



HEINRICH HEINE
UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

**Molekularbiologische und physiologische Untersuchungen der
Fischreproduktion für ein verbessertes Aufzuchtmanagement:
Eine Fallstudie am Atlantischen Blauflossenthunfisch
*Thunnus thynnus***

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Stephan Klaus Schulz
aus Düsseldorf

Düsseldorf, Januar 2012

aus dem Institut für Stoffwechselphysiologie
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. C.R. Bridges

Korreferent: Prof. Dr. E. Lammert

Tag der mündlichen Prüfung:

Erklärung

Die hier vorgelegte Inauguraldissertation habe ich eigenständig und ohne fremde Hilfe angefertigt. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht. Die Inauguraldissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch in keiner anderen Institution eingereicht.

Stephan Klaus Schulz

Düsseldorf, den 27.01.2012

1	EINLEITUNG	10
1.1	Fischerei & Fangmethoden	10
1.2	Ökonomische Bedeutung & Bestandsmanagement	12
1.3	Allgemeine Biologie & Lebensraum	14
1.4	Reproduktion.....	16
1.4.1	HPGL-Achse	17
1.4.2	Oozytenwachstum (Vitellogenese & Zonagenese).....	18
1.4.3	Oozytenreifung.....	21
1.5	Xenobiotika und deren Einfluss auf den ABFT.....	21
1.6	Reproduktive Fehlfunktionen von in Gefangenschaft gehaltenen ABFT.....	23
1.7	Hormonbasierende Gegenmaßnahmen zur Regulierung der Fehlfunktionen.....	24
1.8	Ziele der Arbeit	26
2	MATERIAL & METHODEN	27
2.1	Sammelgebiete, Probenart und-herkunft	27
2.2	Tierhaltung	28
2.3	Probenentnahme.....	29
2.3.1	Plasmaproben.....	30
2.3.2	Leber- und Gonadenproben	31
2.4	Quantitative Bestimmung von Vitellogenin- und Zona radiata Proteinen per ELISA	32
2.4.1	Aufbereitung der Plasmaproben für die ELISA-Messung	32
2.4.2	Indirekter kompetitiver Vitellogenin ELISA.....	33
2.4.3	Indirekter kompetitiver Zona radiata ELISA.....	34
2.4.3.1	Extraktion von Zona radiata Proteinen zur Antikörperherstellung.....	34
2.4.3.2	Synthese von polyklonalen Antikörpern gegen Zona radiata Proteine	35
2.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	35
2.6	Western Blot.....	36
2.7	Dot-Blot.....	37
2.8	Immunopräzipitation	38
2.9	Quantitative Bestimmung von 17 β -Estradiol per ELISA.....	38
2.9.1	Extraktion der Steroide aus Plasmaproben	38
2.9.2	Der Steroid ELISA	39
2.9.3	Vorbereiten der Proben für den ELISA	39
2.9.4	Vorbereiten der Mikrotiterplatten	40
2.9.5	Tracer Herstellung	40
2.9.6	Die Steroid ELISA Prozedur	41
2.9.7	Auswertung der ELISA	42

2.10	Hormonimplantate	43
2.10.1	Herstellung	43
2.10.2	Bestimmung der Hormonabgaberate <i>in-vitro</i> und <i>in-vivo</i>	44
2.10.3	Extraktion von 17 β -Estradiol aus den Implantaten	45
2.10.4	3D-Computertomographische-Analyse	45
2.10.5	Hormoninduktion an freischwimmenden ABFT	47
2.11	RNA-Aufreinigung und cDNA-Synthese	48
2.12	Sequenzanalyse von Perciformes Estrogen Rezeptor alpha und Primer-Design	49
2.13	Klonierung von ABFT Estrogen Rezeptor alpha	50
2.14	DNA Sequenzierung und Sequenzvergleich	51
2.15	Phylogenetische Analyse	51
2.16	Genexpressionsanalyse per Q-PCR	52
2.16.1	Primerdesign	52
2.16.2	Q-PCR: Methodik und Programmeinstellungen zur Datenanalyse	53
2.16.3	Evaluierung des Kontrollgens, Primer-Effizienz und -Konzentration	54
2.17	Statistische Analyse	55
3	ERGEBNISSE	57
3.1	Klonierung von ABFT Estrogen Rezeptor alpha	57
3.2	Molekulare Charakterisierung und phylogenetische Analyse von ERα aus <i>Thunnus thynnus</i>	58
3.3	Evaluierung der Meβsysteme	62
3.3.1	Genexpressionsanalyse per Q-PCR	62
3.3.1.1	RNA & cDNA Qualit \ddot{a} t	62
3.3.1.2	Primerspezifit \ddot{a} t	63
3.3.1.3	Schmelzpunktanalyse	65
3.3.1.4	Primerkonzentration	66
3.3.1.5	Kontrollgen-Evaluierung	67
3.3.1.6	Intra- und Inter-Assay Variation	68
3.3.1.7	Effizienzbestimmung	69
3.3.2	Protein- und Steroidhormonbestimmung per ELISA	71
3.3.2.1	Aufreinigung von Eih \ddot{u} llenprotein (Zona radiata) und Antik \ddot{o} rperherstellung	71
3.3.2.2	Charakterisierung von ELISA und Steroidextraktionsmethode	74
3.3.2.3	Intra- und Inter-Assay Variationen	76
3.4	Reproduktionsphysiologische Parameter im Vergleich zwischen juvenilen und adulten Wild- und K\ddot{a}figtieren	77
3.4.1	Gametogenese	77
3.4.2	Wildbahntiere	79
3.4.3	Ern \ddot{a} hrung	84
3.4.4	Juvenile Thunfische	86
3.5	Hormonimplantate	88
3.5.1	Entwicklungsarbeit f \ddot{u} r die Herstellung	88
3.5.2	<i>In-vitro</i> Untersuchungen zur Hormonabgaberate	91
3.5.3	<i>In-vivo</i> Untersuchungen zur Hormonabgaberate und -wirkung	93
3.5.3.1	Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	93
3.5.3.2	Wolfsbarsch (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	96
3.5.3.3	Juvenile Thunfische (<i>Thunnus thynnus</i>)	97

4	DISKUSSION	101
4.1	Phylogenetische Analyse und Charakterisierung von ER α des ABFT	101
4.2	Bedeutung von ER α für den Reproduktionszyklus weiblicher ABFT	103
4.3	Reproduktive Fehlfunktionen von in Gefangenschaft lebenden ABFT.....	104
4.3.1	Einfluss der Ernährung auf die reproduktive Entwicklung	109
4.4	Hormoninduktion zur möglichen Regulierung der Fehlfunktionen.....	110
4.4.1	17 β -Estradiol Hormonimplantate: Herstellung und Abgabekinetik <i>in-vitro</i>	112
4.4.2	17 β -Estradiol Hormonimplantate: Wirkung auf die HPGL-Achse <i>in-vivo</i>	115
4.5	Der Einfluss von Xenobiotika auf den ABFT.....	118
4.6	Kritische Betrachtung	120
4.6.1	Forschung am ABFT und der Aufbau einer nachhaltigen Aquakultur	120
4.6.2	Experimentelle Umsetzung der Hormoninduktion und genutzte Methodik zur Bestimmung der reproduktionsphysiologischen Parameter	121
5	ZUSAMMENFASSUNG	124
6	SUMMARY	126
7	LITERATURVERZEICHNIS	128
8	ANHANG.....	144
9	DANKSAGUNG	149

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABFT	Atlantischer Blauflossen Thunfisch
AchE	Acetylcholinesterase
ALLOTUNA	Set up of an integrate system of the bluefin tuna (<i>Thunnus thynnus</i>) farming in the Gulf of Taranto
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat Dinatriumsalz
Bo	Maximum Binding
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CMO	Carboxymethyloxim
CV %	Coefficient of Variation
DBD	DNA bindende Domäne
DCM	Dichlormethan
<i>DOTT</i>	Domestication of <i>Thunnus thynnus</i>
$E_{280\text{ nm}}$	Extinktion bei einer Wellenlänge von 280 nm
EDC	Endocrine disrupting chemical
ELISA	Enzym linked Immunosorbent Assay
ER(α , β , γ)	Estrogen Rezeptor (alpha, beta, gamma)
ERE	Estrogen Respons Element
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GnRH(a)	Gonadotropin releasing Hormon (Agonist)
GSI	Gonadosomatischer Index
GtH	Gonadotropin(e)
h	Zeitanagbe (Stunde)

HKG	House Keeping Gen
HPGL-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Gonadale-Leber-Achse
ICCAT	International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas
IUCN	International Union for Conservation of Nature)
kDa	Kilo-Dalton
L	Mengenangabe (Liter)
LBD	Liganden bindende Domäne
LH	Luteinisierendes Hormon
LV	Lipovittelin
mAU	milli Absorption Unit
MIH	Maturation Inducing Hormone
min	Zeitangabe (Minute)
mS	MilliSiemens
mt	metrische Tonne
MW	Molekulargewicht
MWCO	molecular weight cut off
n	Anzahl der Einzelmessungen
NBT	Dimethylformamid-Nitrobluetetrazolium-Chlorid
nm	Wellenlänge
n.v.	nicht veröffentlicht
NSB	Nicht-spezifische Bindungen
OM	Oozytenmaturation
p.i.	post Injektion
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PV	Phosphitin
r	Korrelationskoeffizient
REPRODOTT	Reproduction and domestication of <i>Thunnus thynnus</i>
SD	Standardabweichung

SDS	Sodiumdodecylsulfat
<i>SELFDOTT</i>	Self-sustained Aquaculture and Domestication of Bluefin Tuna <i>Thunnus thynnus</i>
SHBG	Sex Hormon bindende Globuline
Std.	Standard
T	Testosteron
Tab.	Tabelle
TF	Transkriptionsfaktor
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Enzymaktivität
u.a.	unter anderem
V	Volt
Vtg	Vitellogenin
VtgR	Vitellogenin Rezeptor
ZrP	Zona radiata Protein
\bar{x}	Mittelwert
11-KT	11-Ketotestosteron
∅	Durchmesser

1 Einleitung

1.1 Fischerei & Fangmethoden

Keine andere Fischart hat die Kultur und die Traditionen der Mittelmeeranrainerstaaten so geprägt wie der Atlantische Blauflossenthunfisch (ABFT). Erste Hinweise, dass Thunfische schon im 7. Jahrtausend v. Chr. im Mittelmeerraum befishet wurden, konnten durch archäologische Ausgrabungen bewiesen werden (Desse & Desse-Berset, 1994). Bereits in der Antike berichteten der griechische Philosoph Aristoteles, sowie einige andere römische Philosophen, über die in das Mittelmeer wandernden Thunfischschwärme (Mather *et al.*, 1995). In seiner naturwissenschaftlichen Schrift „De partibus animalium“ (gr. *peri zôôn moriôn*, Über die Teile der Tiere), die im 4. Jahrhundert v. Chr. entstand, beschreibt er den morphologischen Aufbau diverser Tierarten, unter anderem auch den der Thunfische. In einer weiteren Schrift „Historia animalium“ (gr. *Περὶ τὰ Ζῷα Ἱστορίαι*, Tierkunde), war er einer der ersten der vermutete, dass der ABFT eigentlich aus dem Atlantischen Ozean stammend in das Mittelmeer einwandert um zu seinen Laichgründen zu gelangen.

Während zu Beginn der Aufzeichnungen die Fischerei nur per Hand oder vereinzelt auch mit Netzen vom Strand aus stattfand, wurden später, zwischen dem 16. und 17. Jahrhundert, die Strandnetze durch Fallensysteme (italienisch: tonnara; spanisch: almadraba) im tieferen Wasser ersetzt. Hierbei nutzte man die natürlichen Wanderwege zur Laichzeit der Thunfische, die die Tiere entlang küstennaher Gewässer ins Mittelmeer ziehen lassen. Durch diese großflächigen Fallensysteme, die einem Labyrinth ähneln, werden die Tiere in immer enger werdende Gänge geleitet, bis sie letztendlich in das Ende der Anlage gelangen, die auch Todeskammer genannt wird. Diese Art der Befischung wurde und wird auch immer noch im gesamten Mittelmeer und an der Straße von Gibraltar betrieben, wo zu damaliger Zeit die ersten industriellen Fischereibetriebe entstanden. Schon damals (um 1550) fing man im Jahr über 15.000 t Thunfisch (Ravier & Fromentin, 2001 & 2002). Generell hat die

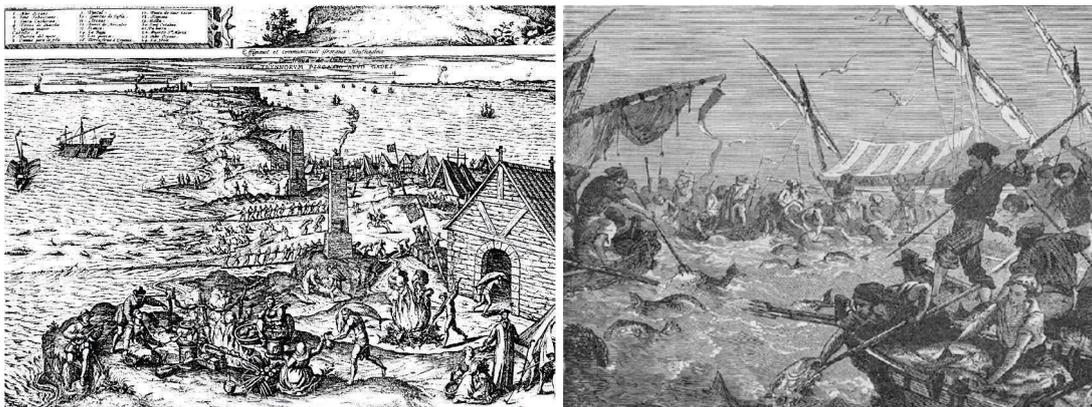


Abb.1.1: links) Bild über die traditionelle Thunfischfischerei im 17. Jahrhundert in der Nähe von Cadiz (Süd-Spanien) von G. Braun and F. Hogenberg (1612 - *Civitates Orbis Terrarum, Colonia*). Die durch die Straße von Gibraltar zu ihren Laichgründen wandernden Thunfische, wurden von Beobachtern auf ihren Türmen erspäht, durch große zuvor gelegte Strandnetze gefangen und direkt an Land von der lokalen Industrie in Dosen verarbeitet. **rechts)** Thunfischfang vor der Küste der Provence im 18. Jahrhundert (von F. Whympfer, 1883) durch Fallensysteme. Diese ersetzten die zuvor erwähnten Strandnetze, da ihre Anwendung einen geringeren Arbeitsaufwand bedeutete.

Bedeutung dieser Fangarten abgenommen, da sie nicht mehr wirtschaftlich sind. Die seit Mitte der 90er Jahre gebräuchlichsten Fangmethoden sind die Langleine (long line) und das Ringwadennetz (purse seining), wobei zuletzt genannte Methode diejenige ist, die den Wildtierbeständen am meisten zusetzt. Allein durch diese werden heutzutage bis zu 85 % der gemeldeten Fänge gemacht (Ottolenghi, 2008). Mit dem Einsatz von riesigen Netzen, die um einen Schwarm von Fischen bis in eine Tiefe von 200 m geführt und nach Ringschluss wie ein Sack (purse) von unten zugezogen werden, kann man so ganze Schwärme von Fischen fangen. Im Fall von Thunfischen können diese bis zu mehreren hundert Tieren groß sein. Während das Fangen mit der Langleine, welche sich Kilometer weit hinzieht und mit tausenden von Köderhaken bestückt ist, nicht so stark reglementiert ist, darf man das purse seining nur in den Monaten der Laichwanderungen von Mai bis Juni anwenden (Mylonas *et al.*, 2010a). Dies stellt aus Überlegungen der Artenrettung einen Widerspruch in sich dar, denn zu keinem anderen Zeitpunkt sind die Tiere leichter zu fangen als während ihrer Laichwanderungen. Ein großer Nachteil der Langleinenteknik ist ihre immense Beifangrate, die im Jahr 2005 bei über 20 % lag (FAO, 2005).

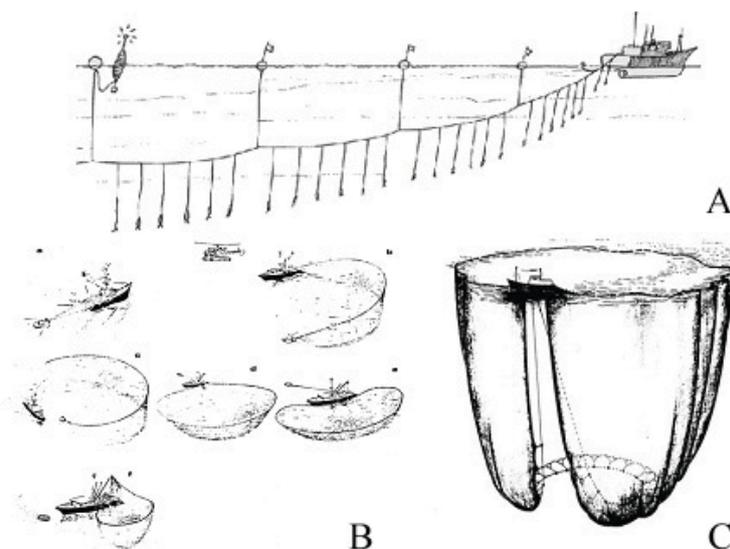


Abb.1.2: Heute genutzte Fangmethoden für Thunfische. **A)** Langleine (engl.: long line) mit Köderhaken (Abbildung nach NOAA, 2011). **B-C)** Ringwadennetz (engl.: purse seining; Abbildung nach Stéquert and Marsac (1983) & FAO 2004-2011 Fishing Techniques).

Um den Anforderungen des Hauptabnehmers Japan gerecht zu werden, der sehr fettreiches Fleisch für die Herstellung von Sushi, besonders aus der Bauchregion (toro) der Tiere, bevorzugt, entwickelte sich in den letzten Jahrzehnten rund um das Mittelmeer aus dem normalen Fischfang, bei dem die Tiere direkt nach dem Fang getötet wurden, eine fast reine Mastindustrie. Nachdem die Fische im Schwarm gefangen wurden, werden sie, je nach Fangort im Mittelmeer, über Monate langsam (1-2 Knoten) in einem sogenannten Schleppkäfig (towing cage) zu den jeweiligen Fischfarmen transportiert. Hier werden sie dann in kleinere Käfige transferiert, in denen man sie anschließend mästet (siehe Abb.2.3). So wurden viele Fischmastbetriebe in Spanien, Malta, Kroatien, Türkei, Zypern, Liby-

en und Tunesien (Lioka *et al.*, 2000) gegründet. Hier werden die aus der Wildbahn gefangenen Tiere für einen Zeitraum zwischen zwei Monaten und zwei Jahren, je nach Marktlage, gemästet, bevor sie geschlachtet und in alle Welt verschifft werden (Miyake *et al.*, 2003; Ottolenghi *et al.*, 2004; ICCAT 2008a). Kroatien stellt dabei eine Ausnahme dar. Es ist das einzige Land, dem es aus historischen und kulturellen Gründen erlaubt wird auch kleine Thunfische (≥ 8 kg) zu fangen. Sonstige Länder müssen eine Mindestfanggröße von 30 kg einhalten.

Konnte man früher noch die Biomasse, Größe und Altersstruktur der gefangenen Tiere direkt nach Fang bestimmen, da sie sogleich verarbeitet wurden, ist dies heute in der Masttierhaltung wegen einer mangelnden technischen Umsetzung nicht möglich. Hieraus ergeben sich Schwierigkeiten in der Datenbereitstellung für die Beurteilung der Bestände, da hierfür nur das Schlachtgewicht und die Größe der Tiere nach der Mästung zur Verfügung steht. Wie viel die Fische allerdings während der Mast an Gewicht und Größe zugenommen haben, ist von vielen Faktoren abhängig und kann deshalb nur geschätzt werden.

1.2 Ökonomische Bedeutung & Bestandsmanagement

Der Fang von Thunfischen bildet die Grundlage für eine weltweit sehr gewinnbringende Fischereindustrie. Während 2002 noch 9 Millionen metrische Tonnen (mt) gefangen wurden, waren es im Jahr 2007 weltweit nur noch 6,3 Millionen mt. 2008 hatten Thunfische einen Anteil von 8 % am Gesamtweltexportvolumen von Fischprodukten (FAO, 2004 & 2010), was einem Wert von 6 Mrd. Euro entsprach. Durch diese starke Befischung stehen mittlerweile die meisten Thunfischarten kurz vor dem Aussterben. Nur eine der Gattung *Katsuwonus* zugehörige Art, der Bonito (*Katsuwonus pelamis*), stellt hier eine Ausnahme dar. Trotz seiner starken Befischung für die weltweite Thunfischkonservenindustrie, sind seine Bestände noch intakt. Die bedrohteste Thunfischart, stellt der ABFT dar, so dass er von der IUCN (International Union for Conservation of Nature) auf die Liste vom Aussterben bedrohter Tierarten gesetzt wurde (IUCN, 2011). Hauptsächlich verantwortlich für diese Lage ist der Suhi-Sashimi Markt. Durch diese stetig anwachsende Nachfrage vor allem in Japan, mittlerweile aber auch in Europa und den USA (Catarci, 2004) werden die Preise für diesen einzigartigen Thunfisch und sein Fleisch stark beeinflusst und machen diesen Markt so zu dem gewinnbringendsten Fischmarkt weltweit. Im Januar 2011 wurde für einen 342 kg schweren ABFT eine Rekordsumme von umgerechnet 279.000 € auf dem weltgrößten Fischmarkt Tsukiji in Tokio geboten (Williams, 2011). Wegen diesem besorgniserregenden Trend, der seit den frühen 70er Jahren immer weiter zunahm, wurde die ICCAT (International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas) gegründet. Sie ist seit dieser Zeit für das Management bedrohter Fischarten, vor allem für Thunfische und mit ihm verwandte Spezies, verantwortlich und überwacht mit den ihr zur Verfügung stehenden Mitteln die Wildtierbestände und die Fangzahlen des ABFT im Atlantischen Ozean und im gesamten Mittelmeer. Um eine bessere Einschätzung und Handhabung des Bestandes zu erzielen, wurde der Thunfischbestand in zwei geographisch separierte Populationen geteilt. 1982 wurde so durch die Statistikabteilung der ICCAT die SCRS (Standing Committee on Research and Statistics) eine imaginäre Grenze entlang des 45° westlicher Länge gezogen (Ottolenghi, 2008).

Die Annahme der Zwei-Populationen-Theorie stand in zunehmender Kritik, da durch Markierungsexperimente bewiesen werden konnte, dass eine transatlantische Migration von Individuen stattfindet (Lutcavage *et al.*, 1999; Block *et al.*, 2001 & 2005). Durch eine Vielzahl von weiteren Markierungsexperimenten, genetischen Analysen und durch die Detektion von radioaktiven Isotopen aus knöchernen Strukturen der Fische (Rooker *et al.*, 2006 & 2008 a, b), wurde versucht Klarheit in diese Frage zu bringen. Neuste Erkenntnisse, in denen die Ergebnisse sämtlicher Methoden einfließen, bestärken nun die Zwei-Populationen-Theorie (Carlson *et al.*, 2007; Boustany *et al.*, 2007) und werfen gleichzeitig eine zusätzliche Hypothese einer im östlichen Mittelmeer befindlichen ABFT Population auf, die anscheinend standorttreu das ganze Jahr in diesem Teil des Mittelmeeres verweilt (Karakulak *et al.*, 2004; Carlson *et al.*, 2004; Heinisch *et al.*, 2008). Untermuert wird diese These desweiteren durch den Umstand, dass beide Populationen ein unterschiedliches Alter beim Eintritt in die Geschlechtsreife aufweisen.

Nachdem es im Jahr 2010 nicht gelungen war den ABFT auf die CITES-Liste (Convention on International Trade in Endangered Species) bedrohter Tierarten zu setzen und damit den internationalen Handel gänzlich zu verbieten, blieb der ICCAT als einzigstes Mittel weiterhin nur die Begrenzung der Fangquoten der einzelnen Länder bzw. unter seiner Flagge fahrenden Fischflotten. So wurde in den letzten Jahren durch die ICCAT, in denen durch wissenschaftliche Berichte immer wieder über einen weiteren dramatischen Rückgang der ABFT Wildtierbestände berichtet wurde, immer geringere Fangquoten erlassen. Wurden im Jahr 1996 noch weltweit über ca. 52.000 mt ABFT gefangen, reduzierte sich die Fangmenge im Jahr 2009 um 40 % auf ca. 21.000 mt (FAO Fishery Statistic). Für das Jahr 2010 wurde die Fangmenge für den gesamten Mittelmeerraum nochmals auf 13.500 mt reduziert (ICCAT Rec. 09-06). Eine weitere Maßnahme zur Minimierung des Drucks auf die Wildtierbestände lag in der Verkürzung des legalen Fangzeitraumes für die Langleinen- und Ringwadennetzflottenschiereiflotte im Mittelmeer, welcher zumindest für zuletzt genannte ab dem Jahr 2010 nur noch einen Monat lang war (ICCAT, 2011). Während es Mitte des 19. Jahrhunderts noch eine gleichmäßige Befischung des westlichen und des östlichen Atlantiks sowie des Mittelmeeres gab, gewann seit den 80er Jahren das Mittelmeer an Dominanz als hauptsächliches Fanggebiet der Tiere (Fromentin & Powers, 2005).

Auf lange Sicht hin betrachtet werden sich die Bestände sämtlicher Thunfischarten nicht erholen können und im schlechtesten Fall sogar weiter dezimiert werden bis hin zur völligen Ausrottung der Arten, wenn nicht weitere Fortschritte im Management der Bestände oder aber in der Zucht der Tiere gemacht werden. Dies ist auf die weiterhin nicht endende große Nachfrage, vor allem vom japanischen Markt, der alleine fast 95 % der im Mittelmeer gefangenen ABFT aufkauft, und durch die starke Überkapazität der Thunfisch fangenden Flotte zurückzuführen (FAO, 2010). Denn auch trotz verhängter Fangquoten, lag der Anteil an unerlaubten Fängen für den ABFT im Jahr 2008 bei über 30 % der reglementierten Fanggrenze. Zwei Jahre später stieg diese Diskrepanz sogar auf ein vielfaches an (ICCAT, 2010; Report PEW Group, 2011). In diesen Berechnungen, die auf dem Vergleich zwischen verhängten Fanggrenzen und tatsächlich auf den Märkten gehandelten Mengen an ABFT beruht, sind die auf dem Schwarzmarkt gehandelten ABFT nicht berücksichtigt. Obwohl die Resultate der PEW

Group mit Vorsicht zu betrachten sind, da sie eine Umweltorganisation repräsentiert und somit zwangsläufig interessen- und meinungsgesteuert ist, zeigt dies trotzdem eine beunruhigende Tendenz auf, die dem neutralen und fachkundigen Beobachter annäherungsweise realistisch erscheinen mag zumal diese auch von der ICCAT bestätigt wurden.

1.3 Allgemeine Biologie & Lebensraum

Der Atlantische Blauflossenthunfisch (*Thunnus thynnus*) ist einer von insgesamt drei Blauflossenthunfischarten. Die beiden anderen sind der Nordpazifische Blauflossenthunfisch (*Thunnus orientalis*) und der Südliche Blauflossenthunfisch (*Thunnus maccoyii*), die, wie es ihr Name schon vermuten lässt, ein anderes Verbreitungsgebiet haben. Zusammen mit fünf weiteren Arten bilden sie die Gattung Thunnus, die zu der Familie der Makrelen und Thunfische (Scombridae) zählt, die der Ordnung der Barschartigen Fische (Perciformes) angehört. Sie zählt damit zur Überordnung der Echten Knochenfische (Teleostei). Der ABFT ist nach dem Mondfisch (*Mola mola*) einer der größten rezenten Knochenfische (Sims *et al.*, 2009). Das längste je gefangene Exemplar war größer als vier Meter und erreichte dabei ein Gewicht von über 700 kg (Cort & Liorzou, 1991; De Stefano & Van der Heijden, 2007). In dieser Größenklasse können sie ein Alter von über 30 Jahren aufweisen (Neilson & Campana, 2008) und sind somit Spitzenprädatoren, die sich von Schwarmfischen, wie Makrelen oder Heringen, aber auch von Cephalopoden und Krebstieren ernähren. Ihre kräftige und stromlinienförmige Körperform unterstützt ihre ruhelos schwimmende Lebensweise. Dabei legen sie nicht selten am Tag Strecken von 200 km mit Spitzengeschwindigkeiten von bis zu 90 km/h zurück (Safina, 1995; Sarà, 1998).

Der Thunfisch ist der einzige große pelagische Fisch, der sich permanent im kühlen atlantischen Wasser aufhalten kann (ICCAT, 2008 b). Bei gleich bleibender Körpertemperatur kann er große Schwankungen in seiner Umgebungstemperaturen von 3 °C bis 30 °C tolerieren (Block *et al.*, 2001) und weist dabei immer eine Körpertemperatur auf, die mindestens 8 °C über der Umgebungstemperatur liegt. Die dafür nötige Wärmeenergie kann nur durch die ständige Bewegung des Tieres aufgebracht werden. Unterstützend wirkt das im Körperkern befindliche Wundernetz (*Rete mirabile*), was als Gegenstromwärmetauscher fungiert. Dies wird über eine spezielle Anordnung der den Muskel versorgenden Blutgefäße erreicht, wobei die den Muskel verlassenden Venen sehr nah an den Arterien vorbeigeführt werden und so die in ihnen gespeicherte Wärme übertragen können (Schmidt-Nielsen, 1999). Hierdurch wird die in der zentral liegenden roten Muskulatur entstehende Wärme zurück gehalten und nicht wie bei anderen Fischarten ins Wasser abgegeben. Nur durch diese bei Thunfischen so stark ausgeprägte physiologische Eigenschaft der Endothermie, ist ihr starkes migratorisches Verhalten möglich. Eine weitere physiologische Charakteristik, die alle Mitglieder der Scombridae aufweisen, ist die fehlende aktive Kiemenatmung. Da die dafür nötige branchiale Muskulatur nicht ausgebildet ist, sind sie darauf angewiesen ständig in Bewegung zu sein, damit immer genügend Wasser durch ihre Kiemenbögen fließt (Dickson & Graham, 2001). Wegen ihrem hohen Energiebedarf, der den anderer Teleosteer um den Faktor vier übersteigt (Brill *et al.*, 1998; Lowe *et al.*,

2000), können so schon kurze Phasen der Bewegungslosigkeit, z.B. durch Verfangen im Käfignetz, zum Tode führen.

Der ABFT weist keinen äußerlichen Geschlechtsdimorphismus auf (Santamaria *et al.*, 2009), weshalb die Geschlechtsbestimmung und die äußerliche Markierung der Tiere einen großen Stellenwert im Aufzuchtmanagement einnehmen. Während es für die äußerliche Markierung schon zahlreiche Lösungsansätze gibt (Chart & Bergersen, 1988; REPRODOTT, 2006), ist die genaue Geschlechtsbestimmung bei Thunfischen auf molekularbiologischer Ebene bis heute noch nicht möglich. Dies liegt u.a. an der bei Fischen vorhandenen Vielfalt der möglichen geschlechtsdeterminierenden Mechanismen, die im Falle des ABFT noch nicht untersucht wurden. Bis heute sind nur Tests auf Basis von Protein (Vtg und ZrP)- und Hormonanalysen (T, 11-KT und 17 β -Estradiol) aus dem Blut oder Muskelgewebe der Tiere verfügbar, die aber nur während der Laichzeit zu zuverlässigen Ergebnissen führen, da dort die Konzentrationen der Analyten ausreichend hoch sind (Susca *et al.*, 2001; Schulz, 2006; Micera *et al.*, 2010).

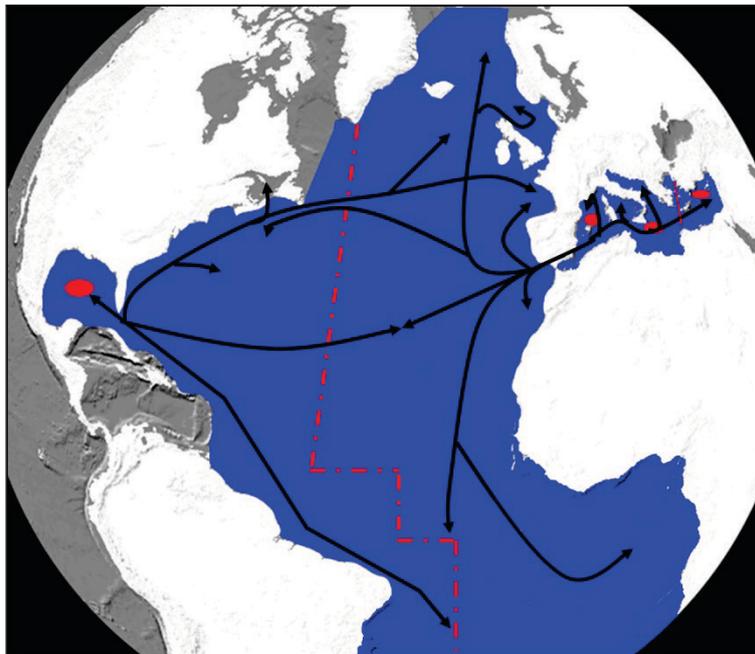


Abb.1.3: Geographische Verteilung des Atlantischen Blauflossenthunfisches (blau unterlegt) und Hauptmigrationsrouten der Tiere (schwarze Pfeile), die durch neuzeitige und historische Aufzeichnungen von Fischern sowie durch Markierungsexperimente und populationsgenetische Analysen bestätigt wurden. Die roten Linien sollen die nach derzeitigem Wissensstand existierenden Populationen des ABFT mit ihren unterschiedlichen Laichgebieten voneinander abgrenzen. Die Hauptlaichgebiete im Golf von Mexiko und im Mittelmeer sind durch rote Ovale gekennzeichnet. Zudem ist die neu postulierte ABFT-Population im östlichen Mittelmeer dargestellt (Abbildung überarbeitet nach Schulz, 2006).

Der ABFT bewohnt das pelagische Ökosystem des gesamten Nord-Atlantik zwischen den Breitengraden 60° N bis 40° S und die an ihn angrenzenden Nebenmeere, hauptsächlich jedoch das Mittelmeer und den Golf von Mexiko (Mather *et al.*, 1995). Während er die tieferen, kühleren und nährstoffreichen Gewässer des Atlantiks hauptsächlich zur Nahrungssuche im Frühjahr nutzt, unternimmt

er jedes Jahr große Wanderungen ins Mittelmeer oder in den Golf von Mexiko, um dort in den wärmeren Wassermassen während der Sommermonate abzulaichen.

Unter anderem dadurch, wie oben schon beschrieben, von der ICCAT in Zwei-Populationen geteilt, erreichen weibliche Individuen der ostatlantischen (mediterranen) Population mit einem Alter von 3-5 Jahren (Abascal *et al.*, 2004; Corriero *et al.*, 2005) ihre volle Geschlechtsreife, was mit einem Gewicht von ca. 30-35 kg und einer Körperlänge von 103-135 cm korrespondiert (Mather *et al.*, 1995; Corriero *et al.*, 2005). Erst viel später tritt die westatlantische Population mit einer mittleren Altersstruktur von 5-8 Jahren in das Stadium der vollen Geschlechtsreife ein (Schaefer, 2001). Während zuletzt genannte Population ihr Hauptlaichgebiet im Golf von Mexiko hat und in den Monaten April bis Juni ablaicht (Teo *et al.*, 2007), besitzt die ostatlantische (mediterrane) Population mehrere Laichgebiete im Mittelmeer. Hier sind vor allem die Gewässer rund um die Balearischen Inseln, die Insel Malta, das Süd-Thyrrhenische Meer und die Levantinische See zwischen der Türkei und Zypern zu nennen (Nishida *et al.*, 1997; Medina *et al.*, 2002; Heinisch *et al.*, 2008), die diese Population in den Monaten von Mai bis Juni zum Ablaichen aufsucht (Corriero *et al.*, 2003; Karakulak *et al.*, 2004).

1.4 Reproduktion

Der Reproduktionszyklus weiblicher Fische ist, wie der anderer Vertebraten, in zwei hauptsächliche Phasen gegliedert. Die erste kann als Spermatogenese und Vitellogenese bezeichnet werden, in der die Proliferation, das Wachstum und die Differenzierung der Gameten stattfindet. Die zweite Phase beinhaltet die Reifung der Oozyten und Spermatozoen, sowie deren Freisetzung und Befruchtung. Da in dieser Arbeit hauptsächlich der weibliche Zyklus eine Rolle spielt, wird auch in nachfolgenden Erläuterungen zu den reproduktionsphysiologischen Vorgängen nur auf diesen eingegangen.

Weibliche ABFT besitzen eine asynchrone Oozytenentwicklung, die auch bei anderen Teleostern, wie der Bernsteinmakrele (*Seriola dumerilii*) oder dem Wolfsbarsch (*Dicentrarchus labrax*) vorzufinden ist. Deshalb können alle Entwicklungsstadien der Eizellen in reifen Ovarien vorgefunden werden. Wegen dieser asynchronen Entwicklung sind sie in der Lage mehr als einmal während der Laichzeit abzulaichen (Corriero *et al.*, 2003 & 2007). Medina *et al.* (2002) bestimmte eine mittlere Laichhäufigkeit für weibliche ABFT von 1,2 Tagen, wobei zu jedem Ablaichvorgang ca. 100.000 Eier/kg (pro kg Muttertier) abgegeben werden können. Neben anderen physiologischen Faktoren, die später ausführlicher besprochen werden, stellt die Wassertemperatur einen wichtigen Schlüsselreiz für die Einleitung der Oozytenmaturation (OM) und der Ovulation dar. Laichvorgänge wurden nur beobachtet, wenn die Umgebungstemperatur > 23 °C betrug (Mylonas *et al.*, 2007). Neuste Erkenntnisse aus dem EU-Projekt SELFDOTT bestärken dieses und zeigen einen weiteren Umstand auf, der zusätzlich berücksichtigt werden sollte. Durch den Einsatz von Fisch- und Käfigdatenloggern konnte hier ein kontinuierlicher und abrupter Anstieg der Wassertemperatur in einem relativ kurzem Zeitraum (weniger als 1 Woche) vor den Ablaichvorgängen beobachtet werden, so dass dies auch einen weiteren wichtigen exogenen Einfluss darstellen könnte (SELFDOTT, 2012). Gleiches wurde zuvor auch schon von Masuma *et al.* (2006) für eine andere Thunfischart vermutet.

1.4.1 HPGL-Achse

Der Reproduktionszyklus von Teleostern wird von verschiedenen exogenen Umwelteinflüssen, wie der zuvor genannten Wassertemperatur oder aber auch von der Photoperiode (Jahresrhythmus etc.) und der Salinität gesteuert. Ein Bindeglied zwischen diesen umweltbedingten Signalen und der Umsetzung dieser bis hin zu den Geschlechtsorganen stellt die sogenannte HPGL-Achse (engl.: Hypothalamus-Pituitary-Gonad-Liver Axis) dar (siehe Abb.1.4). Die Regulation dieser Achse wird von endokrinen Prozessen bestimmt und steht unter multipler, kaskadenartiger hormoneller Kontrolle. Den übergeordneten Startpunkt dieses komplexen Regelkreises bildet der Hypothalamus, der auch das zentrale Steuerzentrum des vegetativen Nervensystems ist. Über die Innervierung des Hypothalamus zur Signalverarbeitung von oben genannten exogenen und endogenen Einflüssen ist zurzeit noch nicht viel bekannt. Er ist mit der Hypophyse über den sogenannten Hypophysenstiel (Infundibulum) verbunden, durch den er mit ihr über zahlreiche neuronale Verbindungen verknüpft ist (Oakley *et al.*, 2009). Die Kommunikation der beiden Gehirnteile miteinander, über ausgeschüttete Neurohormone, stellt bei Teleostern eine Besonderheit dar, die sie von den übrigen landlebenden Vertebraten klar unterscheidet. Während diese ein Hypothalamus-Hypophysen-Pfortader-System aufweisen, ist dieses bei Teleostern nicht vorhanden. Die aus dem Hypothalamus stammenden Projektionen werden direkt über die Nervenbahnen zu den Zielzellen in der Adenohypophyse vermittelt, anstelle erst über das Pfortadersystem über Blutgefäße zu ihren Zielzellen transportiert zu werden (Ball & Olivereau, 1964). Die bis vor 10 Jahren noch als zentrale Regulatoren geltenden Gonadoliberine (Gonadotropin-releasing Hormone; GnRH), die von speziellen GnRH-Neuronen im Hypothalamus ausgeschüttet werden und zur Freisetzung der Gonadotropine (FSH und LH) aus der Adenohypophyse führen (Peter & Yu, 1997), haben ihre Stellung als primäre Regulatoren in der HPGL-Achse verloren.

Heute ist durch wissenschaftliche Studien der letzten Jahre bekannt, dass Kisspeptine direkt für die Aktivierung der GnRH-Neuronen im Hypothalamus verantwortlich sind und so die Stimulation der HPGL-Achse auslösen (Kauffman, 2007). Diese Wirkung der Kisspeptine wird über einen auch in den GnRH-Neuronen exprimierten spezifischen Rezeptor (GPR54 oder KiSS1R) vermittelt (Parhar, 2004). Dieser kann zur Klasse der G-Protein-gekoppelte Rezeptoren zugeordnet werden (Oakley *et al.*, 2009). Das zuerst nur bei Säugetieren nachgewiesene KiSS1/GPR54 System, welches als Tumorsuppressorgen unter dem Namen Metastin bekannt ist, nimmt ebenfalls zunehmende Bedeutung bei Fischen ein. Seine entscheidende Rolle bei reproduktionsbiologischen Vorgängen konnte auch bei diesen gezeigt werden (Parhar *et al.*, 2004; Biran *et al.*, 2008). Als zentrales Bindeglied für eine Vielzahl von Prozessen spielt dessen Regulation und Steuerung eine entscheidende Rolle. Bis heute sind mehrere Ausgangspunkte dieser Kontrolle bekannt, welche u.a. von Steroidhormonen, metabolischen und photoperiodischen sowie von stressbedingten Signalen stammen. So konnte an Mäusen gezeigt werden, dass KiSS1 Neuronen verschiedene mRNA von Steroidrezeptoren wie z.B. ER α (Estrogen Rezeptor alpha) exprimieren und zusätzlich noch weitere Genprodukte von anderen Rezeptoren aufweisen, wie z.B. die für Leptinrezeptoren (Smith *et al.*, 2006). Neben diesen wurden noch weitere mRNA Expressionsmuster von Glucocorticoid-Rezeptoren (Teitsma *et al.*, 1999) und Mechanismen die eventuell für die Umsetzung der exogenen Signale, wie z.B. der Photoperiode, verant-

wortlich sind, gefunden. Aber ob die Regulation dieser Einflussfaktoren tatsächlich über diese Rezeptoren verläuft, muss noch geklärt werden. Somit ist eine Verknüpfung dieser Einflussfaktoren mit der Regulation des KiSS1/GPR54 Systems sehr naheliegend, zumal durch weiterführende Experimente diese Wirkung in Säugetieren teilweise nachgewiesen werden konnte (Martinez-Chavez *et al.*, 2008). Nachdem Kanda *et al.* (2008) auch im Reiskärpfling (*Oryzias latipes*) zwei Populationen von KiSS1 exprimierenden Zellen (NVT & NPPv) fand, die beide in Zellkernen des Hypothalamus lokalisiert sind und ebenfalls an positiven und negativen Rückkopplungsmechanismen der KiSS1 Genexpression, ausgelöst durch die Geschlechtshormone (17 β -Estradiol & Testosteron), beteiligt sind, konnte so eine weitere Gemeinsamkeit zwischen Säugetieren und Fischen aufgedeckt werden. Trotz dieser Entdeckungen steht die Erforschung des KiSS-Systems in Fischen noch am Anfang (Elizur, 2009).

Die durch die GnRH ausgelöste Freisetzung der Gonadotropine GTH I (FSH) und GTH II (LH) aus der Adenohypophyse, die strukturell sowie wirkungstechnisch mit dem menschlichen Follikelstimulierenden-Hormon (FSH) und dem Luteinisierenden Hormon (LH) gleichzusetzen sind (Levavi-Sivan *et al.*, 2010), führt zur Einleitung bzw. Regelung reproduktiver Vorgänge durch die Freisetzung der Sexualhormone aus der Gonade. FSH spielt in den essentiellen reproduktionsbiologischen Phasen der Vitellogenese und Zonagenese eine entscheidende Rolle, während LH bei der finalen Oozytenreifung und der Ovulation entscheidend mitwirkt (Swanson, 1991; Nagahama *et al.*, 2000).

1.4.2 Oozytenwachstum (Vitellogenese & Zonagenese)

Die sich entwickelnde Oozyte ist im Zentrum des Follikels lokalisiert. Dort ist sie von Steroid produzierenden Follikelzellen umgeben. Das Follikelepithel besteht aus einer inneren, der Granulosa-Zellschicht und ein oder zwei äußeren, den Theka-Zellschichten. Die von der Adenohypophyse sekretierten Gonadotropine stimulieren bei weiblichen Fischen in der Theca folliculi die Bildung des Steroidhormons Testosteron. Dieses wird in der darunter liegenden Granulosa-Zellschicht durch die Cytochrom P₄₅₀ Aromatase zu 17 β -Estradiol aromatisiert (Kagawa *et al.*, 1982). 17 β -Estradiol wird gekoppelt an spezifische Sexhormonbindungsglobuline (SHBG) über den Blutstrom zur Leber transportiert (Ovrevik *et al.*, 2001). Da es ein kleines ungeladenes Steroidmolekül ist, kann es durch passive Diffusion oder rezeptorvermittelt in die Leberzellen eindringen (Muller *et al.*, 1979).

Steroidhormone haben eine Vielfalt von regulatorischen Aufgaben in den unterschiedlichsten biologischen Prozessen. Die Reproduktion, verschiedene Vorgänge bei der Differenzierung und Entwicklung, sowie beim Stoffwechsel und der Gehirnfunktion sind nur einige von ihnen. Ihre Wirkung wird dabei über spezifische Rezeptoren (Estrogen Rezeptoren; ER) vermittelt. Diese sind Mitglieder der Familie Nuklearer Rezeptoren, die im Falle von 17 β -Estradiol als hormongesteuerte Transkriptionsfaktoren (TF) agieren. Mittlerweile sind auch in Fischen mehrere dieser Formen bekannt. Sie werden nach ihrer Entdeckungsreihenfolge ER α , ER β und ER γ genannt (Socorro *et al.*, 2000; Sabo-Attwood *et al.*, 2004; Davis *et al.*, 2010). Diese Klasse der nuklearen Rezeptoren ist generell aus mehreren funktionellen Domänen aufgebaut, die je spezielle Aufgaben übernehmen (siehe Abb.3.3). Am C-Terminus des Proteins befindet sich die Liganden (Hormon) Bindungsdomäne (LBD), mittig die DNA bindende Domäne (DBD) und am anderen Ende eine N-terminale Domäne. Innerhalb dieser Domänen befinden

sich mindestens zwei transkriptionsaktivierende Subdomänen (AF-1 & AF-2), die eine Rolle bei Protein-Protein Interaktionen und bei dem Start der Zielgenexpression haben. Während die LDB und DBD hoch konserviert vorliegen, macht der variable Aufbau des N-Terminus und in ihm gelegene AF-1 den Unterschied zwischen ER α und ER β aus (Nilson *et al.*, 2001; Edwards, 2005). Hierdurch besitzen beide u.a. verschiedene Aktivitäten als TF und werden durch unterschiedliche Antagonisten in ihrer Wirkung gehemmt (Mc Donnall *et al.*, 1995). Die ebenfalls im N-Terminus gelegenen Ser/Thr-Sequenz, die als Erkennungssignal für die Phosphorylierung durch Proteinkinasen dient, scheint dabei ein wichtiges Bindeglied für die Kopplung der ER an andere Signaltransduktionswege zu sein (Rochette-Egly, 2003).

Die Rezeptorklasse der ER kann ihre Aufgabe der hormoninduzierten Signaltransduktion auf unterschiedlichsten Wegen ausüben. Hierbei werden generell zwei Typen voneinander unterschieden. Zum einen gibt es sogenannte direkte, genomische (nukleare) Wege, in denen die ER die Kontrolle als TF im Zellkern über die Bindung an ERE (Estrogen Respons Elemente) der DNA ausüben. Hier lösen sie im Zellkern mit der Rekrutierung von weiteren Kofaktoren die Transkription ihrer Zielgene selbstständig aus, zum anderen die über nicht-genomische Wege, in denen sie in weitere Signaltransduktionswege integriert werden und letztendlich dann über diese ihre Wirkung vermitteln (Abb.1.4). Innerhalb zuletzt genannter gibt es mittlerweile eine große Anzahl von möglichen Reaktionswegen, in denen u.a. oben beschriebene Ser/Thr-Phosphorylierungserkennungssequenzen der ER eine Rolle spielen. So können z.B. im Cytoplasma gelegene Signaltransduktionswege von ER über die an vielen intrazellulären Transduktionswegen beteiligte und an der Zellmembran lokalisierte Proteinkinase Src aktiviert werden und dann über weiterleitende Kinaseaktivitätskaskaden wie z.B. MAPK oder PI3K letztendlich zu einer spezifischen Gentranskription und Zellantwort führen (Edwards, 2005). Vor kurzem konnte auch ein transmembrangebundener Estrogenrezeptor (mER; GPR30) identifiziert werden, der als G-Protein-gekoppelter Rezeptor seine Wirkung vermittelt (Prossnitz & Maggiolini, 2009). Die verschiedenen Typen der ER haben unterschiedliche Expressionsmuster in den verschiedenen Organen des Fisches (Pinto *et al.*, 2006) und vermitteln in diesen eine Fülle von unterschiedlichen Funktionen. Vor allem aber nukleare ER α scheinen der Rezeptortyp zu sein, der die durch 17 β -Estradiol induzierte Vtg- und ZrP-Produktion in der Leber vermittelt und somit letztendlich die Vitellogenese in Fischen steuert (Katsu *et al.*, 2010; Nagler *et al.*, 2010). Der ordnungsgemäße Ablauf stellt ein Schlüsselereignis für eine erfolgreiche Reproduktion dar. Denn ohne eine ausreichende Ausstattung an Nährstoffen ist die befruchtete Eizelle bzw. der sich später daraus entwickelnde Embryo während seiner Embryonalentwicklung nicht lebensfähig.

