kime, D. E. (2000). An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for testosterone, 17 $\beta$ -estradiol, and 17 $\beta$ ,20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one using acetylcholinesterase as tracer: Application to measurement of Diel patterns in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology and Biochemistry*. **22**, 355-363.
- Nemerson, D., Berkeley, S. & Safina, C. (2000). Spawning site fidelity Atlantic bluefin tuna, *Thunnus thynnus*: the use of size-frequency analysis to test for the presence of migrant east Atlantic bluefin tuna on Gulf of Mexico spawning grounds. *Fishery Bulletin* **98** (1), 118-126.
- Nishida, T., Tsuji, S. & Segawa, K. (1997). Spatial data analyses of atlantic bluefin tuna larval surveys in the 1994 ICCAT BYP. *ICCAT. Collective Volume of Scientific Papers XLVIII*, 107-110.
- Ng, T.B. & Idler, D.R. (1983). Yolk formation and differentiation in teleost fishes. In "Fish Physiology Reproduction" (Hoar, W.S., Randall, D.J. & Donaldson, E.M. eds), Part A, pp. 373-404. New York, Academic Press.
- Núñez Rodríguez, J., Kah, O., Geffard, M. & Le Menn, F. (1989). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for sole (*Solea vulgaris*) vitellogenin. *Comparative Biochemistry and Physiology* **92B**, 741-746.
- Pankhurst, N.W. (1998). Further evidence of the equivocal effects of cortisol on in vitro steroidogenesis by ovarian follicles of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiology and Biochemistry* **19**, 315-323.

- Patzner, R.A. & Lahnsteiner, F. (1995). Männliche Keimzellen von Knochenfischen. Im Symposiumsband: *Fortpflanzungsbiologie der Aquarienfische*, (Greven, H.& Riehl, eds), 59-68, Bornheim: Schmettkamp
- Perez, L.E. & Callard, I.P. (1992). Identification of vitellogenin in the little skate (*Raja eriancea*). *Comparative Biochemistry and Physiology* **103B**, 699-705.
- Piccinetti, C., Piccinetti-Manfrin, G. & Dicenta, A. (1977). Premieres peches quantitatives de larves de thonides en Adriatique. *Rapport Commision International Mer Méditerranée* **24**, 5.
- Piccinetti, C., Piccinetti-Manfrin, G. & Soro, S. (1997). Résultats d'une campagne de recherche sur les larves de thonidés en Méditerranée. *ICCAT. Collective Volume of Scientific Papers XLVI* 207-214.
- Pottinger, T., Yeomans, W.E. & Carrick, T.R. (1999). Plasma cortisol and 17 $\beta$ -oestradiol levels in roach exposed to acute and chronic stress. *Journal of Fish Biology* **54**, 525-532.
- Rehn, H. (2000). *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics.3.*, überarb. Aufl.-Heidelberg: Berlin: Spektrum, Akad. Verl. pp. 105.
- Reis-Henriques, M.A., Ferreira, M., Silva, L. & Dias A. (2000) Evidence for an involvement of vitellogenin in the steroidogenic activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) vitellogenin oocytes. *General and Comparative Endocrinology* **117**, 260-267.
- Riehl, R. (1995). Die Eier und Eihüllen von Knochenfischen. Im Symposiumsband: *Fortpflanzungsbiologie der Aquarienfische*, (Greven, H.& Riehl, eds), pp. 11-26, Bornheim: Schmettkamp
- Rodríguez-Roda, J. (1964). Biología del Atún, *Thunnus thynnus* (L), de la costa sudatlántica de Espana. *Investigaciones Pesqueras* **25**, 33-164.
- Rodríguez-Roda, J. (1967). Fecundidad del atún, *Thunnus thynnus* (L), de la costa sudatlántica de Espana. *Investigaciones Pesqueras* **31**, 33-52.
- Roubal, W.T., Lomax, D.P., Willis, M.L. & Johnson, L. (1997). Purification and partial characterization of English sole (*Pleuronectes vetulus*) vitellogenin. *Comparative Biochemistry and Physiology* **118B**, 613-622.