Bevor das Vtg die Leber verlässt, wird es durch das raue Endoplasmatische Reticulum und den Golgi-Apparat post-translational modifiziert. Über die post-translationalen Modifikationen von ZrP ist noch nicht viel bekannt. Das nackte Proteinrückrat des Vtg wird phosphoryliert, glykosyliert und lipidiert (Lewis *et al.*, 1976). Vitellogenin ist ein großes (MW: 300 – 600 kDa) und komplexes Glykolipophosphoprotein was ein Zink- und zwei Calciumatome enthält. Es stellt die Transportform der Dotterproteine dar. Es scheint als würden die Calcium-Ionen an der Bildung eines stabilen Komplexes mit den beiden Dotterproteinen, Lipovitellin und Phosvitin, beteiligt sein (Arukwe *et al.*, 1997). Zusätzlich stellen die

Ionen-Bindungseigenschaften des Vitellogenins die Hauptquelle an Mineralien für die Oozyte dar. Das Oozytenwachstum in Fischen beruht auf der Aufnahme von im Blut zirkulierendem Vitellogenin, welches dann modifiziert und als Dotter in der Oocyte eingelagert wird. Die Aufnahme erfolgt dabei über rezeptorvermittelte Endocytose. Hierbei spielt ein Membranrezeptor mit hoher Vtg Affinität (VtgR) eine entscheidende Rolle. Vitellogenin das an diesen Rezeptor gebunden ist, wird über Clathrin ummantelte Vesikel, die diesen VtgR auf ihrer Oberfläche tragen, in das Zellinnere der Oozyte transportiert. Die endozytierten Vesikel fusionieren anschließend mit Lysosomen des Golgi-Apparats und bilden so multivesikuläre Körperchen (MVB), die an Größe zunehmen und so anschließend zu großen Eidottergranula akkumulieren (Le Menn *et al.*, 2007). Vitellogenin wird dort durch das proteolytische Enzym Cathepsin D und Serinproteasen in die Dotterproteine Phosphitin (Pv) und Lipovitellin (Lv), sowie in β' -Komponenten (β' -c) und C-terminale Peptide, gespalten (Carnevali *et al.*, 1999; Perazollo *et al.*, 1999; Kwon *et al.*, 2001). Die Grundstruktur des in Fischen vorkommenden Vitellogenins sieht in Bezug auf die Hauptdotterkomponenten wie folgt aus: $\text{NH}_2\text{-LvH-Pv-LvL-}\beta'\text{-c-C-terminale Peptide-COOH}$. Lipovitellin (Lv) ist, mit einem Fettanteil von 20 % an seiner Gesamtmasse, ein sehr fetthaltiges Protein. Es besteht aus zwei Polypeptiden LvH und LvL. Seine Rolle scheint hauptsächlich in der Versorgung des sich entwickelnden Embryos mit Lipiden und Aminosäuren zu liegen. Phosphitin (Pv) stellt ein sehr phosphathaltiges Protein dar. Es besteht zu ungefähr 50 % aus Serinresten, an die kovalent Phosphat und ionisch Calcium gebunden sind. Es stellt so essentielle Mineralien für die Skelettentwicklung und für den metabolischen Stoffwechsel des sich entwickelnden Embryos zur Verfügung. Über die Funktionen der β' -Komponenten und der C-terminalen Peptide auf die Physiologie und den Nährstoffhaushalt des Embryos ist zurzeit noch nichts bekannt (Hiramatsu *et al.*, 2006). Zudem haben die durch Vitellogenin bereitgestellten Fettsäuren und weitere organische Komponenten eine wichtige regulative Aufgabe bei der Hydratation der Oozyte während ihrer finalen Reifung. Mittlerweile weiß man, dass es auch in Fischen mindestens drei Vtg-Formen (Vtg A-C) gibt, die teilweise unterschiedliche Aufgaben in der heranwachsenden Oozyte ausüben (Matsubara *et al.*, 2003; Hiramatsu *et al.*, 2006; Finn *et al.*, 2007).

Die Proteine der Eischale (Zona radiata, ZrP) bestehen aus drei bis vier Glykoproteinen, die über das gesamte Reich der Teleostee konserviert vorliegen (Arukwe & Goksoyr, 2003) und eine Molekularmasse von 47 bis 129 kDa besitzen. Nachdem die Zona radiata Proteine während der Oozytenentwicklung eingelagert wurden (Zonagenese), werden die einzelnen ZrP- Monomere nach der Besamung der Eizelle durch eine Ca^{2+} -abhängige Transglutaminase verknüpft. Hierbei bilden die schwefelhaltigen AS der Proteine Schwefelbrücken miteinander aus. Dies führt zu einer 1000fachen Zunahme der mechanischen Festigkeit. Die Aufgaben der Eihülle sind vielfältig. Primär ist sie zum Schutz des sich entwickelnden Embryos da. Sie verhindert aber auch die Polyspermie und ist für den Sauerstoffaustausch des Embryos zuständig. In einigen Fischarten besitzt sie antibakterielle Wirkung. Ihren Namen erhielt sie durch die unter dem Elektronenmikroskop sichtbare große Zahl von Radiärkanälen, die für die Streifung dieser Schicht verantwortlich sind (Oppen-Berntsen *et al.*, 1990; Riehl, 1995).

Die oben beschriebenen Vorgänge führen zu einem enormen Größenwachstum der einzelnen Oozyten und so auch zu einer Erhöhung des Gonadosomatischen Index (GSI), dem prozentualen Anteil des Gonadengewichtes am Gesamtkörpergewicht (Kime, 1998). Der GSI-Wert kann so als ein Leitindex angesehen werden, durch den der reproduktive Entwicklungsgrad weiblicher und männlicher Fische eingeschätzt werden kann.

1.4.3 Oozytenreifung

Nach erfolgreich beendeter Vitellogenese folgt die Oozytenmaturation (OM). Dabei kommt es in den Ovarien zu einem abrupten Wechsel zweier Hormone, die stellvertretend für die jeweilige Entwicklungsphase stehen. 17β -Estradiol, welches hauptsächlich in hohen Konzentrationen während des Oozytenwachstums gebildet wurde, wird nun durch das MIH (Maturation Inducing Hormon) abgewechselt (Senthilkumaran *et al.*, 2004). Dies geschieht durch die von LH ausgelöste Bildung des MIH $17,20\beta$ P in den Follikelzellen der herangereiften Oozyten und die durch dieses Hormon ausgelöste Kaskade von zellulären Ereignissen, die letztendlich zur Ovulation der Eizellen führen (Nagahama & Yamashita, 2008). Abbildung 1.4 gibt das zuvor beschriebene noch einmal schematisch wieder.

1.5 Xenobiotika und deren Einfluss auf den ABFT

Für Thunfische wurde bis heute noch keine der ER nachgewiesen bzw. ihre genetische Sequenzinformation aufgedeckt. Effekte, die nachweislich in anderen Fischarten durch sie vermittelt werden, konnten aber auch in Thunfischen gezeigt werden. Dies sind vor allem Effekte die von sogenannten EDCs (Endocrine Disrupting Chemicals) ausgelöst werden. Dabei handelt es sich um Chemikalien, die vom Menschen in die Umwelt entlassen wurden. Ein Teil dieser besitzen ähnliche Strukturen wie Hormone, die das endokrine System der Fische regulieren und so rezeptorvermittelt agonistische sowie antagonistische Wirkungen auf dieses System ausüben können und so die Wirkung der körpereigenen Hormone verstärken oder aber unterbinden (Wheeler *et al.*, 2005; Milla *et al.*, 2011). Da die Vitellogenese durch eines dieser Hormone (17β -Estradiol) induziert wird, ist das Protein Vtg zu einem wichtigen Biomarker geworden, mit dessen Hilfe das Potential von Chemikalien als EDCs und die Belastung von Gewässern und der in ihm lebende Tierpopulationen durch EDCs bestimmt werden können (Hiramatsu *et al.*, 2006). Normalerweise kommt Vtg in höheren Konzentrationen nur in reproduktiv aktiven weiblichen Fischen vor. Nachdem gezeigt werden konnte, dass auch die Leber männlicher Fische Rezeptoren für 17β -Estradiol besitzt und dass die Injektion von 17β -Estradiol zu einer dosisabhängigen Bildung (Celsius *et al.*, 1998) von Vtg führte (Hara *et al.*, 1993; Roubal *et al.*, 1997; Werawatgoompa *et al.*, 1997; Heppel & Sullivan, 1999), wurde die Anwesenheit von Vtg in unreifen weiblichen und männlichen Tieren daher als Indikator für die Kontamination mit EDCs angesehen (Kime *et al.*, 1998; Arukwe *et al.*, 1998). Das ausgeprägte migratorische Verhalten der Tiere und die Tatsache, dass der ABFT als Spitzenprädatoren am oberen Ende der Nahrungskette steht, begünstigen die Akkumulation der EDCs in diesen Tieren. Fossi *et al.* (2002) und Schulz (2006) konnten so erhöhte Vtg Konzentrationen im Blut von wilden männlichen ABFT nachweisen.

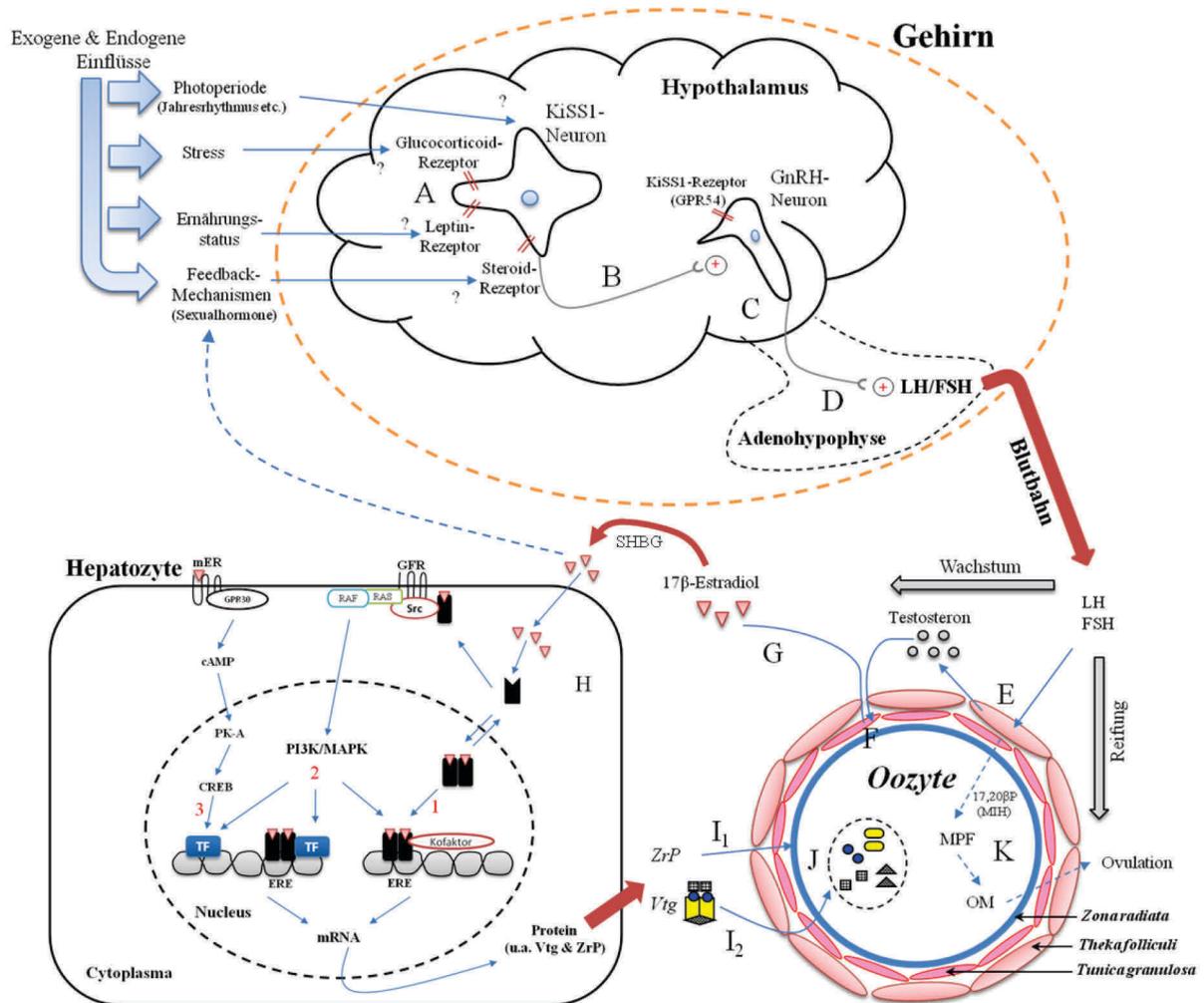


Abb.1.4: Darstellung der HPGL-Achse (Hypothalamus-Hypophysen-Gonadale-Leber-Achse) in weiblichen Fischen nach heutigem Wissensstand. **A-D)** Exo- und endogene Einflussfaktoren bewirken die Ausschüttung von Gonadatropin-releasing-Hormon (GnRH) aus speziellen Neuronen im Hypothalamus. Die Regulation dieses Vorganges geschieht rezeptorvermittelt (GPR54 oder KiSS1R) und wird von Kiss1-Neuronen gesteuert, die sogenannte Kisspeptine ausschütten. Diese wiederum werden durch zuvor genannte umweltbedingte oder körpereigene Faktoren reguliert, wobei sie ihre Wirkung wahrscheinlich über die zahlreichen in KiSS1-Neuronen nachgewiesenen Rezeptorklassen ausüben. Durch das freigesetzte GnRH werden in der Adenohypophyse befindlichen gonadotrope Zellen veranlasst Gonadotropine (LH/FSH) auszuschütten. Nachdem diese über die Blutbahn zur Gonade transportiert wurden, lösen sie je nach Entwicklungsstand der Oozyte (Wachstums- oder Reifungsphase) verschiedene Mechanismen aus (**E**). In der Wachstumsphase wird durch FSH in den Thekazellen des Follikel epithels Testosteron gebildet, welches dann in der darunter liegenden Granulosazellschicht zu 17β-Estradiol aromatisiert wird (**F**). Über SHBG (Sex-Hormon-Binding-Globuline) zur Leber transportiert (**G**) wird durch 17β-Estradiol die Synthese von Vtg und ZrP rezeptorvermittelt (ERα) induziert (**H**). Hauptsächlich geschieht dies über nukleare ER, die direkt nach Bindung ihres Liganden als TF an ERE der DNA binden, was nach weiterer Rekrutierung von Kofaktoren zur Transkription ihrer Zielgene führt (**1**). Andere Wege beinhalten die Kopplung der ER an andere Signaltransduktionswege der Zelle, welche über weitere Proteinkinasekaskaden (z.B. PI3K oder MAPK) zur Aktivierung der Genexpression führen (**2**) bzw. die direkte Aktivierung membranlokalisierter Estrogen Rezeptoren (mER, GPR30), die zur Klasse der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören (**3**). Die beiden daraufhin gebildeten Proteine (Vtg und ZrP) werden in die heranreifende Eizelle inkorporiert (**I₁-I₂**). Vtg wird dabei in der Oocyte in seine Bestandteile, die Dotterproteine Phosvitin und Lipovitellin, sowie β-Komponenten gespalten; ZrP werden für die Bildung der Eihülle in die sich entwickelnde Oozyte inkorporiert (**J**). Die Reifungsphase beinhaltet die durch LH ausgelöste Bildung des MIH (Maturation Inducing Hormon) 17,20βP in den Zellen des Follikel epithels was letztendlich über die Bildung des MPF (Maturation Promoting Factor) zur Einleitung der OM (Oozytenmaturation) führt (**K**). Teilabbildungen nach Edwards (2005).

1.6 Reproduktive Fehlfunktionen von in Gefangenschaft gehaltenen ABFT

Wie bei anderen Fischarten, die in Gefangenschaft gehalten werden, zeigen sich bei Thunfischen ebenfalls reproduktive Fehlfunktionen. In weiblichen Fischen drücken sich diese im Allgemeinen darin aus, dass sie den reproduktiven Jahreszyklus komplett bis zur Vollendung der Vitellogenese durchlaufen und somit herangereifte, befruchtungsfähige Oozyten besitzen, aber nicht in der Lage sind diese abzulaichen. Dies wird durch eine nicht stattfindende Oozytenmaturation (OM) begründet. Auf endokriner Ebene wurde eine Ursache in der nicht normalen Abgabe der Gonadotropine (LH/FSH) aus der Adenohypophyse bestimmt (Rosenfeld *et al.*, 2012). Es wird vermutet, dass der Grund hierfür nicht direkt mit der Hypophyse zusammenhängt, sondern an der übergeordneten Steuerzentrale im Gehirn liegt, die wie zuvor beschrieben von zahlreichen Faktoren beeinflusst werden kann. So fehlt der wichtige Stimulus (LH) für die Einleitung der Reifung der Oozyten nach vollendeter Vitellogenese (Mylonas & Zohar 2001 b). Natürlich kann es auch schon während dem zentralen Schritt der Vitellogenese zu Beeinträchtigungen kommen, was sämtliche nachfolgenden Prozesse (OM und Ovulation) abschwächt oder im schlechtesten Falle komplett unterbindet. Dies würde dann zu teilweise befruchtungsunfähigen bzw. zum Abbläichen von nicht überlebensfähigen Eiern führen (Mylonas *et al.*, 2010 a). Ein äußerliches Indiz hierfür ist ein sehr niedriger GSI Wert von weiblichen Tieren innerhalb ihrer Laichzeit, was des Öfteren schon bei den verschiedenen in Gefangenschaft gehaltenen Fischarten beobachtet werden konnte (REPRODOTT, 2006). Sämtliche Störungen resultieren vermutlich aus der Kombination von dem durch die Gefangenschaft hervorgerufenen Stress (Campbell *et al.*, 1994; Pankhurst, 1997), dem unnatürlichen nicht adäquaten Umfeld zum Abbläichen (Zohar, 1989; Battaglene, 1996), sowie dem Mangel an notwendigen Nährstoffen (Watanabe & Vassallo-Agius, 2003). Diese reproduktiven Fehlfunktionen nehmen erfahrungsgemäß über nachfolgende Generationen der Zucht ab oder aber treten durch Gewöhnung der Tiere an ihr neues Umfeld nach einigen Jahren in Gefangenschaft nur noch vermindert auf.

Die Entwicklung einer Thunfischzucht benötigt, wie es auch schon in den bereits etablierten Fischzuchten anderer Spezies gezeigt wurde, reproduktionsbiologische Studien und die Etablierung von Methoden zur Kontrolle des Prozesses der Geschlechtsreifung und des Einleitens des Abbläichvorganges für eine zuverlässige Eigewinnung (Bromage & Roberts, 1995). Aufgrund der oben genannten Gründe, war es lange Zeit nicht möglich Fortschritte zur Kultivierung des ABFT zu verzeichnen. Um diesen Umstand Rechnung zu tragen, fördert die Europäische Union seit nunmehr vielen Jahren Projekte mit dem finalen Ziel den ABFT in Aquakulturen zu züchten und ihn so vor dem Aussterben zu bewahren. Diese Projekte hatten folgende Akronyme: DOTT (Domestication of *Thunnus thynnus*, 2001-2002), REPRODOTT (Reproduction and domestication of *Thunnus thynnus*, 2003-2006), ALLOTUNA (Set up of an integrate system of the bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) farming in the Gulf of Taranto, 2008-2010), SELFDOTT (Self-sustained Aquaculture and Domestication of Bluefin Tuna *Thunnus thynnus*, 2008-2011). Erstmals gelang es hierdurch innerhalb Europas Thunfische in Gefangenschaft zum Abbläichen zu bringen und befruchtete Eier zu gewinnen. Im Rahmen des Projektes „SELFDOTT“ wurde von den 13 Partner im Jahr 2011 vielversprechende weitere Züchterfolge und Fortschritte in der Larvenaufzucht erreicht, so dass die Kultivierung des ABFT in Aquakulturen in na-

her Zukunft keine Utopie mehr ist (SELFDOTT, 2012). Pionier der Thunfischzucht in Gefangenschaft ist allerdings die japanische Kinki Universität, die seit 1970 den Pazifischen Blauflossen-Thunfisch (*Thunnus orientalis*) versucht zu züchten. Im Jahr 2002 gelang es ihnen letztendlich nach 32 Jahren mit der Gewinnung von ca. 1,6 Mio befruchteten Eiern den Lebenszyklus dieser Thunfischart zu schließen (Sawada *et al.*, 2005). Generelles Problem hier war und ist auch immer noch die nur sporadisch eintretenden Abblanchvorgänge ihrer Zuchttiere, so dass auch Jahre zu verzeichnen sind, die keine befruchteten Eier hervorbringen (Masuma *et al.*, 2008). Im Gegensatz hierzu konnte in den letzten Jahren innerhalb der EU-Projekte immer wieder über erfolgreiche Abblanchereignisse berichtet werden. Ein Hauptgrund liegt dabei in den unterschiedlichen reproduktionsphysiologischen Strategien die von beiden eingesetzt werden. Während die Japaner schon immer eine „No Touch“ Strategie verfolgten, setzen die Europäer hormonbasierende Induktionsmethoden ein, um die Fische gezielt zum Abblanchen zu bringen. Trotz diesem Vorsprung den die Europäer vor den Japanern haben, sind diese in dem wichtigen Punkt der Larvenaufzucht noch um einiges voraus (Sawada *et al.*, 2005; Masuma *et al.*, 2008).

1.7 Hormonbasierende Gegenmaßnahmen zur Regulierung der Fehlfunktionen

Um die oben beschriebenen Störungen, die in der reproduktiven Achse von in Gefangenschaft gehaltenen Tieren auftreten zu beseitigen bzw. zu minimieren, wurden in den letzten Jahren nicht nur am Thunfisch hormonbasierende Induktionsmethoden erprobt. Damit diese Hormonbehandlung erfolgversprechend ist, sollte zuvor der jeweilige Auslöser der Fehlfunktion bestimmt werden. Wie oben beschrieben liegt dies häufig im einfachsten Falle an der nicht stattfindenden Reifung der Oozyten und einem somit ausbleibendem Abblanchvorgang. Mylonas *et al.* (2011) konnte dies auch als eine der Ursachen für die reproduktiven Fehlfunktionen im ABFT zeigen. Früher wurden hauptsächlich Hypophysenextrakte oder aufgereinigtes LH für die künstliche Stimulation der reproduktiven Achse in Fischen eingesetzt, da diese direkt auf der Ebene der Gonade wirken (Zohar, 1989). Seitdem zahlreiche GnRH Agonisten (GnRH_a) für humanmedizinische Zwecke erforscht und synthetisiert wurden (Ulloa-Aguirre & Timossi, 2000) sind diese auch wegen ihrer klaren Vorteile im Vormarsch. GnRH Analoga sind nicht so speziesspezifisch wie es die LH Extrakte sind, da die nativen Formen des GnRH einen hohen Grad der Identität in allen Fischen aufweisen. Desweiteren setzt ihre Wirkung in höheren Regionen der HPGL-Achse ein, so dass von ihnen auf natürliche Weise physiologische Konzentrationen von LH & FSH und auch weitere eventuell essentielle Hormone aus der Adenohypophyse freigesetzt werden können. Nachdem Kisspeptine zunehmend in Fischen an Bedeutung gewonnen haben, wurden auch diese erstmals für die hormongestützte Einleitung des Abblanchens und für die Erforschung einer künstlich hervorgerufenen vorzeitigen Geschlechtsreife im ABFT eingesetzt (SELFDOTT, 2012).

Liegt als Ursache der Fehlfunktionen nicht nur eine beeinträchtigte OM vor, sondern eine schon vorher geminderte Entwicklung der Geschlechtsorgane während der Vitellogenese und Spermatogenese (Gametogenese), wie es z.B. beim europäischen Aal (*Anguilla anguilla*) der Fall ist, müssen umfangreichere Hormontherapien eingesetzt werden, um auch noch die Gametogenese künstlich zu stimu-

lieren (Kagawa *et al.*, 2005). Abgesehen von diesen Protokollen ist die Induktion von Fischen mit Geschlechtshormonen, wie 17β -Estradiol, Testosteron (T) und 11-Ketotestosteron (11-KT), gängige Praxis. Dabei werden diese für die unterschiedlichsten Zwecke genutzt. Zum einen ist es die Fähigkeit der Steroidhormone die Geschlechtsdifferenzierung von hermaphroditen Spezies zu regulieren bzw. eine Geschlechtsumkehr zu bewirken (Hendry *et al.*, 2003; Piferrer, 2001); zum anderen ihre Wirkung auf die Entwicklung des Geschlechtsapparates (Henry *et al.*, 1998; Cavaco *et al.*, 1998). Zusätzlich wird vor allem 17β -Estradiol genutzt um durch seine künstliche Erhöhung im Blutkreislauf der Tiere Teilaspekte der HPGL-Achse zu erforschen. Hierunter fällt u.a. die Beteiligung der verschiedenen ER an der Vitellogenese, bzw. deren Aufgabe bei der Regulation der Vitellogenese (Pakdel *et al.*, 1991; Devlin & Nagahama, 2002; Leanos-Castaneda & van der Kraak, 2007; Davis *et al.*, 2010).

Bei kleineren, leicht zu handhabenden Fischarten werden die zu injizierenden Stoffe bis heute oft intramuskulär in einem Konjugat aus Kokosnussbutter (Pinto *et al.*, 2006), per Injektion mit der Spritze (Berg *et al.*, 2004) oder aber direkt im Wasser (Fuentes *et al.*, 2007) verabreicht. Hierzu müssen die Tiere immer gefangen werden oder aber in separate Becken gesetzt werden. Handelt es sich allerdings bei dem Versuchstier um einen großen und stressanfälligen Fisch wie den Thunfisch, sind diese Techniken nicht praktikabel. Deshalb muss für die Verabreichung der Hormone andere Techniken angewandt werden, wie z.B. die Verabreichung in Implantaten. Diese bestehen hauptsächlich aus einem Polymer (EVAc; Ethylen-Venyl-Acetat) und weiteren Bestandteilen (BSA, Inulin und dem spezifischen Hormon). Zuerst genannte wirken dabei als Quellungsmittel und führen innerhalb der Implantate nach Kontakt mit Körperflüssigkeiten zu einer inneren Oberflächenvergrößerung der Implantatmasse und somit letztendlich zur kontinuierlichen Langzeitabgabe des Hormons. Diese Eigenschaft spielt eine besondere Rolle bei Fischen mit einem asynchronen Oozytenwachstum, da diese so über ihren gesamten reproduktiven Zyklus (speziesspezifisch ca. 1-3 Wochen) mit einer künstlichen Hormondosis stimuliert und so zu mehrfachen Abblanchvorgängen angeregt werden können (Mylonas *et al.*, 2010 b). Diese Implantate können ohne den Fisch zu fangen unter Wasser per Harpune intramuskulär injiziert werden. Die Einbindung der Implantate in ein Trägersystem (siehe Abb.2.12), welches den Implantaten einen Schutz vor mechanischen Kräften bietet und zusätzlich eine farbliche Identifikation der induzierten Fische ermöglicht, ist dabei ebenfalls für den Erfolg dieser Methodik von großer Bedeutung. Experimente an Thunfischen zur künstlichen Einleitung des Abblanchens wurden schon erfolgreich mit zuvor erwähnten Hormonanalogen (GnRH α) in benannten EU-Projekten durchgeführt (Mylonas & Zohar, 2001 a; Mylonas *et al.*, 2007).

Um hormonbasierende Induktionsversuche erfolgreich am ABFT anwenden zu können, muss die Abgabekinetik und die Wirkung der Implantate zuerst an einem Modellorganismus evaluiert werden und kann nicht direkt am eigentlichen Versuchstier getestet werden. Dies ist gängige Praxis in der Erforschung von großen pelagischen Fischen, wie dem Thunfisch, und hat vor allem mit dem hohen kommerziellen Wert der Tiere zu tun (Mylonas *et al.*, 2007). So wurden auch die in dieser Arbeit eingesetzten Hormonimplantate zuerst an zwei Modellfischen getestet. Um die hieraus gewonnenen Ergebnisse auch auf den ABFT übertragen zu können, wurden eine limnische- und marine Spezies (Nil-Tilapia: *Oreochromis niloticus* & Wolfsbarsch: *Dicentrarchus labrax*), die wie der ABFT auch zur

Ordnung *Perciformes* (Barschartigen) zählen, als Modelltiere gewählt. Beide werden bereits in Aquakulturen kultiviert, waren somit kostengünstig und konnten ohne auf Wildtiere zurückgreifen zu müssen, eingesetzt werden. Zudem ist die Gattung *Oreochromis* (Tilapien) allgemein dafür bekannt, dass sie sehr anspruchslos in Bezug auf Besatzgröße, Wassertemperatur und Wasserqualität ist (Kirk, 1972), wodurch die Fische ohne Probleme in dem für sie konstruierten Aquarium gehalten werden konnten.

1.8 Ziele der Arbeit

Im Rahmen des von der EU geförderten Projektes „SELFDOTT“ (Self-sustained Aquaculture and Domestication of Bluefin Tuna *Thunnus thynnus*, 2008-2011) beschäftigt sich diese Dissertation mit molekularbiologischen und physiologischen Aspekten des Reproduktionszyklusses weiblicher ABFT. Es sollte ein weiterer Beitrag zur Klärung der Frage geleistet werden, warum der weibliche Zyklus von in Gefangenschaft gehaltenen Fischen nicht vergleichbar mit dem von Wildtieren abläuft und es so zu keinen bzw. zu verminderten Ablaichvorgängen (verminderte Fertilität) dieser Tiere kommt. Zudem wird, an Anlehnung an die bereits bestehende Hormoninduktionsmethode mittels GnRHa-Implantate, eine verbesserte, abgewandelte Methodik in Bezug auf Implantat-Herstellung und eingesetztem Hormon (17β -Estradiol) für die Induktion, speziell von großen pelagischen Fischen, entwickelt und getestet werden. Ihre Wirkung auf bzw. ihr Potential für die Stimulation eines Teiles der HPGL-Achse sollte, zuerst an Modellfischen und letztendlich am ABFT, geprüft werden.

Besonderes Augenmerk lag dabei auf den Teilen der HPGL-Achse, die wie schon durch andere Fischarten bewiesen, essentiell für die wichtige Entwicklungsphase der Vitellogenese, also für das Wachstum der Oozyten (Gonade) und so letztendlich des gesamten weiblichen Geschlechtsapparates, sind. Hierzu gehören die vor dieser Arbeit im ABFT noch nicht erforschten Estrogen Rezeptoren (ER), vor allem $ER\alpha$ aus der Leber, der in anderen Fischarten für die Signalweiterleitung und Zellantwort, ausgelöst durch das Steroidhormon 17β -Estradiol, verantwortlich ist. Durch die Bestimmung der Genexpression von $ER\alpha$ per Q-PCR und weiterer Messparameter, die innerhalb der Zelle als oben genannte Zellantwort durch die ER Wirkung gebildet werden, sollte zum einen eventuelle Unterschiede zwischen Käfig- und Wildtieren ausfindig gemacht werden; zum anderen die Wirkung der Hormoninduktion auf die HPGL-Achse gezeigt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Sammelgebiete, Probenart und-herkunft

Die in dieser Arbeit untersuchten Proben vom atlantischen Blauflossenthunfisch (*Thunnus Thynnus*) stammten alle aus dem EU-Projekt SELFDOTT und aus dem apulischen Nationalprojekt ALLOTUNA. Hier wurden sie im Laufe der Jahre 2008-2010 in den verschiedenen Arbeitsprogrammen der Projekte an den verschiedenen Standorten im Mittelmeerraum, wie unter 2.1 abgebildet, genommen. Wegen des ausgeprägten Migrationsverhaltens der Thunfische standen mehrere Sammelorte für Wildtierproben zur Verfügung. Diese erstreckten sich im Mittelmeerraum über die Straße von Gibraltar in das westliche und zentrale Mittelmeer. Proben von Käfigtieren stammten von kooperativen Fischfarmen aus Malta (Malta Fish Farming), Cartagena (Fuentes Group, Tuna Graso), Vibo Valentia (Mare Nostro) und Zadar/Split (Kroatien, Atlantis Group, Kali tuna). Durch zuletzt genannte war es möglich Experimente an juvenilen Thunfischen in verschiedenen Altersklassen (2-4 Jahre) zu machen. Tabelle 2.1 gibt genauere Auskunft über Probenherkunft und -art sowie Fangzeiträume und die Einteilung der Tiere zu den jeweiligen Arbeitsprogrammen.



Abb.2.1: Sammelgebiete von Wildbahntieren (rote Sterne) und Standorte der kooperativen Thunfischfarmen (gelbe Sterne) im Mittelmeer. Die Grafik wurde mit dem Programm NASA World Wind 1.4 (2001) erstellt und modifiziert.

Insgesamt standen 226 Thunfische der Gattung *Thunnus*, je 113 Weibchen und 113 Männchen, zur Verfügung, wobei nicht zu jedem Tier alle drei Probenarten (Plasma, Leber und Gonade) gesammelt werden konnten. Proben von Käfigtieren waren mit 163, im Vergleich zu Wildtieren mit 63, am häufigsten vertreten. Käfigtiere unterteilten sich dabei noch einmal in adulte (110) und juvenile (53) Tiere. Außerdem wurden für diese Arbeit insgesamt 40 Nil-Tilapien (*Oreochromis niloticus*) zu Versuchszwecken genutzt. Diese wurden von der Universität Wageningen (Fishbreeding „De Haar“, Holland) bezogen. Für die Tierhaltung und Versuche mit diesen bestand eine tierschutzrechtliche Genehmigung mit dem Aktenzeichen 8.87-50.10.34.08.239 des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (NRW). Durch unsere maltesischen Kollegen (Matla Fishfarming) wurde es mir ermöglicht

an sieben weiblichen Wolfsbarsch (*Dicentrarchus labrax*) vergleichende Experimente durchzuführen. Die Tiere stammten aus der Zuchtanlage und wurden wegen äußerlichen Deformationen, die eventuell an die Nachkommen weitergegeben werden könnten, ausgemustert.

Tab.2.1: Probenherkunft: Plasma a), Leber b) und Gonade c) weiblicher und männlicher ABFT von den verschiedenen Standorten im Mittelmeerraum von Käfig- und Wildtieren aus den unterschiedlichen Arbeitsprogrammen (Gametogenese 1-3, Ernährung, Hormoninduktion, Kontrollproben) der Projekte SELFDOTT und ALLOTUNA.

Käfigstandorte / Fanggebiete	Probenart	Alter	Titel Arbeitsprogramm (WP)	Fangzeitraum	Proben		
					Gesamt	♂	♀
Kartagena (Spanien)	Käfig-Tiere	adult	Gametogenese 1-3	14.04 / 26.05 / 10.07.2008	39 ^{a, b, c}	18	21
Marsaxlokk (Malta)			Ernährung & Kontrolle	25.06.2009/ 18.06.2008	35 ^{a, b, c} / 8 ^a	27	16
Vibo Valentia (Italien)			Probennahme	24.06 / 04.07 / 18.10	28 ^a	12	16
Zadar (Kroatien)		juvenil	Hormoninduktion	16.06.2010	33 ^{a, b, c}	17	16
Zadar (Kroatien)			Probennahme	05.07.2009	20 ^{a, b, c}	13	7
Malta	Wild-Tiere	adult	Probennahme	07.06 / 01.06.2008	11 ^{a, b} / 4 ^{a, b, c}	2	13
Sardinien			Probennahme	16.05.2008	42 ^{a, b}	23	19
Marokko			Probennahme	29.05.2008	6 ^{a, b}	1	5
total:					226	113	113

Alle drei Fischarten gehören zur Ordnung „Perciformes“ (Barschartigen) und sind in der Aquakultur weit verbreitete und gezüchtete Spezies. Sie stellen nahe Verwandte des ABFT dar und wurden deswegen als Vergleichs- bzw. Modellorganismen genutzt. Aus Machbarkeitsgründen wurde für die Versuche im Labor (nicht in meeresnahe gelegen) eine limnische Fischart (*Oreochromis niloticus*) gewählt.

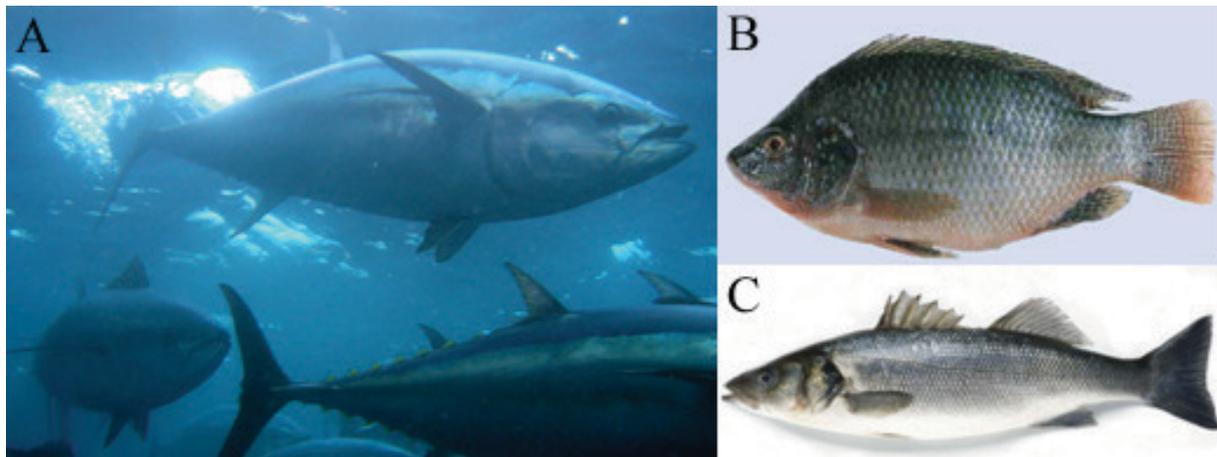


Abb.2.2: In dieser Arbeit als Modellorganismen genutzte Fischarten: **A)** Atlantischer Blauflossenthunfisch (*Thunnus thynnus*), **B)** Nil-Tilapia (*Oreochromis niloticus*) und **C)** Wolfsbarsch (*Dicentrarchus labrax*).

2.2 Tierhaltung

Die Hälterung der Nil-Tilapien erfolgte in einer Klimakammer, die zu einem Aquarienraum umgebaut wurde. Das Aquariensystem wurde in Eigenarbeit aufgebaut. Dieses bestand aus drei 800 L Rundbecken (Ø 110 cm, Höhe 90 cm), welche über ein Filtersystem (Kreiselpumpe mit zylindrischem Aussen-

filter: 66 Liter Fassungsvermögen) mit integriertem UV-Lampen Beipass keimfrei gehalten wurde. Die Wassertemperatur wurde auf die für Tilapien benötigte Temperatur von 25 °C eingestellt. Mit dem durch die Firma Tetra GmbH vertriebenen Nitrittest überwachte man den Nitritgehalt der Anlage kontinuierlich um rechtzeitig einen Wasserwechsel durchführen zu können. Nach dem Einlaufen der Anlage ergab sich so ein nötiger Wasserwechselrhythmus von 7 Tagen. Pro Becken waren 30-40 Individuen eingesetzt. Mit Hilfe einer Zeitschaltuhr (Auto Dimm LSL, Heers Elektronik) und dimmbarer Lichtleiste wurde ein circadianer Rhythmus von 12h Tag/12h Nacht eingestellt. Die Fütterung erfolgte einmal täglich mit Trockenfutter (Skretting). Da Tilapien ein ausgeprägtes Revier und aggressives Balzverhalten aufweisen, mussten männliche und weibliche Tiere in getrennten Becken gehalten werden. Während Experimente durchgeführt wurden, kamen die Versuchstiere in 100-200 L Glasbecken mit separatem Filter- und Luftsysteem.

Die Thunfische wurden in den jeweiligen Fischfarmen in großen freischwimmenden Netzkäfigen gehalten, die küstennah platziert waren. Diese waren mit Leinen, die an auf dem Meeresgrund versenkten Betonklötzen befestigt wurden, gesichert. Die Käfige bestanden aus einem an der Wasseroberfläche als Auftriebskörper dienendem Ring, an dem die Netzstruktur rundum befestigt war. Die Durchmesser der Käfige variierten zwischen 25 m und 50 m, dabei waren sie bis zu 20 m tief (Abb.2.3).



Abb.2.3: Thunfisch-Zuchtkäfige der Fischfarm (Mare Nostro) vor der Küste von Vibo Valentia (Italien).

Die Wolfsbarsche wurden während der Experimente auf Malta getrennt in einer Außenanlage gehalten. Sie bestand aus Rundbecken (ca. 800 L), die an die Meerwasserversorgung der Anlage angeschlossen waren.

2.3 Probenentnahme

Alle Proben wurden im Rahmen des von der EU geförderten Projektes SELFDOTT und dem apulischen Nationalprojekt ALLOTUNA in dem Zeitraum von 2008 bis 2010 gesammelt. Als Untersuchungsmaterial kamen Plasma-, Leber- und Gonadenproben von Wildbahntieren und von in Gefangenschaft gehaltenen Tieren zum Einsatz. Bei allen Probenentnahmen arbeitete man nach einem standardisierten Protokoll, welches von der Forschergemeinschaft des Projektes erarbeitet wurde. Die hauptsächliche Jahreszeit in der die Probenentnahme erfolgte, waren die Sommermonate von Ende Mai bis Ende

Juli, in der Laichzeit der Thunfisch im Mittelmeerraum. Es wurden aber auch Proben während der Vor- und Nachlaichzeit (Februar bis Mai & August) genommen. Dies variierte je zur experimentellen Fragestellung des Arbeitsplans des Projektes (Abb.2.5).

Nachfolgendes Organigramm (Abb.2.4) gibt eine kurze Übersicht über die in dieser Arbeit unternommenen proteinbiochemischen und molekularbiologischen Messverfahren, sowie die hierfür genutzten Proben.

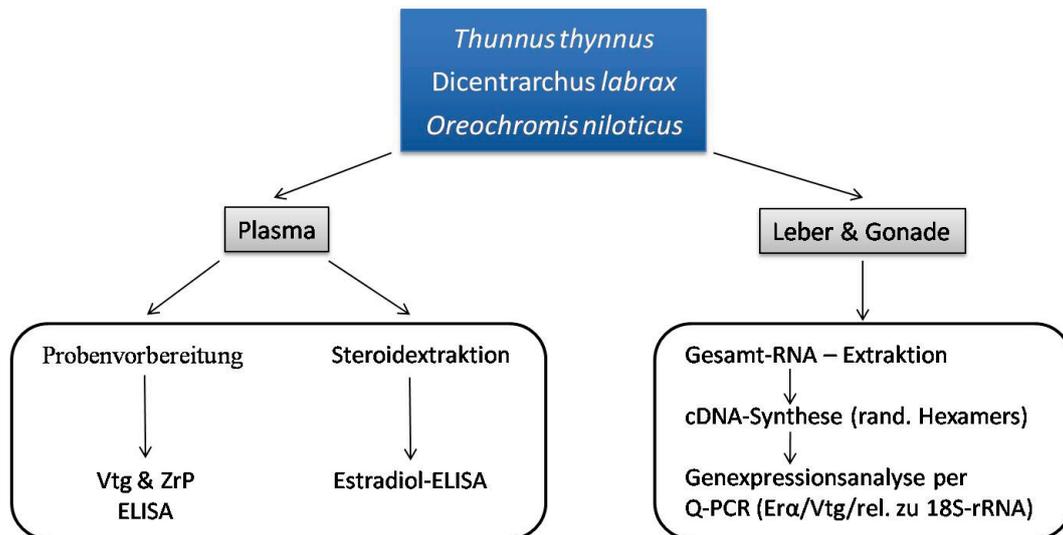


Abb.2.4: Organigramm der in dieser Arbeit unternommenen proteinbiochemischen und molekularbiologischen Messverfahren und die jeweils dafür genutzte Probe von den Versuchstieren Blauflossenthunfisch (*Thunnus thynnus*), Wolfsbarsch (*Dicentrarchus labrax*) und Nil-Tilapia (*Oreochromis niloticus*).

2.3.1 Plasmaproben

Handelte es sich um große Tiere wurden sie von einem Taucher durch einen gezielten Kopfschuss mit einer Harpune unter Wasser getötet. Kleinere Tiere bis ca. 20 kg konnten von den Angestellten der Farmen per Hand gefangen werden. Zuvor wurde das Volumen des Käfigs durch geschicktes Anheben des Netzes mit einem Kran oder durch ein separates Netz verringert, so dass die Tiere einen geringeren Aktionsradius hatten. Die Entnahme der Blutproben erfolgte noch während die Fische am Kran hingen, der sie vom Wasser auf das Fischerboot hob oder auch nachdem der Fisch auf dem Deck platziert worden war. Zuerst versuchte man durch Perforation der lateralen Vene an eine ausreichende Menge Blut zu gelangen. War dies durch bereits zu starkes Ausbluten der Tiere im Wasser nicht möglich, konnte durch einen Messerstich in das Herz, welches sich ventral zwischen den Brustflossen befindet, eine ausreichende Menge Blut gewonnen werden. Wildtiere wurden abhängig vom Fangort entweder durch Schleppnetze, Stellnetze oder per Langleine gefangen. Das so erhaltene Blut sammelte man in 50 ml großen Gefäßen. Um der Blutgerinnung und der Degradation von Proteinen durch Proteasen entgegenzuwirken, wurden die Gefäße vorher mit einer Protektionslösung (200 mM NaCl, 8,6 mM KCl, 8000 I.U. ml⁻¹ Natriumheparin, 1 mM Pefabloc SC PLUS, pH 7,3) ausgewaschen, die Heparin und einen Proteaseinhibitor 4-(2-Aminoethyl)-benzenesulfonyl-Fluoride-Hydrochloride (Pefabloc SC PLUS, Roche) enthielten. Die Proben lagerten an Bord des Schiffes bis zur Zentrifugation

(5 Minuten bei 14.000 rpm) im Labor auf Eis. Nach der Zentrifugation konnte man den Überstand vom Pellet dekantieren und das so erhaltene Plasma in Portionen von 500 µl in Eppendorfgefäße aliquotieren. Anschließend wurden die Proben bei -80 °C eingefroren. Der Transport nach Deutschland erfolgte per Luftfracht in Kühlboxen auf Trockeneis.



Abb.2.5: Zusammenfassung der aufwendigen Probenentnahme am ABFT. **A)** Durch Verringerung des Aktionsradius der Thunfische durch Einbringen eines Schwimmetzes oder durch Anheben des Netzbodens konnten die Tiere leichter aus dem Käfig gefangen werden. **B)** Nach Tötung der Tiere, meist unter Wasser durch Einsatz von geladenen Schusskörpern, wurden sie mit Hilfe eines Kranes an Deck des Schiffes gebracht. Hier erfolgte die Blutabnahme durch Perforation der lateralen Vene (**C**), welches auf Eis bis zur Weiterverarbeitung im provisorischen Labor (**D**) gelagert wurde. Die Entnahme der Leber- und Gonadenproben (hier nicht abgebildet) erfolgte ebenfalls hier.

2.3.2 Leber- und Gonadenproben

Proben von Leber und Gonade von Thunfischen nahm man nach Ankunft in den Fabrikhallen, die zur Probenweiterverarbeitung zur Verfügung standen, genommen. Hierzu wurde den Tieren nach dem Fangen bereits auf dem Boot der Eingeweidesack entfernt und getrennt vom restlichen Körper auf Eis transportiert. Anschließend wurden die zur Probeentnahme nötigen Gewebe unter den bestmöglichen sterilen Bedingungen vom Rest abgetrennt, gewogen und in kleine Stücke (200 mg) geschnit-

ten. Zur Konservierung dieser Proben kam *RNAlater* (Sigma) zum Einsatz. Bis zur Untersuchung kamen die Proben in einen -80 °C Kühlschrank.

Die Organentnahme bei den anderen Versuchstieren (Tilapia und Wolfsbarsch) erfolgte direkt nach der Tötung. Nach vollkommener Narkotisierung wurde eine Blutabnahme und Identifikation des Fisches per ID-Scanner vorgenommen. Durch einen Herzstich, den man ventral zwischen den beiden Brustflossen ansetzte, tötete man die Tiere. Für die Leberprobenentnahme musste der Bauchraum durch einen Schnitt von der Afteröffnung bis zu den Brustflossen geöffnet werden. Nach Präparation der inneren Organe konnte ein Teil der Leber entfernt und anschließend in *RNAlater* (Sigma) konserviert werden.

2.4 Quantitative Bestimmung von Vitellogenin- und Zona radiata Proteinen per ELISA

Mittels ELISA wurden Plasmaproben quantitativ auf die Konzentrationen von Vitellogenin und Zona radiata überprüft. Zum Einsatz kam ein indirekter, kompetitiver ELISA (Enzyme-Linked-Immunesorbent Assay) nach Susca *et al.* (2001), welchen ich während meiner Diplomarbeit (Schulz, 2006) genutzt und weiter etabliert habe. Sämtliche Standards, Antikörper und sonstige für den Test benötigte Reagenzien wurden von mir hergestellt und evaluiert. Um nähere Informationen hierüber zu erhalten siehe in der Diplomarbeit mit dem Titel „Bestimmung der geschlechtsspezifischen Proteine Vitellogenin und Zona radiata im Roten Thun *Thunnus thynnus* mittels immunologischer Nachweisverfahren“. Das hier genutzte immunologische Nachweisverfahren basiert, im Gegensatz zum Radioimmunoassay (RIA) nicht auf einer Radioaktivitätsmessung, sondern auf einer enzymatischen Farbreaktion. Hierzu wurden spezifische Antikörper benötigt, die gegen das zu bestimmende Antigen (Vitellogenin oder Zona radiata) gerichtet waren. Die Bindung an das Antigen erfolgte in dem hier genutzten System kompetitiv. Der Erstantikörper konkurrierte dabei um das an der festen Phase (Standard auf Mikrotiterplatte) gebundene oder freie Antigen (Probe). Der Antigen-Antikörper Komplex wurde dann durch einen enzymgekoppelten Zweitantikörper, der gegen den Erstantikörper gerichtet war, detektiert. Durch eine Farbreaktion, die durch das Enzym des Zweitantikörpers (Alkalische Phosphatase) katalysiert wird, konnte das Antigen indirekt nachgewiesen werden. Die Auswertung erfolgte über eine Standardreihe mit bekannten Konzentrationen an Antigen.

2.4.1 Aufbereitung der Plasmaproben für die ELISA-Messung

Für die Messung der Proben per ELISA wurde das Plasma auf Eis aufgetaut und für 5 Minuten bei 14.000 rpm abzentrifugiert (Kühlzentrifuge, Eppendorf 5402). Anschließend mussten die Proben noch mit Vitellogenin-Ansatz-Puffer (0,1 M PBS pH 7,4; 0,05 % Tween-20, 27 mM KCl) verdünnt werden. Hierzu dienten 96-well Mikrotiterplatten mit geringer Zellbindungseigenschaft (Low Cell Binding, Nunc). Die einzelnen Plasmaproben wurden in den Platten 20- und 200fachverdünnt. Für eventuelle Nachmessungen lagerte man sie bei 4 °C für maximal 5 Tage.

2.4.2 Indirekter kompetitiver Vitellogenin ELISA

Zu Beginn mussten die Mikrotiterplatten (Maxisorp, Nunc) mit Vitellogenin-Standard beschichtet werden. Hierzu wurden die Platten für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 500 ng/ml Standardlösung gelöst in 0,05 M Carbonatpuffer pH 9,6 versetzt. Nach einer Inkubation über Nacht bei 4 °C erfolgte ein Waschschriff mit Millipore durch einen Mikrotiterplatten-Waschgerät (Columbus, TECAN, Österreich). Nachfolgend blockte man die noch freien Bindungsplätze der Probenkammern mit 200 µl Blocking-Puffer (0,1 M PBS, 2 % BSA, 5 mM NaN₃, pH 7,4). Die mit Vitellogenin-Standard belegten und geblockten Platten wurden im Anschluss 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und dreimal mit Waschpuffer (20 mM PBS, 0,05 % Tween 20, pH 7,4) gewaschen. Hiernach konnten die Platten für die Messungen genutzt werden. Benötigte man die Mikrotiterplatten erst später, konnten sie bei -20 °C gelagert werden. Hierzu wurden sie vorher durch speziellen Abdeckfolien (Plate Sealers, Thermo Scientific) abgeklebt.

Vor dem Auftragen der zu bestimmenden Proben wurde auf jeder Mikrotiterplatte in den Kammern AB 1-10 eine Standard-Reihe mit bekannten Vitellogeninkonzentrationen (10 µg/ml – 0,02 µg/ml) aufgetragen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Standard-Reihe										Bo	NSB
B												
C	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12
D												
E	P13	P14	P15	P16	P17	P18	P19	P20	P21	P22	P23	P24
F												
G	P24	P25	P26	P27	P28	P29	P30	P31	P32	P33	R1	R2
H												

Abb.2.6: Plattenbelegung einer Mikrotiterplatte. In den Kammern AB 1-10 wurde eine Standard-Reihe mit aufgereinigtem Vitellogenin (10 µg/ml – 0,02 µg/ml) oder 17β-Estradiol-Standard (5300 pg/ml – 80 pg/ml) erstellt. Die Proben (P1 – P33) wurden jeweils durch Doppelmessungen bestimmt. Bo: Maximale Bindung des 1. Antikörpers ohne Vtg/ZrP-Inhibition. NSB: Nicht spezifische Bindung des 2. Antikörpers. R₁-R₂: Interne Standards mit bekannten Konzentrationen.

Die hierfür nötige serielle Verdünnung wurde direkt in den Kammern der Platte durchgeführt. Die zu bestimmenden Proben überführte man in ihren entsprechenden Verdünnungen (1/10 bis 1/200) von der Probenverdünnungsmikrotiterplatte (siehe 2.7) auf die Testplatte. Das Probenvolumen betrug jeweils 10 µl. Mit demselben Volumen wurden auch die zur Kontrolle des Tests dienenden internen Standards aufgetragen. Zur Bestimmung der maximalen Bindungsstärke des 1. Antikörpers setzte man in der Kammer AB 11 nur 20µl des 1. Antikörpers in einer Verdünnung von 1/15000 ein. Die nicht spezifische Bindung des 2. Antikörpers wurde in der Reaktionskammer AB 12 bestimmt. Abbildung 2.6 stellt das eben beschriebene noch einmal graphisch dar.

Nachdem sowohl Proben als auch interne Standards aufgetragen worden waren, wurde in jede Kammer, außer in AB 12, 20 µl 1. Antikörper (1/15000) gefüllt. Abschließend mussten noch alle Reak-

tionskammern mit Vitellogenin-Ansatz-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 150 µl gebracht werden. Nach Fertigstellung dieser Arbeitsschritte fand eine Inkubation der Messplatte für 2 Stunden bei Raumtemperatur statt.

Bevor der 2. Antikörper auf die Mikrotiterplatte gegeben wurde, musste die Platte dreimal mit Waschpuffer (20 mM PBS, 0,05 % Tween 20, pH 7,4) gewaschen werden. Der 2. Antikörper (anti-Rabbit-IgG konjugiert mit alkalischer Phosphatase) wurde mit Vitellogenin-Ansatz-Puffer 1/15000 verdünnt und so in einer Menge von 150 µl auf alle Kammern gegeben. Nach einer weiteren Inkubation über Nacht bei 4 °C konnte am darauf folgenden Tag die Substratinkubation stattfinden. Hierzu musste die Platte noch einmal einem Waschschrift unterzogen werden. Man wusch sie einmal mit Waschpuffer und zweimal mit pNPP-Substratpuffer (500 mM Diethanolamin, 0,5 mM MgCl₂, pH 9,8). Das Substrat der alkalischen Phosphatase 4-Nitrophenylphosphat (USB, Ohio) wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml mit pNPP-Substratpuffer eingesetzt und in einer Menge von 170 µl in die Probekammern gegeben. Die Farbentwicklung fand im Dunkeln bei Raumtemperatur statt. Die Messung der Absorption erfolgte bei 405 nm und bei einer Referenzwellenlänge von 620 nm mit einem Mikrotiterplatten Photometer (Sunrise, TECAN, Österreich), erst nachdem die Maximalbindung (Bo) 1,5 O.D. erreicht hatte.

2.4.3 Indirekter kompetitiver Zona radiata ELISA

Allgemein wurde bei der Bestimmung von Zona radiata Proteinen in den Proben genauso verfahren, wie es unter 2.4.2 für die Vitellogeninmessung schon beschrieben wurde. Folgende Änderungen nahm man allerdings vor: Da der polyklonale rabbit anti-Thunfisch Zona radiata Antikörper neuer (Herstellungsdatum 2008) war als der polyklonale rabbit anti-Thunfisch Vitellogenin Antikörper (Herstellungsdatum 1999), konnte er in höheren Verdünnung eingesetzt werden. Es zeigte sich, dass mit einer Verdünnung von 1/30000 mit ZrP-Ansatz-Puffer (0,1 M PBS pH 7,4, 0,05 % Tween-20, 27 mM KCl) zufrieden stellende Ergebnisse erreicht werden konnten.

2.4.3.1 Extraktion von Zona radiata Proteinen zur Antikörperherstellung

Als Ausgangsmaterial zur Extraktion dienten reife Gonaden vom Thunfisch *Thunnus thynnus*, die bei – 20 °C gelagert wurden. Das Extraktionsprotokoll wurde von Oppen- Berntsen *et al.* (1990) übernommen. Etwa 5 g Gonade wurde in 100 mM EDTA, 500 mM NaCl, pH 8,5 aufgetaut und mittels Heidolph-Homogenisator homogenisiert. Im Anschluss verteilte man diese Suspension auf zwei 30 ml Corex-Gläser (Du Pont Instruments) und zentrifugierte für 10 min bei 3500 g und 4 °C (Zentrifuge Sorvall RC 5C Plus, Rotor: Sorvall SS 34). Anschließend wurde das Pellet in 500 mM NaCl resuspendiert. Es folgten im Zeitraum von 24 Stunden vier weitere Zentrifugationsschritte zwischen denen das Präzipitat wie oben beschrieben resuspendiert und bei 4 °C gelagert wurde. Im Verlauf der nächsten 24 Stunden zentrifugierte man der Ansatz erneut fünfmal. Die Resuspension des Pellets erfolgte dann jedoch mit eiskaltem, hochreinem Wasser (Millipore®). Um zu Überprüfen, ob sich der Proteingehalt während der Zentrifugationsschritte im Überstand verringerte, wurde die Absorption

der jeweiligen Überstände mit einem Spektrophotometer UV-1700 (Shimadzu, Japan) bei 280 nm gemessen. Das nach der letzten Zentrifugation gewonnene Präzipitat trochnete man auf einem Uhrmacherglas bei 37 °C über Nacht und konnte es anschließend bei -80 °C bis zur weiteren Bearbeitung lagern. Für anschließende Untersuchungen wurden 15 mg des getrockneten Pellets in ein äquivalentes Volumen Solubilisation-Puffer (100 mM Tris/HCl, 8 M Harnstoff, 1 % SDS, 10 mM EGTA, 300 mM β -Mercaptoethanol, pH 8.8) gegeben und 20 Minuten in einem Wasserbad bei 70 °C inkubiert. Ein vollständiges Lösen des getrockneten Präzipitats erfolgte durch eine Ultraschallbehandlung mit dem Homogenisator Sonifier Sonoplus HD 2200 (Bandelin Electronic, Berlin). Die Probe wurde mit der Spitze MS-72 des Sonifiers in 20 Sekundenschritten über einen Zeitraum von zwei Minuten mit 50 W Leistung beschallt. Nachdem die Probe wiederholt 5 Minuten in einem Wasserbad bei 70 °C inkubiert wurde, erfolgte eine erneute Behandlung. Die so gewonnene Suspension konnte im Anschluss in Dialyseschläuche (molecular cut off < 12-14 kDa, Medicell International Ltd, UK) gefüllt und über Nacht bei Raumtemperatur unter dem Abzug gegen 50 mM Tris/HCl, 50 mM Glycerol, pH 8,8 dialysiert werden.

2.4.3.2 Synthese von polyklonalen Antikörpern gegen *Zona radiata* Proteine

Nachdem die Proteinkonzentration in der Probe nach der Bradford-Methode ermittelt war, wurde 3 x 0,5 ml mit jeweils 500 μ g der aufgereinigter ZrP-Lösung (50 mM Tris/HCl, 50 mM Glycerol, pH 8,8) der Firma Pineda (Antikörper-Service, Berlin) zur Immunisierung von drei Neuseeland Kaninchen übergeben. Die Immunisierung wurde nach dem Standardprotokoll der Firma durchgeführt, in dem weitere Boost-Injektionen in inkomplettem Freund's Adjuvant angewandt wurden. Die Primärimmunisierung fand in kompletten Freund's Adjuvant statt. Nach 120 Tagen wurden die Tiere ausgeblutet und das Serum durch Koagulation über Nacht auf Eis gewonnen. Zuvor wurde das an den Tagen 61 und 90 entnommene Blut der Tiere auf seinen Antikörper Titer untersucht. Hierbei zeigte sich, dass dieser noch zu gering war um zufriedenstellende Extinktionswerte im ELISA zu erzielen.

2.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur weiteren Charakterisierung der aufgereinigten Proteine kam eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zum Einsatz. Die meisten Proteine binden die Seife SDS (Sodiumdodecylsulfat) zu negativ geladenen SDS-Protein-Komplexen mit konstanter Ladung zu Masse Verhältnis. Dabei überdeckt das Detergenz die Eigenladung des Proteins, so dass diese keinen Einfluss mehr auf die Wanderung des Proteins im elektrischen Feld hat. Pro g Protein binden ungefähr 1,4 g SDS. Sodiumdodecylsulfat denaturiert die Proteine durch Brechen ihrer Sekundär- und Tertiärstrukturen und unterbindet Protein-Protein-Wechselwirkungen. Die Proteine unterscheiden sich damit nur noch in ihrer Größe. Hierbei wandern die SDS-Protein-Komplexe im elektrischen Feld zum Plus-Pol und werden durch den Molekularsiebeffekt einer porösen Polyacrylamidmatrix nur nach ihrem Stokes-Radius aufgetrennt (Rehm, 2002). Zur Molekulargewichtsbestimmung von *Zona radiata* Proteinen wurde ein diskontinuierliches System nach Laemmli genutzt. Dabei kam ein 4 % Sammelgel mit 3 % Quervernetzung kombiniert mit

einem 12 % Trenngel zum Einsatz. Als Apparatur diente das Mini-Protean 3 Cell-System der Firma BioRad (München). Die zu bestimmenden Proben wurden mit SDS-Probenpuffer (0,5 M Tris/HCl pH 6,8; 26 % Glycerol, 10 % (w/v) SDS, 0,5 % (w/v) Bromphenolblau) verdünnt, der vorher noch mit 5 % β -Mercaptoethanol versetzt worden war. Als Elektrodenpuffer diente 25 mM Tris/HCl, 192 mM Glycin, 0,01 % SDS, pH 8,3. Für die Größenbestimmung der Zona radiata Proteine wurde der Marker Molecular weight marker 14,4 – 116 kDa (Fermentas, #SM0431) eingesetzt.

Die mit SDS-Probenpuffer verdünnten Proben und Marker wurden vor der Auftragung auf das Gel bei 95 °C für 5 Minuten erhitzt. Der Marker wurde in einem Volumen von 5 μ l und Proben in einem Volumen von 10 μ l eingesetzt. Folgende Parameter wurden für den Lauf an der Gleichspannungsquelle (Power Pac 3000, Bio Rad) eingestellt:

- a) Vorlauf: 15 Minuten bei 200 V (konstant), max. 15 W und 100mA
- b) Lauf im Sammelgel: 50 V (konstant)
- c) Lauf im Trenngel: 15 Minuten bei 200 V (konstant)
- d) Banden schärfen: 25 V (konstant)

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele mit dem Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau R-250 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg/Deutschland) angefärbt. Dieser lagert sich an basische und aromatische Seitenketten von Aminosäuren, und färbt so alle Proteine unspezifisch an. Zur Fixierung der Proteine im Gel wurden diese für 10 Minuten in 20 % Trichloressigsäure unter schütteln inkubiert. Die Färbung erfolgte über eine Stunde mit der zuvor erwärmten Coomassie-Lösung. Um Hintergrundfärbungen zu beseitigen und somit einen besseren Kontrast zu den eigentlichen Proteinbanden zu erhalten, wurde das Gel für ca. eine Stunde in 10 % Essigsäure gelegt.

2.6 Western Blot

Der Western Blot dient der Identifikation und Quantifizierung spezifischer Proteine in komplexen Proteingemischen. Nach Auftrennung der Proteine, in Abhängigkeit von ihrer Größe im elektrischen Feld, werden sie auf eine Membran transferiert und dadurch immobilisiert. Auf der Membran erfolgt der Nachweis des Proteins mittels eines spezifischen Antikörpers. Der gebundene 1. Antikörper wird durch den 2. Antikörper, der entweder radioaktiv markiert oder an ein Enzym (Peroxidase, Phosphatase etc.) gekoppelt ist, detektiert.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P, Millipore) transferiert. Hierzu blockte man das Gel in der Blotting-Kammer (Biorad, Mini Trans-Blot) bei 100 V für eine Stunde (4 °C). Der verwendete Transferpuffer enthielt 25 mM Tris/HCl, 192 mM Glycin und 20 % (v/v) Methanol. Nach Beendigung des Transfers der Proteine auf die Membran wurde diese für eine Stunde mit Blocking-Puffer (3 % BSA in TBS-Puffer) versetzt. Vorher fand noch ein zweimaliges Waschen der Membran mit TBS-Puffer (10 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5) statt. Die so abgesättigten, vorher noch freien, Bindungsplätze der

Membran mussten noch zweimal mit TBS-Tween/Triton (20 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, pH 7,5; 0,05 % Triton X, und 0,1 % Tween-20) und einmal mit TBS-Puffer jeweils für 10 Minuten gewaschen werden. Nachfolgend fand die Visualisierung der transferierten Proteine mittels NBT/BCIP-System statt (Erklärung siehe 2.7). Der Erstantikörper wurde 1/15000 und der Zweitantikörper 1/10000 mit TBS-Puffer verdünnt.

2.7 Dot-Blot

Die zu bestimmenden Proben wurden auf eine Nitrocellulosemembran mit Stützgewebe (Porablot NCL, Macherey-Nagel) aufgetragen. Probenvolumina zwischen 0,5 - 1 µl stellten sich als geeignet heraus. Die Proben mussten je nach erwartetem Gehalt an Vitellogenin und Zona radiata mit 0,1M Tris/HCl pH 6,8 verdünnt werden. Dabei entstanden 50- bis 1000fache Plasmaverdünnungen. Um die nicht durch die Plasmaprobe besetzten Bereiche der Membran abzusättigen, wurde diese mit 10fach verdünntem Roti-Block (Firma Roth) für 30 Minuten versetzt. Als nächster Schritt erfolgte die 1. Antikörperinkubation. Für die qualitative Bestimmung von Vitellogenin und Zona radiata standen die gleichen Antikörper, wie schon im ELISA genutzt, zur Verfügung.

Der α -Vitellogenin Antikörper wurde 1/5000 und der α -Zona radiata Antikörper 1/30000 eingesetzt. Die Antikörperverdünnungen stellte man mit PBS (Phosphat Buffered Saline: 137 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2,6 mM KCl, 0,8 mM KH₂PO₄) her. Die Inkubationszeit mit 1. Antikörper betrug bei Raumtemperatur 2 Stunden. Wurde der Dot-Blot über Nacht inkubiert, so stellte man ihn in die Kühlkammer bei 4 °C. Beide Inkubationsarten erfolgten unter ständigem Schütteln (Titramax 100, Heidolph). Für den darauf folgenden Waschschrift wurde die Membran zweimal über einen Zeitraum von fünf Minuten in PBS, 0,05 % Triton X und 0,1 % Tween-20 unter Schütteln inkubiert. Für die 2. Antikörperinkubation wurde ein α -Rabbit-IgG Alkalienphosphatase Konjugat (Sigma-Aldrich, Deutschland) verwendet. Dieser wurde 1/15000 in PBS verdünnt und mit 0,1 % Tween-20 eingesetzt. Nach erneutem Waschen der Membran in PBS erfolgte die Detektion des im Plasma enthaltenen Vitellogenin und Zona radiata. Hierfür wurde die NBT/BCIP-Farbreaktion verwendet. Als Substratlösung für diese Immunofärbung nutzte man 50 mg/ml 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat Dinatriumsalz (BCIP, Roth) mit 100 mg/ml Dimethylformamid-Nitrobluetetrazolium-Chlorid (NBT, Serva) in 100 mM Tris/HCl, 100 mM MgCl₂ und 100 mM NaCl, pH 9,5. Die Inkubation der Nitrocellulosemembran mit Substratlösung fand im Dunkeln ohne Schütteln statt. Die Alkalische Phosphatase setzte dabei das BCIP um, welches wiederum mit dem NBT zu Indigoblau weiterreagierte. Das aus dem NBT entstandene Formazan unterstützte dabei den blaupurpurfarbenen Farbniederschlag des Indigoblaus (Abb.2.7).

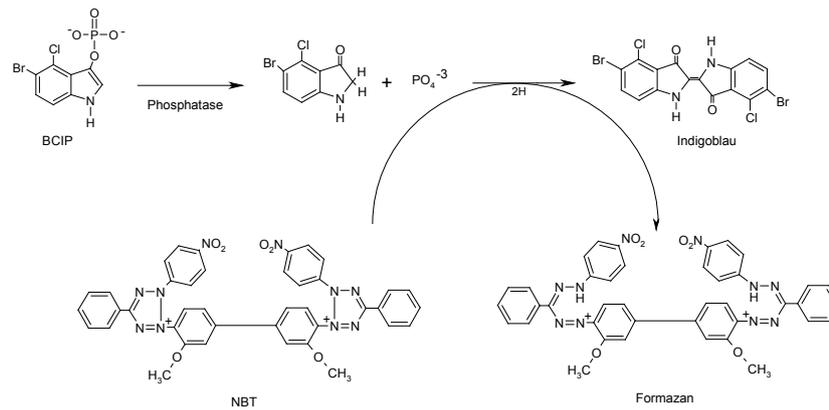


Abb.2.7: Reaktionsschema des NBT/BCIP-Reportersystems (Quelle: Invitrogen).

2.8 Immunopräzipitation

Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die verwendeten polyklonalen Antikörper gegen Vitellogenin und Zona radiata unspezifische Bindungen mit Plasmaproteinen eingingen, wurden die Antisera nach der Methode von Heppel und Sullivan (1999) immunopräzipitiert. Hierzu brachte man gleiche Volumina (400 μl) von Antikörper und männlichem Plasma, welches kein Vitellogenin/Zona radiata Protein enthält, in ein Eppendorfgefäß zusammen. Zu diesem Gemisch wurde noch 1 % Aprotinin und 5 mM Natriumazid gegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 2 Stunden bei 37 °C in einem Thermoblock (Bioblock Scientific 92607, Thermolyne Corp., USA). Um die unspezifischen Antikörper von den spezifischen zu trennen, folgte eine Fällung dieser in einer weiteren Inkubationsrunde auf Eis für 30 Minuten. Nach einstündiger Zentrifugation (Kühlzentrifuge, Eppendorf 5402) bei 14.000 rpm (16000 \times g) und 4 °C konnte der Erfolg der Immunopräzipitation an einem weißrötlichem Pellet erkannt werden. Nachdem der Überstand abpipettiert und bei 4 °C gelagert wurde, konnte dieser für die ELISA-Messungen verwendet werden.

2.9 Quantitative Bestimmung von 17 β -Estradiol per ELISA

2.9.1 Extraktion der Steroide aus Plasmaproben

Der größte Anteil des Steroidhormons 17 β -Estradiol kommt durch seinen lipophilen Charakter nicht frei gelöst in den Körpersäften vor, sondern gebunden an Plasmaproteine, sogenannte SHBG (Sexualhormonbindendes Globulin; Hammond & Bocchinfuse, 1995.). Aus diesem Grund müssen Steroide zuerst von diesen gelöst werden, um sie später quantifizieren zu können.

Die tiefgefrorenen Plasmaproben wurden langsam auf Eis aufgetaut. Zur Extraktion der Steroide wurden 200 μl Plasma in ein Extraktionszentrifugenröhrchen (Glaswerkstatt, Universität Düsseldorf) gegeben. Durch die Zugabe von 5 ml Dichlormethan (DCM) und durch kurzes, kräftiges Schütteln sollten die Steroide aus dem Plasma extrahiert werden. Anschließend wurden die Röhrchen 10 Minuten bei 3000 rpm und 4 °C zentrifugiert (Minifuge RF II, Hereaus, Deutschland). Die untere organische Phase, welche die Steroide enthält, überführte man mit einer Glaspasteurpipette in ein Rollrandglas. Die obere wässrige Phase wurde noch einmal extrahiert und die Steroide in das Rollrandglas gefüllt.

Unter dem Abzug evaporierte man das DCM bei 37 °C aus den Rollrandgläsern. Die Steroide wurden in jeweils 400 µl Ethanol resuspendiert und in Mikrotiterplatten mit geringer Bindungsaffinität (Low Cell Binding, Nunc) transferiert. Nach der Evaporation des Ethanols bei 37 °C wurden die Steroide noch zwei weitere Male mit Ethanol rückgelöst und auf die Mikrotiterplatten überführt. Nach erneutem Verdampfen des Ethanols konnten die Steroidproben, verschlossen bei 4 °C, bis zum Einsatz im Steroid ELISA aufbewahrt werden.

2.9.2 Der Steroid ELISA

Die Konzentrationen des Östrogens 17β-Estradiol (E_2 , 1, 3, 5(10)-ESTRATRIEN-3, 17β-DIOL) wurde im Plasma mittels einem indirekten ELISA nach Cuisset *et al.* (1994), Nash *et al.* (2000) und Susca *et al.* (2001) bestimmt. Bei diesem kompetitiven ELISA konkurrierte ein mit dem Enzym Acetylcholinesterase (kurz: AChE, Sigma) gekoppeltes Steroid (Tracer) mit dem freien Steroid aus der Probe bzw. aus dem Standard um die spezifischen Antikörper-Bindungsplätze. Das Antiserum gegen 17β-Estradiol war ein polyklonales Kaninchenimmunoglobuline und wurden von der Firma Pineda-Antikörper-Service (Berlin) hergestellt. Die an den Tracer gekoppelte AChE katalysierte die Umsetzung der Ellman's Reagenz (5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoesäure) oder DNTB). Bei dieser enzymatischen Umsetzung wird Acetylthiocholin zu Thiocholin und Acetat hydrolysiert. Die Sulfhydrylgruppe des Thiocholins reagierte dabei mit dem DTNB und führt unter Spaltung der Disulfidbrücke im DNTB zur Bildung von 2-Nitro-5-Thiobenzoat (NTB⁻), welches weiter zur NTB²⁻ ionisiert. Das NTB²⁻-Ion hat eine gelbliche Farbe und kann spektrophotometrisch mit dem Mikrotiterplatten-Photometer (Sunrise, Tecan, Österreich) bei einer Wellenlänge von 405 nm (Referenzwellenlänge 605 nm) gemessen werden.

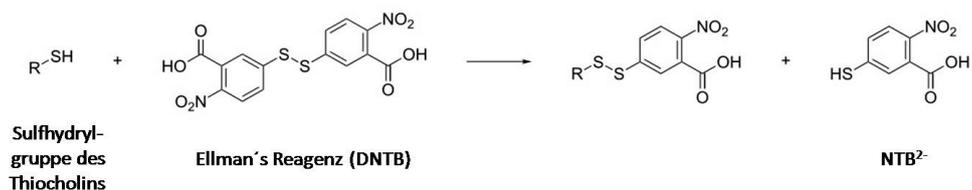


Abb.2.8: Chemische Reaktion des Ellman's Reagenz (DNTB) mit einem Thiol unter Bildung von NTB²⁻ (genaue Beschreibung siehe Text, Strukturformeln: Edgar, 2010).

2.9.3 Vorbereiten der Proben für den ELISA

Für die Messung der Steroidkonzentration wurden die extrahierten und auf Mikrotiterplatten transferierten Steroide in 300 µl Ethanol rückgelöst. Für die Bestimmung der Konzentrationen von Estradiol transferierte man 40 µl der rückgelösten Steroide auf eine weitere Mikrotiterplatte (Transferplatte: Low Cell Binding, Nunc). Anschließend wurde das Ethanol bei 37 °C evaporiert und die Steroide in 110 µl Steroid-ELISA-Puffer (100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 mit 1 mM EDTA, 0,15 mM NaN₃ und 0,1 % BSA) resuspendiert. Je nach Probenherkunft und erwarteter Dosis des Hormons in der Probe setzte man zwischen 5 und 50 µl (Doppelbestimmung) im ELISA als Probe ein.

2.9.4 Vorbereiten der Mikrotiterplatten

Mikrotiterplatten, die eine hohe Bindungsaffinität aufwiesen (Maxisorp, Nunc), wurden mit polyklonalen Ziegenimmunoglobinen gegen Kaninchenimmunoglobinen (Sigma) beschichtet. Dazu verdünnte man die Ziegenimmunoglobine in einem 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 (PPB) 1/1850. 150 µl dieser Lösung wurden in jede Probenkammer der Mikrotiterplatte pipettiert. Mit einem Abdeckfilm (Plate Sealers, Thermo Scientific) verschloß man die Mikrotiterplatte und inkubierte sie über Nacht bei Raumtemperatur. Die noch freien unspezifischen Bindungsplätze wurden durch Inkubation mit 3 % BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma) über Nacht gesättigt. Das BSA löste man in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 mit 1 mM EDTA und 5 mM NaN₃. In jede Probenkammer der Mikrotiterplatte wurden 100 µl dieser Lösung gegeben. Danach waren die Platten für den Steroid ELISA gebrauchsfertig und konnten in feuchtem Milieu bei 4 °C bis zum Gebrauch mehrere Monate aufbewahrt werden. Unmittelbar vor dem Gebrauch wurden die Mikrotiterplatten mit Waschpuffer (20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 mit 0,05 % Tween-20) und einem automatischen Mikrotiterplatten-Waschgerät (Columbus, Tecan, Österreich) dreimal gewaschen.

2.9.5 Tracer Herstellung

Die Steroid-CMO-AChE-Konjugate (Tracer) wurden im Steroid-ELISA eingesetzt und dienten zur Bestimmung der Steroid Konzentration in aus den extrahierten Plasmaproben. Die Tracer konkurrieren mit dem freien Steroid in der Probe um die Antikörperbindungsplätze. Der Tracer wurde selber nach einem Protokoll von Nash et al. (2000) generiert.

Die Acetylcholinesterase (AChE, Sigma) wurde, um G₄-AChE zu generieren, mit Trypsin über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Dazu wurden insgesamt 1 mg der AChE in 500 µl eines 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 7 gelöst und mit 25 µl der Trypsinlösung (25 mg/ml Trypsin in 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 7) gemischt. Das Enzym Trypsin verdaute dabei die AChE zu tetrameren globulären Formen mit je vier katalytischen Untereinheiten, der G₄-AChE. Durch eine anschließende Dialyse sollten die Salze aus der Lösung entfernt werden. Die Lösung dialysierte man dabei gegen 200 ml eines 100 mM Boratpuffer pH 8,5 bei 4 °C. Der Boratpuffer wurde während der Dialyse mehrmals erneuert. Nach abgeschlossener Dialyse überführte man den Inhalt des Dialyseschlauchs in ein frisches Reaktionsgefäß. Die noch im Schlauch befindlichen Reste wurden durch erneutes Spülen ebenfalls in das Reaktionsgefäß überführt. Das Endvolumen der G₄-AChE betrug 1 ml.

In ein Eppendorf Reaktionsgefäß wurden 174 µg des 17β-Estradiol-Carboxymethyloxim (E₂-CMO, Steraloids, USA), welches frei von jeglicher Feuchtigkeit sein musste, gegeben und in insgesamt 38 µl einer frisch angesetzten N-Hydroxysuccinimid-Lösung (Sigma) rückgelöst (1 mg N-Hydroxysuccinimid in 1 ml Dimethylformamid, DMF (Sigma)). Zu dieser Lösung gab man 32 µl einer NN-Dicyclohexylcarbodiimid-Lösung (2 mg Dicyclohexylcarbodiimid (Sigma) in 1 ml DMF) zu. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur.

Dreißig Mikroliter der aktivierten 17β-Estradiol-3-CMO wurden mit 200 µl der G₄-AChE Lösung in einem Eppendorf Reaktionsgefäß gemischt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Um

einen Niederschlag an der zur Reinigung benutzten PD-10 Säule (Amersham Bioscience, Schweden) zu verhindern, wurde der Lösung 1 ml Steroid-ELISA-Puffer (100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 mit 1 mM EDTA, 0,15 mM NaN_3 und 0,1 % BSA) zugegeben. Die 17β -Estradiol-CMO-AChE-Lösung gab man zur Reinigung mittels Gelfiltration auf eine PD10 Säule. Eluiert wurde mit einem 10 mM Tris Puffer pH 7,4 mit 1 M NaCl, 10 mM MgCl_2 und 15 mM NaN_3 .

Nach dem Ausschlussvolumen wurden die Fraktionen zu je 200 μl (vier Tropfen) in Reaktionsgefäßen, in welche 1 ml Steroid-ELISA-Puffer vorgelegt wurden, gesammelt. Zu jeweils 5 μl jeder Fraktion, welche auf eine Mikrotiterplatte vorgelegt waren, gab man 200 μl Ellmanns Reagenz (20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 mit 0,75 mM Acetylthiocholin Iodid (Sigma) und 0,5 mM 5,5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoesäure (DTNB, Sigma)) und die entstandene Farbentwicklung las man mit dem ELISA-Platten Photometer aus. Die ersten 12 Fraktionen, in denen sich nach Nash *et al.* (2000) das mit dem Enzym markierte 17β -Estradiol befinden sollte, wurden vereinigt und in Aliquots zu je 400 μl , 800 μl und 1200 μl bei -20°C eingefroren. Verdünnt mit 20 ml bzw. 40 oder 60 ml Millipore konnten eine bzw. zwei und drei ELISA-Platten entwickelt werden.

Um die richtigen Verdünnungen der Antiseren und Steroid-AChE-Konjugate herauszufinden, wurde für das Tracer-Antiserumpaar eine Schachbrett-Titration nach Nash *et al.* (2000) durchgeführt. In die Spalte eins einer Mikrotiterplatte gab man zu 100 μl Steroid-ELISA-Puffer weitere 100 μl des Antiserums in einer bestimmten Anfangsverdünnung zu. In die Probenkammer A1 wurde kein Puffer vorgelegt, stattdessen füllte man 200 μl des Antiserums ein. Mit der automatischen Transferpipette (Research Pro, Eppendorf) stellte man nun eine serielle Verdünnung des Antiserums bis zur Spalte 10 her. Dazu wurden der Puffer und das Antiserum dreimal gemischt und insgesamt 100 μl in Spalte zwei transferiert. Spalte 11 erhielt kein Antiserum, da hier die unspezifischen Bindungen (NSB) des Steroid-Tracers bestimmt werden sollten. Spalte 12 diente zur Bestimmung der Totalen Enzymaktivität. Weiter wurden in die Probenkammern der Zeile A der Mikrotiterplatte 100 μl der zuvor verdünnten (z.B. 1/50) Steroid-Tracer Lösung pipettiert. Ausgehend von Zeile A stellte man eine serielle Verdünnung des Tracers bis zur Zeile H her. Nach zweistündiger Inkubation wurden alle Kammern, bis auf Spalte 12, dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Nach Zugabe von 175 μl Ellmans Reagenz wurde die Mikrotiterplatte bei Raumtemperatur so lange inkubiert bis die maximale Absorption ungefähr 1,5 AU betrug.

2.9.6 Die Steroid ELISA Prozedur

Die Probenkammern der Mikrotiterplatten wurden nun entsprechend dem Steroid ELISA nach Nash *et al.* (2000) mit Steroid-ELISA-Puffer, Steroid-Standard, Proben, Antiseren und Steroid-Tracer befüllt. In die Probenkammern, in welche die Proben eingefüllt werden sollten (C1-H12), wurden zunächst 50 μl Steroid-ELISA-Puffer vorgelegt. In die Reihen A und B (außer in die Probenkammern A1 und B1 und A12 und B12) pipettierte man jeweils 100 μl des Steroid-ELISA-Puffers. In die Probenkammern A12 und B12 legte man jeweils 125 μl des Steroid-ELISA-Puffers vor, da in diese kein Antiserum gefüllt werden sollte. In diesen Probenkammern der Reihen A und B wurden die unspezifischen Bindungen (Non-specific binding, NSB) der Steroid-Tracer an die Messplatte bestimmt. 192 μl Steroid-ELISA-

Puffer gab man in die ersten beiden Probenkammern der Reihen A und B. Ausgehend von A1 und B1 wurde eine Serienverdünnung des Steroid-Standards bis zu den Kavitäten A10 bzw. B10 hergestellt. Dazu füllte man 8 µl eines Steroid-Standards in die Probenkammern A1 und B1. Nun wurde die Lösung dreimal gemischt und 100 µl davon in die nächsten Kavitäten transferiert. Die Verdünnungen wurden mit einer programmierbaren Transferpipette (Research Pro, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) hergestellt. Es konnte so eine Verdünnungsreihe des Standards von 400 pg/Kavität (A1 und B1) bis 0,78 pg/Kavität (A10 und B10) hergestellt werden. Von der Transferplatte wurden nun jeweils 50 µl (Doppelbestimmung) Probe auf die Messplatte transferiert. Insgesamt standen so auf einer Platte 36 Plätze für Proben oder interne Steroid-Standards zur Verfügung. Anschließend konnten 25 µl der Steroid-Tracer Lösung zugegeben werden. Der Startpunkt des kompetitiven ELISA war die nachfolgende Zugabe von 25 µl Antiserum. Mit einer Plastikklebefolie (Plate Sealers, Thermo Scientific) verschlossen erfolgte für mindestens zwei Stunden die Inkubation der Mikrotiterplatte bei Raumtemperatur. Nach abgeschlossener Inkubation wurde die Mikrotiterplatte dreimal mit dem automatischen Mikrotiterplatten-Waschgerät gewaschen um alle ungebundenen Steroide, Steroid-Tracer oder Antikörper zu entfernen. Nach Zugabe von 200 µl Ellmans Reagenz und Inkubation der Mikrotiterplatte über Nacht bei Raumtemperatur konnte die Absorption bei 405 nm mit dem ELISA-Plattenphotometer (Sunrise, Tecan, Österreich) gemessen werden. Die Absorptionen konnten direkt mithilfe des Programms XFLOUR (Tecan, Österreich) in Microsoft Excel für die finale Auswertung eingefügt werden.

2.9.7 Auswertung der ELISA

Um die in den Proben vorhandene Menge an Protein oder Steroid zu bestimmen, mussten die gemessenen Extinktionen in Bezug zu der Standardreihe gebracht werden. Zuerst subtrahierte man den Mittelwert der zwei NSB-Kammern von allen anderen Mittelwerten der Proben und der internen Standards. Die NSB korrigierten Extinktionswerte der Standardreihe und der Probenkammern wurden nun in Bezug zur Maximalbindungsstärke des Erstantikörpers (B_0), welche als 100 % festgelegt wurde, gebracht. Die so erhaltenen prozentualen Werte der Erstantikörperbindung, welche im Idealfall eine sigmoide Kurve beschreiben (Abb.2.9 B), wurden anschließend nach folgender Formel logit linearisiert (Cuisset, 1994).

$$\text{logit } B / B_0 = \ln\left[\frac{B / B_0}{1 - (B / B_0)}\right]$$

Die Abkürzung B steht dabei für die korrigierten Standard- oder Probenwerte. B_0 beschreibt den Maximalbindungswert des Erstantikörpers. Nachfolgend konnten die logit-Werte der Standardreihe gegen ihre Vitellogenin-, Zona radiata- oder Steroidkonzentrationen aufgetragen werden. Um einen linearen Kurvenverlauf zu erzielen, wurden diese Werte logarithmisch auf der x-Achse aufgetragen. Abbildung 2.9 zeigt eine so erstellte Standardkurve.

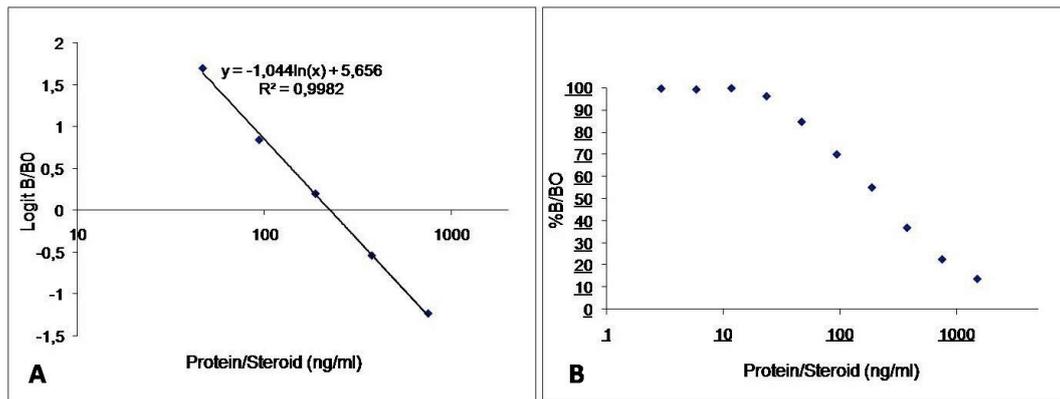


Abb.2.9: **A)** Graphisch Darstellung der Auftragung von logit-Werten gegen die Protein/Steroidkonzentration [ng/ml] der Standardreihe. Ebenfalls angegeben ist die Regressionsanalyse der Ausgleichsgeraden mit ihrem Korrelationskoeffizienten (r) und ihrer Gradengleichung. **B)** Standardreihe ausgedrückt als %B/Bo gegen die eingesetzte Protein- oder Steroidkonzentration [ng/ml]. Nur Punkte die im linearen Bereich der Kurve lagen (20 % - 80 % B/Bo), wurden für die Erstellung der Standardgeraden verwendet.

Die so erhaltene Gleichung der Regressionsgeraden wurde für die Berechnung der Protein- und Steroidkonzentrationen der Proben und der internen Standards mittels Dreisatz verwendet. Die geringste Konzentration an Vitellogenin und Zona radiata, die mit diesem ELISA-System erfasst werden konnte, wurde anhand des linearen Bereiches der Standardkurve festgelegt.

2.10 Hormonimplantate

2.10.1 Herstellung

Der nicht degradierbare Kunststoff Elvax (DuPont™ Elvax 40L-03), ein Poly [Ethylen-Vinyl Acetat], bildet den Hauptbestandteil der Hormonimplantate. Die Verarbeitung geschah, durch mich modifiziert, nach der Methode von Mylonas und Zohar (2001). In einem Rundkolbenmesszylinder wurde im Wasserbad eine entsprechende Menge Elvax in Dichlormethan (DCM) gelöst, so dass eine 15 %ige Elvaxlösung (w/v) entstand. In einem getrennten Arbeitsschritt wurde jeweils Inulin, Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin, BSA) und das Hormon 17β -Estradiol (1, 3, 5(10)-ESTRATRIEN-3, 17β -DIOL) in einem möglichst geringem Volumen an niederprozentigem Ethanol gelöst und in 1,5 ml Portionen lyophilisiert (Lyovac GT2, Finn Aqua). Das so entstandene feine Pulver konnte, je nach gewünschter Zielkonzentration der beteiligten Stoffe, zusammengemischt werden. Es konnten so Elvax-Hormon-Inulin/BSA-Gemische hergestellt werden, die eine große Bandbreite an möglichen Mischungsverhältnissen aufwiesen. Genutzte 17β -Estradiol-Konzentrationen lagen zwischen 1 bis 10 mg/kg Körpergewicht. Um ein ideales Verhältnis zwischen BSA/Inulin und den anderen Komponenten zu finden, wurden verschiedene Mischungsverhältnisse der beiden Stoffe getestet, da diese die Abgabekinetik der Implantate maßgeblich beeinflussen. Es wurden so prozentuale Mischungsverhältnisse von 5, 10 und 25 % verwendet, wobei dies immer auf die Menge an eingesetztem Elvax bezogen war. Nach Berechnung der gewünschten Zielkonzentrationen wurden die Bestandteile in einem Glasgefäß mit Deckel zusammengeführt und unter starkem Schütteln und nachfolgender kur-

zer Ultraschallbadbehandlung, die alle restlichen Akkumulationen und Luftblasen beseitigte, zu einer homogenen, viskosen Lösung vermischt.

Zu Beginn der Implantatherstellung bestand die Methode in dem Gießen in eine quadratische Metallform (Innenmaße: H: 5 cm x B: 5 cm x T: 2 cm) und anschließendem Ausstanzen der Implantate. Dies erwies sich allerdings als ineffizient und kompliziert, da immer sehr viele unverwertbare Stanzreste übrig blieben. Zudem war die Form der Implantate, durch den Druck, der beim Stanzen auftrat, nie einheitlich. Nach Recherche und Weiterentwicklung kam später eine neue Technik zum Einsatz. Das viskose Gemisch wurde dann mittels einer handelsüblichen 10 ml Spritze mit Kanüle aufgezogen und in eine zweiteilige metallerne Gießvorrichtung mit 5 Bohrungen (\varnothing : 0,6 cm x L: 3 cm) abgelassen. Hierauf folgten unterschiedlich lange Lagerungen bei Temperaturen von -80 °C (20 min), 40 °C (24h) und -20 °C (24h). Nach dem ersten Schritt, der zum totalen Erstarren des Gusses führte, wurde dieser aus der Form gelöst (Abb.3.27). Durch diese Schritte konnte eine langsame Evaporation des Dichlormethans erreicht werden, so dass die Endprodukte wohlgeformte Zylinder bildeten. Letztlich folgte eine Inkubation im Vakuumexsikkator, um auch die letzte Restfeuchtigkeit aus den Implantaten zu entfernen. Zum Schluss mussten nur noch gleichgroße Stücke (Durchmesser: 3 mm, Länge: bis 4 mm) aus den fertigen Implantatstücken geschnitten werden, je vier aus einem 2 cm großen Stück. Diese wurden in einem Gefäß mit Silicagel (Orangeegel) bei -20 °C gelagert.

2.10.2 Bestimmung der Hormonabgaberate *in-vitro* und *in-vivo*

Um die genaue Abgabekinetik der Hormonimplantate bestimmen zu können, muss dies *in-vivo* geschehen und kann nicht an Zellkulturen oder anderen künstlichen Systemen erfolgen, da diese nicht den gesamten Organismus eines Fisches widerspiegeln. Ohne die genaue Abgabekinetik der Implantate und die Auswirkungen dieser auf den Fisch zu kennen, können die Implantate später nicht am eigentlichen Versuchstier, dem Thunfisch, erfolgreich eingesetzt werden. Dies ist gängige Praxis in allen Veröffentlichungen zu diesem Thema (Mylonas *et al.*, 2007; Corriero *et al.*, 2007). Zuerst wurden die Implantate an einem *in-vitro* System getestet. Um ein annähernd ähnliches physiologisches Milieu, in dem die Implantate auch *in-vivo* zum Einsatz kommen, zu gewährleisten, wurden die einzelnen Implantate in Fisch-Ringer (144 mM NaCl, 6 mM KCl, 5 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, 12,4 mM NaHCO₃) inkubiert. Durch die nur geringe Löslichkeit von 17 β -Estradiol in wässrigen Lösungen (1,5 μ g/ml, Shareef *et al.*, 2006), musste das Volumen des Ansatzes dementsprechend ausgewählt werden. So kamen die Implantate in Reaktionsgefäße mit Schraubverschluss (Greiner) und wurden unter Schütteln 24 h lang inkubiert, bis sie gegen frische Ringerlösung ausgetauscht wurden. Jeweils 1 ml der Probe wurde bis zur Auswertung per ELISA bei -20 °C gelagert. Um die maximale Abgaberate zu bestimmen, kamen die Implantate in ein Gemisch aus 75 % Alkohol in Fisch-Ringer. Hier ist die Löslichkeit von 17 β -Estradiol um fast 2000fach erhöht. Es lösen sich 2,5 mg pro ml Ethanol (Cayman Chemical, 2008). Die Proben konnten direkt, ohne vorherige Extraktion, nach Verdünnung mit Steroid-ELISA-Puffer im ELISA eingesetzt werden.

In-vivo wurden die Implantate an Buntbarsch (*Oreochromis niloticus*), Wolfsbarsch (*Dicentrarchus labrax*) und Dorade (*Sparus aurata*) getestet. Nachdem die Tiere per Betäubungsbad (Benzocain, 100 mg/L; Neiffer, 2009) narkotisiert waren, konnte ihnen mittels eines Injektors das Implantat im Bereich der dorsalen Flosse eingesetzt werden. Hierbei wurden die Implantate in einer geringen Menge Kokosnussbutter eingebettet. Dies sollte eine bessere Abgabe des Hormons in das Gewebe des Fisches bewirken. Der Injektor wurde von der Zentralwerkstatt Biologie hergestellt. Er bestand aus einer Kanüle (\varnothing 3,5 mm, Luer-Lock), die an einen federgelagerten Konus angeschlossen war. Nachdem dem Fisch Blut über die Schwanzvene abgenommen und ihm ein ID-Chip (Firma Dasmann) eingesetzt wurde, kam er für die restliche Zeit des Versuches in ein separates Becken. Von Tilapien wurden nach 2, 5, 9 und 14 Tagen Proben genommen, von Wolfsbarsch nach 2, 7, 10, 14 und 21 Tagen. Zur Analyse der Blutproben kam ebenfalls, wie oben beschrieben, der Steroid-ELISA zum Einsatz.

2.10.3 Extraktion von 17 β -Estradiol aus den Implantaten

Um die Abgaberate der Implantate genauer zu bestimmen, wurden sie nach Versuchsende aus den Tieren (Tilapien) entnommen. Das sich noch in ihnen befindliche Hormon wurde in folgenden Schritten extrahiert. Nach Trocknung der Implantate wurden sie manuell so fein wie möglich zerkleinert, so dass das danach genutzte Lösungsmittel (80 %-Ethanol) eine möglichst große Angriffsfläche hatte. Die so über 24 Stunden unter Schütteln bei RT inkubierte Masse, wurde anschließend mit einem Pistill im Eppi nochmals bearbeitet, um möglichst sämtliches noch in den Implantatstücken zurückgehaltenes Hormon zu lösen. Nach einer 15minütigen Zentrifugation bei 14.000 rpm (Kühlzentrifuge, Eppendorf 5402) wurde der so gewonnene Überstand auf eine Mikrotiterplatte mit geringer Bindungsaffinität (Low Cell Binding, Nunc) überführt. Nach der Evaporation des Ethanols bei 37 °C wurden die Steroide bis zum Einsatz im Steroid ELISA bei 4 °C aufbewahrt.

2.10.4 3D-Computertomographische-Analyse

Die computertomographischen Untersuchungen der Implantate wurden am TPW Prüfzentrum für Computertomographie (TPW ROWO Material Testing, Neuss) durchgeführt. Die Implantate wurden mit einem industriellen Mikrofokus-Computertomographen, v|tome|x L450 (phoenix x|ray, GE Measurement & Control Solutions, Wunstorf), gescannt (Abb.2.10). Ausgestattet mit einer offenen 240kV (320W) Mikrofokus-Röntgenröhre und einem hochauflösendem Flächendetektor (Perkin Elmer 1620, 16 Bit, 2048 x 2048 Pixel, 200 μ m pro Pixel, 409 x 409 mm), wurden Volumen mit einer Voxelauflösung (Voxel = Volumen Pixel) von 13,05 μ m³ erstellt. Alle Messungen wurden mit einer Beschleunigungsspannung von 140 kV und einem Röhrenstrom von 200 μ A durchgeführt.