- Sarà, R. (1998). Dal Mito all'Aliscafo. Storie di tonni e di tonnare. Migrazioni e biologia, leggende, tradizioni e socialità. Buch publiziert vom Autor: Piazzale De Gasperi, 18 – 90146 Palermo (Italia).
- Schaefer, K.M. (1998). Reproductive biology of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) in the Eastern Pacific Ocean. *Inter-American Tropical Tuna Commission. Bulletin* **21**:5.
- Schmidt-Nielsen, K. (1999). Physiologie der Tiere. *Spektrum Akademischer Verlag GmbH*, Heidelberg – Berlin. pp. 255.
- Schrägger, H. (1994). Native gel electrophoresis. In *A Practical Guide to Membrane Protein Purification* (von Jagow, G. & Schrägger, H. eds). pp. 81-95. New York: Academic Press. Inc.
- Scott, A.P, Stewart, C., Allen, Y. & Matthisen, P. (2000). 17 $\beta$ -oestradiol im male flatfish. In *Proceeding of the 6<sup>th</sup> International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*, (Noberg, B., Kjesbu, O.S., Taranger, G.L., Andersson, E. & Stefansson, S.O., eds), pp. 382, Bergen: FishSymp.99.
- Sissenwine, M.P., Mace, P.M., Powers, J.E. & Scott, G.P. (1998). A Commentary on Western Atlantic bluefin tuna assessment. *Transcription of the American Fisheries Society*. **127**, 838-855.
- So, Y.P., Idler, D.R. & Hwang, S.J. (1985). Plasma vitellogenin in the landlocked Atlantic salmon, *Salmon solar* Ouananiche: Isolation, homologous radioimmunoassay and immunological crossreactivity with vitellogenin from other teleosts. *Comparative Biochemistry and Physiology* **81B**, 63-71.

- Specker, J.L. & Anderson, T.R. (1994). Developing an ELISA for a model protein-vitellogenin. In *Analytical Techniques* (Hochachka, P.W. and Mommsen, T.P., eds), pp. 567-578. Amsterdam: Elsevier..
- Sumpter, J.P. (1995). Feminized responses in fish to environmental estrogens. *Toxicology Letters* **82/83**, 737-742.
- Suquet, M., M.H. Omnes, Y. Normant and C. Fauvel. 1992. Influence of photoperiod, frequency of stripping and presence of females on sperm output in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Aquaculture and Fisheries Management* **23**: 217-225.
- Susca, V. (1996). Sauerstofftransport bei pelagisch lebenden Fische. Diplomarbeit, Universität Düsseldorf.
- Susca, V., Corriero, A., M. Bridges, C.R. & De Metrio, G. (2001). Study of the sexual maturity of female bluefin tuna: purification and partial characterization of vitellogenin and its use in an enzyme-linked-immunosorbent assay. *Journal of Fish Biology* **58**, 815-831.
- Tao, Y., Hara, A., Hodson, R.G., Woods III, L.C. & Sullivan, C.V. (1993). Purification, characterization and immunoassay of striped bass (*Morone saxatilis*) vitellogenin. *Fish Physiology and Biochemistry* **12**, 31-46.
- Tao, Y., Berlinky, D.L. & Sullivan, C.V. (1996). Characterization of a vitellogenin receptor in white perch (*Morone americana*) vitellogenin. *Biology and Reproduction* **5**, 646-656.
- Tyler, C.R., Sumpter, J.P. & Bromage, N.R. (1988). *In vivo* ovarian uptake and processing of vitellogenin in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Journal of Experimental Zoology* **246**, 171-179.
- Young, G., Crim, L., Kagawa, H., Kambegawa, A. & Nagahama, Y. (1983). Plasma  $17\beta,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one levels during sexual maturation of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*): Correlation with plasma gonadotropin and *in vivo* production by ovarian follicles. *General and Comparative Endocrinology* **51**, 96-106.