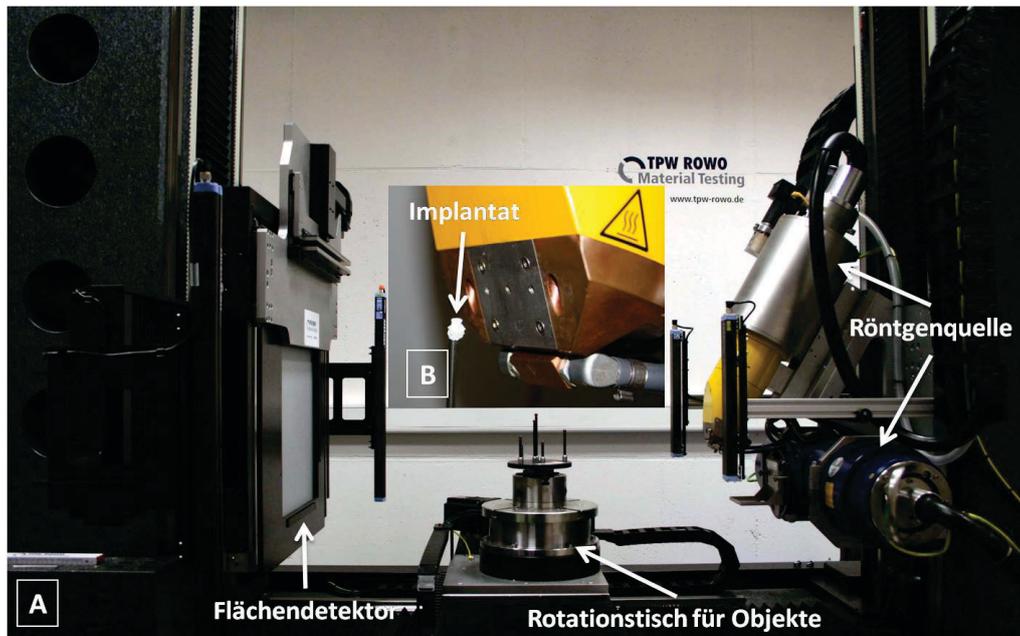


Abb.2.10: A) Röntgen-CT „v|tome|x L 450“ der Firma TPW ROWO Material Testing GmbH. B) Vergrößerung der Röntgenröhre und des Implantates welches auf dem Rotationstisch befestigt wurde.

Bei der 3D-CT (Kegelstrahltomographie) wird die Probe während einer Rotation um 360° durchstrahlt und dabei eine Serie von 2D-Bildern in meist 1° Schritten aufgenommen. Die Akquisition dieser Projektionen wurde mit der Software *datos|x acq 2* (GE Measurement & Control Solutions, Wunstorf) gemacht. Aus diesen Projektionen kann dann mittels gefilterter Rückprojektion (*Radon, 1917*) ein dreidimensionales Volumenmodell errechnet werden. Diese sogenannte Rekonstruktion wurde mit der Software *datos|x rec 2* (GE Measurement & Control Solutions, Wunstorf) durchgeführt.

Die Auflösung V in der tomographischen Abbildung ist die Voxelgröße des rekonstruierten Volumendatensatzes. Die Voxelgröße ist genauer als die Kantenlänge eines Voxels definiert. Das Voxel (Volumenpixel) stellt das kleinste Element der Rekonstruktionsmatrix (Volumenelement) dar. Es stellt ein Maß für die Detailerkennbarkeit dar und kann näherungsweise mit der Ortsauflösung gleichgesetzt werden. Die Voxelgröße ist gegeben durch die Größe P der Detektorpixel dividiert durch die geometrische Vergrößerung M , also $V=P/M$ (Abb.2.11). M ist das Verhältnis von Focus-Detektor-Abstand und Fokus-Objekt-Abstand: $M= FDA/FOA$ (www.phoenix-xray.com). Die Auswertung der gescannten Volumen erfolgte mit der Software *VG Studio Max 2.1* (Volume Graphics, Heidelberg).

Hierdurch war es möglich die Struktur der Implantate nach dem Aushärten auf ihre Homogenität zu untersuchen. In der Entwicklungsphase konnten zu große Luftporen in der Elvax-Matrix beobachtet werden, welche die Funktion der Implantate beeinträchtigt hätten. Mit Hilfe des CT konnten die verschiedenen Arbeitsschritte evaluiert werden, welche die Luftblasenbildung während der Implantatherstellung verhinderten. Außerdem sollten eventuelle Strukturveränderungen innerhalb der Implantate, die während der Inkubation durch Quellung des BSA/Inulin-Zusatzes auftreten könnten, untersucht werden.

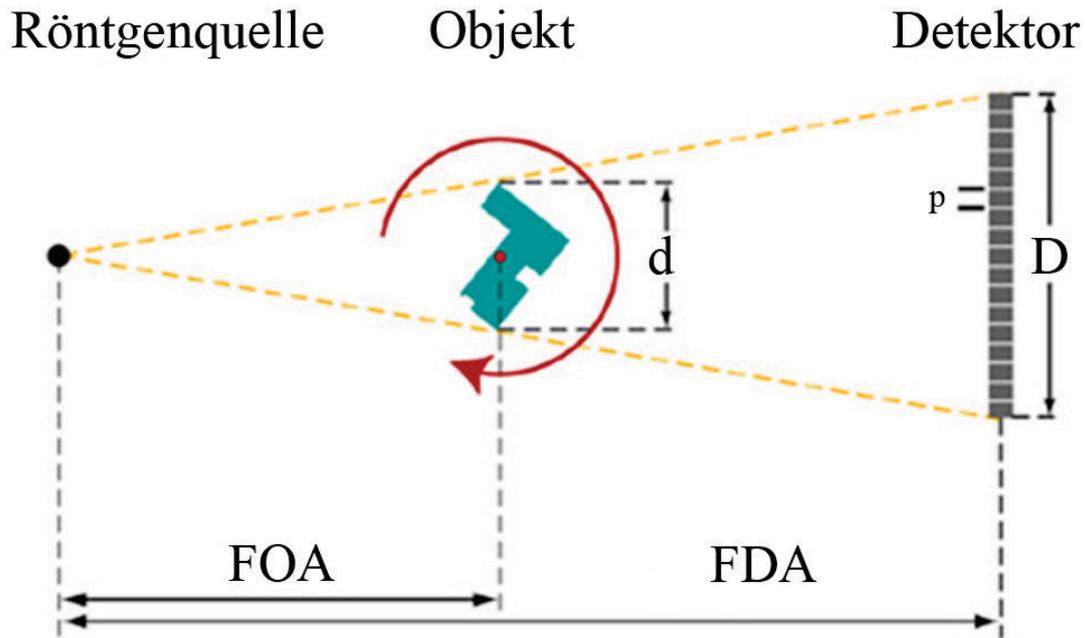


Abb. 2.11: Auflösung eines CT-Volumens ist gegeben durch die Detektorpixelgröße P geteilt durch das Verhältnis Fokus-Detektor Abstand zu Fokus-Objekt Abstand (phoenix-xray).

2.10.5 Hormoninduktion an freischwimmenden ABFT

Die fertiggestellten Implantate konnten den Thunfischen auf zweierlei Art und Weise verabreicht werden. Zum einen bestand die Möglichkeit, eine Harpune, zum anderen eine Lanze/Speer (engl. jabstick) zu nutzen. Um diese Systeme für die Implantation verwenden zu können, mussten die Hormonimplantate an einen Träger (Länge: 14 cm) befestigt werden. Dieser bestand aus einer Pfeilkopfspitze aus Polyethylen (Floy-tag, USA), an der die Implantate durch ein Nylonmonofilament (\varnothing 0,6 mm) befestigt wurden. Um die Implantate vor auftretenden physikalischen Kräften zu schützen, die bei der Verabreichung auftreten, wurden sie durch ein konisch geformtes Frontstück und durch einen Stopper flankiert. Zu Beginn waren diese nur aus Plastik, weiterentwickelt dann aus Titan (Zentralwerkstatt Biologie). Um die hormoninduzierten Tiere von den nicht induzierten zu unterscheiden, kam ein Farbcode zum Einsatz. Er bildete den letzten Teil des Trägers. Er bestand aus unterschiedlich gefärbten, flexiblen Röhrenmaterial (Floy-tag, USA), die über das Nylonmonofilament gezogen wurden. Um dem gesamten Konstrukt eine gewisse Festigkeit zu verleihen, wurden vordere Teile mit Gewebekleber (Histoacryl, Braun) zusammengeschlossen und das Röhrengebilde mit formbarem, elastischem Kunststoff (Silastic® MDX4-4210 BioMedical Grade Elastomer, Dow Corning) gefüllt (Abb.2.12).

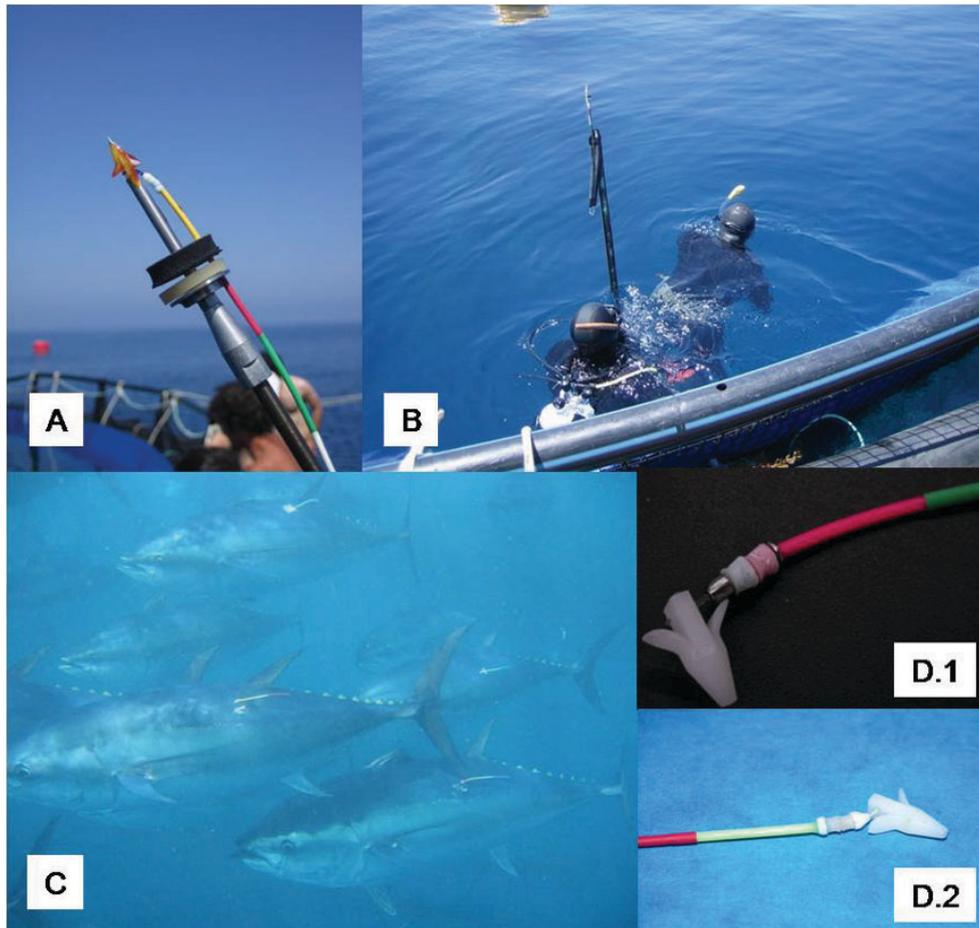


Abb.2.12: Für die Implantation wurden die gefertigten Hormonträger mit Farbcode durch einen Adapter auf einen Harpune befestigt (A), um diese dann durch Taucher den Fischen zu implantieren (B). Erfolgreich im Bereich der Rückenflosse implantierte Thunfische (C). Durch einen nach dem eigentlichen Hormon-Implantat gelegenen Reporter (D), konnte das korrekte Eindringen der Implantate visuell bestätigt werden.

2.11 RNA-Aufreinigung und cDNA-Synthese

Leber- und Gonadenproben wurden aufgetaut und von wässrigen Rückständen des RNA^{later} befreit. Zur Isolation der totalen RNA kam TRI Reagent (Sigma) zum Einsatz, welches nach Herstellerangaben genutzt wurde. Nachdem das RNA Pellet unter einer Sterilbank mit Abzug getrocknet war, wurde es je nach Größe des Pellets mit DEPC (Diethylpyrocarbonat, Roth) behandeltem Millipore (50-100µl) versetzt und rückgelöst. Bis zur cDNA-Herstellung wurden die RNA-Proben bei -80 °C gelagert. Die Qualität und Konzentration der RNA wurde durch spektrophotometrische Messungen (Biomate 3 mit nano cell Accessory, Thermo Scientific) bei einer Ratio von 260/280 nm und durch Auftragung der RNA auf 1 %ige Agarosegele kontrolliert. Nur Proben, die bei der Messung einen Quotienten zwischen 1,8-2,2 aufwiesen, wurden weiter verwendet. Vor der eigentlichen cDNA Erzeugung wurden eventuelle Verunreinigungen der RNA durch DNA mittels einer DNase-Behandlung (DNase I, Fermentas) nach Herstellerangaben beseitigt, so dass spätere Messfehler die aus der fälschlichen Amplifikation genomischer DNA hervorgehen, ausgeschlossen werden konnten. Erststrang-cDNA wurde aus 2 µg totaler RNA mittels random Hexamer Primer (0,5 µg/µg RNA), M-MLV Reverser Transkriptase (final 50 U, Promega) und RNasin Ribonuclease-Inhibitor (final 25 U, Promega), sowie dNTP's (final

330 μM) in einem Reaktionsvolumen von 30 μl hergestellt. Die so gewonnenen cDNA Proben standen dann zur Genexpressionsanalyse bereit. Zudem wurde die cDNA mittels 18S-Kontroll-PCR auf ihre Verwendbarkeit getestet. Primer für diese PCR wurden von dem Institut CCMAR (FARO) erhalten.

Tab.2.2: Primersequenzen für 18S rRNA

Primer	Sequenz (5'-3')
18S Sense	TCAAGAACGAAAGTCGGAGG
18S Antisense	GGACATCTAAGGGCATCACA

Dabei beinhaltete jede 25 μl PCR Reaktion 1 mM MgCl_2 , je 10 μM von jedem dNTP, 200 nM je Primer, 0,5 U EuroTaq Polymerase (Euroclone) und 1 μl cDNA. Das Thermocycler Programm war wie folgt: 95 $^\circ\text{C}$ für 2 Min, 25 Zyklen bei 95 $^\circ\text{C}$ für 30 s, 60 $^\circ\text{C}$ für 30 s, und bei 72 $^\circ\text{C}$ für ebenfalls 30 s, gefolgt von einer finalen Inkubation bei 95 $^\circ\text{C}$ für 5 min.

2.12 Sequenzanalyse von Perciformes Estrogen Rezeptor alpha und Primer-Design

Da noch keinerlei Sequenzinformationen für das Gen des Estrogen Rezeptor alpha ($\text{ER}\alpha$) vom ABFT in Datenbanken existierten, war es nötig Sequenzen bei nahverwandten Fischarten zu finden und auf Homologien zu untersuchen. Die Datenbanksuche nach $\text{ER}\alpha$ (Uniprot.org) ergab alle zur Verfügung stehenden Sequenzen von barschartigen Fischen (Perciformes). Einige dieser wurden mittels Align-mentanalyse untersucht. Hierzu wurden folgende Datenbankeinträge zur Sequenzanalyse herangezogen: *Astatotilapia burtoni* (AY422089), *Oreochromis niloticus* (U75604), *Oreochromis mossambicus* (AM284390), *Lepomis macrochirus* (EF191018), *Micropogonias undulatus* (AF298183), *Acanthopagrus schlegelii* (AY074780), *Sparus aurata* (AF136979), *Chrysophrys major* (AB007453), *Perca flavescens* (DQ984124), *Halichoeres tenuispinis* (Y305026), *Halichoeres trimaculatus* (AF326-201), *Acanthogobius flavimanus* (AB290321), *Takifugu rubripes* (n.v.), *Tetraodon nigroviridis* (n.v.). Ausgehend von diesen Daten wurden mittels der Software Primer Premier teilweise degenerierte Primer gegen konservierte Regionen in der $\text{ER}\alpha$ -Sequenzen konstruiert, die ein 690 bp ($\text{ER}\alpha_1$) und 980 bp ($\text{ER}\alpha_2$) großes Amplikon amplifizierten (siehe Tab.2.3).

Tab.2.3: Genutzte Primersequenzen zur Sequenzanalyse von Estrogen Rezeptor a ($\text{ER}\alpha$) vom ABFT, sowie deren T_A -Wert und Amplikonlänge (bp).

Ziel-Gen	Primer	Sequenz (5'-3')	T_A [$^\circ\text{C}$]	Amplikon Länge (bp)
$\text{ER}\alpha_1$	Sense	AGGAATCGGAGRAAGAG	52	690
	Antisense	GAGAAGGCACCRGAGTT		
$\text{ER}\alpha_2$	Sense	GCCCAGCAACMAATCAG	55	980
	Antisense	GGTGAGCGTCCARCATC		

Beide Primer-Paare wurden in einer Temperaturgradienten-PCR mit 2 unterschiedlichen MgCl_2 -Konzentrationen getestet. Die PCR wurde in einem Gesamtvolumen von 25 μl durchgeführt und mit

folgenden PCR Zyklen gefahren: 5 min bei 94 °C, 35 Zyklen bei 94 °C für 45 s, 52-57 °C für 45 s, und bei 72 °C für ebenfalls 45 s, gefolgt von einer finalen Inkubation bei 94°C für 5 min. Dabei wurden die Primer in einer finalen Konzentration von 200 nM, dNTP's 40 µM, MgCl₂ 1,5 mM oder 2,5 mM und Taq DNA Polymerase (EuroTaq) in 0,5 U eingesetzt. Hatten die Banden in dem darauffolgenden Agrosegel die erwartete Größe, wurden die Banden über einem UV-Tisch ausgeschnitten und deren beinhaltende DNA nach Herstellerangaben aufgereinigt (GE Healthcare Kit illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification).

2.13 Klonierung von ABFT Estrogen Rezeptor alpha

Das aufgereinigte cDNA Produkt wurde in einem Reaktionsgesamtvolumen von 11 µl in den Vektor (PGemTeasy, Promega) ligiert. Hierbei wurde abweichend vom Protokoll nur 15 ng Vektor mit 1,5 U DNA-Ligase (Promega) genutzt. Anschließend wurden kompetente E.coli Zellen (XL-1 Blue MRF' (Stratagene)) mit dem Vektor transformiert. Hierzu kamen 5 µl des Klonierungsproduktes in 100 µl kompetente Bakterienlösung. Nach 20minütiger Inkubation auf Eis, erfolgte eine 2 minütige Erwärmung bei 42 °C. Auf vorgewärmte Nährmedienplatten (LB Agar (Sigma), Ampicillin (50 µg/ml), IPTG (0,5 mM), X-Gal (50 µg/ml)) konnten dann die transformierten Bakterien ausplattiert werden. Nachdem die Platten über Nacht bei 37 °C lagerten, wurden sie zur besseren Farbentwicklung bei 4 °C gehalten. Positive Bakterienkolonien (weiß) konnten darauf in 96-well Platten (Greiner, U-Form) überführt werden. Die Kavitäten waren mit 75 µl ampicillinhaltigen LB-Medium gefüllt. Nach 4 stündiger Inkubation bei 37 °C wurden die Platten über Nacht bei 4°C gelagert. Um den Erfolg der Ligation zu überprüfen, wurden nach jeder Ligation eine Kolonie-PCR durchgeführt. Hierzu wurden spezifische Primer (SP6 & T7) verwendet, die das zuvor ligierte Stück amplifizieren. Am folgenden Tag kamen nach erfolgreicher Kolonie-PCR 10 µl des Bakterienmixes in 4 ml LB-Medium, welches 80 µg/ml Ampicillin enthielt, und wurden bei 30-37 °C in einem Inkubator (200-250 rpm) für 5 Stunden geschüttelt. Zur Extraktion der Plasmid-DNA (Minipräp) aus den kompetenten Bakterien kam die Methode der alkalischen Lyse zum Einsatz. Um den Erfolg der Plasmidtransformation mit dem gewünschten Fragment zu testen, konnte anschließend ein enzymatischer Verdau mit dem Restriktionsenzym EcoRI durchgeführt werden. Da die Klonierungszone des Vektors Erkennungssequenzen für dieses Enzym besitzt, kann das ligierte Fragment so ausgeschnitten werden.

Tab.2.4: Reagenzien für den enzymatischen Verdau der Plasmid-DNA aus der Plasmidextraktion.

	µl
pDNA (Minipräp)	1,5
OPA Puffer	2
EcoRI	0,5
steriles Wasser	6
finales Vol.	10

Nach 1,5 h Inkubation bei 37 °C konnte das DNA-Fragment mit der gewünschten Größe durch ein 1%-Agarosegel, (V= const 100 V, 25 Minuten) visualisiert werden.

2.14 DNA Sequenzierung und Sequenzvergleich

Hatten die nach Plasmidverdau erhaltenen Fragmente die erwartete Größe, wurde der Ansatz quantifiziert und in einer Konzentration von 10-15 ng/µl zur Sequenzierung (mit SP6 und T7 Primer je 10 µM) gegeben. Methodisch wurde dies gemäß der Sanger-Technik mit der "Cycle Sequencing"-Technologie unter Verwendung markierter "Dye-Terminatoren" (BigDyes und Rhodaminfarbstoffe) mit dem ABI Prism 3100/3130 XL umgesetzt (BMFZ, Uni Düsseldorf) angestellt. Es wurden so mehrere positive Klone ausgesucht und ausgewertet. Ihre DNA-Sequenzen wurden dann einem Alignment unterzogen (BioEdit, ClustalW). Es konnten so die jeweiligen Sequenzen ausgesucht werden, die zu 100 % übereinstimmten. Mit der so erhaltene Konsensussequenz für den Sense- und Antisensestrang wurde ein Homologievergleich (BLAST) durchgeführt. Nach positivem Vergleich wurde die Sequenz zur Generierung von spezifischen Primern gegen ER α genutzt. Die so neu aufgedeckte Sequenz von ER α wurde in die Genbank unter der Nummer JN036397.1 aufgenommen.

2.15 Phylogenetische Analyse

Die phylogenetische Analyse der in dieser Arbeit sequenzierten cDNA und aus ihr abgeleiteten Aminosäuresequenz für das Gene ER α von *Thunnus thynnus* wurde mit der Software MEGA v.5.0.5 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Tamura *et al.*, 2011) erstellt. Der Sequenzvergleich wurde durch die Software BioEdit v.7.0.9.0 mit darin implementiertem ClustalW v.1.4 erstellt. Es gibt eine große Anzahl von Methoden um phylogenetische Bäume aus molekularbiologischen Datensätzen zu erstellen. Dabei kann man zwischen Cluster-Methoden, Parsimony-Methoden und Likelihood-Methoden unterscheiden (Knopp & Müller, 2009). Alle diese Verfahren ergeben Stammbäume, die auf unterschiedlichen Voraussetzungen (Algorithmen) beruhen. Um die Verwandtschaftsbeziehung des ER α vom Roten Thun zu anderen barschartigen Fischen zu bestimmen, wurden in dieser Arbeit mehrere dieser Methoden getestet um eventuelle Unterschiede in den Baumstrukturen zu erkennen.

Zur Bestimmung des phylogenetischen Baumes wurde letztendlich die Maximum-Likelihood Methode gewählt. Diese Methode versucht den Stammbaum zu ermitteln, der unter einem gegebenen Modell (JTT-Modell) der Sequenzevolution die Wahrscheinlichkeit (*Likelihood*) der Daten (Alignment) maximiert. Anhand dieser konnte durch MEGA v.5.0.5 das beste Aminosäure-Substitutionsmodell berechnet werden. Es wurde das JTT-Modell nach Jones, Taylor und Thornton (Jones *et al.*, 1992) gewählt, dabei wurde die Verteilung der Substitutionsraten der Aminosäuren zwischen den Alignmentpositionen über eine Gamma-Verteilung mit 5 diskreten Kategorien modelliert (Modell: JTT +G; 5). Die Verlässlichkeit der Knotenpunkte im Stammbaum wurde anhand des Bootstrap-Verfahren (Efron, 1997) mit 1000 Wiederholungen evaluiert. Es werden aus dem Ausgangsdatsatz durch zufälliges Vertauschen, Entfernen und Verdoppeln von Sequenzen x-fach ähnliche Bootstrap-Datensätze erzeugt. Für jeden Datensatz wird unter Verwendung des gewählten Baumkonstruktionsalgo-

rithmus ein Baum erzeugt. Aus der Gesamtzahl der zufällig generierten Bäume kann dann nach dem Mehrheitsprinzip ein Konsensus-Baum ermittelt werden, der zu jedem Knotenpunkt innerhalb des Baumes eine prozentuale Häufigkeit angibt (Knopp & Müller, 2009).

2.16 Genexpressionsanalyse per Q-PCR

2.16.1 Primerdesign

Sämtliche in dieser Arbeit generierten Primer wurden mit der Software GeneFisher 2 (Universität Bielefeld, Giegerich *et al.*, 1996) erstellt. Das Primerdesign fand mit den folgenden Programmeinstellungen statt: Länge: 15-18 bp, GC-Gehalt: 45-65 %, T_m: 55-60 °C; 3'-clamp Parameter: 3'-Länge: 4 bp, 3'-GC-Gehalt 45-55 %, Primer-Ende: Adenin. Außer für die Primer T.t ER α , deren Sequenzinformation durch Eigenarbeit aufgeklärt wurde, wurden für die anderen Primer, die in dieser Arbeit Anwendung fanden, bereits bekannte Sequenzen genutzt. Mittels NCBI (Pubmed) und Uniprot.org-Suche konnten bereits veröffentlichte Sequenzen zur Analyse gesammelt werden. Anhand dieser konnten dann spezifische Primer für die entsprechenden Zielgene generiert werden. Tabelle 2.5 zeigt eine Übersicht über das genutzte Primersortiment.

Tab.2.5: Liste der in dieser Arbeit genutzten Primerpaare für die verschiedenen Fischarten, sowie deren Zielgen, Sequenz (5' - 3'), T_A-Wert und Amplikonlänge (bp).

Spezies	Ziel-Gen	Primer		Sequenz (5' - 3')	T _A [°C]	Amplikon Länge (bp)
<i>Thunnus thynnus</i> (T.t.)	Estrogen Rezeptor α	T.t. ER α	Sense	ACTGCCCTGGCAAACCTCA	58	316
			Antisense	GTCTCGACTGCTGCTGGA		
	Vitellogenin	T.t. Vtg	Sense	ACCAGCATCCCACCGCTA	59	203
Antisense			TCCGTTGGGTGTGCGGTA			
	rRNA (18S)	T.t. 18S	Sense	TCAAGAACGAAAGTCGGAGG	60	485
			Antisense	GGACATCTAAGGGCATCACA		
<i>Oreochromis niloticus</i> (O.n.)	Estrogen Rezeptor α	Q.n. ER α	Sense	GAACCGAGCAGCACGTGA	58	205
			Antisense	GGCAGCGTACAAGGCTGA		
	Estrogen Rezeptor β	O.n. ER β	Sense	CGGCAACCAATCAGTGCA	57	218
			Antisense	GAACCCTCAGCTGGTCCA		
Vitellogenin	O.n. Vtg	Sense	CACAGCCCTGGCTACTCA	58	228	
		Antisense	GCGTCCTCCCTGATCACA			
	rRNA (18S)	O.n. 18S	Sense	TCAAGAACGAAAGTCGGAGG	60	485
			Antisense	GGACATCTAAGGGCATCACA		
<i>Dicentrarchus labrax</i> (D.l.)	Estrogen Rezeptor α	D.l. ER α	Sense	CATCCATTGCCCCGGCAA	59	217
			Antisense	CTCCATTGTGCCGGTGCA		
		rRNA (18S)	D.l. 18S	Sense	TCAAGAACGAAAGTCGGAGG	60
			Antisense	GGACATCTAAGGGCATCACA		

Folgende, in der Gendatenbank hinterlegte, Sequenzinformationen wurden für die Erstellung der in Tabelle 2.5 aufgelisteten Primer genutzt: T.t. Vtg (GenBank: AM076794 und FJ743688.1), O.n. ER α (GenBank: U75604.1), O.n. ER β (GenBank: U75605), O.n. Vtg (GenBank: FJ709597.1) und D.l. ER α (GenBank: AJ505009.1).

Um sicherzustellen, dass die generierten Primer auch die gewünschten Genprodukte amplifizierten, wurden die nach PCR erhaltenen Banden der jeweiligen Primer ausgeschnitten und aufgereinigt (GE Healthcare Kit illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification). War die Bandenstärke nach Kontrolle der Aufreinigung per Agarosegel zu schwach, wurden die aufgereinigten PCR-Produkte erneut als Template in eine weitere PCR eingesetzt. So im ausreichenden Maß erhaltene Produkte wurden für die Sequenzierung vorbereitet.

2.16.2 Q-PCR: Methodik und Programmeinstellungen zur Datenanalyse

Für die Genexpressionsanalyse per Q-PCR wurde das System von Stratagene Mx3000P (Agilent Technologies) genutzt. Jede Probe wurde per Doppelbestimmung in einer Platte mit 96 Kavitäten (96 well Q-PCR plate, Stratagene) mit optischem Verschluss (Optical Cap, Stratagene) analysiert. Für jede zu bestimmende Probe wurde ein Master Mix an Template cDNA für 4 Reaktionen erstellt. So konnte man sicherstellen, dass in jedem Ansatz gleiche Mengen an cDNA eingesetzt wurden. Diese wurde dann für das Kontrollgen (18S-rRNA) und für das zu untersuchende Gen (T.t. ER α , T.t. Vtg, O.n. ER α , usw.) je in einer Doppelbestimmung eingesetzt. Jeder Reaktionsansatz (15 μ l) beinhaltete 1 μ l cDNA, 7,5 μ l 2x Brilliant II Fast SYBR® Green QPCR Master Mix (Cat # 600843, Stratagene) und 1,5 μ l des jeweiligen Vorwärts- und Rückwärts-Primers (final 100 mM). Zu Beginn musste die Taq-Polymerase durch eine 2minütige Inkubation bei 95 °C aktiviert werden, gefolgt von 40 Zyklen a' 95 °C für 5 Sekunden und 59 °C für 20 Sekunden. Für die Erstellung der Dissoziationskurve folgten 1 Minute bei 95 °C und eine kontinuierliche Temperaturerhöhung (0,2 °C/Sekunde) von 55-95 °C während dieser wurde jede 30 Sekunden der Fluoreszenzanstieg bestimmt. Um Kontaminationen von eingesetzten Reagenzien auszuschließen, wurden Negativkontrollen (NTC) von jedem in die Q-PCR eingesetzten Primer durchgeführt. Bestimmungen zur Intra- und Inter-Assay Variation ausgedrückt als CV % (Coefficient of variation) wurden ebenfalls zur Absicherung der Testergebnisse angestellt.

Nach der Datengenerierung durch das Q-PCR-System wurden folgenden Parameter (Fluoreszenz-Rohdaten, Basislinien- und Schwellenwertberechnung) auf ihre Genauigkeit untersucht. Als Basislinie wird derjenige Bereich definiert, dessen Fluoreszenzsignal zu Beginn nicht aufgrund der PCR-Amplifikation entsteht (lineare Komponente). Den zweiten Bereich (exponentielle Komponente) bildet der Teil, der durch Amplifikation des Produktes entsteht. Nach Festlegung dieses linearen Bereiches anhand seiner PCR- Zyklenzahl wird durch das Programm diese Hintergrundfluoreszenz von der restlichen abgezogen („baseline correction“). Als Schwellenwert-Zyklus (engl. threshold cycle; C_T) bezeichnet man in der Q-PCR denjenigen PCR-Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Ab hier findet ein exponentielles Wachstum statt, das quantifizierbar ist. Für die Umsetzung der Berechnung für Basislinie und Schwellenwert wurden die in der Software (MxPro-Mx3000P v.4.10, Build 389 Schema 85, Stratagene) als Grundeinstellung hinterlegten Programmeinstellungen genutzt (Adaptive Baseline, Amplification-based Threshold), welche nach Kontrolle immer zufriedenstellende und reproduzierbare Ergebnisse lieferten.

Zur Auswertung der Q-PCR Daten kam die effizienzkorrigierte, relative Quantifizierung mittels der $\Delta\Delta C_T$ -Methode zum Einsatz (Pfaffl, 2002). Hierbei wird die Expression des zu untersuchenden Genes mit der eines nicht reguliertem Kontrollgenes (HKG: Housekeeping Gen) normalisiert. Es kommt nicht wie bei der absoluten Quantifizierung zur Bestimmung der Startkopienzahl oder –konzentration mittels einer Standardkurve. Hier wird die Expression des Zielgens (z.B. ER α) auf ein zweites, in allen Zellen ubiquitär vorkommendes und homogen exprimiertes Gen (18S-rRNA) bezogen. Im ersten Schritt wird der C_T -Wert des HKG von dem des Zielgens subtrahiert. Man erhält so den ΔC_T -Wert ($C_{T(\text{Zielgen})} - C_{T(\text{HKG})}$). Entweder man verwendet diese Werte nach Entlogarithmierung um Unterschiede zwischen einzelnen Proben deutlich zu machen oder man erstellt eine relative Ratio zwischen dem ΔC_T -Wert der behandelten Probe und dem ΔC_T -Wert einer Kontrollprobe ($2^{-\Delta\Delta C_T} = \Delta C_{T(\text{Behandlung})} - \Delta C_{T(\text{Kontrolle})}$).

Die Bestimmung der jeweiligen PCR-Effizienzen wurde anhand von zwei Methoden durchgeführt. Es wurde eine Standardkurve aus unterschiedlichen cDNA-Verdünnungsstufen (50 ng/ μ l bis 0,5 ng/ μ l) erstellt. Aus der logarithmischen Auftragung der cDNA Konzentration gegen den gemittelten C_T -Wert (Dreifachbestimmung je cDNA-Konzentration) konnte aus der Steigung der Geraden die Q-PCR Effizienz des jeweiligen Primer durch folgende Formel errechnet werden.

$$E = 10^{[-1/\text{Steigung}]}$$

Unter Einbezug der so ermittelten Effizienzen ergibt sich so die neue Formel zu Berechnungen der relativen Expressionsunterschiede (Pfaffl, 2002).

$$\text{Verhältnis} = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta C_{T(\text{Zielgen})}} (\text{Behandlung} - \text{Kontrolle})}{(E_{\text{HKG}})^{\Delta C_{T(\text{HKG})}} (\text{Behandlung} - \text{Kontrolle})}$$

Des Weiteren wurde zur Kontrolle obiger Bestimmung nach jedem PCR Lauf die Steigung aus den absoluten Fluoreszenzrohdaten (R) des Amplifikationsplots in der exponentiellen Phase der Reaktion für jedes Primerpaar exemplarisch bestimmt (Lineare Regression: Schefe *et al.* 2006).

2.16.3 Evaluierung des Kontrollgens, Primer-Effizienz und -Konzentration

Primer für β -Actin wurden anhand der in der Gendatenbank hinterlegten Sequenz (AB243676) wie zuvor unter 2.12.1 beschrieben, erstellt. Für das Gen der 18S-rRNA wurden die Primer, die in Tab.2.2 beschrieben wurden, übernommen. Um beide zu testen, wurden verschiedene Versuchsansätze gemacht. Es wurden beide Gene auf Unterschiede in ihren Expressionsmustern, die durch eine Hormoninduktion (Estradiol) hervorgerufen werden könnten, untersucht. Hierzu wurden äquivalente Mengen an Ausgangs-cDNA (50 ng/ μ l) von Kontrolltieren und Estradiol induzierte Tiere in die Q-PCR

eingesetzt. Eventuelle Expressionsunterschiede, die durch eine unterschiedliche cDNA Template Menge bedingt sein könnten, wurden ebenfalls untersucht. Hierzu wurden Verdünnungsreihen (50 ng/μl – 0,5 ng/μl) von bereits quantifizierten cDNA Proben gemacht, um diese dann als Template (Doppelbestimmung) einzusetzen. So erhaltene, gemittelte C_T -Werte der jeweiligen Primer (T.t. 18S/ T.t. ERα) wurden durch das Kontrollgen normalisiert um den Wert ΔC_T zu erhalten. Diese konnten dann in den verschiedenen Gruppen verglichen werden. Zu große Schwankungen der ΔC_T -Werte (bzw. ihrer entlogarithmierten Form) würden dabei auf ein nicht konstant exprimiertes Kontrollgen hindeuten.

Um die Spezifität der genutzten Primerpaare zu testen, wurden diese in einer Standard-PCR getestet. Für die Bildung des spezifischen Produktes in der PCR, welches über Agarosegelelektrophorese sichtbar gemacht wurde, kam folgendes PCR-Programm zum Einsatz: 5 min bei 94 °C, 35 Zyklen bei 94 °C für 30 s, 59 °C für 30 s, und bei 72 °C für ebenfalls 30 s, gefolgt von einer finalen Inkubation bei 94 °C für 5 min. Dabei wurden die Primer in einer finalen Konzentration von 400 nM, dNTP's 80 μM, MgCl₂ 1,5 mM und Taq DNA Polymerase (EuroTaq) in 1 U eingesetzt. PCR-Gesamtvolumen war 25 μl in dem 1 μl cDNA als Template eingesetzt wurde. Bildete das Primerpaar optisch nur ein Amplifikationsprodukt, konnte es für weitere Tests in die Q-PCR eingesetzt werden. Zudem wurden diese Banden, wie zuvor schon beschrieben unter UV-Licht ausgeschnitten und aufgereinigt. Eine anschließende Sequenzierung sollte die Spezifität der Primerpaare zusätzlich bestätigen (siehe Anhang). Außerdem wurde von jeder Q-PCR Reaktion eine Schmelzpunktanalyse standardmäßig im PCR-Programm eingestellt, wodurch die Bildung von Primer-Dimeren ausgeschlossen werden konnte.

Die Bestimmung der bestgeeignetsten Primerpaarkonzentrationen erfolgte in Kombination von 100 nM, 150 nM und 200 nM für die jeweiligen Primerpaare in einem Q-PCR Gesamtvolumen von 15 μl eingesetzt, wobei unter 2.16.2 beschriebenes Q-PCR Programm genutzt wurde.

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Primersysteme wurden nur genutzt, wenn alle oben beschriebenen Tests zufriedenstellend ausfielen.

2.17 Statistische Analyse

Die statistische Analyse der in dieser Arbeit gewonnenen Daten wurde mit den Softwarepaketen Origin 8.5 (Origin Lab Corporation, Northhampton USA) sowie Sigma Plot Version 10 und dem darin implementiertem Sigma Stat Version 3.5 (Systat Software, Inc., Chicago USA) durchgeführt. Normalerweise wird die statistische Datenanalyse von Genquantifizierungen auf der Basis von klassischen, standardisierten parametrischen Tests durchgeführt. Hierzu zählen der t-Test (bei Ein- oder Zweistichprobenproblemen) oder die Varianzanalyse bzw. ANOVA mittels des f-Tests (bei mehreren unabhängigen Stichproben). Die beiden letztgenannten parametrischen Testverfahren basieren alle auf der Annahme, dass die Daten einer Normalverteilung folgen (und benötigen sogar zusätzlich noch die Voraussetzung identischer Varianzen in den Gruppen). In der absoluten und relativen Quantifizierung von Q-PCR Daten ist dies allerdings unklar, da hier die Ergebnisse eher auf Verhältnissen beruhen (Pfaffl, 2004). Deshalb sollte bei Unklarheit nichtparametrische Tests, wie z.B. der Mann-Whitney-

bzw. Wilcoxon-Rangsummentest (bei einer oder zwei unabhängigen Gruppen) sowie der Kruskal-Wallis-Rangsummentest (bei mehreren unabhängigen Stichproben) angewandt werden (Scheffe *et al.*, 2006). Diese Tests stellen außer der Varianzhomogenität keine zusätzlichen Annahmen an die Verteilung der Daten.

Vor der statistischen Analyse der Q-PCR Daten wurden die Rohdaten (C_T -Werte) logarithmisch transformiert, um die Streuung zu stabilisieren, und so die erforderliche Varianzhomogenität besser zu erreichen.

Bevor die Daten mittels einem der oben genannten Testverfahren analysiert wurden, wurde zunächst überprüft, ob diese einer Normalverteilung folgen und eventuell Varianzunterschiede vorhanden sind. Zum Testen auf Normalverteilung wurde der Shapiro-Wilk-Test verwendet und die Varianzhomogenität wurde mittels des Levene-Tests durchgeführt. Bei allen Tests wurde das Fehlerniveau auf 5 % gesetzt, so dass die jeweiligen Nullhypothesen signifikant verworfen werden konnten, falls der p-Wert kleiner oder gleich 0,05 war.

Wurden die Modellannahmen der klassischen ANOVA erfüllt, so kam diese auch zum Einsatz, um zunächst die Nullhypothese identischer Erwartungswerte in den Gruppen zu testen. Falls die Nullhypothese signifikant verworfen werden konnte, wurden die Gruppen zusätzlich noch paarweise verglichen. Hierfür wurde der Holm-Sidak-Test mit adjustiertem p-Wert verwendet, um eine Kumulation der Fehlerwahrscheinlichkeiten in diesem Fall zu verhindern.

Waren die Voraussetzung der klassischen ANOVA nicht erfüllt, so wurde ein nichtparametrisches Testverfahren verwendet. Es wurde zunächst die Nullhypothese identischer Erwartungswerte in den einzelnen Gruppen mit einer sog. ANOVA on Ranks mittels Kruskal-Wallis-Test überprüft. Konnte diese signifikant abgelehnt werden, so kam für die paarweisen Vergleiche der Gruppen der Dunn Test mit adjustiertem p-Wert zum Einsatz.

3 Ergebnisse

3.1 Klonierung von ABFT Estrogen Rezeptor alpha

Mittels degenerierter Primerpaare, die nach Alignmentanalysen von ER α unterschiedlicher peripherer Fischarten generiert wurden (siehe 2.12), konnten nach einer Gradienten-PCR und anschließender Gelelektrophorese zwei Fragmente mit erwarteter Produktgröße (690 bp und 980 bp) aus dem Lebergewebe geschlechtsreifer, weiblicher Thunfische amplifiziert (Abb.3.1), aufgereinigt und für die weiteren Klonierungsschritte verwendet werden.

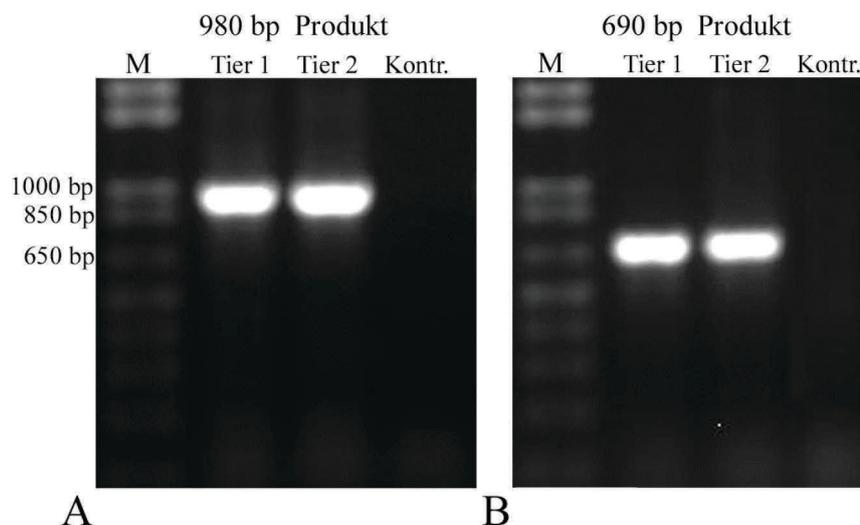


Abb.3.1: Agarosegelelektrophorese (1,5 %) von PCR Produkten A) 690 bp Fragment und B) 980 bp Fragment, die durch die beiden degenerierten Primerpaare für ER α aus Proben der Leber von zwei Versuchstieren (Tier 1 & Tier 2) amplifiziert wurden. Proben wurden in einem Volumen von 11 μ l aufgetragen. Für die negative Kontrolle (Kontr.) wurde in der PCR als Template H₂O anstatt cDNA eingesetzt. M= Molekulargewichtsmarker.

Nach erfolgreicher Ligation der Produkte in einen Klonierungsvektor (PGemTeasy, Promega) und dessen Transformation in kompetente E.coli Bakterienzellen (Abb.3.2), konnten aus diesen nach Antibiotikaselektion positive Klone (blau-weiß Selektion) geerntet werden. Wurde das Fragment nicht erfolgreich in das Plasmid ligiert, erschien auf dem Testgel eine Bande bei ca. 140 bp, die der Multiple-Cloning-Site (MCS) des Vektors entsprach, die durch die Primer Sp6 & T7 amplifiziert wurde. War die Ligation erfolgreich, so wurde dies anhand einer größeren Bande bei 830 bp bzw. 1120 bp bewiesen (MCS + Fragment; Abb.3.2 A). Nachdem die Plasmid-DNA durch alkalische Lyse aus den Bakterienzellen isoliert und aufgereinigt worden war (Abb.3.2 B), konnte durch nachfolgende zweiseitige Sequenzierung von mehreren dieser Klonen ein ideales Fragment mittels Alignmentanalyse bestimmt werden. Die Teilsequenz der Klone des 690 bp Fragments war zu 100 % mit denen des 980 bp Fragments identisch. Durch den Sequenzvergleich mit bereits bekannten Sequenzen von ER α anderer Fischarten wurde eine starke Homologie (≥ 88 %) der Klone zu diesen festgestellt. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass es sich bei den Anfangs amplifizierten DNA-Fragmenten eindeutig um zumindest einen Teil der Sequenzinformation des Gens handelte, welches spezifisch für das Protein von

ER α im Thunfisch codiert. Ein Alignment mit bereits bekannten und vollständig entschlüsselten Sequenzeninformationen des ER α von barschartigen Fischen ergab, dass obige Primer die DNA- und Ligandenbindungsdomäne der Estrogen Rezeptoren flankieren. Diese Regionen stellt innerhalb der ER einen hoch konservierten Bereich dar (Abb.3.3).

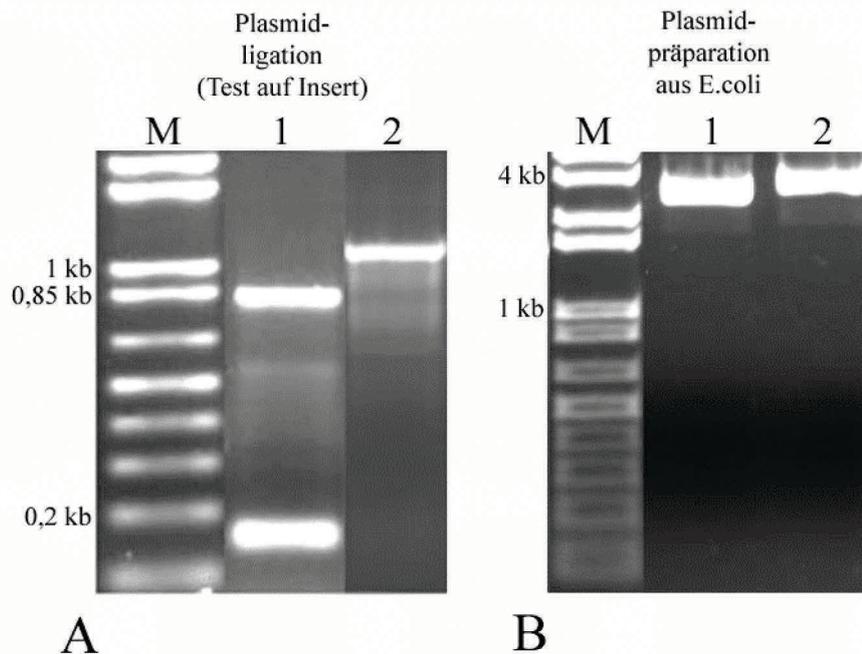


Abb.3.2: Agarosegelelektrophorese (1,5 %) zum Test der **A)** Plasmid-Ligation (Insert plus Multiple-Cloning-Site ca. 140 bp des Vektors, sowie MCS ohne Insert) und **B)** Kontrolle der Transformation von kompetenten *E.coli* Bakterien (Vektor 3015 bp plus Insert). Bande 1 = 690 bp Produkt; Bande 2 = 960 bp Produkt. M = Molekulargewichtsmarker.

3.2 Molekulare Charakterisierung und phylogenetische Analyse von ER α aus *Thunnus thynnus*

Eine Multisequenzanalyse und ein Abgleich mit der CDD-Datenbank (Conserved Domain Database; Marchler-Bauer *et al.*, 2011), der in dieser Arbeit aufgedeckten Teilsequenz des ER α mit anderen ER α von Teleostern, offenbarte, in Form seiner abgeleiteten Aminosäuresequenz, mehrere konservierte Regionen, die innerhalb der Klasse der Nuklearen Rezeptoren weit verbreitet anzutreffen sind. Diese Rezeptorklasse besteht generell aus fünf selbständigen, aber trotzdem interagierenden Domänen. Abbildung 3.3 gibt diese Domänenstruktur und die Position der partiell entschlüsselten Sequenz (326 AS lagen) von ER α aus *Thunnus thynnus*, schematisch wieder.

Es konnten verschiedene konservierte Regionen bzw. Aminosäuren von zwei Hauptdomänen des Proteins identifiziert werden (Abb.3.4). Charakteristisch für die DNA-Bindungsdomäne aller ER, ist das zweifach vorkommende hochkonservierte Zinkfinger motive, welches insgesamt aus je vier Cysteinresten besteht, die das zentrale Zinkatom koordinativ binden (Nilsson *et al.*, 2001). Die in dieser Arbeit partiell entschlüsselte Sequenz des Thunfisches hat das zweite dieser Motive (vier Cysteinreste) aufgewiesen. Vor diesem liegt das als D(istale)-Box bezeichnete Motive (PATNQ), von dem ange-

nommen wird, dass es an der Protein-Protein-Wechselwirkung während der Rezeptordimerisation beteiligt ist (Kaspar *et al.*, 1993). Die sich durch ihre variable Struktur klar von den anderen abgrenzende D-Domäne (hinge-Region) stellt ein Bindeglied zwischen der DBD und LBD dar und ist ebenfalls deutlich erkennbar. Weitere konservierte Motive die innerhalb der LBD liegen, konnten ebenfalls nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich u.a. um die [D/K]LXXEM - Region, welche innerhalb der LBD als AF-2 Motiv (als Helix 12) essentiell für die Koregulatorerkennung ist, und die konservierten bindungstaschenformenden Aminosäuren. Zudem sind noch Erkennungssequenzen der Protein-Kinase A & C aufgedeckt worden, die entweder in allen hier verglichenen Sequenzen von ER α konserviert vorgelegen haben oder aber nur vereinzelt u.a. auch in *Thunnus thynnus* aufgetreten sind.

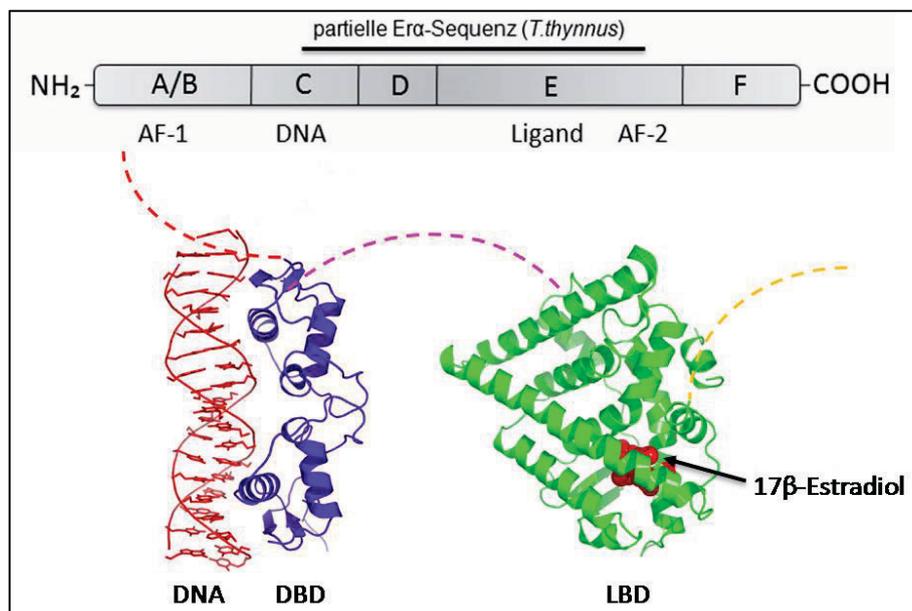


Abb.3.3: Schematische Domänenstruktur nuklearer Rezeptoren am Beispiel von ER α , einem Mitglied der Steroid-/Thyroidhormon-Superfamilie und die Lage des in dieser Arbeit partiell entschlüsselten Teils von ER α aus *Thunnus thynnus*. Die A/B-Domäne am N-terminus beinhaltet die AF-1 (Aktivierungs-Funktion) deren Bindungsstellen mit Transkriptionsfaktoren interagieren. Die C-Domäne (DBD) zeigt typische Zink-Finger Motive, die für die Bindung an die Estrogen responsiven Elemente (ERE) der DNA verantwortlich sind. Ein Zwischenstück, welche die C- und E-Domäne verbindet, stellt die variable D-Domäne dar. Am C-terminalen Ende liegen die E/F-Domänen (LBD), welche eine Ligandenbindungstasche formen und die AF-2 beinhalten, welche Bindungseigenschaften für Koaktivator- & Korepressorpeptid besitzt. Die E-Domäne ist in der Anwesenheit des Liganden in der Lage die Gentranskription zu aktivieren. Zusätzlich ist die strukturelle Organisation eines ER in einem 3D-Modell abgebildet (Hoffmeier, 2007), hierbei liegt der Fokus auf DNA-Bingundsdomäne (DBD) und Liganden-Bindungsdomäne (LBD) des Rezeptors. Die restlichen Domänen (A/B-, D- und F-Domäne) sind durch gestrichelte Linien angedeutet.

Die abgeleitete Aminosäuresequenz des ER α von *Thunnus thynnus* zeigt so eindeutige Charakteristika in ihrer Struktur, welche auch in der Ordnung Barschartiger (Perciformes) Fische vorzufinden ist. Da es in der Literatur keine weiteren Informationen für weitere ER α von Makrelenartigen (Scombroidei) Fischen gibt, stellt der Thunfisch den einzigen Vertreter seiner Ordnung in den Sequenzhomologieanalysen dar. Die höchste Sequenzhomologie des ABFT ER α von 87 % - 88 % hat sich zur

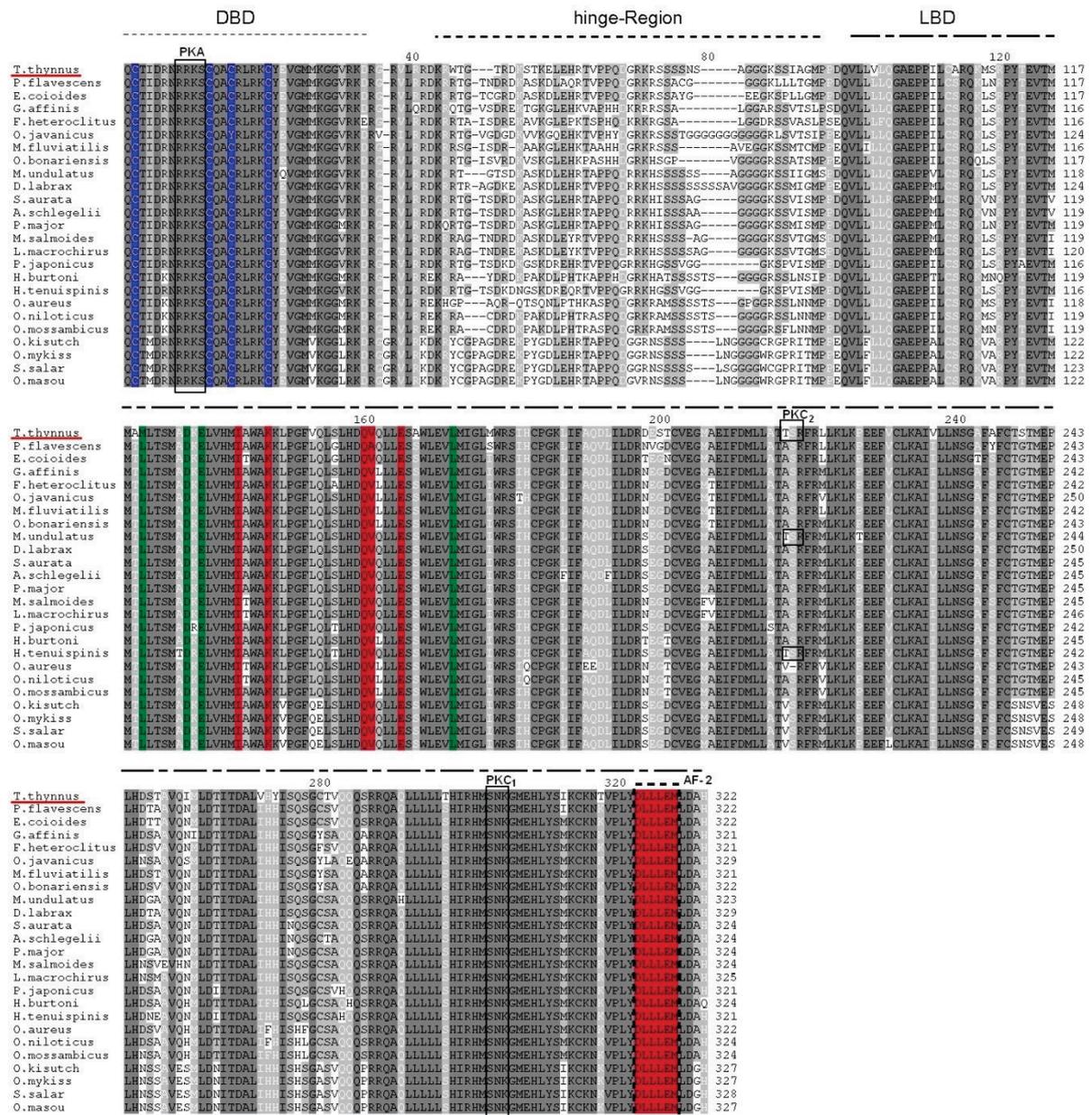


Abb.3.4: Alignment der abgeleiteten Aminosäuresequenz des Estrogen Rezeptor α (ER α) von *Thunnus thynnus* mit weiteren bekannten Sequenzen von anderen Fischen. Konservierte Regionen der Sequenzen werden farblich durch unterschiedliche Graustufen dargestellt, wobei Dunkelgrau für eine 100 %ige Übereinstimmung steht. Die verschiedenen Domänen des Proteins (DBD, hinge-Region und LBD) sind über den Sequenzen dargestellt. Konservierte Aminosäuren innerhalb der Domänen sind farblich hervorgehoben. blau: Cysteine des Zinkfingermotivs der DNA-Bindungsdomäne, grün: Koregulator regulierende Motive, rot: Aminosäuren die Bindungstasche formen, sowie die konservierte [D/K]LXXEM -Region, welche als AF-2 Motiv essentiell für die Koregulatorerkennung und -rekrutierung ist (rot mit gestrichelter Linie umrandet) und Erkennungssequenzen der Protein-Kinase A & C (PKA & PKC; schwarz durchgehend umrandet). Die GenBank-ID der verwendeten Sequenzen für ER α sind wie folgt: *Micropogonias undulatus*: P57753; *Epinephelus coioides*: D9ZA69; *Sparus aurata*: Q9PVZ9; *Dicentrarchus labrax*: Q6A4C2; *Acanthopagrus schlegelii*: Q804Q6; *Pagrus major*: O42132; *Micropeterus salmoides*: Q9DDZ4; *Perca flavescens*: A8NA74; *Lepomis macrochirus*: A9XE65; *Halichoeres tenuispinis*: Q7T2K8; *Pseudolabrus japonicus*: Q2V570; *Oreochromis mossambicus*: Q17UB5; *Oreochromis niloticus*: Q9YH33; *Oreochromis aureus*: P50240; *Melanotaenia fluviatilis*: D6N7U3; *Haplochromis burtoni*: Q6TGB3; *Odontesthes bonariensis*: A9YRP5; *Gambusia affinis*: A7VKK1; *Fundulus heteroclitus*: Q7SZI0; *Oryzias latipes*: P50241; *Oryzias javanicus*: Q5D1Z0; *Oncorhynchus kisutch*: Q0H3B5; *Oncorhynchus mykiss*: P16058; *Salmo salar*: Q4ZHP9; *Oncorhynchus masou*: Q5YFR8; *Thunnus thynnus*: JN036397.1.

Unterordnung der Echten Barsche (Percoidei) ergeben, wie dem Orangegefleckten Zackenbarsch (*Epinephelus coioides*) oder dem Amerikanischen Flussbarsch (*Perca flavescens*). Geringere Sequenzidentitäten zwischen 81 % und 85 % haben die Vertreter der Unterordnung Buntbarsche (Cichlidae, u.a. *Oreochromis niloticus*) und die Gruppe der Ährenfischverwandten (Atherinomorpha, u.a. *Oryzias javanicus*) gezeigt. Lachsartige Fische (Salmoniformes) wiesen, bis auf die als Außengruppe gewählten Vertreter der Aves und Hominidae (59 %), mit 79 % den höchsten Sequenzunterschied auf.

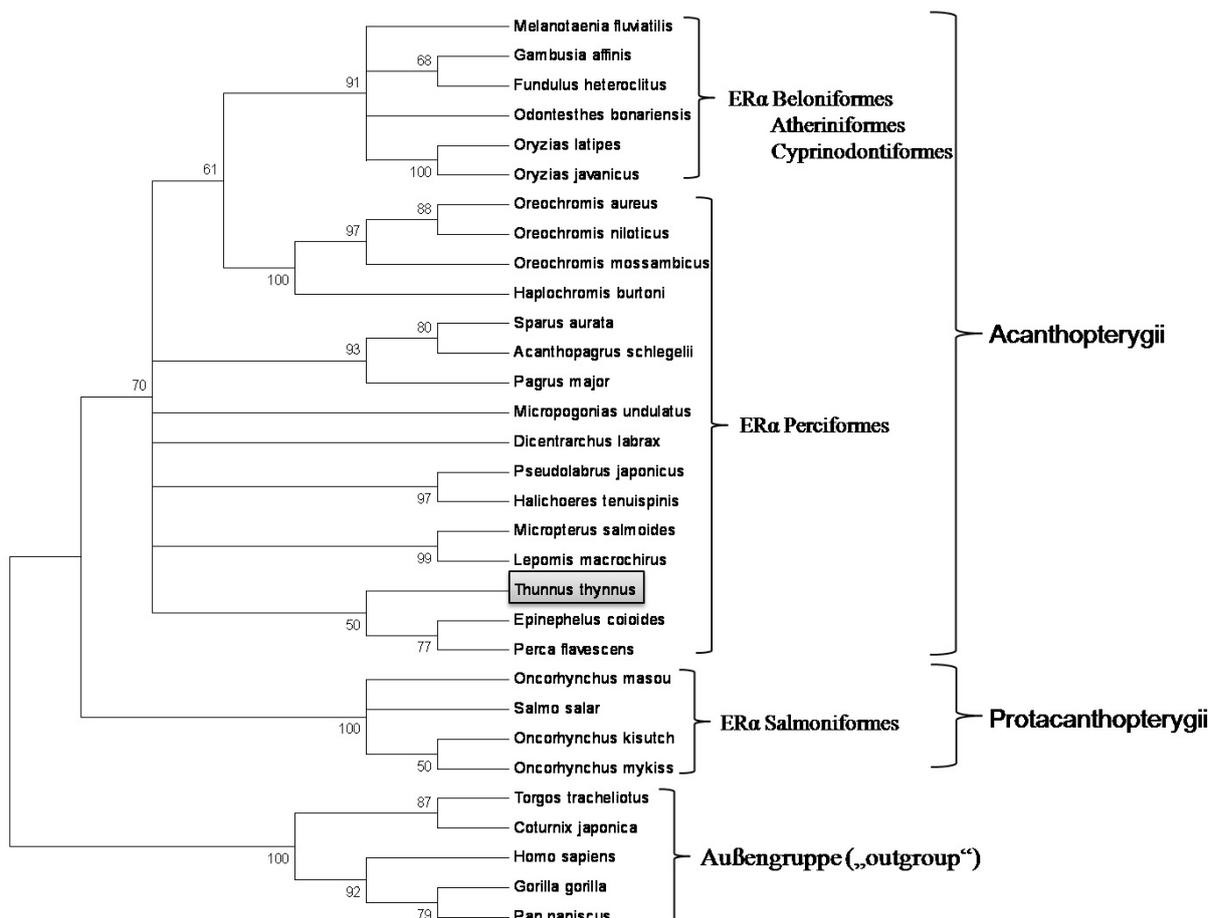


Abb.3.5: Phylogenetischer Baum basierend auf einem Alignment von der abgeleiteten Aminosäuresequenz des Estrogen Rezeptor α (ER α) von *Thunnus thynnus* mit weiteren bekannten Sequenzen von anderen Teleosteen. Für die Bewurzelung des Baumes wurden bekannte Sequenzen für ER α von Mensch, Affe und Vogel als Außengruppe („outgroup“) verwendet. Die Zahlenwerte an jedem Ast geben die prozentuale, statistische Häufigkeit des Auftretens dieser Knotenpunkte, die durch den Bootstrap-Test (Felsenstein, 1985) mit 1000 Replikaten erstellt wurde, wieder. Knotenpunkte, die mit geringerer Häufigkeit als 50 % auftraten, wurden entfernt. Der dargestellte Baum wurde mittels der Maximum-Likelihood-Methode und dem Aminosäure-Substitutionsmodell nach Jones, Taylor und Thornton (JTT-Modell; Jones *et al.*, 1992) generiert. Dabei wurde die Verteilung der Substitutionsraten der Aminosäuren zwischen den Alignmentpositionen über eine Gamma-Verteilung mit 5 diskreten Kategorien modelliert. Die phylogenetische Analyse wurde mit dem Programm MEGA v.5.0.5 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Tamura *et al.*, 2011) durchgeführt. Die Skalierung des Baumes, also die Länge seiner Äste, gibt die Anzahl der Substitutionen pro Sequenzposition wieder. GenBank-ID der verwendeten Sequenzen für ER α siehe Abbildung 3.4. Zusätzlich wurden folgende Sequenzen genutzt: *Coturnix japonica*: AF434713; *Torgos tracheliotus*: AB447537; *Gorilla gorilla*: EU213015; *Pan paniscus*: EU213014; *Homo sapiens*: Q14268.

Zudem wurde eine phylogenetische Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz des Thunfisch ER α anhand der Maximum-Likelihood-Methode und dem Aminosäuresubstitutions-Modell nach Jones, Tylor und Thornton (JTT-Modell; Jones *et al.*, 1992) durchgeführt. Diese Methode versucht den Stammbaum zu ermitteln, der unter einem gegebenen Modell der Sequenzevolution (hier JTT-Modell) die Wahrscheinlichkeit der Daten (Alignment) maximiert. Um evtl. Unterschiede zwischen den verschiedenen möglichen Methoden der phylogenetischen Analyse (Neighbor Joining, Minimum Evolution Matrix etc.) aufzuzeigen, wurde die Analyse mit genannten Methoden zusätzlich durchgeführt. Hierbei ergaben sich aber keine Abweichungen in der Einordnung des Thunfisch ER α zu unten abgebildetem Baum (Daten nicht gezeigt). Die Verlässlichkeit der Knotenpunkte im Stammbaum wurde anhand des Bootstrap-Verfahren (Efron, 1979) mit 1000 Wiederholungen evaluiert. Knotenpunkte, die dabei mit einer geringeren Häufigkeit als 50 % auftraten, wurden im Baum entfernt. Abbildung 3.5 zeigt den so generierten phylogenetischen Baum. Die im Sequenzvergleich der verschiedenen ER α gewonnenen Einblicke, konnte hierdurch zusätzlich bestätigt werden.

3.3 Evaluierung der Meßsysteme

3.3.1 Genexpressionsanalyse per Q-PCR

Zur Auswertung der Q-PCR Daten, die mittels SYBR Green Färbung generiert wurden, kam die effizienzkorrigierte, relative Quantifizierung mittels der ΔC_T -Methode (bzw. $\Delta\Delta C_T$) zum Einsatz (Pfaffl 2002). Hierbei kommt es nicht wie bei der absoluten Quantifizierung zur Bestimmung der Startkopienzahl oder –konzentration mittels Standardkurve. Die Expression des Zielgens (z.B. ER α) wird auf ein zweites, in allen Zellen ubiquitär vorkommendes und homogen exprimiertes Kontrollgen (HKG: Housekeeping Gen; hier 18S-rRNA) bezogen. Es findet also eine Normalisierung statt, deren Ergebnis ein Verhältnis von Zielgen zu HKG darstellt. Um diese Quantifizierungsmethode bedenkenlos nutzen zu können und damit ihre Ergebnisse reproduzierbar sowie nicht verfälscht sind, müssen vorher einige Einflussfaktoren ausgetestet bzw. bestimmt werden.

3.3.1.1 RNA & cDNA Qualität

Die Qualität der RNA wurde durch photometrische Messungen anhand der Ratio des Absorptionswertes bei 260 und 280 nm (A_{260}/A_{280}) für jede hergestellte RNA Probe bestimmt. Werte zwischen 1,8 und 2,1 wurden dabei als zufriedenstellend angesehen (Pfaffl, 2004). RNA Proben, die diesen Test nicht bestanden, wurden erneut aus Leber- oder Gonadenproben aufgereinigt. Desweiteren wurden die so verifizierten RNA Proben in einer Gelelektrophorese weitergetestet, um zu starke RNA Degradation auszuschließen und um das Vorhandensein intakter ribosomaler Banden von der 18S & 28S Untereinheit zu zeigen. Waren alle Test zufriedenstellend wurden die RNA-Proben für die cDNA-Synthese eingesetzt. Durch eine 18s-Kontroll-PCR konnte daraufhin die Qualität der cDNA getestet werden. In Abbildung 3.6 ist das Ergebnis einer RNA Aufreinigung und nachfolgende cDNA-Synthese dieser RNA von drei Leberproben exemplarisch dargestellt. Wie zu erkennen ist, kam es teilweise zu

einer geringeren, mangelhaften Ausbeute an Gesamt-RNA. Slot 3 zeigt im Verhältnis zu den beiden Banden der 18S- & 28S- rRNA in Slot 1 und 2 sehr starke Degradationserscheinungen der RNA. Die nachfolgende 18S-Kontroll-PCR der cDNA dieser Proben, zeigte für alle klar definierte Banden bei ca. 485 bp, wobei Slot 3 eine mindere Intensität hatte. Da eine möglichst genaue Genexpressionsanalyse aus Gesamt-RNA aber darauf angewiesen ist, dass die zum Zeitpunkt der Probennahme in dem Gewebe enthaltenen mRNA auch vollständig in cDNA umgeschrieben werden kann, wurde nur mit solchen Proben weitergearbeitet, die wie Slot 1 und 2 in Abbildung 3.6, keine bzw. gering Degradationsprodukte aufwiesen.

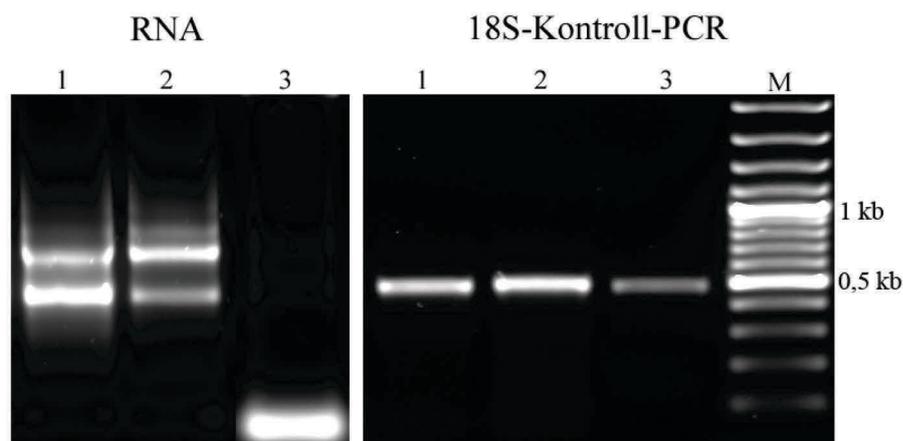


Abb.3.6: Gelelektrophorese von aufgereinigter RNA (Tri-Reagent, Sigma) aus Leberproben (**links**) und 18S-Kontroll-PCR dieser Proben nach cDNA-Synthese (**rechts**). Exemplarisch ist die Auswertung von 3 verschiedenen Proben (Slot 1- 3) abgebildet. M= Molekulargewichtsmarker (100 bp Plus DNA-Ladder, Fermentas).

3.3.1.2 Primerspezifität

Primerpaare, die in der Q-PCR genutzt werden sollen, müssen etlichen zusätzlichen Anforderungen gerecht werden, die weit über die generellen anerkannten Primergenerierungsregeln hinausgehen: 1) Die Länge der Primer sollte zwischen 100-300 bp liegen. 2) Der T_m -Wert sollte keine zu starke Differenz zwischen beiden Primerpaaren aufweisen und sollte je nach genutztem Q-PCR Master Mix auf diese abgestimmt sein. 3) Die Primerkonzentration sollte so gering wie möglich sein und zwischen 50 und 400 nM liegen. 4) Es darf nur ein spezifisches Produkt in der Q-PCR entstehen. 5) Die Effizienz der genutzten Primerpaare sollte Werte zwischen 1,8 und 2,1 annehmen.

Die Spezifität der in dieser Arbeit generierten Primerpaare (siehe 2.5), wurde zuerst anhand einer normalen PCR (Abb.3.7) getestet. Nur Primer die in der Gelelektrophorese eine klare Bande mit erwarteter Größe aufwiesen wurden weiteren Tests unterzogen. Primer für ER α wurden zusätzlich in einer PCR mit dem zuvor für die Klonierung ligierten Plasmidvektoren als Template getestet. Auch hier ergab die nachfolgende Gelelektrophorese nur eine Bande mit erwarteter Größe (Daten nicht gezeigt). Die nachfolgende Sequenzierung der PCR Produkte ergab nach einer vergleichenden Sequenzanalyse (BLAST) eine 100 %ige Übereinstimmung mit Sequenzen der jeweiligen Gene in den jeweiligen Fischarten (siehe Anhang).

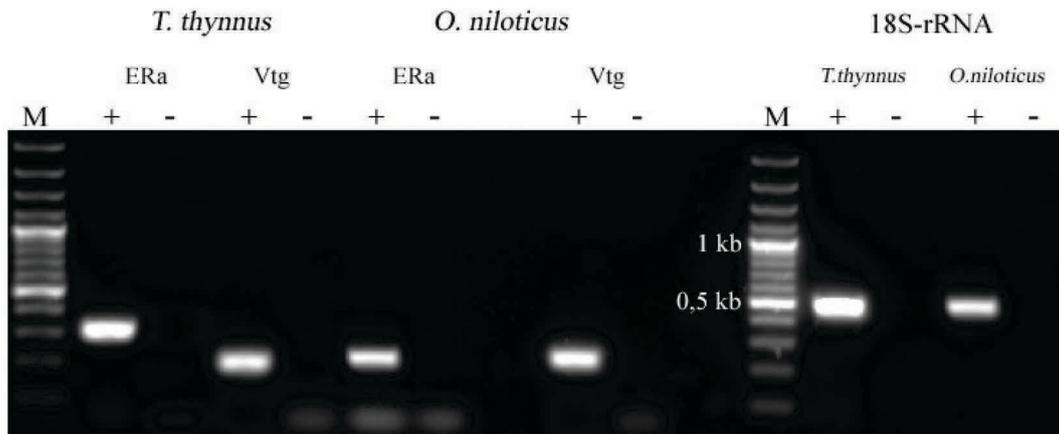


Abb.3.7: Spezifitätstest von den in dieser Arbeit genutzten Primerpaaren (ER α , Vtg und 18S-rRNA) für Thunfisch (*Thunnus thynnus*) und Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Mittels Agarosegelelektrophorese wurden je eine positiv (+) & negative (-) Kontrolle für jedes Primerpaar getestet. Banden der positiven Kontrollen wurden später ausgeschnitten, aufgereinigt und für eine Sequenzierung vorbereitet. M= Molekulargewichtsmarker (100 bp Plus DNA-Ladder, Fermentas).

Die Verunreinigung der RNA mit genomischer DNA (gDNA) ist eine weitere Fehlerquelle die ausgeschlossen werden musste. Hierzu wurden sporadisch Polymerasekettenreaktionen mit RNA als Template, die zuvor einem DNase Verdau unterzogen wurde, durchgeführt. Es kam nie zu Amplifikationsprodukten durch die jeweiligen Primer. Eine weitere Möglichkeit diese Fehlerquelle auszuschließen, ist die Generierung von spezifischen Primern, deren Erkennungssequenz über Exon-Exon Grenzen reicht und die somit nicht an gDNA binden können. Wie es am Beispiel der Primerpaare für *Thunnus thynnus* in Abbildung 3.8 dargestellt ist, konnte hierdurch ein Primer (ER α I) identifiziert werden, der mit gDNA als Template ebenfalls spezifische Produkte amplifizierte. Ein daraufhin neu synthetisierter Primer für ER α (ER α II) zeigte diese Eigenschaft nicht mehr.

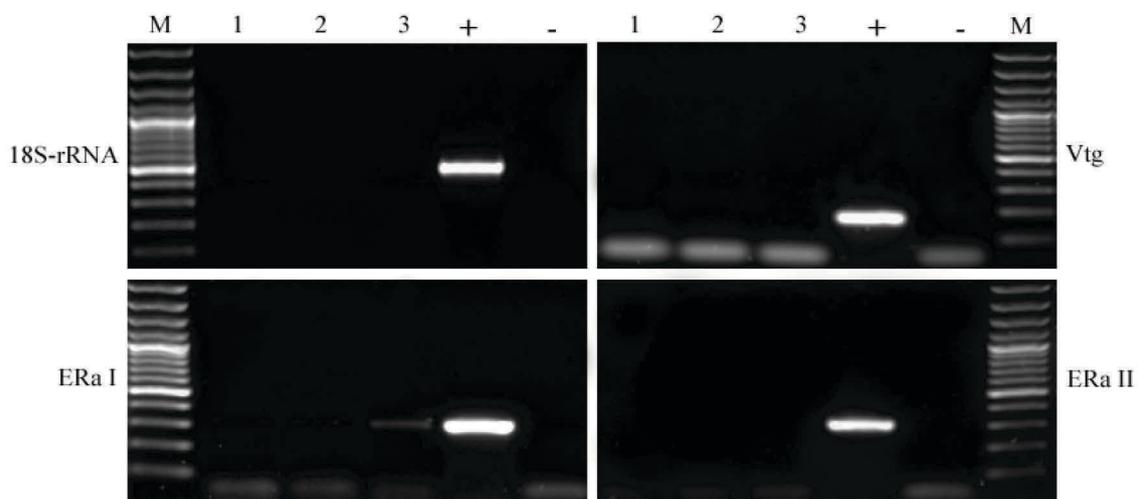


Abb.3.8: Test der Primerpaare (ER α I & II, Vtg und 18S-rRNA) für *Thunnus thynnus* auf Kreuzreaktionen mit genomischer DNA. Es wurden je 3 DNA-Proben von adulten weiblichen Thunfischen (1-3), eine positiv (+) Kontrolle (cDNA) und eine negativ (-) Kontrolle (H₂O) eingesetzt. M= Molekulargewichtsmarker (100 bp Plus DNA-Ladder, Fermentas).

3.3.1.3 Schmelzpunktanalyse

Nächster Schritt in der Evaluierungsphase lag im Einsetzen der Primer in die Q-PCR (siehe 2.16.2). Da sich der Farbstoff SYBR-Green sequenzunspezifisch in alle amplifizierte dsDNA, also auch Primer-Dimere und unspezifisch gebildete PCR Produkte, einlagert, muss dies anhand einer Schmelzkurvenanalyse ausgeschlossen werden. Hierbei wird nach den eigentlichen PCR-Zyklen durch stetiges Erhitzen (0,2 °C/Sekunde) von 55 °C bis 95 °C die dsDNA Struktur denaturiert. Durch Freisetzung des in die dsDNA interkalierten Farbstoffes kommt es zu einer Verringerung der Fluoreszenz. Zeigt die spätere graphische Auftragung des Fluoreszenzanstiegs (-R') gegen die Temperatur nur einen Wendepunkt bzw. Maximum, so kann von nur einem spezifisch generierten Produkt ausgegangen werden. Abbildung 3.9 gibt eine beispielhafte Auswertung wieder. Während Primerpaar 1, wie erwünscht nur ein Maximum zeigte, wies Primerpaar 2 mehrere Maxima auf. Dies deutete auf mehrere amplifizierte Produkte hin, was die nachfolgende Agarosegelelektrophorese auch bewies. Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Primersysteme wurden nur genutzt, wenn die Schmelzpunktanalyse ein zufriedenstellendes Ergebnis (nur ein Peak) lieferte. Zudem wurden sämtliche Einzelreaktionen nach jedem Q-PCR Lauf kontrolliert, traten hierbei Doppelpeaks auf, wurden diese Läufe wiederholt bzw. zur Auswertung ausgeschlossen.

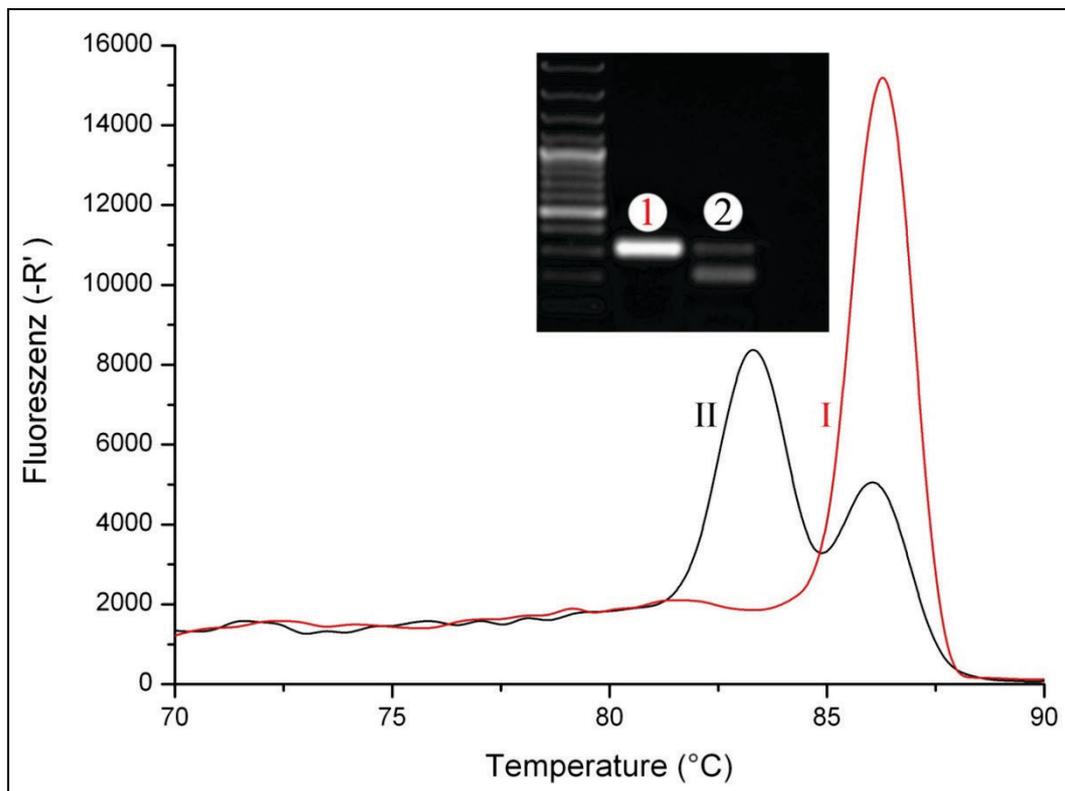


Abb.3.9: Schmelzpunktanalyse anhand der ersten negativen Ableitung der Rohfluoreszenzdaten (-R') aufgetragen gegen die Temperaturzunahme in °C sowie die dazu korrespondierenden Banden aus einer Agarosegelelektrophorese (siehe Gelbild im Diagramm).

3.3.1.4 Primerkonzentration

Um von vorne herein die Bildung unspezifischer Produkte und Primer-Dimeren auszuschließen und um die Sensitivität des Testes zu maximieren, spielt die Primerkonzentration eine entscheidende Rolle. Es ist die Konzentration am geeignetsten, die einen möglichst niedrigen C_T -Wert und ein ausreichendes Fluoreszenzsignal liefert, ohne die PCR-Effizienz zu beeinflussen. Zur experimentellen Umsetzung des oben beschriebenen, wurden die jeweiligen Primerpaare in Konzentrationen von 100 nM, 150 nM und 200 nM getestet. Wie aus Abbildung 3.10 hervorgeht, waren die niedrigsten C_T -Werte mit dem Einsatz der höchsten Primerkonzentration gewährleistet. Um der Bildung von Primer-Dimeren vorzubeugen wurde aber letztendlich die Konzentrationen gewählt, die einer möglichst niedrigen Primerkonzentration entsprachen, aber dennoch niedrige C_T -Werte ergaben. Dies war für die Kombination von 100 nM vorwärts und 150 nM rückwärts Primer für alle getesteten Primerpaare für Thunfisch und Tilapia der Fall. Außerdem wies diese gewählte Kombination des Vorwärts- und Rückwärtsprimers im Amplifikations-Plot, wie in Abb.3.10 D zu sehen, keinen Unterschied zu stärker konzentrierten Primerkombinationen (200/200 oder 150/150) auf, was auch einen Grund darstellte

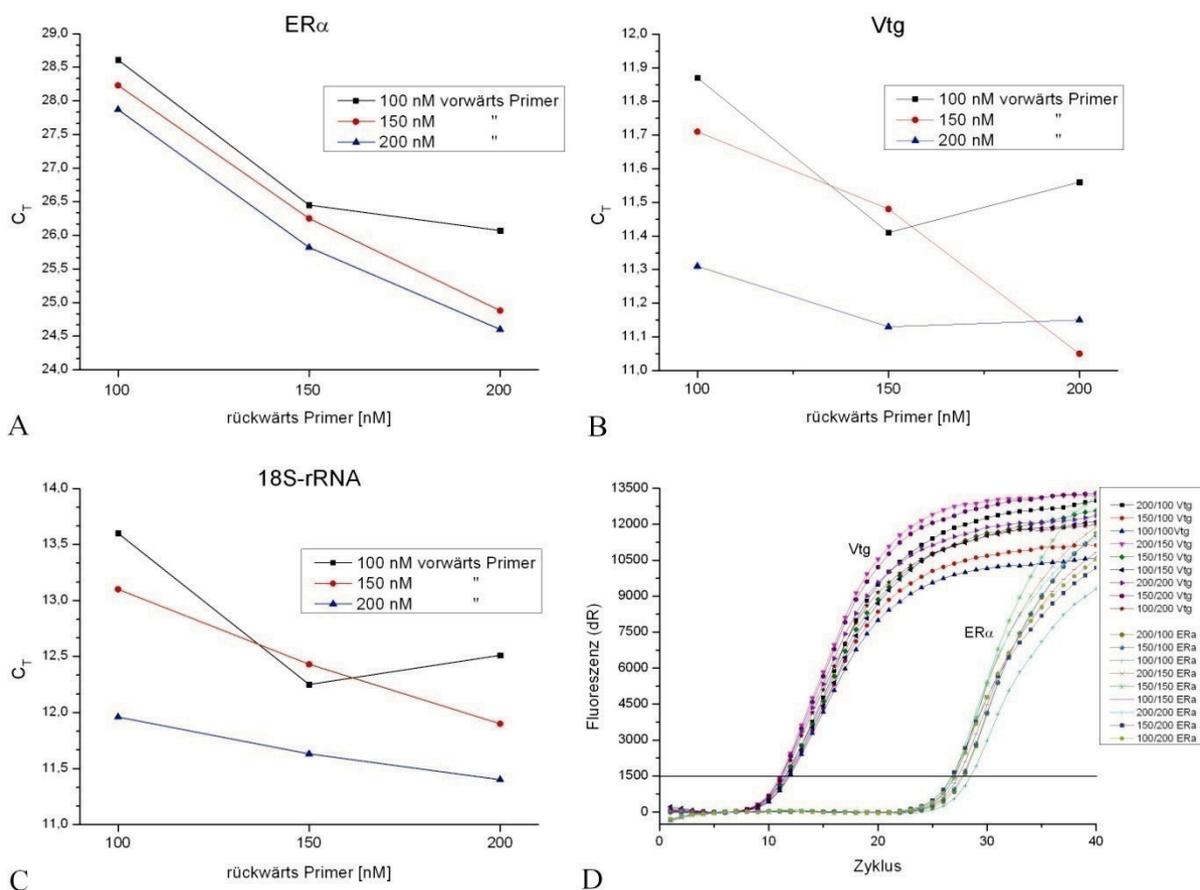


Abb.3.10: A-C) Bestimmung der optimalen Primerkonzentration für vorwärts und rückwärts Primer von ER α , Vtg und 18S-rRNA für *Thunnus thynnus* in der Q-PCR. Hierzu wurden die unter D ermittelten C_T -Werte der Primerkombinationen gegeneinander aufgetragen. D) Amplifikations-Plot am Beispiel von Vtg und ER α (*Thunnus thynnus*) für die verschiedenen Kombinationen der Konzentration von vorwärts und rückwärts Primer. Die durchgezogene Linie symbolisiert die vom Programm festgesetzte Schwellenwertfluoreszenz (Synonym: Threshold Cycle), durch die der C_T -Werte der verschiedenen Kombinationen definiert wird.

diese zu wählen. Noch geringer konzentrierte Kombinationen wie z.B. 100/100 für ER α wiesen zudem eine sehr starke Abweichung in ihren C_T-Werten auf, weswegen diese für die weitere Anwendung ausgeschlossen worden. Das so gewählte Verhältnis der Primerkonzentration lieferten während sämtlicher Analysen immer zufriedenstellende Ergebnisse.

3.3.1.5 Kontrollgen-Evaluierung

Die Wahl des Kontrollgenes zur Normalisierung spielt ebenfalls eine entscheidende Rolle. Es sollte stabil und konstant exprimiert und nicht reguliert sein. Außerdem sollte das generelle Expressionslevel nicht zu stark von dem zu untersuchenden Gen abweichen. Nachdem in einigen Studien gezeigt werden konnte, dass die genutzten Kontrollgene, beeinflusst durch die experimentelle Behandlung (hier 17 β -Estradiol), durchaus reguliert und sich in ihrem Expressionsmuster stark unter den verschiedenen experimentellen Bedingungen unterscheiden können, müssen diese Umstände für die Etablierung einer Genexpressionsanalyse ebenfalls in Betracht gezogen werden. Um ein solches HKG ausfindig zu machen, wurden die schon oft verwendeten Gene für β -Actin und 18S-rRNA ausgewählt und am Modellfisch Tilapia getestet.

Hierzu wurden verschiedene Versuchsansätze gemacht. Äquivalente Mengen von Ausgangs-cDNA (50 ng/ μ l) von sechs Kontrolltieren und neun 17 β -Estradiol induzierten Tieren wurden in eine Q-PCR eingesetzt. Dabei wurde die Expressionsrate von β -Actin durch die Hormonbehandlung signifikant dreifach verringert, während die von 18S-rRNA konstant blieb (Abb.3.11 A & B).

Eventuelle Expressionsunterschiede innerhalb der HKG, die durch eine unterschiedliche cDNA Template Menge bedingt sein könnten, wurden ebenfalls untersucht. Hierzu wurden Verdünnungsreihen (50 ng/ μ l – 0,5 ng/ μ l) von cDNA Proben gemacht, um diese dann als Template (Doppelbestimmung) einzusetzen. So erhaltene, gemittelte C_T-Werte für ER α wurden durch das jeweilige Kontrollgen normalisiert um den Wert Δ C_T zu erhalten. Diese konnten dann in ihrer linearisierten Form ($2^{-\Delta$ C_T) untereinander verglichen werden. Ein gut geeignetes HKG sollte dabei immer gleich große Verhältniswerte aufweisen. Zu große Schwankungen der Werte würden dabei auf ein nicht geeignetes Kontrollgen hindeuten. Wie aus Abbildung 3.11 C deutlich zu erkennen ist, ist dies in dieser Arbeit nur für das Gen der 18S-rRNA der Fall. Ein CV (Coefficient of Variation) von fast 16 % für β -Actin stand einem CV von 7,9 % für 18S-rRNA gegenüber.

Betrachtet man die Ergebnisse der verschiedenen Versuchsansätze zusammen, musste man zu dem Schluss kommen, das β -Actin für diese Studie nicht das geeignete HKG darstellte. Zum einen zeigte es deutliche Anzeichen einer durch Hormoninduktion hervorgerufenen Regulierung seiner Genexpression, zum anderen konnten keine gleichbleibenden Verhältnisse der durch β -Actin normalisierten ER α Expressionswerte erzielt werden.

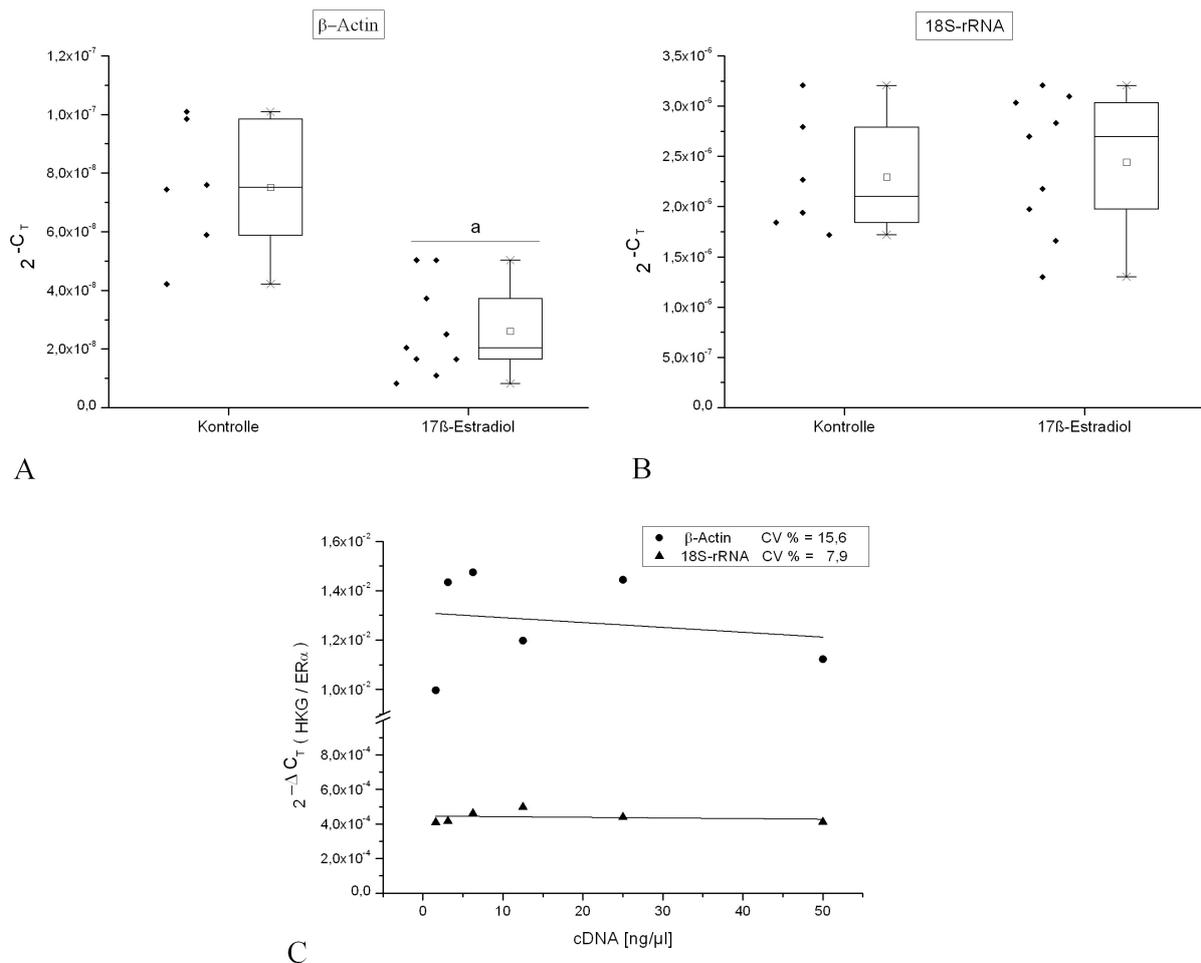


Abb.3.11: Einfluss der 17β-Estradiol Hormoninduktion auf die Kontrollgenen β-Actin und 18S-rRNA von *Oreochromis niloticus*. **A)** Die cDNA (je 50 ng/μl) von sechs weiblichen Kontrolltiere wurde mit neun hormoninduzierten Tieren in einer Q-PCR in Form ihrer linearisierten Werte ($2^{-\Delta C_T}$) verglichen. **B)** Vergleich der beiden Kontrollgene bei Einsatz unterschiedlichen cDNA Templatkonzentrationen (50 ng/μl – 0,5 ng/μl). C_T -Werte des jeweiligen HKG wurden zur Normalisierung von $ER\alpha$ genutzt, dessen C_T -Werte ebenfalls aus den verschiedenen cDNA Templatkonzentrationen bestimmt wurden. Erklärung des Diagrammtyps in A & B siehe Anhang.

3.3.1.6 Intra- und Inter-Assay Variation

Die Reproduzierbarkeit der Messungen ist eine weitere Voraussetzung für ein verlässliches Messsystem. Um dies auch für die hier etablierte Q-PCR zu beweisen, wurden die Intra- und Inter-Assay Variation (CV %) für die Primerpaare $ER\alpha$, Vtg und 18S-rRNA bestimmt. Es wurde cDNA der gleichen Probe in einem Lauf insgesamt 10-mal eingesetzt (Intra-Assay Variation). Die Vergleichbarkeit zwischen mehreren Q-PCR Läufen (Inter-Assay Variation) wurde für die verschiedenen Primerpaare in sechs Läufen bestimmt.

Da C_T -Werte exponentielle Terme darstellen, würde die Berechnung der Intra- und Inter-Assay Variation aus diesen Rohdaten zur einer verfälschten Darstellung führen. Eine genauere, den Gegebenheiten besser angepasste Form, stellt die Linearisierung der Rohdaten in Form von 2^{-C_T} dar (Scheffe, 2006, Schmittgen & Livak 2008).

Tab.3.1: Intra- und Inter-Assay Variation (CV %) der Primerpaare für ER α , Vtg und 18S-rRNA (*Thunnus thynnus*) in exponentieller (Rohdaten: C $_T$) und linearisierter Form (2 $^{-C_T}$), sowie die zugehörigen Mittelwerte und Standardabweichungen (SD). Intra-Assay-Replikate je Primer (n = 10); Inter-Assay-Replikate je Primer (n = 6).

Exponentiell (C $_T$)						
Primer	Mittelwert	SD	Intra-Assay (CV %)	Mittelwert	SD	Inter-Assay (CV %)
ER α	21,7	0,12	0,6	21,6	0,19	0,9
Vtg	14,5	0,13	0,9	14,5	0,18	1,3
18S-rRNA	11,4	0,13	1,2	11,4	0,17	1,5

Linear (2 $^{-C_T}$)						
Primer	Mittelwert	SD	Intra-Assay (CV %)	Mittelwert	SD	Inter-Assay (CV %)
ER α	2,8x $^{10^{-7}}$	2,4x $^{10^{-8}}$	8,3	3,1x $^{10^{-7}}$	4,2x $^{10^{-8}}$	13,4
Vtg	4,2x $^{10^{-5}}$	3,7x $^{10^{-6}}$	8,9	4,5x $^{10^{-5}}$	5,9x $^{10^{-6}}$	13,3
18S-rRNA	3,6x $^{10^{-3}}$	3,2x $^{10^{-5}}$	8,9	3,8x $^{10^{-3}}$	4,6x $^{10^{-5}}$	12,1

Wie in Tabelle 3.1 dargestellt, variieren die CV-Werte zwischen den beiden Darstellungsweisen sehr stark. Durch die Linearisierung der Daten mittels 2 $^{-C_T}$ konnten so trotzdem zufriedenstellende Werte für die Intra-Assay-Variation von 8,3 % bis 8,9 %, sowie für die Inter-Assay-Variation von 12,1 % bis 13,4 % erreicht werden (Schmittgen & Livak, 2008).

3.3.1.7 Effizienzbestimmung

Idealerweise setzt man eine Verdopplung der DNA Menge in jedem Zyklus der PCR Reaktion voraus. Diese Annahme ist aber in der Realität eher unzutreffend. Wirkliche PCR Effizienzen schwanken je nach Bestimmungsmethode eher um den Faktor 1,5-2,2 (Pfaffl, 2001). Deshalb ist es von enormer Wichtigkeit die Effizienz der genutzten Primer zu bestimmen. Denn Schwankungen in der Effizienz von Zielgen zu HKG führen in der späteren Analyse zu Unterschieden in ihren Expressionsmustern.

Um diesem Umstand Rechnung zu tragen, wurde auch in dieser Arbeit eine Effizienzbestimmung sämtlicher eingesetzter Primer durchgeführt. Es wurde eine Standardkurve aus unterschiedlichen cDNA-Verdünnungsstufen (50 ng/ μ l bis 0,5 ng/ μ l) erstellt. Aus der logarithmischen Auftragung der cDNA Konzentration gegen den gemittelten C $_T$ -Wert (Dreifachbestimmung je cDNA-Konzentration) konnte aus deren Steigung der Geraden die Q-PCR Effizienz des jeweiligen Primer errechnet werden. Neben dieser Methode wurde zusätzlich nach jedem Q-PCR Lauf die Steigung aus den absoluten Fluoreszenzrohdaten (R) des Amplifikationsplots in der exponentiellen Phase der Reaktion für jedes Primerpaar exemplarisch bestimmt (Lineare Regression: Schefe *et al.*, 2006) und daraus die Effizienz berechnet (Abb.3.12). Es zeigte sich, dass die so erhaltenen Effizienzen für die verschiedenen Primerpaare in den verschiedenen Läufen immer zufriedenstellende Werte aufwiesen, die mit den Werten der ersten Methode, vergleichbar waren. Die galt auch für cDNA Proben, die in unterschiedlicher Konzentration eingesetzt wurden. Wiesen die so bestimmten Effizienzen zu starke Unterschiede auf, wurden die entsprechenden cDNA Proben erneut in eine Q-PCR eingesetzt.

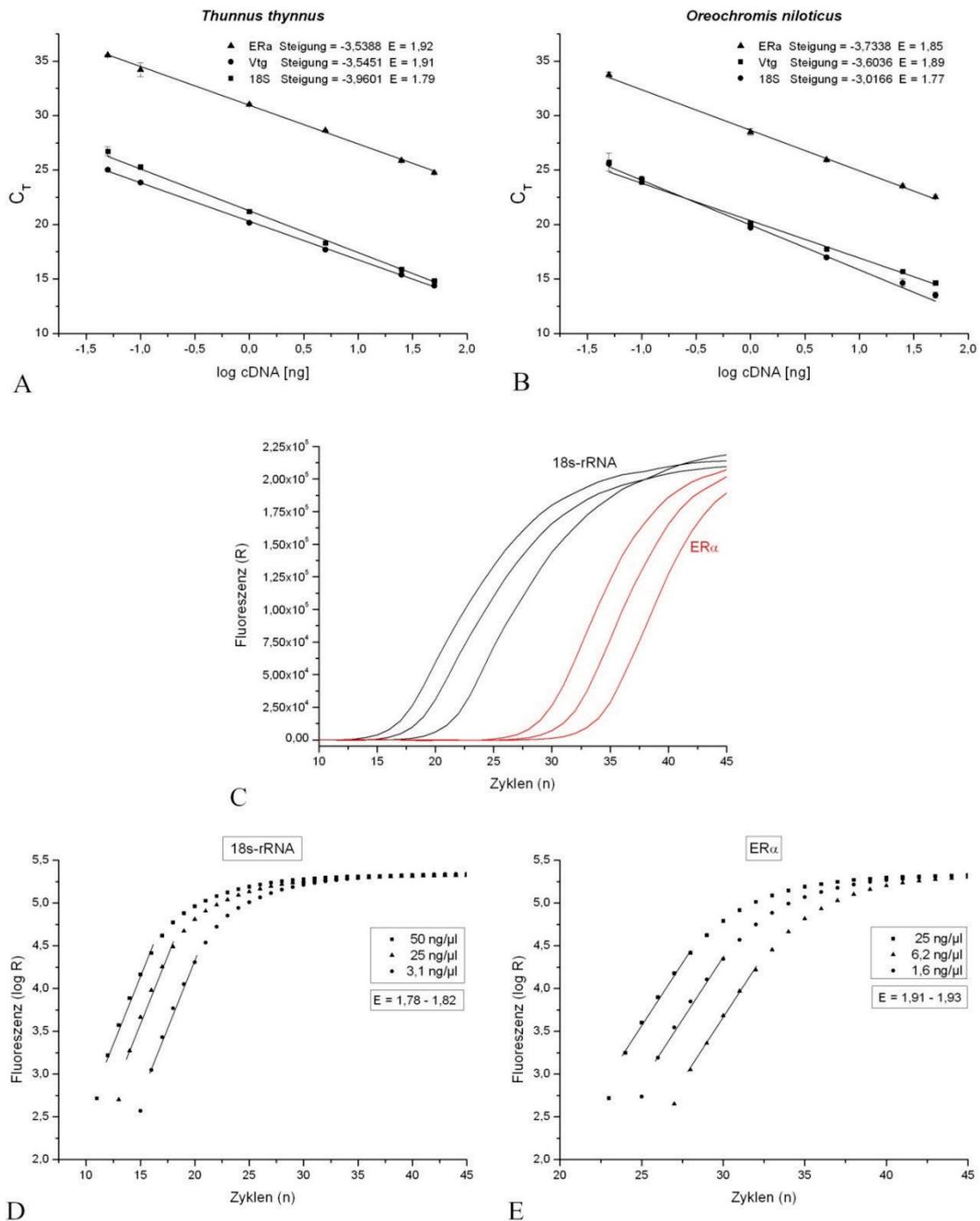


Abb.3.12: A-B) Experimentelle Bestimmung der Effizienzen (Formel: $E = 10^{[-1/\text{Steigung}]}$) von Primern für *Thunnus thynnus* und *Oreochromis niloticus* anhand einer Standardkurve, generiert durch die halblogarithmische Auftragung der cDNA Template Menge (50 – 0,5 ng/ μ l; je n = 3) gegen die nach Q-PCR gemittelten C_T -Werte (\pm SD). C-E) Berechnung der Effizienz aus dem absoluten Fluoreszenzanstieg (R bzw. log R) in der exponentiellen Phase der Q-PCR Reaktion durch lineare Regression am Beispiel von ER α und 18S-rRNA (*Thunnus thynnus*) mit unterschiedlichen cDNA Templatemengen (50 – 1,6 ng/ μ l).

Um auszuschließen, dass unterschiedliche cDNA Templatmengen zu einer starken Variation im Term ΔC_T führten, wurde folgender Test durchgeführt. Setzte man unterschiedliche Konzentrationen von cDNA (unverdünnt, 50 ng/ μ l bis 1 ng/ μ l) als Template in eine Q-PCR ein und berechnete den ΔC_T -Werte von HKG und ER α , so zeigten sich keine großen Schwankungen in der linearisierten Form ($2^{-\Delta C_T}$) zwischen den verschiedenen Verdünnungsstufen (CV % = 2,6). Schwankungen in der eingesetzten Templatmenge führten also zu keiner Verfälschung des Verhältnisses von Zielgen zu HKG im Term $2^{-\Delta C_T}$ (siehe Abb.3.13).

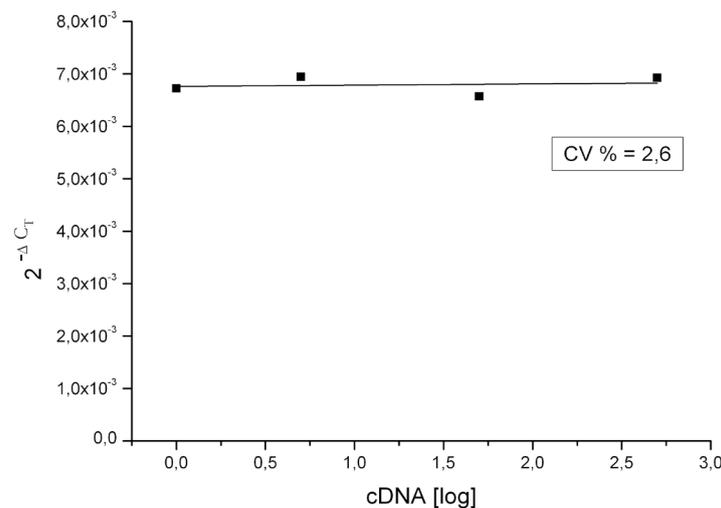


Abb.3.13: Studie zur Bestimmung der Testvarianz in Form von $2^{-\Delta C_T}$ bei unterschiedlicher Konzentration von eingesetzter Template cDNA (unverdünnt, 50 ng/ μ l bis 1 ng/ μ l).

3.3.2 Protein- und Steroidhormonbestimmung per ELISA

3.3.2.1 Aufreinigung von Eihüllenprotein (Zona radiata) und Antikörperherstellung

Sämtliche für die quantitative Bestimmung per ELISA eingesetzten Antikörper wurden durch Mitglieder der Arbeitsgruppe Ökophysiologie hergestellt. Die Antikörper für 17 β -Estradiol und Vitellogenin stammten aus den Jahren 2005 und 1999 und wurden schon vielfältig eingesetzt. Der in dieser Arbeit verwendete Zona radiata Antikörper wurde neu hergestellt. Hierzu wurde eine vom Südlichen Blauflossenthunfisch (*Thunnus maccoyii*) stammende Gonade verwendet. Nach Aufarbeitung bzw. Extraktion des im Gonadengewebe enthaltenen Zona radiata Proteins, wurde zur Überprüfung der Extraktion der Extrakt per SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Abbildung 3.14 zeigt ein so entstandenes Gelbild. Es waren 3 distinkte Banden zu erkennen, deren Molekulargewichte bei 80, 60 und 54 kDa lagen. Der Vergleich der beiden Thunfischspezies zeigte gleiche Bandenprofile auf, wobei Banden mit einer Größe von über 100 kDa in Proben des Südlichen Blauflossenthunfisches stärker hervortraten. Da es die schlechte Löslichkeit unter nicht denaturierenden Bedingungen schon immer erschwert hat, diese Proteinklasse zu beschreiben, beschränkt sich ihre Charakterisierung hauptsächlich auf die löslichen Hauptdegradationsprodukte (Oppen & Berntsen, 1990). Hier traten in jeder Fischspezies, wie Dorsch (*Gadus morhua*) oder Lachs (*Salmo salar*), drei Proteinmo-

nomere in den Vordergrund, die gleiche Größenordnungen aufwiesen, wie die oben beschriebenen aus der Gattung *Thunnus*.

Aus diesem Grund und um die Spezifität des Antikörpers zu erhöhen, wurden die ZrP Extrakte einer weiteren Aufreinigung unterzogen, die die Banden mit einer Größe von über 100 kDa beseitigen sollte. Wie aus Abbildung 3.15 A zu erkennen ist, wurde dies durch Ultra-Zentrifugation mit einem MWCO (Molecular-Weight-Cut-Off) von 100 kD erreicht. Durch den zusätzlichen Aufreinigungsschritt wurde die Gesamtproteinkonzentration der Proben von 1,76 mg/ml auf 1,36 mg/ml herabgesetzt.

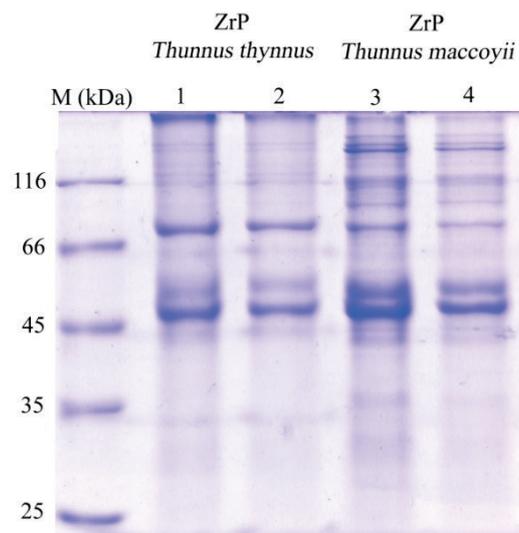


Abb.3.14: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von aufgereinigtem Zona radiata Proteinen von *Thunnus thynnus* und *Thunnus maccoyii*. Es wurden jeweils 2 Proben 1:2 und 1:4 verdünnt in einem Volumen von 8 μ l eingesetzt.

Nach einer 96 tägigen Immunisierung von 3 Neuseeland-Kaninchen (Firma Pineda, Berlin) mit diesem aufgereinigtem Extrakt als Immunogen in komplettem Freundschens Adjuvants, konnte der polyklonale Antikörper aus dem Plasma der Tiere gewonnen und getestet werden. Eine korrespondierende Immunofärbung (Abb. 3.15 B) lieferte übereinstimmende Ergebnisse zur vorherigen SDS-PAGE. Der neu synthetisierte α -Thunfisch Zona radiata Antikörper reagierte mit genau den durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteinbanden und färbte auch die zuvor entfernten Banden (> 100 kDa) spezifisch an.

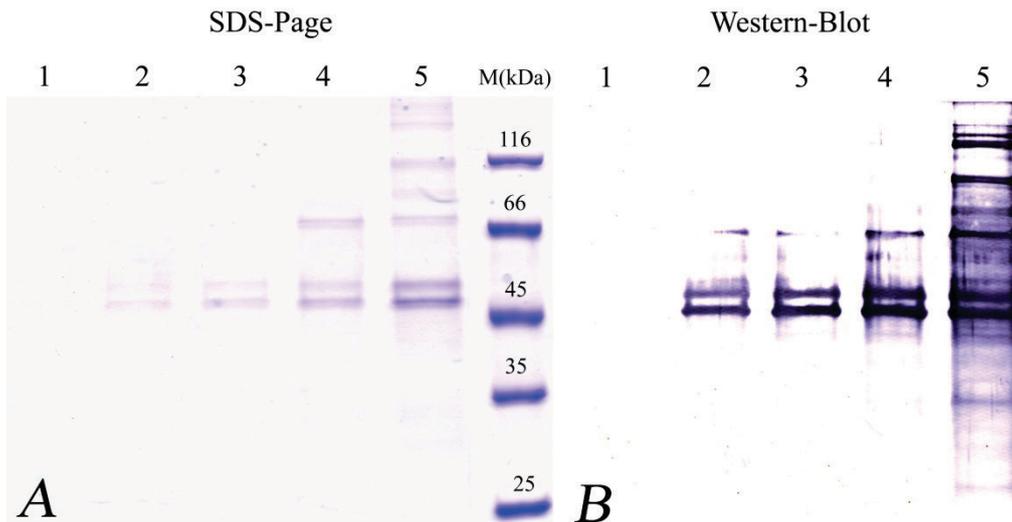


Abb.3.15: **A)** SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von zuvor extrahierten und nochmals speziell gereinigten Zona radiata Proteinen. Slot 1: Kontrolle, Slot 2-4: jeweils mit SDS-Probenpuffer verdünnte Aufreinigung (1:8, 1:4 und 1:2), Slot 5: unaufgereinigte Fraktion. Das Gel wurde mit Coomassie angefärbt. **B)** Western-Blot der unter A aufgetrennten Proteinbanden. Marker: Protein molecular weight marker 14,4-116 kDa, Fermentas.

Es trat keine Kreuzreaktivität zwischen den gegen die Proteine Vtg und ZrP gerichteten Antikörper auf. Der Vitellogenin Antikörper zeigte im Dot-Blot (Abb.3.16) keine Affinität für den eingesetzten ZrP-Standard, gleiches galt auch für den Zona radiata Antikörper. Standard-Proben des jeweilig komplementären Antigens ergaben, im ELISA eingesetzt, immer vergleichbare Extinktionen wie B_0 (Maximum Binding) Kavitäten, in denen die Abwesenheit des Antigens zur Maximalbindung des 1. Antikörpers führt. Sie konnten so durch den jeweiligen Antikörper als nicht detektierbar angesehen werden. Sonstige Matrix – Effekte konnten durch den verdünnten Einsatz der Proben im ELISA ausgeschaltet werden (siehe männliches Plasma in Abbildung 3.16 B).

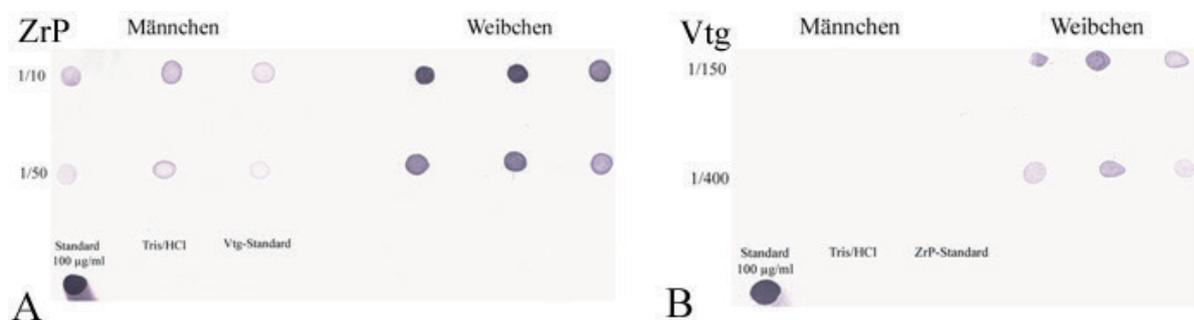


Abb.3.16: Dot-Blot-Analyse von männlichem und weiblichem Thunfischplasma für die Proteine **A)** Zona radiata und **B)** Vitellogenin. 1.Antikörper wurden 1/30.000 (ZrP) und 1/7500 (Vtg) eingesetzt, der 2.Antikörper 1/15.000. Das Probenvolumen betrug 1 µl, wobei Proben vorher mit Tris/HCl (1/10, 1/50, 1/150 und 1/400) vorverdünnt wurden. Als positiv Kontrolle wurde der jeweilige Standard (100 µg/ml, 1/10 verdünnt) und als negativ Kontrolle der komplementäre Standard eingesetzt.

3.3.2.2 Charakterisierung von ELISA und Steroidextraktionsmethode

Jeder der genutzten Antikörper zeigte kompetitive Bindungseigenschaften (sigmoider Kurvenverlauf), die gleich für den eingesetzten Standard, den seriell verdünnten internen Standard oder Plasma, waren. Durch die Linearisierung des sigmoiden Kurvenverlaufs der Bindungskurve anhand der Logit-Funktion, konnte für die jeweiligen eingesetzten Antigene klare Analogien der durch Lineare Regression erhaltenen Geraden, bezüglich ihrer Steigung, gezeigt werden. Hierfür wurden nur Werte genutzt, die im linearen Bereich, meist von 20 % bis 80 % B/B₀ lagen. Es gelang so Standardkurven in den Konzentrationsbereichen von 5,3 ng/ml – 0,2 ng/ml für 17β-Estradiol und 2500 ng/ml – 80 ng/ml für Vitellogenin und Zona radiata zu konstruieren. Die Punkte der Geraden wiesen mit einem Korrelationskoeffizienten $r \geq 0,97$ nach Pearson eine eindeutige lineare Abhängigkeit zueinander auf (Abb.3.17). Zudem ergab eine Varianzvergleich der Datenpunkte der jeweiligen Geraden mit $p \leq 0,05$ einen signifikanten Zusammenhang der jeweiligen Geraden zueinander. Es konnte somit gezeigt werden, dass die Antiseren in gleicher Weise das jeweilige Antigen im Plasma wie auch im Standard erkannten. Männliches Plasma, in dem normalerweise kein Vtg und ZrP enthalten ist, zeigte in den eingesetzten Verdünnungen keine mit weiblichem Plasma vergleichbare Bindungseigenschaften (Daten nicht gezeigt).

Die Genauigkeit und Qualität der genutzten Steroidextraktionsmethode spielt eine erhebliche Rolle, um verlässliche und reproduzierbare Ergebnisse zu erlangen. Um dies zu kontrollieren und die evtl. mit ihr eingebrachten Fehler in den Steroidkonzentrationen des Plasmas zu eliminieren, wurde in jede Extraktion zusätzlich ein Standard mit bekannter Konzentration (Doppelbestimmung) eingesetzt. Die Wiederfindungsrate des 17β-Estradiolstandards lag dabei bei 95 ± 4 %. Hierdurch konnte eindeutig die Verlässlichkeit der Steroidextraktionsmethode bewiesen werden und deren Extrakt somit für die ELISA Messung genutzt werden.

Um die Antikörper- und Antigenverdünnungen für den genutzten Steroid-ELISA zu bestimmen, die die höchstmögliche Testsensitivität erbringen, wurde eine Schachbretttitration durchgeführt. Abbildung 3.18 zeigt die so erstellten Titrationskurven der konstanten Antikörperverdünnungen zu den variierenden Antigenverdünnungen (hier Tracer: Steroid-Enzym-Konjugat) am Beispiel des 17β-Estradiol-ELISA's. Um die bestmöglichen Resultate zu erlangen, ist es dabei wichtig in Bereichen von 1,5 bis 1,7 AU (Absorption Units) zu messen, da Werte über diesen keine exakte photometrische Messung zulassen (Crowther, 2001). Es muss somit für die Optimierung des Testes darauf geachtet werden, dass Maximalwerte der Plateauphase diesen AU-Wertebereich nicht übersteigen. In der Plateauphase findet dabei die Sättigung des 2. Antikörpers durch den Tracer, der dabei im Überschuss vorhanden ist, statt. Die richtige Tracerverdünnung ist diejenige, die nicht in der Plateauphase liegt, sondern im linearen Bereich der Titrationskurve. Es wurden so eine Antikörperverdünnung von 1/320.000 und eine Tracerverdünnung im Bereich von 1/400 bis 1/800 gewählt. Für die Evaluierung der bestmöglichen Antikörper- und Antigenkonzentrationen für den Vitellogenin und Zona radiata ELISA wurde ähnlich verfahren. Hier wurden so 1. Antikörperverdünnungen von 1/7500 (Vtg) und 1/15.000 (ZrP) gewählt.

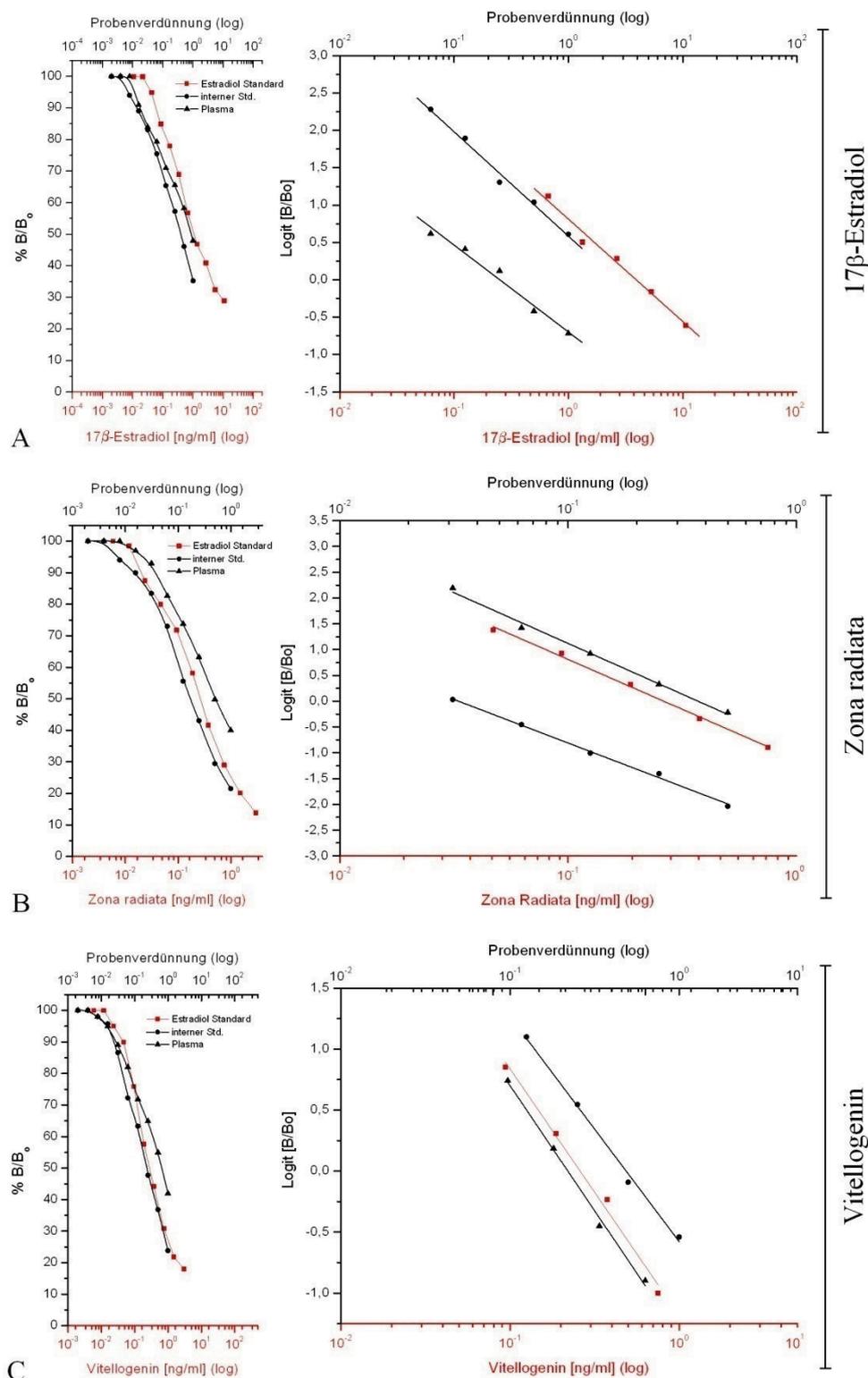


Abb.3.17 : Sigmoide Bindungskurven und ihre Linearisierung durch die Logit-Funktion für die im ELISA quantitativ bestimmten Parameter **A**) Estradiol, **B**) Zona radiata und **C**) Vitellogenin. Der Term $\%B/B_0$ beschreibt dabei das prozentuale Verhältnis der Extinktionswerte (B), hier die verschiedenen Verdünnungen von Standard, Probe etc.) zur Maximalbindung des 1. Antikörpers ($B_0 = 100\%$). Korrelationskoeffizient aller Geraden lag bei $r \geq 0,97$ (nach Pearson) mit $p \leq 0,05$. Rot markierte x-Achse und rot markierte Datenpunkte samt Regressionslinie gehören zusammen und beziehen sich immer auf den jeweiligen verdünnten Standard. Schwarz markierte, obige x-Achse beschreibt die serielle Probenverdünnung von eingesetztem Plasma und internen Standard.

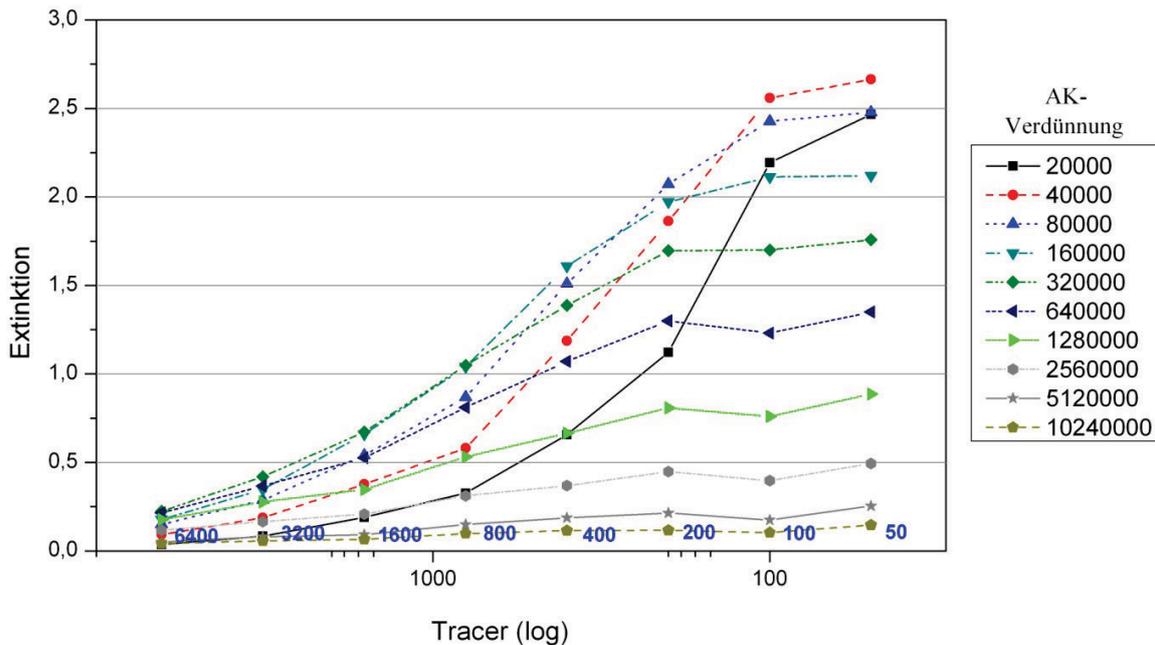


Abb. 3.18: Schachbretttitration der getesteten Antikörper- und Tracerverdünnungen des 17 β -Estradiol-ELISA anhand ihrer jeweiligen Extinktionswerte.

3.3.2.3 Intra- und Inter-Assay Variationen

Der für die quantitative Analyse genutzte ELISA erzielte für alle zu bestimmenden Parameter, für das Steroidhormon 17 β -Estradiol und für die beide Proteine Vitellogenin & Zona radiata, reproduzierbare Ergebnisse. Es konnten zufriedenstellende Werte der Testvariabilität in den einzelnen ELISA bestimmt werden. Die Variation der Analysen-Ergebnisse bei mehrfacher Bestimmung aus einer Probe in einer Messung (Intra-Assay CV %) lag zwischen 3,1 % und 4,6 %, während die Variation der Analyseergebnisse bei mehrfacher Bestimmung einer Probe innerhalb mehrerer Messserien (Inter-Assay CV %) eine leicht erhöhte Variabilität zwischen 6,1 % und 8,7 % annahm. Intra- & Inter-Assay Variationen, sowie die Messbereiche (Bereiche von 20 % - 80 % B/B₀) der einzelne ELISA's waren wie folgt:

Tab. 3.2: Zusammenfassung der Intra- & Inter-Assay Variationen (CV %), sowie die Messbereiche der verschiedenen ELISA's und der Wert für die minimal detektierbare Antigenkonzentration (MDK).

ELISA	MDK ng/ml	Messbereich ng/ml	Intra-Assay (CV %)	Inter-Assay (CV %)
17 β -Estradiol	0,2	5,3 - 0,2	3,1 (n=8)	6,1 (n=11)
Vtg	80	2500 - 80	4,6 (n=8)	8,7 (n=19)
ZrP	80	2500 - 80	3,9 (n=8)	7,6 (n=15)

3.4 Reproduktionsphysiologische Parameter im Vergleich zwischen juvenilen und adulten Wild- und Käfigtieren

Durch den Vergleich von in Gefangenschaft gehaltenen und in freier Wildbahn lebenden Thunfische, sollte auf Basis der zuvor vorgestellten proteinbiochemischen und molekularbiologischen Messsysteme, Aspekte der Hormon- und Reproduktionsphysiologie der Tiere genauer untersucht werden. Hierdurch sollten weitere Antworten auf die momentan in der weltweiten Thunfisch-Aquakultur vorrangigste Frage gefunden werden, wieso in Gefangenschaft lebende weibliche Fische reproduktive Dysfunktionen aufweisen und teilweise keine vergleichbare sexuelle Entwicklung einschlagen, wie die weiblichen Wildtiere (REPRODOTT, 2006). Um einen Weg zu finden dieses Problem zu lösen bzw. genauere Informationen darüber zu erlangen, wurden mehrere Arbeitsprogramme innerhalb des EU-Projektes SELFDOTT erarbeitet und umgesetzt. Nachfolgend sollen die hierzu erzielten Ergebnisse meiner Arbeit vorgestellt werden.

3.4.1 Gametogenese

Das Programm Gametogenese 1-3 bezeichnet eine Untersuchung in der zu den verschiedenen reproduktiven Jahreszeiten (I. Vorlaichzeit, II. Laichzeit, III. Nachlaichzeit) insgesamt 39 Thunfische (21 Weibchen) beprobt wurden, welche zuvor schon 1-2 Jahre in Gefangenschaft gehalten wurden. Dies diente dazu, um festzustellen, ob sich die Gameten der Tiere im Laufe des Jahres in Gefangenschaft vergleichsweise entwickelten, wie die ihrer Artgenossen in der Wildbahn. Hierfür wurden in dieser Arbeit die Plasmaproteine Vitellogenin & Zona radiata, das Geschlechtshormon 17β -Estradiol und die Genexpression der Gene des $ER\alpha$ und Vtg aus Leber- und Gondenproben von weiblichen und teilweise männlichen Tieren untersucht. Im Mittel wiesen die drei Gruppen keine großen Schwankungen in ihrer Körperlänge auf (I: 142 ± 7 cm; II: 138 ± 6 cm; III: 147 ± 5 cm), was auf eine einheitliche Altersstruktur der Versuchstiere hindeutete.

Die Auswertung der Daten (Abb.3.19) zeigte eine eindeutige jahreszeitliche Abhängigkeit der Entwicklung aller Messparameter in weiblichen Fischen. Während die Konzentrationen der Proteine Vitellogenin, Zona radiata und des Geschlechtshomons 17β -Estradiol (E_2) in der Vorlaichzeit noch sehr niedrig, bis kaum detektierbar waren (Vtg: $0,07 \pm 0,03$ mg/ml; ZrP: 0; E_2 : $1,1 \pm 0,28$ ng/ml), stiegen sie im Zeitraum der Laichzeit stetig an und erreichten Ende Mai ihr Maximum (Vtg: $1,37 \pm 0,28$ mg/ml; ZrP: $1,92 \pm 0,76$ mg/ml; E_2 : $6,6 \pm 1,81$ ng/ml), bis sie in der Nachlaichzeit Mitte Juli wieder Werte der Vorlaichzeit annahmen bzw. zu diesen leicht erhöht vorlagen (Vtg: $0,27 \pm 0,22$ mg/ml; ZrP: $0,27 \pm 0,07$ mg/ml; E_2 : $0,8 \pm 0,2$ ng/ml). Das Wachstum der Gonade (GSI %) spiegelte diesen Verlauf ebenfalls wieder (Vorlaichzeit: $0,5 \pm 0,09$ %; Laichzeit: $1,6 \pm 0,3$ %; Nachlaichzeit: $0,8 \pm 0,2$ %). Im Gegensatz dazu wiesen Werte des HSI (hepatosomatischer Index) keine Unterschiede für die verschiedenen Reproduktionsphasen auf. Für männliche Fische konnte der oben beschriebene Trend anhand der hier ermittelten Parameter nur für ihrer GSI Werte bestätigt werden (Abb.3.20 E). 17β -Estradiol Werte lagen bei ihnen anscheinend unter Detektionsminimum und konnten somit nicht bestimmt werden.

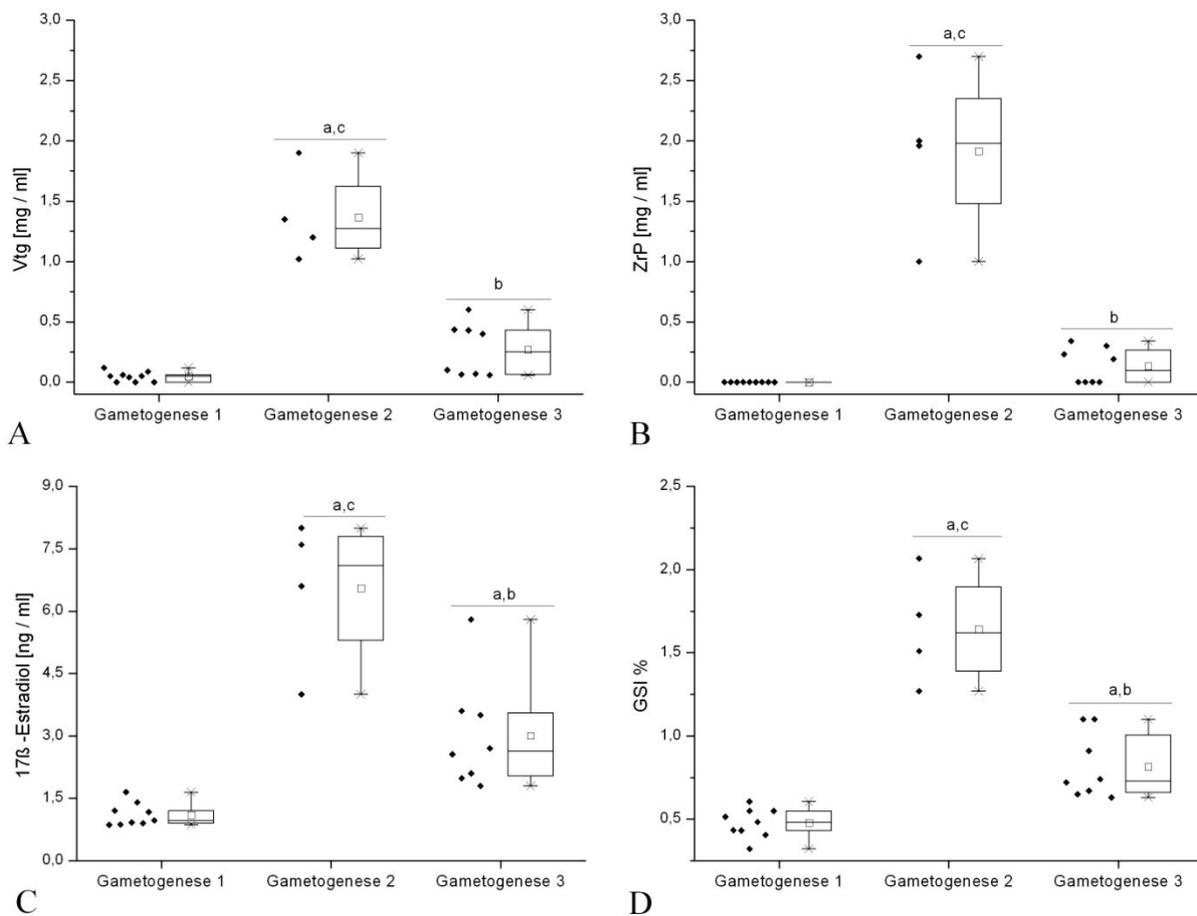


Abb.3.19: Entwicklung der Protein- und Hormonkonzentrationen von weiblichen Thunfischen im Zeitraum eines Reproduktionszykluses. Die Tiere wurden zuvor 1-2 Jahre in Gefangenschaft gehalten. Proben wurden je zur Vorlaichzeit (15. April 2008), Laichzeit (27. Mai 2008) und Nachlaichzeit (11. Juli 2008) in Carthagena (Spanien) genommen. Die verschiedenen reproduktiven Jahreszeiten sind mit Gametogenese 1 bis 3 benannt. Bemerkung: einzelne Punkte repräsentieren den Messwert eines Tieres, Kürzel a, b und c (a = Gametogenese 1, usw.) beschreiben den signifikanten Unterschied des jeweiligen Datensatzes ($p \leq 0,05$) zu dem durch den Buchstaben benannten.

Die Expressionsraten hier untersuchter Gene ($ER\alpha$ und Vtg) deuteten einen ähnlichen jahreszeitlichen Verlauf an (Abb.3.20), wobei sich die Unterschiede als nicht so eindeutig herausstellten, wie es für die zuvor beschriebenen Parameter der Fall war. Trotzdem stach die Periode der Laichzeit als Zeitraum hervor, die im Mittel die höchsten Expressionswerte aller Genprodukte ($p \leq 0,05$) in beiden Gewebetypen aufwies. Ein Vergleich dieser Werte zur Kontrollgruppe (Gametogenese 1) erbrachte für $ER\alpha$ eine 5fach höhere Expressionsrate in beiden Geweben, für das Genprodukt des Vtg Gens konnte sogar in diesem Zeitraum eine 390fache Erhöhung festgestellt werden. Generell blieben sämtliche Expressionsraten im Mittel auch während der Nachlaichzeit erhöht. Männliche Tiere wiesen keinen reproduktionsphasenabhängigen Verlauf ihrer $ER\alpha$ Genexpression auf. Verglichen mit weiblichen Tieren aus der Vorlaichzeit, zeigten sie im Mittel eine 5fach geringere Expressionsrate für $ER\alpha$ im Lebergewebe, bezogen auf weiblich Tiere aus der Laichzeit sogar eine 30fache (Abb.3.20 D).

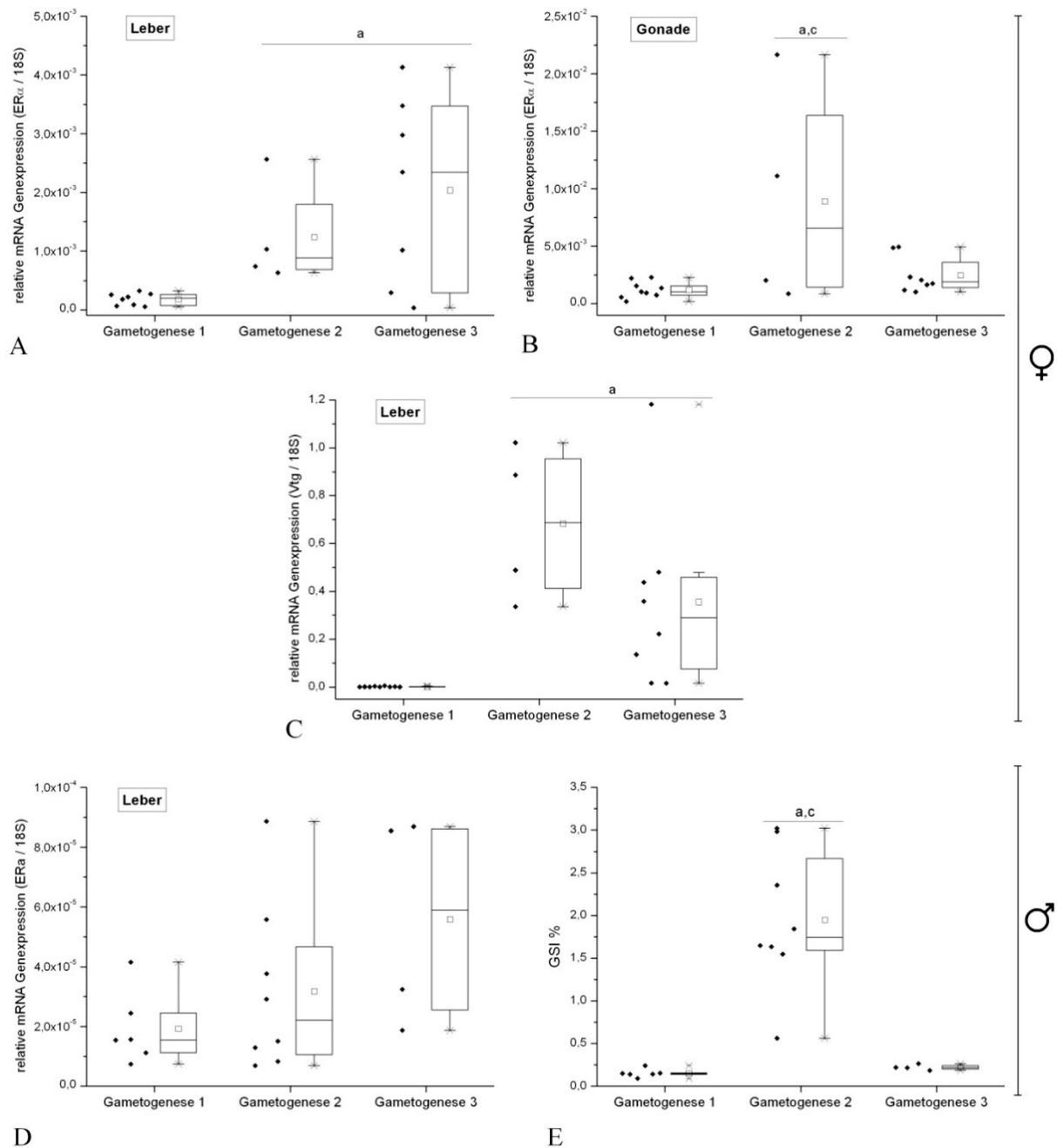


Abb.3.20: Entwicklung der Genexpression für ER α aus **A)** Leber und **B)** Gonade, sowie die von **C)** Vtg aus der Leber von weiblichen **D-E)** von männlichen Thunfischen (ER α und GSI) im Zeitraum eines Reproduktionszyklus. Weitere Informationen siehe vorherige Abbildung. Die Expression des jeweiligen untersuchten Gens wurde mit der eines nicht regulierten Kontrollgens (18S-rRNA) normalisiert und als Verhältnis (z.B. ER α /18S) seiner effizienzkorrigierten und linearisierten Form ($E^{-\Delta C_T}$) dargestellt. Kürzel a, b und c (a = Gametogenese 1, usw.) beschreiben den signifikanten Unterschied des jeweiligen Datensatzes ($p \leq 0,05$) zu dem durch den Buchstaben benannten.

3.4.2 Wildbahntiere

Ein Vergleich der oben dargestellten Studie der Gonadenentwicklung von Fischen, die zwischen 1 bis 2 Jahren in Käfigen gehalten wurden, mit anderen Käfig- oder Wildbahntieren, erbrachte aufschlussreiche neue Erkenntnisse. Für diesen Vergleich standen mehrere Proben von unterschiedlichen Standorten im Mittelmeerraum zur Verfügung. Sämtliche Proben, bis auf die von Gametogenese 1

und 3, wurden während der Laichzeit der Thunfische im Mittelmeerraum zwischen Ende Mai und Ende Juni genommen. Um eine korrekte Bewertung der evtl. Unterschiede sicherstellen, wurden deshalb die Werte für die Vor- und Nachlaichzeit (Gametogenese 1 & 3) für Vergleiche ausgelassen bzw. ihr Probenahmezeitpunkt berücksichtigt.

Im Vergleich zu allen anderen stachen Käfigtiere aus Vibo Valentia (Italien) besonders hervor. Ihre Proben wurden nachweislich nur zwei Tage vor einem mehrere Tage dauernden Ablaichvorgang ihrer Schwestertiere in einem Nachbarkäfig genommen. Hieraus resultierten 20 Mio. Eier, die eine Fertilisationsrate von 80 % aufwiesen (De Metrio *et al.*, 2010).

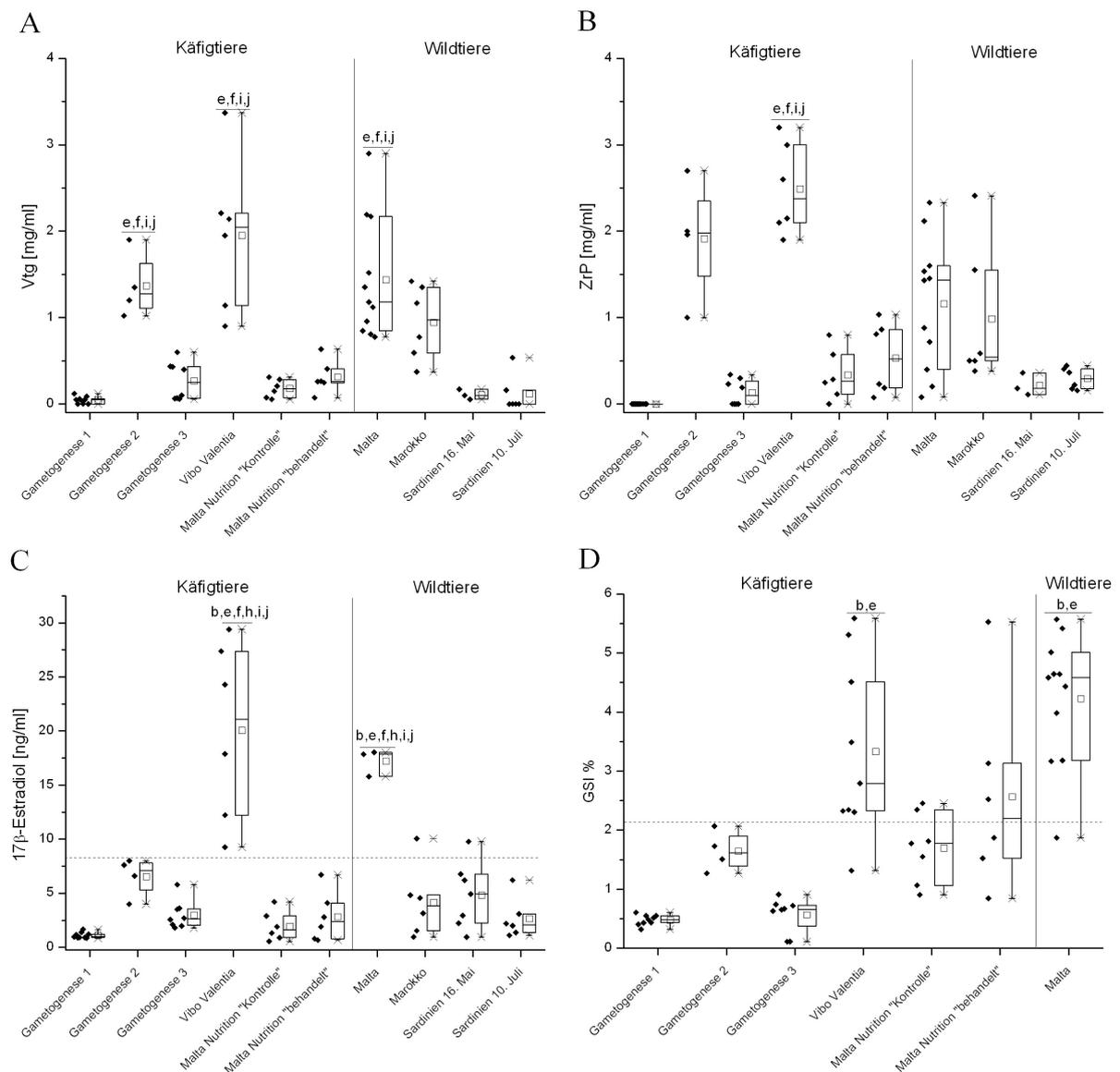


Abb.3.21: Vergleich der Protein- (A-B: Vtg & ZrP) und Hormonkonzentration (C: 17β-Estradiol) von weiblichen Käfig- und Wildbahn Thunfischen (*Thunnus thynnus*) von verschiedenen Standorten rund ums Mittelmeer, sowie deren GSI % (D). Käfigtiere wurden für 1-2 Jahre in den verschiedenen Fischfarmen gehalten, bevor sie für die Probenahme getötet wurden. Sämtliche Proben (bis auf Gametogenese 1 und 3) wurden während der Laichzeit der Thunfische im Mittelmeer (Ende Mai bis Ende Juni) genommen. Die gestrichelte Linie soll als Referenzlinie dienen, die den jeweiligen Höchstwert aus der Laichzeit der Gametogenesestudie darstellt. Kürzel a, b und c (a = Gametogenese 1, b = Gametogenese 2 usw.) beschreiben den signifikanten Unterschied des jeweiligen Datensatzes ($p \leq 0,05$) zu dem durch den Buchstaben benannten.

Sie stellen deshalb eine ideale Kontrollgruppe dar, durch die Tiere der anderen Standorte in ihrer Reife zum Ablachen eingestuft werden können. In sämtlichen durchgeführten Messungen der verschiedenen Parameter wiesen diese Tiere, bis auf zwei Ausnahmen, stark erhöhte Werte auf, durch die sie von den anderen Gruppen klar zu unterscheiden waren. Ein erster Anhaltspunkt für ihre hervorragende reproduktive Entwicklung war im GSI-Wert der Tiere zu erkennen (Abb.3.21 D). Ähnlich hohe Werte konnten nur in Wildtieren, die in den Gewässern um die Insel Malta gefangen wurden und in einigen Tieren aus der Ernährungsstudie (Malta Nutrition), festgestellt werden.

Die Plasmakonzentrationen von Vitellogenin und Zona radiata, welche in die sich entwickelnden Oozyten eingelagert werden und so zu dem Größenwachstum der Gonade beitragen, waren ebenfalls erhöht, konnten sich aber dennoch nicht signifikant von den gemessenen Proteinkonzentrationen aus Gametogenese 2 abgrenzen (Abb.3.21 A-B).

Gänzlich anders war dies bei dem Hormonlevel von 17β -Estradiol. Hier konnte wieder ein eindeutiger und signifikanter Unterschied zwischen Vibo Valentia Fischen und den restlichen Tieren der Standorte erkannt werden (Abb.3.21 C). Ähnlich hohe Werte wiesen wieder nur Wildtiere gefangen um Malta auf. Gleicher Trend galt auch für die Genexpressionen der Gene $ER\alpha$ und Vtg in Leber und Gonade. Hier konnten eindeutige Unterschiede in den Expressionsmustern festgestellt werden (Abb.3.22). Setzte man die Werte der Tiere aus Gametogenese 2 als Kontrollgruppe ein, so ergaben sich daraus folgende Genexpressionserhöhungen im Vergleich zu Käfigtieren aus Vibo Valentia und den hier zur Verfügung stehenden Wildtieren. Im Mittel zeigte die Gruppe der weiblichen Tiere aus Vibo Valentia, wie auch die Wildtiere, eine 6fach höhere Genexpression für $ER\alpha$ im Lebergewebe. Die Expressionsrate des Gens Vtg war bei beiden sehr hoch und erreichte erhöhte Werte von 11 bis 13fach. Gleiches galt auch für die $ER\alpha$ Werte aus Gonadengewebe. Für diese konnte eine Erhöhung um das 5 bis 9fache bestimmt werden. Wie auch schon aus anderen Arbeiten bekannt, unterscheiden sich die verschiedenen Organe in Fischen in ihrer Rezeptordichte bzw. im Vorhanden sein von bestimmten Rezeptortypen. Die hier untersuchten Gewebe (Leber & Gonade) aus dem Thunfisch zeigten eine unterschiedliche Expressionsrate für $ER\alpha$. Vergleich man die Expressionsraten weiblicher Tiere in den jeweiligen Fangorten untereinander, so konnte übereinstimmend eine 12fach höhere Genexpression in der Leber festgestellt werden. Setzte man wieder die Gruppe der Tiere aus Gametogenese 2 als Kontrolltiere ein, so zeigten diese, wie auch schon zuvor, eine viel geringere Expressionsrate (50fach) in diesem Gewebe als es Wildtiere und Tiere aus Vibo Valentia taten.

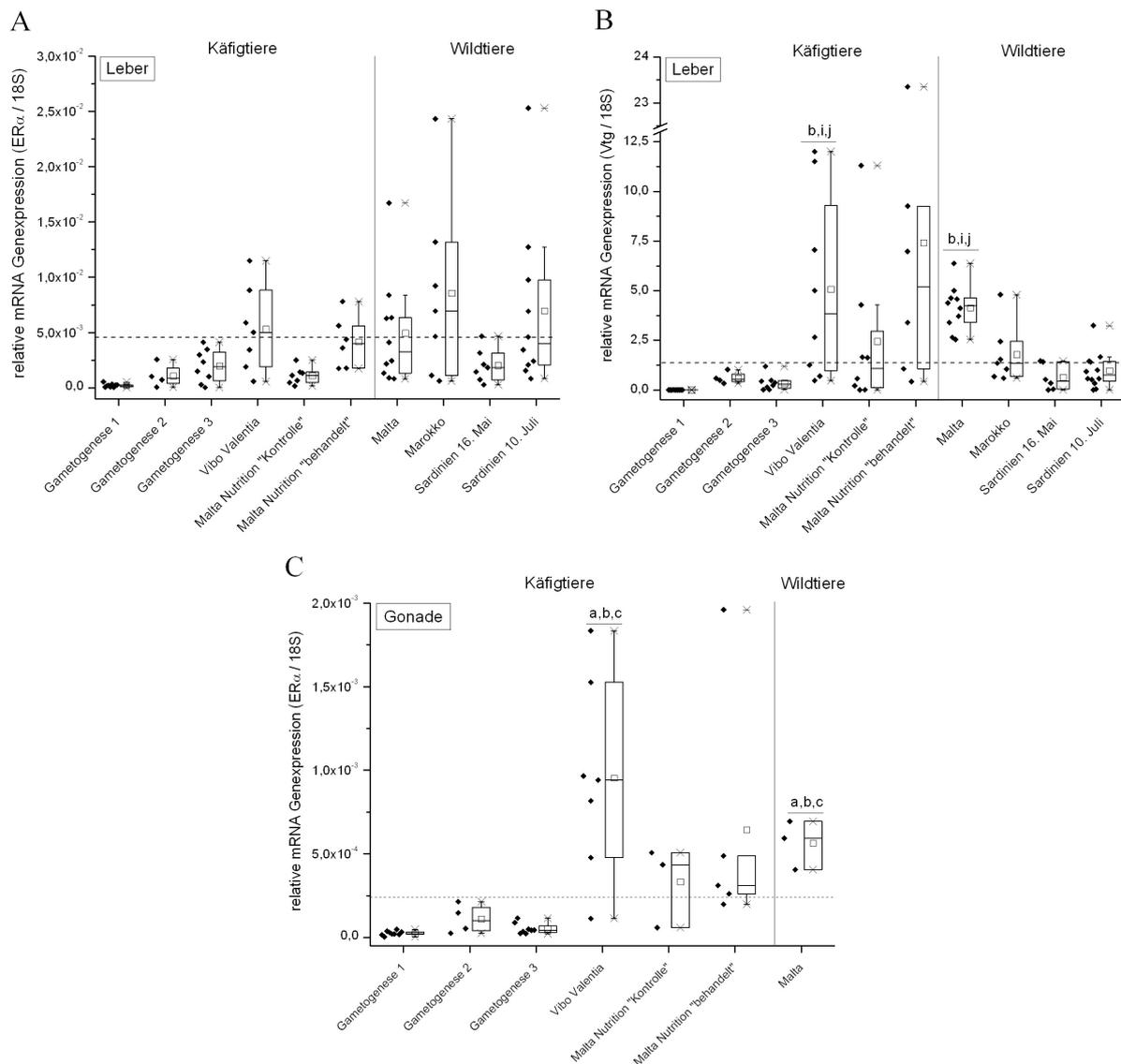


Abb.3.22: Vergleich der Genexpression von ER α aus Leber und Gonade (A & C) sowie die Genexpression von Vtg aus der Leber (B) von weiblichen Käfig- und Wildbahn Thunfischen (*Thunnus thynnus*) von verschiedenen Standorten rund ums Mittelmeer. Sämtliche Proben (bis auf Gametogenese 1 und 3) wurden während der Laichzeit der Thunfische im Mittelmeer (Ende Mai bis Ende Juni) genommen. Kürzel a, b und c (a = Gametogenese 1, usw.) beschreiben den signifikanten Unterschied des jeweiligen Datensatzes ($p \leq 0,05$) zu dem durch den Buchstaben benannten.

Durchschnittlich wiesen männliche Wildtiere eine 8-fach höhere ER α Expression im Lebergewebe auf als es männliche Käfigtiere taten. Im Mittel hatten diese Männchen eine Länge von 163 ± 40 cm, männliche Käfigtiere waren hingegen 22 cm kürzer (141 ± 6 cm), was eine unterschiedliche Altersstruktur der beiden Gruppen vermuten ließ. Generell wiesen männliche Tiere im Vergleich zu weiblichen Tieren eine 30-fach geringere Expressionsrate für ER α im Lebergewebe auf. Zudem zeigte sich bei ihnen eine klare Abhängigkeit der Genexpression von ER α in Bezug zu ihrer Körperlänge (Alter). Dieses schien aber erst ab einer Körperlänge von über 150 cm der Fall zu sein. Fische mit geringerer Länge (120 cm bis 150 cm) wiesen keine Korrelation zur ER α Expression auf (Abb.3.23 B, $r = 0,21$). Für weibliche Wildbahn- und Käfigtiere (Abb.3.23 A) sowie für männliche Tiere unter einer Körperlänge von 150 cm galt dieser Trend nicht.

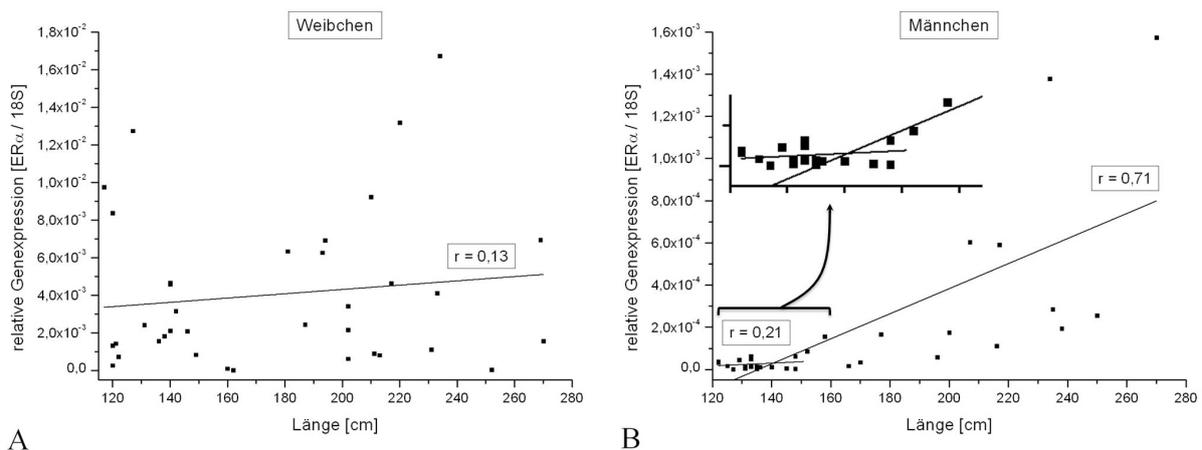


Abb.3.23: Korrelation der relativen Genexpression von ER α mit der Länge (cm) von weiblichen **A)** und männlichen **B)** Wildtieren ausgedrückt als Korrelationskoeffizient (r). Eine Datenreihe des jeweiligen Datenpaares wurde hierzu, ohne dabei die Zuordnung der Wertepaare zu verändern, der Größe nach sortiert und anschließend gegeneinander aufgetragen.

Um einen eventuellen kausalen Zusammenhang der in dieser Arbeit bestimmten Parameter zu untersuchen, wurden diese in Paaren, wie in Abbildung 3.24 zu sehen ist, gegenübergestellt und ihre Korrelation zueinander bestimmt. Da eine Korrelation aber nicht zwangsläufig einen Kausalität zweier Wertegruppen zueinander erklärt, sondern in erster Linie ohne weiteres Fachwissen und Deutungen nur deren Zusammenhang beschreibt, soll hier erst einmal nur der Begriff „Korrelation“ verwendet werden. Für die Berechnung des Korrelationskoeffizienten muss die Struktur der vorliegenden Daten zuerst analysiert werden. Liegen normalverteilte Daten vor, so kann die Berechnung von r nach Pearson angewandt werden. Im Fall von nicht normalen Verteilungen führt der Korrelationskoeffizient nach Pearson zu falschen Ergebnissen. Tritt diese Situation auf, sollte der Spearman'schen Rangkorrelationstest verwendet werden.

Allen so verglichenen Parametern konnte eine positive Korrelation zueinander nachgewiesen werden, welche unterschiedlich stark ausgeprägt war. So zeigten die beiden Expressionsmuster der Gene Vtg und ZrP sowie die Produkte beider Gene auf Proteinebene, einen klaren Trend. Der Anstieg des einen Faktors bedingte ebenfalls eine Erhöhung des anderen ($r = 0,81$ bzw. $0,82$, Abb.3.24 A-B). Einen geringeren r -Wert erzielten die Vergleiche in Abbildung 3.24 C-D dargestellten Wertegruppen ($r = 0,61$ bzw. $0,66$). Da hier Wertepaare verglichen wurden, deren Bildungsorte in unterschiedlichen Ebenen der HPGL-Achse liegen (z.B. ER α und das Proteine Vtg), ist die geringere Korrelation dieser zueinander erklärbar. Denn es können noch andere Faktoren an deren Regulation beteiligt sein, bis es letztendlich zu ihrer Synthese kommt.

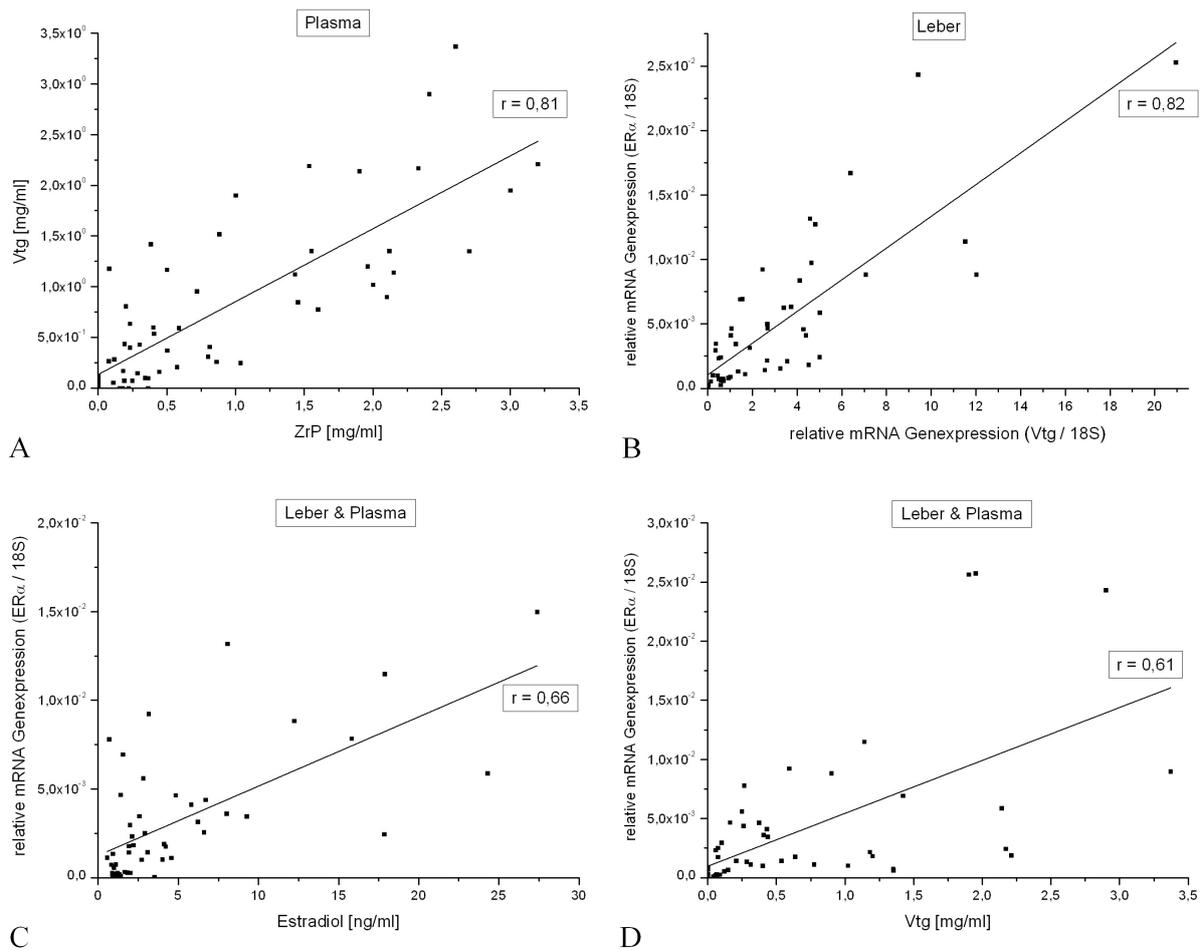


Abb.3.24: Korrelation der in dieser Arbeit bestimmten Parameter aus weiblichen Fischen zueinander, ausgedrückt als Korrelationskoeffizient (r). Eine Datenreihe des jeweiligen Datenpaares wurde hierzu, ohne dabei die Zuordnung der Wertepaare zu verändern, der Größe nach sortiert und gegeneinander aufgetragen.

3.4.3 Ernährung

Das Arbeitsprogramm Ernährung beschäftigte sich mit der Fragestellung, in wieweit sich eine unterschiedliche Fütterungsweise der Thunfische auf ihren reproduktiven Status bzw. auf die verschiedenen physiologischen Parameter auswirkt. Zu diesem Zweck wurden insgesamt 35 Thunfische (19 Kontrolltiere und 16 Versuchstiere), die zuvor schon 1 Jahr in Käfigen gehalten wurden, in zwei Käfige separiert und mit unterschiedlichem Futter über einen Zeitraum von 3 Monaten vor Laichzeitbeginn (Anfang April bis Ende Juni) gefüttert. Während der Separierung der zwei Gruppen wurde von den Angestellten der Fischfarm darauf geachtet, dass die Tiere der Gruppen ungefähr gleiche Größe und Gewicht hatten. Kontrolltiere erhielten während dieses Zeitraums nur Makrelen, während Versuchstiere ein höherwertiges Futter, einen Mix aus Makrelen, Kalmaren und einem Vitaminzusatz (Paprikapulver), erhielten.

Schon das Gewicht der beiden Gruppen wies im Mittel, nach Ablauf der Versuchsdauer, einen deutlichen Unterschied auf. Während weibliche Kontrolltiere im Mittel $64,3 \pm 21,6$ kg wogen, brachten die Versuchstiere 24 kg mehr auf die Waage ($88,2 \pm 18,8$ kg). Es zeigte sich im weiteren Verlauf der hier durchgeführten Analysen, dass die besser gefütterte Gruppe im Mittel, auch wenn keine signifikan-

ten Unterschiede auftraten, eindeutig höhere Werte aufwies. Dies zeigte sich in sämtlich gemessenen Parametern. So war der Anteil der Gonade am Gesamtkörpergewicht (GSI) bei behandelten Tieren ($2,7 \pm 1,6 \%$) um 1 Prozent, im Vergleich zu den Kontrolltieren ($1,7 \pm 0,6 \%$), erhöht.

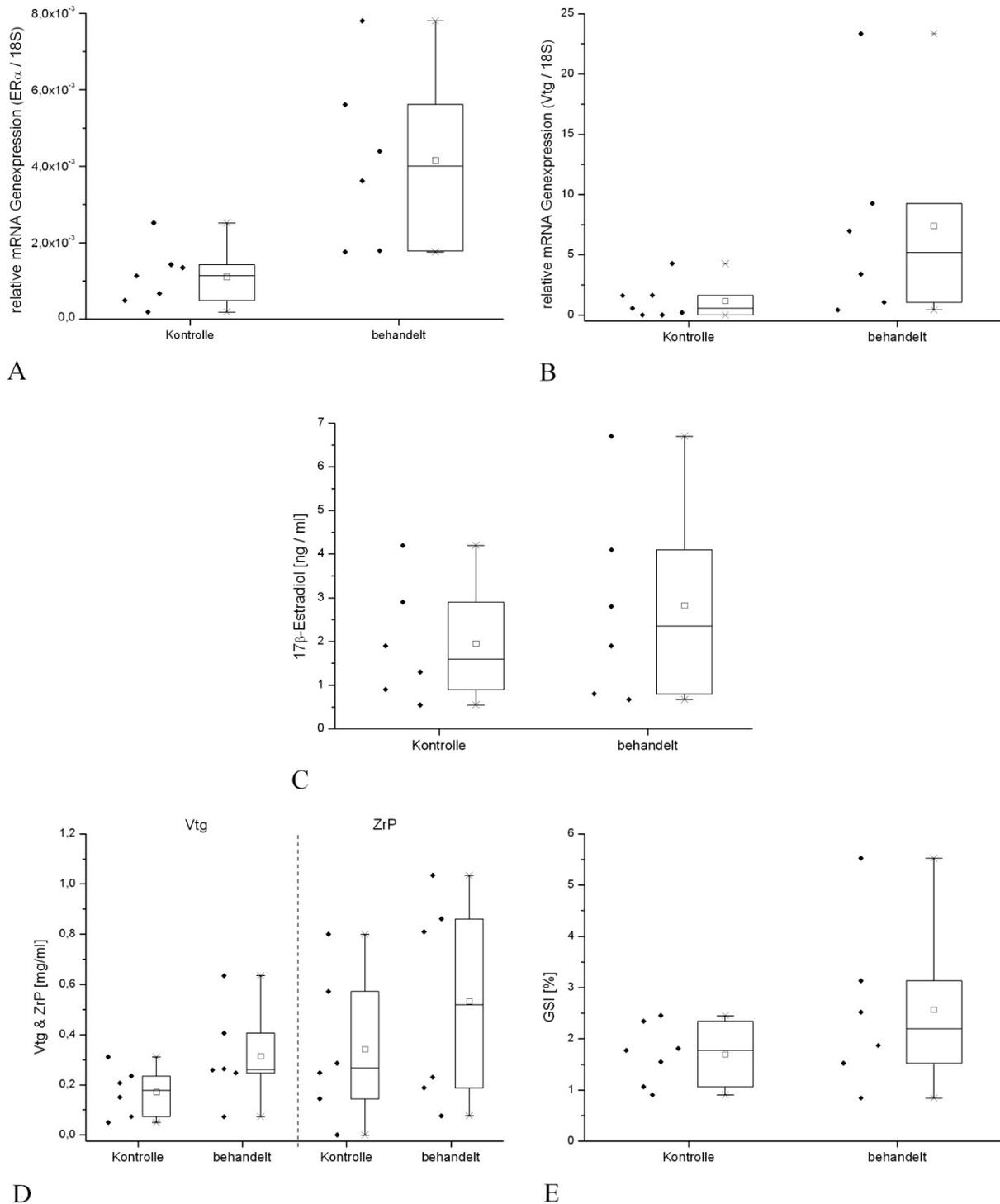


Abb.3.25: Ernährungsstudie an adulten, weiblichen Thunfischen (*Thunnus thynnus*) und ihre Auswertung anhand der unter **A-E**) dargestellten Parameter. Kontrolltieren wurden über einen Zeitraum von 3 Monaten nur Makrelen verfüttert, wohingegen die Versuchstiere (behandelt) mit einer höherwertigen Diät (Makrele, Kalmar und Vitaminzusatz) gefüttert wurden. Es konnte keine statistisch belegbaren Unterschiede bestimmt werden.

Die Plasmakonzentrationen der Proteine Vtg und ZrP waren in der Versuchsgruppe (Vtg: $0,31 \pm 0,18$ mg/ml; ZrP: $0,53 \pm 0,41$ mg/ml) fast doppelt so hoch wie in der Kontrollgruppe (Vtg: $0,17 \pm 0,09$ mg/ml; ZrP: $0,34 \pm 0,29$ mg/ml), sind aber für Fische dieser Altersklasse generell zu niedrig. Für die Expression der Gene ER α und Vtg aus Lebergewebe konnten 4fache bzw. 6fache Erhöhungen, für ER α aus der Gonade nur eine 2fache, festgestellt werden. Trotz dieser im Mittel vorzufindenden Unterschiede, konnte ein statistisch signifikanter Unterschied innerhalb der verschiedenen Parameter nicht bestimmt werden.

Ein Vergleich der in dieser Studie ermittelten Werte mit denen von Wild- oder anderen Käfigtieren, wie schon in den Abbildungen 3.21 & 3.22 abgebildet, ergab die folgenden Auffälligkeiten. Die Genexpressionsraten der Gene ER α und Vtg aus der Leber zeigte in Tieren, die die bessere Diät erhielten, eine eindeutige Annäherung an die Werte von laichbereiten Tieren (Vibo Valentia). Gleiches galt für ihre GSI-Werte, die ebenfalls erhöht waren. Gänzlich anders verhielt es sich bei den Plasmaproteinen Vtg und ZrP und für das Steroidhormon 17 β -Estradiol. Hier konnten weder Kontrolltiere noch behandelte Tiere ähnlich hohe Plasmakonzentrationen erreichen, wie es laichbereite Fische oder Wildtiere taten.

3.4.4 Juvenile Thunfische

Um die Entwicklung in Gefangenschaft lebender Thunfische genauer charakterisieren zu können, wurden am 7. Juli 2009 zwei Gruppen (je $n = 10$) juveniler Thunfische unterschiedlicher Größe ($8,67 \pm 1,1$ kg & $19,38 \pm 2,4$ kg) in Kroatien beprobt. Die Fische wurden zuvor im Mittelmeer gefangen und anschließend in der Drvenik Thunfischfarm (Inseln Drevnik & Kluda, nahe Split) gehalten. Nach einer Analyse italienischer Kollegen, hatte die Gruppe kleinerer Tiere ein Alter von zwei Jahren, die größeren ein Alter von drei Jahren. Dies spiegelte sich auch in ihrer Körperlänge wieder. Während Fische der zweijährigen Altersgruppe Längen zwischen 79 und 90 cm hatten, variierte die der dreijährigen Tiere zwischen 98 und 108 cm.

Verglich man die beiden Altersgruppen miteinander, so konnte für weibliche Tiere ein klarer signifikanter Anstieg der Genexpression im Lebergewebe für ER α (5fach) und der GSI-Werte (3fach) innerhalb der dreijährigen Gruppe festgestellt werden (Abb.3.26 A & D). Für männliche Tiere galt dies nicht. Die Unterschiede im 17 β -Estradiolgehalt und der Expression des Vtg Gens waren bei weiblichen Tieren nur in den gemittelten Werten der Gruppen zu erkennen, diese zeigten aber keine Signifikanz (Abb.3.26 B & C). Generell fallen sämtliche Meßparameter sehr niedrig aus, nahe einem evtl. noch zu postulierenden Schwellenwert (background level) der minimalen Produktion der verschiedenen Faktoren in juvenilen Thunfischen, was allerdings für juvenile Tiere eher charakteristisch ist und ihre reproduktive Entwicklung klar zeigt. Während die Gruppe der zweijährigen weiblichen Tiere keine Korrelation ihrer einzelnen Parameter zueinander zeigte, war dies innerhalb der dreijährigen Gruppe der Fall. Hier konnten positive Abhängigkeiten der Parameter (ER α /Vtg und 17 β -Estradiol/ER α) zueinander, wie es auch in adulten Tieren der Fall war, beobachtet werden. Hatten zweijährige weibliche Fische in ihrer ER α Expression und in ihren GSI-Werten noch gleich Level wie männ-

lichen Tieren derselben Altersklasse, konnte in den dreijährigen weiblichen Tieren eine deutliche Entwicklung der Genexpression um den Faktor 3 gezeigt werden. Ein Vergleich dieser juvenilen weiblichen Thunfische mit adulten Tieren aus der Vorlaichzeit erbrachte eine eindeutige Tendenz. Zeigten zweijährige weibliche Tiere noch ein 11fach geringere Expressionsrate für ER α , war diese bei 3jäh-

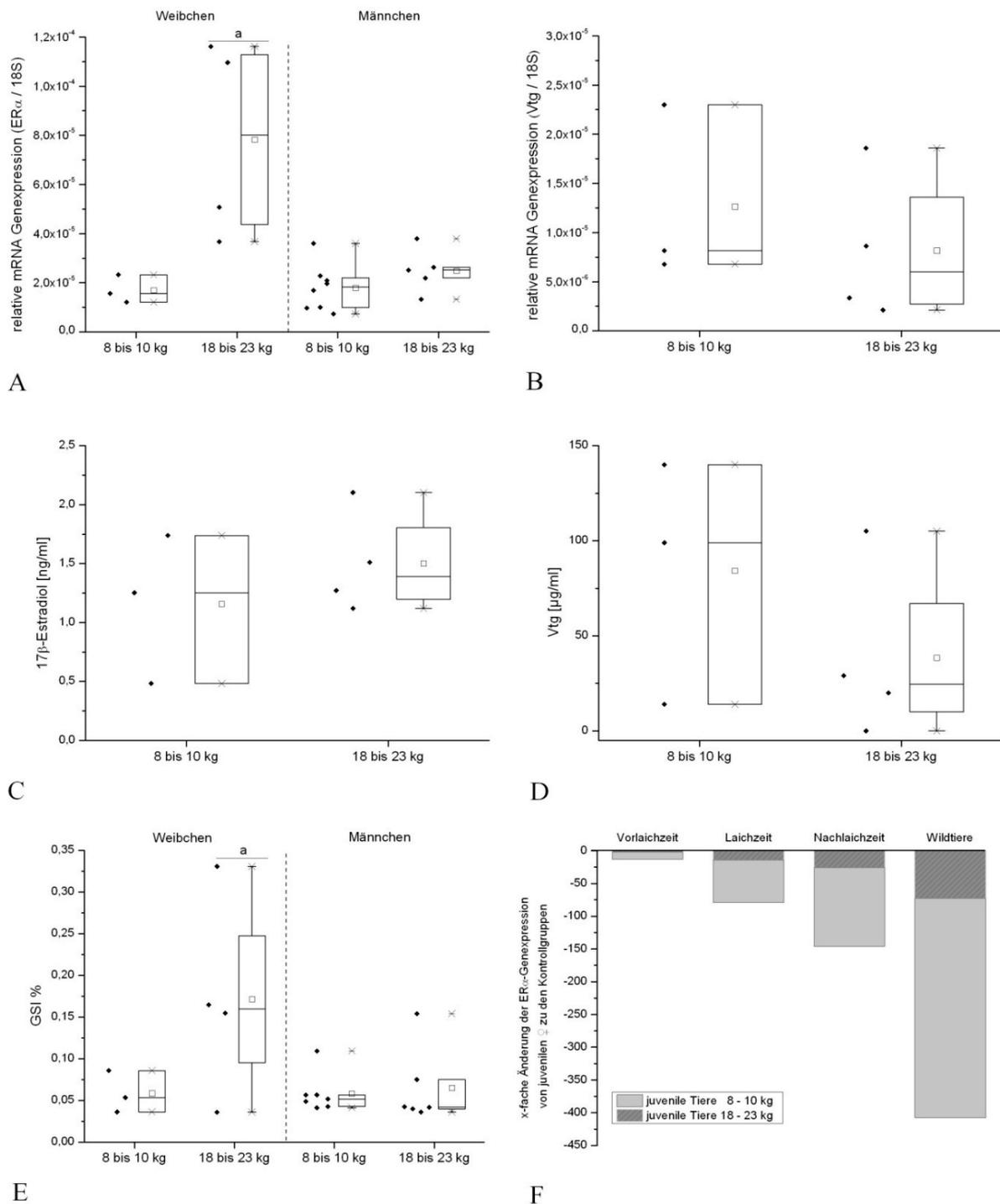


Abb.3.26: A-E) Studie zur Genexpression von ER α und Vtg aus Lebergewebe, sowie die Plasmakonzentrationen des Steroidhormons 17 β -Estradiol und die des Proteins Vitellogenins von juvenilen weiblichen und männlichen Thunfischen aus Gefangenschaft. Tiere der 8-10 kg Klasse hatten ein Alter von zwei Jahren, während die der 18-23 kg Klasse ein Alter von drei Jahren besaßen. F) Vergleich der Genexpression von ER α für zwei- und dreijährige weibliche Fische zu den jeweiligen Kontrollgruppen (Gametogenese 1-3 & Wildtiere).

igen Tieren nur noch 2fach geringer (Abb.3.26 F). Die Expressionsrate des Vtg Gens teilte diesen Verlauf nicht. Es konnte keine Annäherung der Messwerte von 2 oder 3 jährigen juvenilen Fischen an Werte von adulten, aus der Vorlaichzeit stammenden, Tieren beobachtet werden. Verglichen mit diesen hatten juvenile Weibchen immer noch eine stark erniedrigte Expression des Vtg-Gens um den Faktor 120.

3.5 Hormonimplantate

Die in dieser Arbeit verwendeten Hormonimplantate stellen, bezüglich ihrer Herstellungsweise und ihres Anwendungsbereiches, eine Neu- bzw. Weiterentwicklung dar. Die Anwendung basiert auf einer bereits publizierten Methode (Mylonas *et al.*, 2007) in der die Implantate allerdings mit einem anderen Hormon gefertigt wurden. Es sollten so neue Erkenntnisse über die Injektion mit dem Steroidhormon 17β -Estradiol gewonnen werden. Deswegen mussten die im Implantat verarbeiteten Komponenten (BSA, Inulin und Hormon) neu aufeinander abgestimmt werden, um eine zufriedenstellende und den Umständen angepasste Langzeitabgaberate des Hormons zu erreichen. Ziel war es eine adäquate Hormonkonzentration im Blutkreislauf des Versuchstieres einstellen zu können, die auch über mehrere Tage/Wochen aufrecht erhalten werden kann, um somit den reproduktiven Zyklus der Tiere kontrollieren bzw. beeinflussen zu können.

3.5.1 Entwicklungsarbeit für die Herstellung

Die Herstellung der Implantate fand zuerst nach der Methode beschrieben in Mylonas *et al.* (2007) statt. Es zeigte sich aber schnell, dass diese in einigen Arbeitsschritten verbessert werden musste, um eine effizientere Ausbeute an Implantaten, ohne Abfallprodukte, zu erzielen. Wie aus Abbildung 3.27 eindeutig zu erkennen ist, unterschieden sich beide Methoden eindeutig in ihrer Effizienz. Während nach der veralteten Methodik sehr viel Abfallprodukt nach dem finalen Ausstanzen zu verzeichnen war, konnte nach der neuen Methode fast 100 % der gegossenen Implantatmasse genutzt werden.

Ein weiteres Problem bestand zu Beginn in der nicht homogenen Struktur der Implantate nach Evaporation des Lösungsmittels. Es konnte durch 3D-Computertomographie (3D-CT) eindeutig gezeigt werden, dass es zu einer Bildung von Lufteinschlüssen während des Aushärtungsprozesses kam. Nach der Überarbeitung der Schritte für die Erstellung des Elvax-/Hormon-/Inulin-/BSA-Gemisches und dem nachfolgenden Schrumpfungsprozess konnten hiernach sehr zufriedenstellende Ergebnisse erreicht werden, die ebenfalls durch 3D-CT sichtbar gemacht werden konnten. Hauptverbesserungspunkte lagen in der Herstellung eines homogenen und in Dichlormethan gut vermengbaren Gemisches, was durch Lyophilisation der einzelnen Bestandteile erreicht wurde, und in dem langsamen herunterkühlen der erstarrten Implantatmasse (Abb.3.27 C) durch eine Kühlkaskade. Das Ergebnis hieraus waren wohl geformte zylindrische Implantatstücke (Abb.3.27 D) mit einer Länge von 2 cm und einem Durchmesser von 3 mm, die je nach zuvor eingesetzter Hormonmenge unterschiedliche Hormonkonzentrationen enthielten. Diese war durch Portionierung der Stücke in weitere kleinere Exemplare noch weiter einstellbar, so dass man bei bekanntem Gewicht der Versuchstiere die ge-

wünschte 17β -Estradiolkonzentration pro kg Körpergewicht exakt einstellen konnte. Für die verschiedenen *in-vitro* Studien, die innerhalb dieser Arbeit durchgeführt wurden, kamen Hormonimplantate mit einer finalen 17β -Estradiolkonzentration von 5 bzw. 10 mg/kg Körpergewicht zum Einsatz.

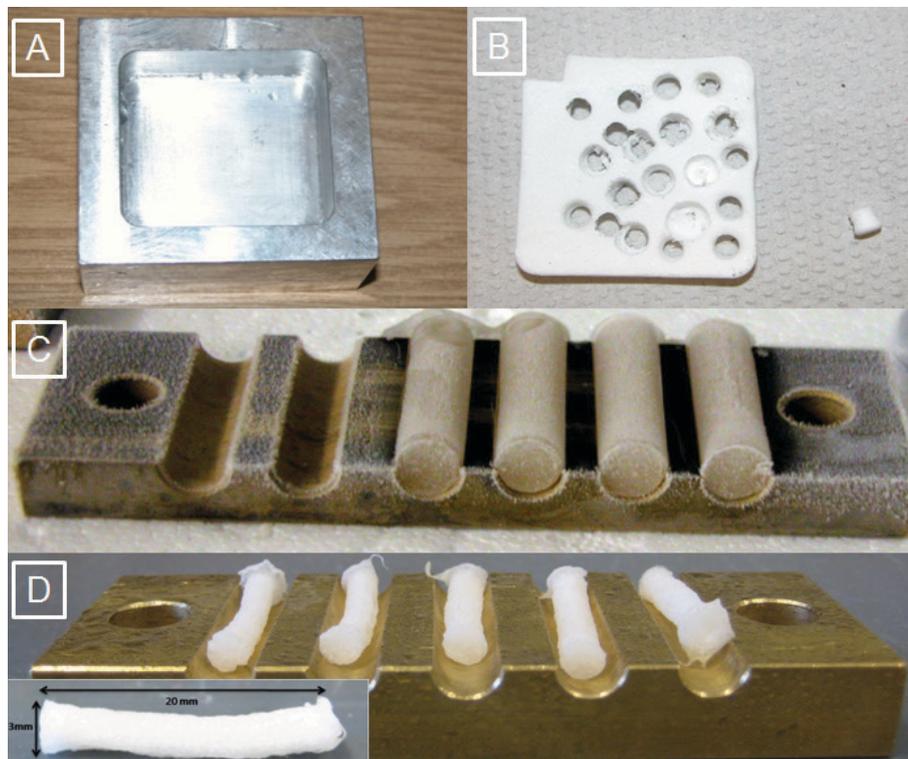


Abb.3.27: A-B) Gießform für die Herstellung des Implantatblocks, aus dem die Implantate nach Aushärtung ausgestanzt wurden (*alte Methode*). C) Erster Implantat-Guss nach dem Erstarren des Elvax-/Hormon-/Inulin-/BSA-Gemisches bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 20 min. D) Geschrunpfte Implantatstücke (Länge:2 cm, Ø 3 mm) durch Evaporation des Dichlormethans nach 48 h bei $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (verbesserte *neue Methode*).

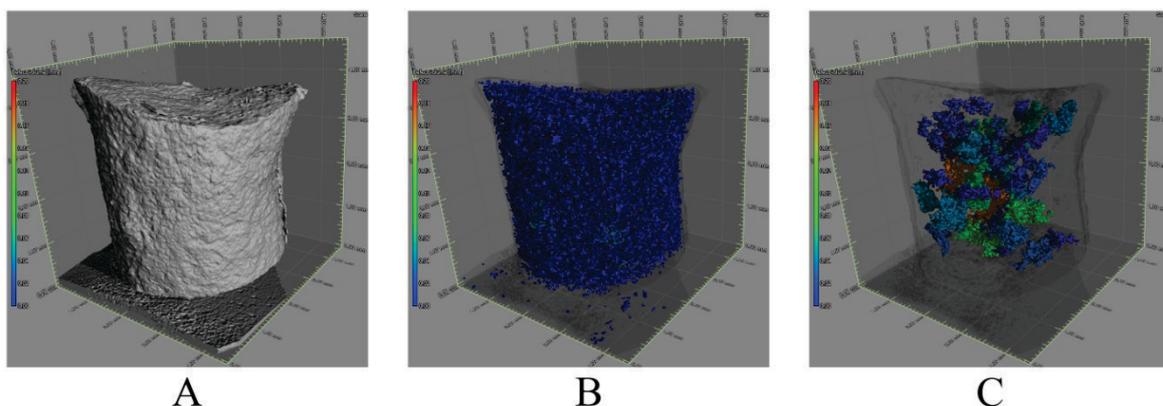


Abb.3.28: 3D-CT für Implantate alter Herstellungsart (Skala von 0,01 bis 0,20 mm^3). A) Äußere Struktur eines Implantats mit den Abmessungen (H:4mm, Ø : 4 mm) B) Innere Struktur des Implantats, wobei der Fokus hier auf sehr kleinen, oberflächlichen Poren ($\leq 0,02\text{ mm}^3$) liegt. C) Verteilung größerer Luftsinschlüsse innerhalb des Implantats, kleinere wie in B) wurden weggefiltert.

Der Vergleich der drei Schnittebenen nach der Auswertung des 3D-CT Scans (Abb.3.29) zeigte eindeutig größere Porositäten in Implantaten, die durch die alte Herstellungsweise produziert worden waren. Das generierte 3D-Bild des gesamten Implantats verdeutlicht den oben beschriebenen Sachverhalt noch einmal. Während neuere Hormonimplantate eine einheitliche, gleichverteilte Struktur geringer Einschlüsse aufwiesen, waren diese in alten Implantaten voluminöser und vermehrt anzutreffen. Bezogen auf ihr Gesamtvolumen nahmen hier die Lufteinschlüsse $\geq 0,01 \text{ mm}^3$ ca. 11 % ein, wobei hier größere Defektvolumen zwischen $0,10 - 0,35 \text{ mm}^3$ auftraten. Dies war in Implantaten, hergestellt nach neuer Methodik, nicht der Fall. Der Anteil lag hier bei einer maximalen Porengröße von $0,05 \text{ mm}^3$ nur unter 5 %.

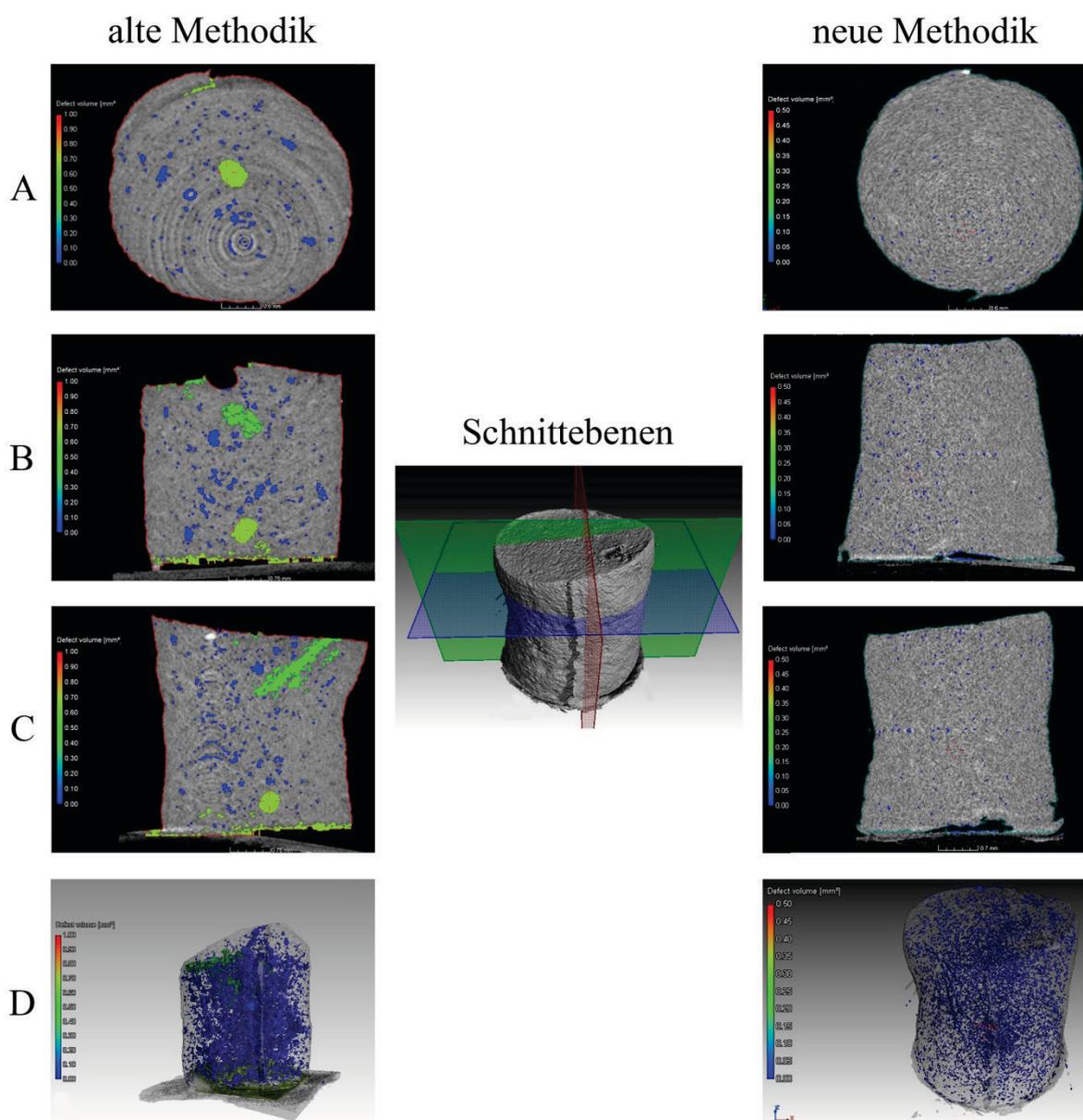


Abb.3.29: 3D-CT von Hormonimplantaten hergestellt nach alter und neuer Methodik. Die Farbskala (blau bis rot) gibt dabei das Volumen der Lufteinschlüsse in einer Skala ab $0,01$ bis $1,00 \text{ mm}^3$ in den drei Schnittebenen (A bis C) wieder. Teilabbildung **D** zeigt die räumliche Verteilung der Einschlüsse in einem 3D-Bild.

Durch die Änderung der Skala im Programm, wodurch nur noch Defektvolumen von 0,01 - 0,20 mm³ abgebildet wurden, konnten die Lufteinschlüsse älterer Implantate im 3D-Modell in ihrer räumlichen Anordnung noch detaillierter dargestellt werden (Abb.3.28) Poren $\geq 0,1\text{mm}^3$ sind generell eher im inneren des Implantats anzutreffen, während die äußere Schicht aus Einschlüssen $\leq 0,02\text{mm}^3$ besteht.

Desweiteren konnte durch die Analysen gezeigt werden, dass es während der Exposition der Implantate in den verschiedenen Medien zu keiner durch das CT nachweisbaren Veränderung in ihrer Struktur kam. Auch nach einer zwei monatigen Inkubation in 75 %igen Ethanol konnten in der Matrix keine Änderung der Porositäten festgestellt werden. Einziger Unterschied lag in der Härte bzw. Formbarkeit ihrer Grundstruktur, welche nach Inkubation eindeutig weicher und formbarer war. Dies deutete darauf hin, dass die Implantate gut Flüssigkeit aufnahmen bzw. von dieser gut durchdrungen wurden.

3.5.2 In-vitro Untersuchungen zur Hormonabgaberrate

Da aus der Literatur bekannt war, dass die Zusammensetzung der Komponenten im Implantate stark die Abgaberrate des Hormons beeinflusst, welches in die Matrix inkorporiert wird (Mylonas & Zohar, 2001 a), wurden vor den Tierversuchen Experimente angestellt die Abgaberrate durch die Kombination der Bestandteile BSA und Inulin sowie des Hormons 17 β -Estradiol zufriedenstellend einzustellen. Die 15 %ige (w/v) viskose Elvax-Lösung wurde hierzu mit den verschiedenen Anteilen an BSA, Inulin und 17 β -Estradiol versetzt um die entsprechenden prozentualen Konzentrationen an BSA/Inulin (je 5, 10 oder 25 %) im finalen Implantat einstellen zu können. Um in den *in-vitro* Versuchen keinem Trugschluss einer zu geringen Steroidabgaberrate zu erliegen, mussten die Medien und deren Volumina wohl überlegt gewählt werden. Steroidhormone gelten als hydrophobe Substanzen, ihre Löslichkeit unterscheidet sich stark zwischen wässrigen (1,5 $\mu\text{g/ml}$ bei 25 °C; Shareef *et al.*, 2006) und organischen Lösungsmitteln (z.B. Ethanol: 2,5 mg/ml; Cayman Chemical, 2008). Da es in diesem Schritt schwierig und zudem nicht unbedingt nötig war ein Medium zu finden, das den späteren Körperflüssigkeiten des Fisches in seiner Zusammensetzung ähnelt, wurde zum einen eine Ringerlösung, die zumindest der osmolaren Zusammensetzung des Fischblutes gleicht, und zum anderen eine 75 %ige Ethanolösung, die als organisches Lösungsmittel zu einer annähernden 100 %igen Steroidauslösung aus dem Implantat führen sollte, eingesetzt.

Die Hormonabgaberrate schwankte eindeutig zwischen den verschiedenen Implantaten mit unterschiedlichem BSA-/Inulingehalt (Abb.3.30 A). Höchstwerte von 45 $\mu\text{g/Tag}$ wurden bei einem BSA-/Inulingehalt von 25% erreicht. Im Mittel ergab sich hier eine Abgaberrate von $16 \pm 4,09\text{ }\mu\text{g/Tag}$ über eine Versuchsdauer von 20 Tagen. Die Hormonabgabe der beiden anderen Implantattypen war mit $13,9 \pm 4,4\text{ }\mu\text{g/Tag}$ und $7,7 \pm 1,2\text{ }\mu\text{g/Tag}$ geringer. Trotz der höchsten Abgabewerte von den 25 % Implantaten, erwiesen sich diese nicht als geeignet. Ein viel besserer 17 β -Estradiolabgabeverhalten zeigten die beiden anderen Typen (10 % & 5 %). Trotz geringeren mittleren Abgabewerten konnte bei

diesen eine kontinuierliche Abgabe über den gesamten Versuchszeitraum festgesellt werden. Ein ähnliches Bild zeigte sich auch während der Inkubation in 75 % Ethanol.

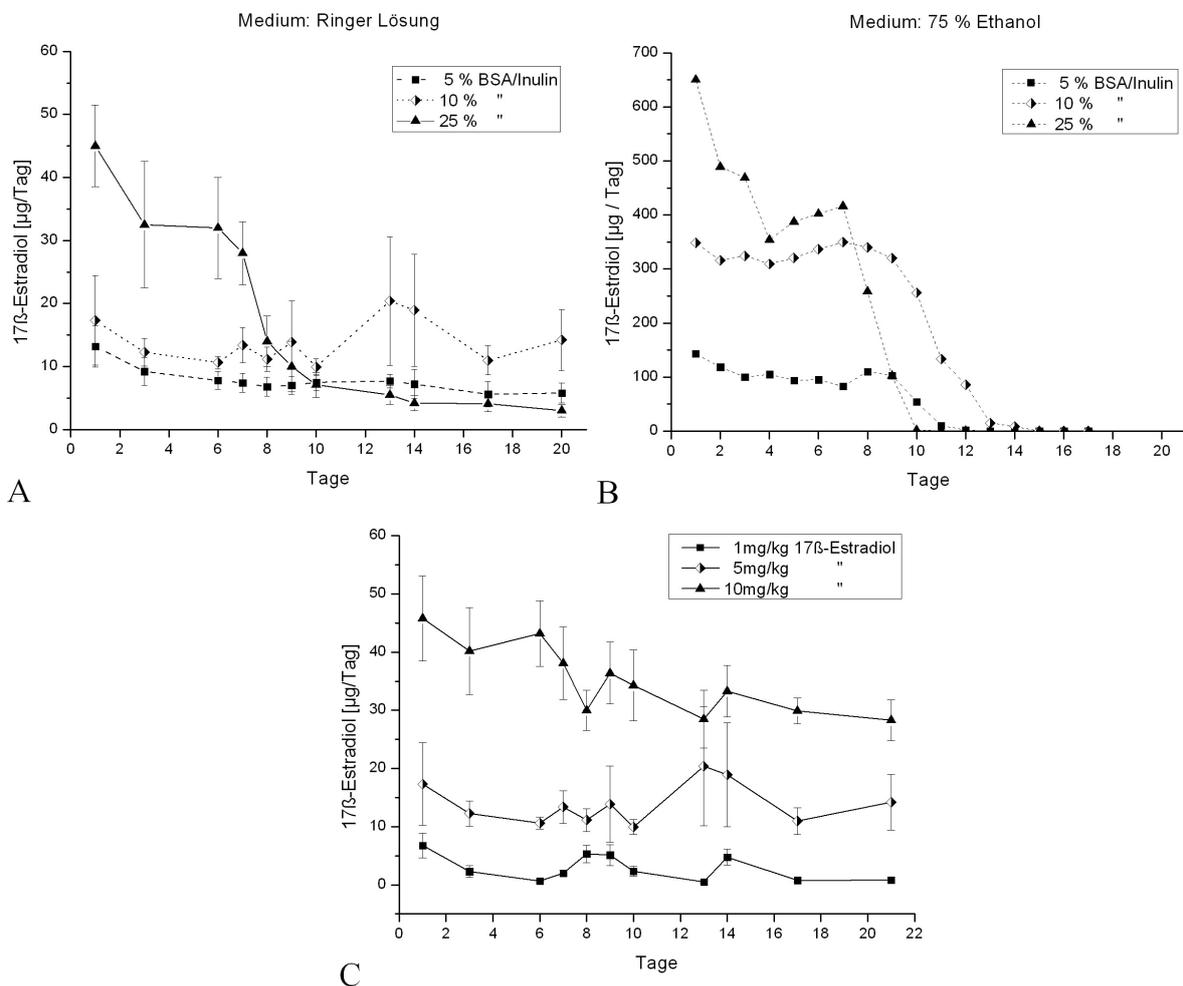


Abb.3.30: *In-vitro* Hormonabgaberate [$\mu\text{g}/\text{Tag}$, \pm SD] von 17 β -Estradiol Implantaten mit einem Hormongehalt von 5 mg, hergestellt mit unterschiedlichen Konzentrationen von BSA/Inulin (5 %, 10 % und 25 %). Implantate ($n = 3$) wurden **A**) in Fisch-Ringer (295 mOsm/l) und **B**) in einer 75 % Ethanollösung für je 24 h inkubiert. Nach Austausch des Mediums erfolgten weitere Inkubationszyklen bis zu einer Gesamtversuchsdauer von 20 Tage. **C**) Implantate hergestellt aus einem BSA-/Inulingehalt von 10 % und aus den verschiedenen 17 β -Estradiolkonzentrationen (1, 5 und 10 mg/kg) wurden, wie oben beschrieben, insgesamt über einen Zeitraum von 21 Tagen in Fisch-Ringer inkubiert.

Hierdurch sollte herausgefunden werden, wie die maximale Abgaberate der drei Implantattypen war (Abb.3.30 B). Mit einer kontinuierlichen und zugleich hohen 17 β -Estradiolausschüttung bis Tag 9 (\bar{x} : $329,5 \pm 14,6$ $\mu\text{g}/\text{Tag}$) zeichneten sich Implantate mittlerer BSA-/Inulin-Gehalte aus. Die maximale prozentuale Abgabe von 17 β -Estradiol unterschied sich bei 10 & 25 %igen Implantaten kaum. Beide gaben über den gesamten Zeitraum von 20 Tagen ca. 76 % (3800 μg von 5000 μg) des Hormons ab, während es nur ca. 30 % (1500 μg) bei 5 %igen Implantaten war.

Wählte man dementsprechend Implantate mit einem 10 % BSA-/Inulingehalt und unterschiedlichen 17 β -Estradiolkonzentrationen (1, 5 und 10 mg/kg) aus, konnten gleichbleibende Hormonabgaberraten

über einen Versuchszeitraum von 21 Tagen erreicht werden. Hierbei zeigten die verschiedenen Implantate je nach Hormondosis die erwarteten Abgabeneiveaus (Abb.3.30 C).

3.5.3 *In-vivo Untersuchungen zur Hormonabgaberate und -wirkung*

Um die genaue Abgabekinetik von Hormonimplantaten bestimmen zu können, muss dies *in-vivo* geschehen und kann nicht an Zellkulturen oder anderen künstlichen Systemen erfolgen, da diese nicht den gesamten Organismus eines Fisches widerspiegeln. Ohne die genaue Abgabekinetik der Implantate und die Auswirkungen dieser auf den Fisch zu kennen, können die Implantate später nicht am eigentlichen Versuchstier eingesetzt werden. Das so an den Modellfischen Niltilapia (*Oreochromis niloticus*) und Wolfsbarsch (*Dicentrarchus labrax*) gesammelte Wissen diente als Grundlage, um die Methode auf den ABFT übertragen zu können. Es sollte so untersucht werden, ob man die reproduktive Entwicklung juveniler Thunfische gezielt durch Hormongabe manipulieren bzw. reproduktionsphysiologische Parameter signifikant erhöhen kann.

3.5.3.1 *Tilapia (Oreochromis niloticus)*

Es wurden insgesamt 40 Niltilapien (♀: n= 24; 439 ± 202 g; ♂: n= 16; 625 ± 250 g) mit Hormonimplantaten (à 5 mg/Implantat ± ca. 10 mg/kg) versetzt und über einen maximalen Versuchszeitraum von 2 Wochen gehalten. Hierbei wurden die Experimente für die einzelnen Tag 0 (Kontrolle), 2, 5, 9 und 14 p.l. getrennt voneinander durchgeführt. Während dieser Versuche wurde den Fischen, wie in Abbildung 3.31 dargestellt, zu den verschiedenen Zeitpunkten Blut unter Narkose entnommen und auf die Konzentration an 17β-Estradiol per ELISA getestet.

Die Plasmaprofile für 17β-Estradiol wiesen bei beiden Geschlechtern im Vergleich zu Kontrolltieren (\bar{x} (♀): 15,0 ± 7,7 ng/ml; \bar{x} (♂): 10,1 ± 4,5 ng/ml) eine statistisch signifikante Erhöhung der Plasmawerte über den gesamten Versuchszeitraum auf (Abb.3.31 A-B). Im Mittel wurde eine 2,5 bis 3facher Anstieg des Hormonlevels bis zu 9 Tage p.l. erreicht. Dieser stieg im Mittel bei beiden Geschlechtern auf das ca. 6fache (\bar{x} (♀): 89,7 ± 45,5 ng/ml bzw. \bar{x} (♂): 58,3 ± 7,1 ng/ml) während der Tage 11 bzw. 14 p.l. an.

Mit zunehmender Dauer der 17β-Estradiol Exposition nahm der Anteil der Gonade am Gesamtkörpergewicht (GSI, Abb.3.31 D) bei weiblichen Tieren, verglichen mit Kontrolltieren (\bar{x} : 2,3 ± 0,46 %) ab Tag 5 p.l. (\bar{x} : 3,1 ± 0,30 %), signifikant zu. Nach 14 Tagen p.l. wurde ein mittlerer maximaler GSI-Wert von 3,7 ± 0,17 % erreicht.

Durch die Extraktion des nach den jeweiligen Inkubationstagen (2, 5, 9 und 14) in den Implantaten (je n = 4) zurückgebliebenen 17β-Estradiol (siehe Abschnitt 2.10.3), konnte die genau Abgabe des Hormons an die Fische in den vier verschiedenen Gruppen bestimmt werden (Abb.3.31 C). Während der gesamten Versuchsdauer ergab sich so eine kontinuierlich steigende 17β-Estradiolabgabe, von 3,2 ± 0,6 % an Tag 2 bis zu 18 ± 3,6 % an Tag 14, welche, wie oben schon beschrieben, zu einem erhöhten Hormonlevel im Blutplasma der Tilapien führte. Die *in-vivo* Abgaberate der Implantate lag damit zwi-

schen den im *in-vitro* Experiment simulierten extrem Bedingungen einer minimalen und maximalen Hormonabgaberate.

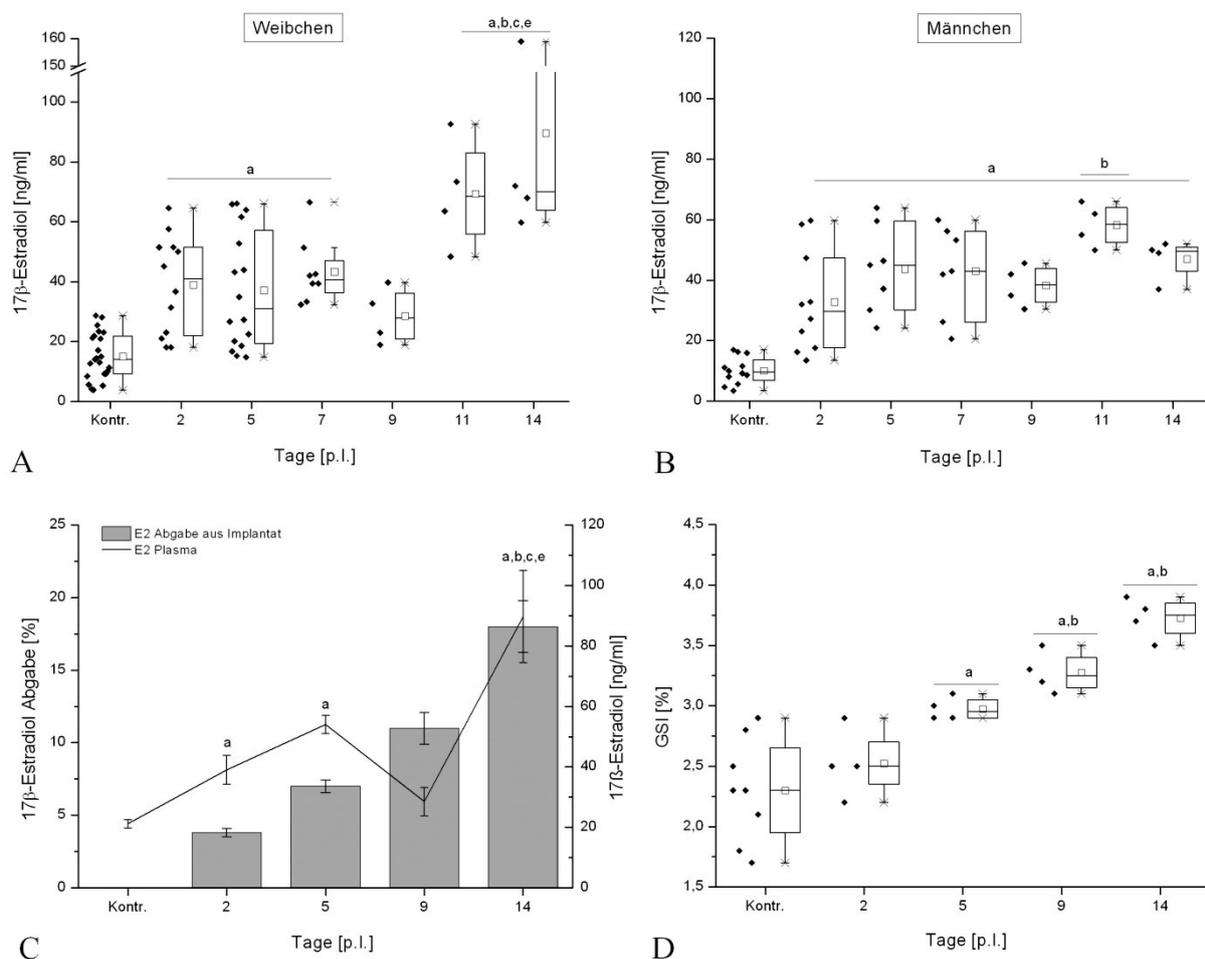


Abb.3.31: 17β-Estradiolkonzentrationen [ng/ml] im Plasma von **A**) weiblichen (n = 24) und **B**) männlichen (n = 16) Tilapien (*Oreochromis niloticus*) nach Injektion von Hormonimplantaten [5 mg/kg] zu den jeweiligen Tagen nach Injektion (p.I.). **C**) Hormonabgabewerte der oben eingesetzten Implantate in % (je n = 4), sowie die hierdurch erreichten 17β-Estradiolwerte im Plasma der weiblichen Tiere (± SD). **D**) Gonadosomatischer Index, der unter C abgebildeten Tiere, nach Hormoninduktion. Bemerkung: einzelne Punkte repräsentieren je ein Tier, Kürzel a-d (a = Kontr., b = Tag 2 p.I. usw.) beschreiben den signifikanten Unterschied des jeweiligen Datensatzes ($p \leq 0,05$) zu dem durch den Buchstaben benannten.

Einer Berechnung zufolge, in der man ein Blutvolumen der meisten Teleostee von 5-10 % des Körpergesamtgewichts (Brill *et al.*, 1998) annimmt, ist neben dem körpereigenen 17β-Estradiol (Kontrollwerte) weniger als 2 % des von den Implantaten abgegebenen Hormons in den weiblichen Fischen nachweisbar. Trotz dieser scheinbar geringen Dosis konnte das physiologische Plasmalevel von 17β-Estradiol in weiblichen und männlichen Tilapien signifikant, wie oben beschrieben, über den gesamten Versuchszeitraum erhöht werden.

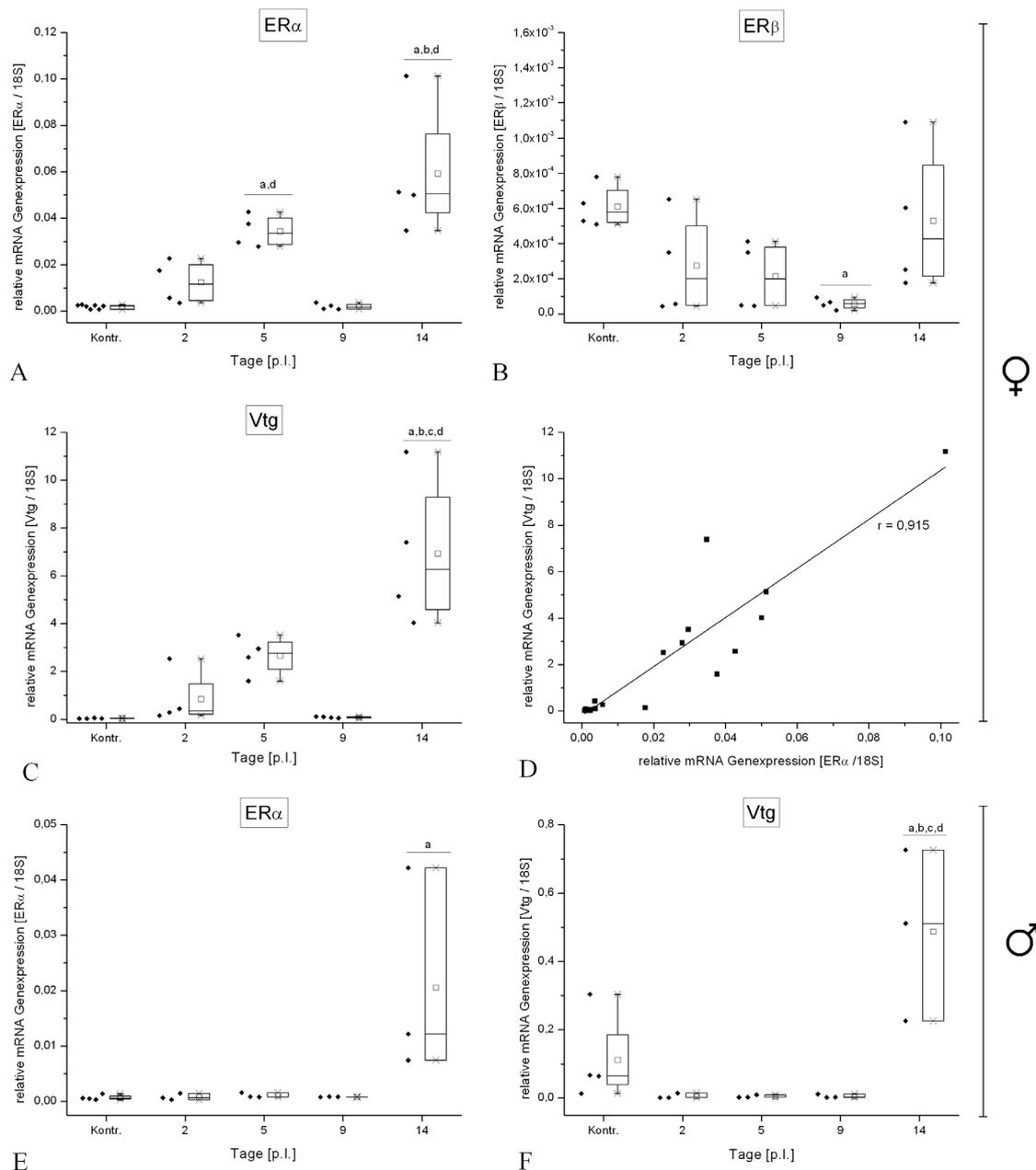


Abb.3.32: Genexpressionsanalyse von cDNA der Gene ER α , ER β und Vtg aus der Leber von weiblichen **A – C**) und von männlichen **E - F**) Tilapien (*Oreochromis niloticus*) nach Exposition von 17 β -Estradiol per Implantat an den verschiedenen Tagen nach Induktion. **D)** Korrelation der Genexpressionswerte von ER α zu Vtg in weiblichen Fischen. Die Expression des jeweiligen untersuchten Gens wurde mit der eines nicht regulierten Kontrollgens (18S rRNA) normalisiert und als Verhältnis (z.B. ER α /18S) in Form seiner effizienzkorrigierten und linearisierten Form ($E^{-\Delta C_t}$) dargestellt. Bemerkung: einzelne Punkte repräsentieren je ein Tier, Kürzel a-d (a = Kontr., b = Tag 2 p.I. usw.) beschreiben den signifikanten Unterschied des jeweiligen Datensatzes ($p \leq 0,05$) zu dem durch den Buchstaben benannten.

Neben der Bestimmung der Plasmawerte für 17 β -Estradiol wurden zudem in obigen Versuchen Genexpressionsanalysen für die Gene ER α , ER β und Vtg angestellt. Hierzu wurden zu den Tagen 2, 5, 9 und 14 p.I. Leberproben von weiblichen und männlichen Versuchstieren genommen und diese per Q-PCR auf die mengenmäßige Anwesenheit ihrer Genprodukte in Form ihrer mRNA analysiert. Abbildung 3.32 gibt die so gewonnen Ergebnisse wieder. Für die Genprodukte von ER α und Vtg ergab sich

während der Versuchsdauer eine kontinuierliche und signifikante Steigerung ihrer Genexpression. Zudem zeigten beide eine starke positive Korrelation ($r = 0,915$) zueinander (Abb.3.32 D). Im Vergleich zu Kontrollwerten erhöhte sich die ER α Expression im Mittel bei weiblichen Tieren an Tag 14 p.l. um den Faktor 30, während sich die Expression von Vtg um den Faktor 200 änderte. Die Genexpression von ER β korrelierte nicht mit der Dauer der Hormoninduktion. Es konnte eher der Trend zu einem reziproken Verlauf beobachtet werden. Im Mittel fand hier eine Abnahme der Expression bis zu Tag 9 p.l. statt, welcher als einziger nachweisbar unterschiedlich zu Kontrollwerten war (10 fach geringer als Kontrolle). Hiernach näherte sich die Expression an Tag 14 p.l. wieder dem Niveau der Kontrollwerte an (Abb.3.32 B)

Bei männlichen Tieren (Abb.3.32 E – F) konnten für beide Genprodukte keine signifikanten Änderungen bis zu Tag 9 p.l. festgestellt werden. Erst ab Tag 14 p.l. zeigte sich ein nachweisbarer Einfluss der Hormonbehandlung auf die Expression der beiden Gene in der Leber. Interessanter Weise war hier die maximale Steigerung der Genexpressionsrate für ER α identisch mit der bei weiblichen Tieren, wohingegen die Expression des Vtg Gens in Männchen nur 83fach erhöht vorlag (Vergleich zur Kontrolle) Weibliche Tiere zeigten so eine eindeutig stärkere maximale Reaktion (200fach vgl. zu 83fach) auf die Hormonbehandlung als es männliche Tiere taten. Auffällig bei weiblichen Tieren war der jeweils an Tag 9 p.l. auftretende Abfall der Expressionswerte für alle untersuchten Gene auf Kontrollwertlevel. Diese Beobachtung korrelierte mit einem ebenfalls wieder sinkenden Wert von 17 β -Estradiol im Plasma der Tiere an Tag 9 p.l. (Abb.3.31 A & C).

3.5.3.2 Wolfsbarsch (*Dicentrarchus labrax*)

Durch unsere maltesischen Kollegen konnten die 17 β -Estradiolimplantate auch an einem barschartigen Meeresfisch, dem Wolfsbarsch (*Dicentrarchus labrax*), ausgetestet werden. Insgesamt standen sieben weibliche Fische, die wegen Deformationen am Körper aus dem Zuchtbecken aussortiert worden waren, für diesen Teilversuch zur Verfügung. Den Tieren (780 ± 147 g) wurden Implantate mit einer Hormondosis von ca. 10 mg/kg an Tag 0 verabreicht. Um aus der geringen Tieranzahl die bestmöglichen Resultate zu erlangen, wurde während des Versuchszeitraumes von insgesamt 20 Tagen an den Tagen 0 (Kontrolle), 2, 6, 9, 13, 16 und an Tag 20 (p.l.) Proben (Leber und Gonade) von je einem Fisch genommen, so dass sich die Gesamtzahl im Laufe der Versuchsreihe sukzessive um ein Tier reduzierte. Somit stand für die Genexpressionsanalyse von ER α immer nur ein Tier pro Tag zur Verfügung. Blutproben wurden zu jeder Probennahme von den zuvor sedierten Tieren genommen. Die Analyse des Blutplasmas nach Hormoninduktion offenbarte, wie zuvor auch schon bei Tilapien, eine signifikante Erhöhung der 17 β -Estradiolkonzentration. Während Kontrolltiere Werte von $5,4 \pm 0,9$ ng/ml aufwiesen, erreichten induzierte Fische an Tag 6 p.l. ein maximales Level von $55,4 \pm 18,9$ ng/ml. Hiernach fiel die intrinsische Hormonkonzentration kontinuierlich ab, wies aber immer noch 3 fach erhöhte Werte von 15 ng/ml bei Versuchsende an Tag 20 p.l. auf. Ebenso wie die Hormonkonzentration stieg auch die Genexpression von ER α in den Versuchstieren an. Ein Vergleich der Kontrollwerte für Leber und Gonade erbrachte eine 13fach höhere Expressionsrate für ER α im Lebergewebe.

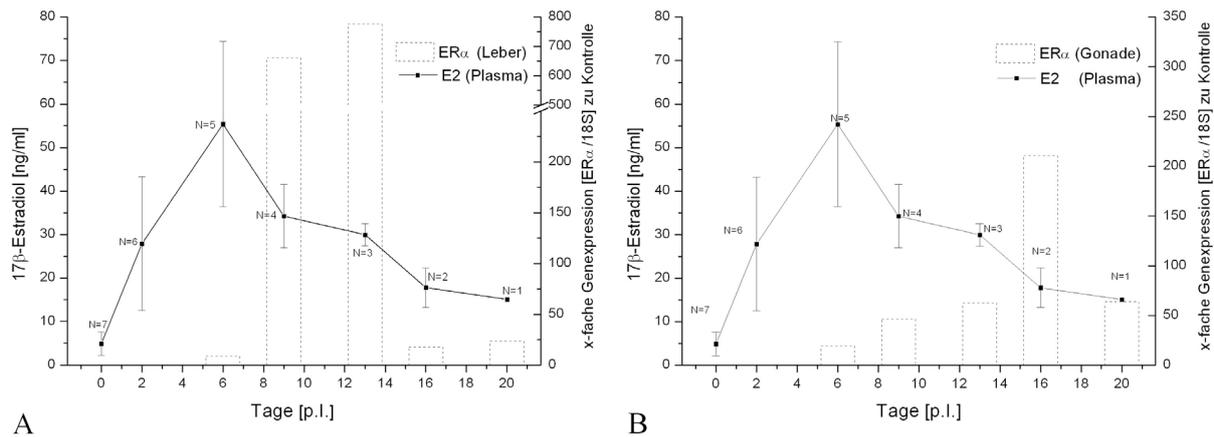


Abb. 3.33: Genexpressionsanalyse von cDNA des Genes ER α aus Leber **A**) und Gonade **B**) von sieben weiblichen Wolfsbarschen (*Dicentrarchus labrax*) nach Exposition von 17 β -Estradiol (10mg/kg) per Implantat über einen Zeitraum von 20 Tagen, sowie deren 17 β -Estradiolhormonlevel aus dem Plasma [ng/ml \pm SD] an den jeweiligen Tagen (p.I.).

Generell war die Genexpression von ER α in beiden Geweben zu jedem Zeitpunkt nach Induktion erhöht und zeigte in den Geweben einen ähnlichen Verlauf der Entwicklung, die in der Leber ab Tag 9 p.I. und 13 p.I. um ein vielfaches stärker ausfiel (maximal 750fach), als es in der Gonade der Fall war (maximal 210fach). In beiden Geweben wurde das Maximum der Genexpression für ER α erst erreicht, nachdem der 17 β -Estradiolspiegel im Blut der Tiere Höchstwerte erreicht hatte und schon wieder einen abnehmenden Verlauf aufwies.

3.5.3.3 Juvenile Thunfische (*Thunnus thynnus*)

Um die zuvor beschriebenen physiologischen Veränderungen, die durch eine 17 β -Estradiolinduktion hervorgerufen wurden, auch auf den atlantischen Blauflossenthunfisch übertragen zu können, wurden im Juni 2010 Versuche an diesen in Kroatien (Zadar, Kali Tuna) durchgeführt. Hier standen insgesamt 33 juvenile Thunfische für Induktionsexperimente zur Verfügung, welche ein Gewicht von $23 \pm 5,6$ kg (Mittelwert \pm SD) aufwiesen.

Wegen der einzigartigen Gelegenheit wurde hier nicht nur mit 17 β -Estradiol, sondern auch mit anderen Hormonen (GnRH α & Kiss-Peptid), induziert. Es standen so letztendlich für die Hormonbehandlung mit 17 β -Estradiol sieben Tiere zur Verfügung, wobei von diesen nur drei weibliche Fische waren. Wegen Problemen, die sich bei der Verabreichung der Implantate auftraten, welche auf die geringe Fischgröße und deren zu schnelles Schwimmen zurückzuführen waren, konnte insgesamt nur eine Induktionserfolgsquote von 44 % erreicht werden. Glücklicherweise war die Induktion mit 17 β -Estradiol am Erfolgreichsten. Es konnten fünf von sieben Tieren hormoninduziert werden, was einer Quote von 71,4 % entsprach. Das Geschlechterverhältnis der Kontrolltiere lag bei sechs Weibchen und fünf Männchen. Das Alter der Tiere wurde auf drei bis vier Jahre bestimmt. Folgende Abbildungen (Abb.3.34 & 3.35) geben die so gewonnenen Ergebnisse, die anhand der Proben (Blutplasma, Leber und Gonade) obiger Fische erhalten wurden, wieder.

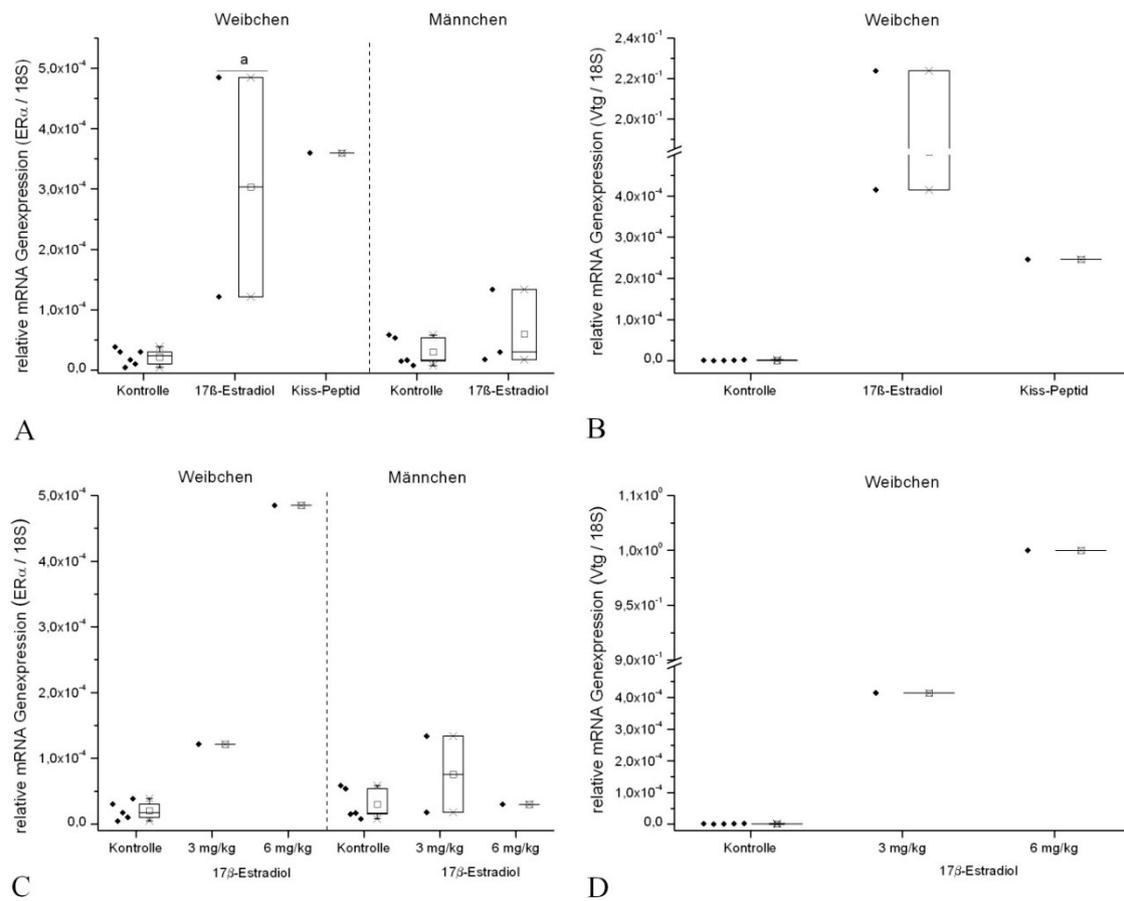


Abb.3.34: A-B) Genexpressionsanalyse von cDNA der Gene ER α und Vtg aus der Leber von weiblichen und männlichen Thunfischen (*Thunnus thynnus*) nach Exposition von 17 β -Estradiol und Kiss-Peptid per Implantat über einen Zeitraum von 21 Tagen. **C-D)** Genexpression der vorherigen Werte in Abhängigkeit zur Hormonkonzentration von 17 β -Estradiol (6mg/kg oder 3mg/kg). Die Expression des jeweiligen untersuchten Gens wurde mit der eines nicht regulierten Kontrollgens (18S-rRNA) normalisiert und als Verhältnis (z.B. ER α /18S) in Form seiner effizienzkorrigierten und linearisierten Form ($E^{-\Delta C_T}$) dargestellt. Bemerkung: einzelne Punkte repräsentieren je ein Tier, Kürzel a-d (a = Kontr., usw.) beschreiben den signifikanten Unterschied des jeweiligen Datensatzes ($p \leq 0,05$) zu dem durch den Buchstaben benannten.

Auch am Modellfisch Thunfisch (*Thunnus thynnus*) konnte durch Induktion mit dem Steroidhormon 17 β -Estradiol gleiche Tendenzen bezüglich der erhöhten Genexpression für die Gene ER α und Vtg festgestellt werden, wie es zuvor auch an Tilapien (*Oreochromis niloticus*) und Wolfsbarsch (*Dicentrarchus labrax*) gezeigt werden konnte. Die Exposition mit dem Hormon 17 β -Estradiol führte im Mittel zu einem 15fachen Anstieg der ER α -Genexpression in weiblichen Tieren, während das mit Kiss-Peptid induzierte weibliche Tier eine 18fach erhöhte Expression aufwies. Männliche Tiere zeigten hier keinen signifikanten Unterschied. Eine höhere Dosis an Hormon (3 mg/kg oder 6 mg/kg) führte bei den zwei weiblichen Tieren zu einer ebenfalls erhöhten Genexpression für beide untersuchten Gene (Abb. 3.34 C-D), wobei der Expressionshöchstwert beider Gene auch bei der stärksten Hormondosis vorzufinden war. Die Verabreichung von 17 β -Estradiol in einer Konzentration von 6 mg/kg führte dabei zu einem mehr als 1000fachen Anstieg des Genproduktes von Vtg. Eine Änderung der Genexpression für ER α im Gewebe der Gonade konnte nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Eine positive Korrelation der Parameter zueinander konnte auch hier wieder gezeigt werden.

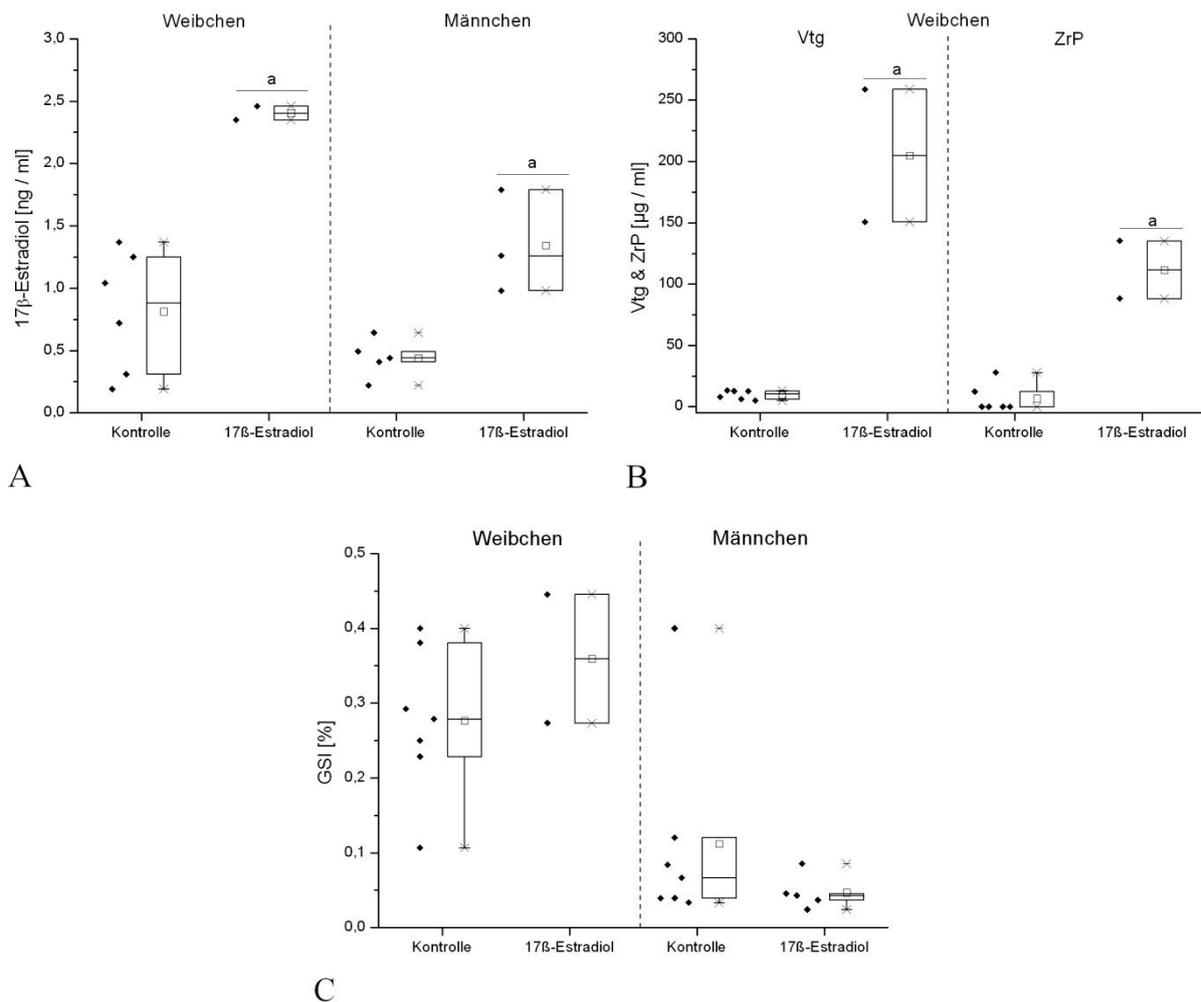


Abb.3.35: Physiologische Parameter von weiblichen und männlichen Thunfische nach 21 tägiger 17β-Estradiol-induktion im Vergleich zu Kontrolltieren. **A)** 17β-Estradiolkonzentration [ng/ml] und **B)** Vitellogenin- & Zona radiata Proteinkonzentration [µg/ml] im Plasma der weiblichen Versuchstiere. **C)** Gonadosomatischer Index in % (Anteil des Gonadengewichts am Gesamtkörpergewicht). Kürzel a-d (a = Kontr., usw.) beschreiben den signifikanten Unterschied des jeweiligen Datensatzes ($p \leq 0,05$) zu dem durch den Buchstaben benannten.

Waren die Expressionswerte der Gene ERα und Vtg erhöht, so lagen auch für die übrig bestimmten Parameter, wie die 17β-Estradiol- und die Proteinkonzentrationen von Vtg und ZrP, erhöhte Messwerte vor. Durch den Einsatz der Hormonimplantate konnte das Plasmahormonlevel in induzierten weiblichen Fischen nach 3 Wochen im Mittel von $0,82 \pm 0,72$ ng/ml (Kontrolle) auf $2,41 \pm 0,8$ ng/ml angehoben werden. Gleiche Tendenz galt für männliche Tiere (Abb.3.35 A). Die Proteine Vitellogenin und Zona radiata zeigten ebenfalls im Vergleich zu Kontrolltieren (\bar{x} Vtg: $9,7 \pm 3,8$ µg/ml; \bar{x} ZrP: $6,7 \pm 11,5$ µg/ml) erhöhte Werte in induzierten Weibchen (\bar{x} Vtg: 204 ± 77 µg/ml; \bar{x} ZrP: 112 ± 33 µg/ml), was eine 21- bzw. 16fache Erhöhung darstellte (Abb.3.35 B). Die Änderungen der oben beschriebenen physiologischen Parameter hatten keinen Einfluss auf den Gonadosomatischen Index der Tiere. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Männliche Tiere wiesen dabei allerdings einen deutlich niedrigeren mittleren GSI-Wert auf als es weibliche Tiere taten. (Abb.3.35 C).

Verglich man die Gruppen der juvenilen weiblichen Thunfische aus den beiden Arbeitsprogrammen, die in den Jahren 2009 (Kontrollgruppe: 2-3 Jahre alt) und 2010 (Hormoninduktion: 3-4 Jahre alt) während der Laichzeit adulter Tiere durchgeführt wurden, so konnte ein eindeutiger Unterschied in der gonadalen Reife der Tiere festgestellt werden (Abb.3.26 & Abb.3.35). Während die 3-4 Jahre alten Tiere GSI-Werte zeigten, die auch adulte Tiere in der Vor- oder Nachlaichzeit aufwiesen (Abb.3.25), konnte die Gruppe der jüngeren Tiere nur geringere Werte aufweisen. Generell wurde eine der Altersstruktur der Tiere erwartete Entwicklung ihrer Gonaden beobachtet. Betrachtete man die weiteren physiologischen Parameter wie das Blutlevel von 17β -Estradiol, die Konzentration des Proteins Vtg oder die Genexpression der Gene $ER\alpha$ und Vtg, konnte nur bei hormoninduzierten Fischen signifikante Unterschiede zu den anderen festgestellt werden. Kontrolltiere der Altersklasse von 3-4 Jahre zeigten keinen mit statistischer Sicherheit beweisbaren Unterschied in oben aufgezählten Parametern. Die durch Hormoninduktion bewirkte Erhöhung sämtlicher Parameter, reichte in Bereiche, die auch von adulten weiblichen Tieren aus Gametogenese 1 erreicht wurden. Diese Tiere waren allerdings im Schnitt 3 - 4 Jahre älter.

4 Diskussion

4.1 Phylogenetische Analyse und Charakterisierung von ER α des ABFT

Der erste ER, der in Fischen entdeckt wurde, war der ER α und stammte aus der Regenbogenforelle (Pakdel *et al.*, 1989). Mittlerweile wurde dieser in einer Vielzahl von anderen Fischarten nachgewiesen. Zudem konnten weitere Formen (ER β & ER γ) in diesen gefunden werden, welche vermutlich durch Polyploidie oder Genomduplikation in einem den heutigen aquatischen Vertebraten gemeinsamen Vorfahren entstanden sind (Wang *et al.*, 2005). Die Entdeckung multipler Formen der ER macht das Bestreben ihre Funktions- und Regulationsmechanismen aufzuklären besonders anspruchsvoll. Teleostee erfuhren eine weitere Duplikation ihres gesamten Genoms, das vor ca. 320-350 Millionen Jahre stattgefunden haben muss, und damit anders als bei Landwirbeltieren (Tetrapoden), in denen nach heutigem Wissensstand nur zwei dieser Ereignisse stattfanden. Deshalb besitzen diese auch nur zwei ER-Formen, nämlich ER α und ER β (Xu *et al.*, 2003). Die erst dadurch mögliche Vervielfachung von Genen wird als Grund angesehen, warum sich die Teleostee gegenüber anderen Fischklassen entwicklungsgeschichtlich so durchsetzen konnten. Durch die damit entstandenen eigentlich überflüssigen Gene bzw. Proteine, die so neue Funktionen übernehmen oder unterstützend wirken konnten, hatte diese Klasse der Fische einen evolutiven Vorteil, der ihr zu einer schnellen Artenbildung und Diversifizierung verhalf. Heute sind fast 27.000 Spezies bekannt, die zur Klasse der Teleostee gezählt werden. Damit gehören fast 96 % aller lebenden Fischarten zu ihnen und etwa die Hälfte aller beschriebenen Vertebratenarten (Ravi & Venkatesh, 2008). Dass die so entstandenen verschiedenen Formen der ER (α , β , γ) teilweise in Teleostee unterschiedliche Strukturen, Funktionen und Gewebeverteilungen in den Arten aufweisen, scheint nicht verwunderlich. Aufgrund dieser Entwicklungsgeschichte besteht eine stärkere Homologie zwischen den einzelnen Rezeptortypen in den verschiedenen Fischfamilien als innerhalb derselben Fischart (Halm *et al.*, 2004). Vergleicht man die α -Form auf Homologie mit der β -Form in *V. barbatulus* (japanische Karpfenart), so zeigen beide nur eine 42-50 % Identität (Fu *et al.*, 2008), gleiches gilt u.a. für Regenbogenforellen (Nagler *et al.*, 2007) und für Doraden (Socorro *et al.*, 2000).

Thornton (2001) zeigte durch seine Analysen, dass der ursprüngliche ER eine sehr starke Homologie mit dem heute in Humanoiden vorzufindenden ER α hat und schlussfolgerte u.a. daraus, dass sich aus diesem alle weiteren entwickelt haben bzw. dupliziert wurden. Auch deshalb ist es leichter diesen Rezeptortyp in Fischarten neu zu entschlüsseln, da er mit den übrigen ER α der Arten stärkere Homologien aufweist. Der Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz des hier neu aufgedeckten ER α vom ABFT mit dem anderer Fische zeigte übereinstimmende Merkmale in den funktionellen Domänen des nativen Proteins. Somit ist die Einordnung dieses ER zur Klasse der nuklearen Rezeptoren zulässig (Abb.3.4). Es konnten so übereinstimmende Bereiche gefunden werden, die alle nuklearen ER α teilen. Diesen Teilzonen innerhalb der verschiedenen Proteindomänen sind verschiedene Funktionen, die für die ER Wirkung nötig sind, zugeschrieben. Die DNA bindende Domäne (DBD) und Liganden bindende Domäne (LBD) nehmen einen großen Teil des Proteins ein und beinhalten neben der

ihnen den Namen gebenden Funktion auch noch weitere, die als Aktivierungsfunktionen 1 & 2 (AF 1 & AF-2) gelten. AF-2 befindet sich in der LBD und ist für die Koregulatorerkennung und –rekrutierung essentiell. Die konservierte [D/K]LXXEM -Region, welche als AF-2 Motiv diese Funktion vermittelt, beinhaltet im nativen Protein eine als Helix-12 bekannte Aminosäurekonformation. Diese kann je nach gebundenem Liganden (Agonist oder Antagonist) verschiedene Konformationen einnehmen, und bestimmt so ob der Rezeptor nach Bindung seines Liganden weitere Koaktivatoren rekrutieren kann, die für die weitere Aufgabe der ER als TF nötig sind. Bei Bindung eines Antagonisten wird die Bindungstasche von Helix-12 für Coaktivatoren verdeckt, so dass diese ihre Funktion nicht ausüben können. Ein weiterer hoch konservierter Bereich innerhalb der DBD aller ER ist das zweifach vorkommende Zinkfinger motive, welches insgesamt aus je vier Cysteinresten besteht, die das zentrale Zinkatom koordinativ binden. Diese spielen eine besondere Rolle bei der Rezeptordimerisation und bei der Bindung an die spezifischen DNA-Abschnitte in den Estrogen-Respons-Elementen (Nilsson *et al.*, 2001).

Der Phosphorylierung von ER wird einer Vielzahl von verschiedenen Aufgaben zugeschrieben, die der Aktivierung der Transkription, der DNA-Bindung oder dem Einbinden von ER in andere Signaltransduktionswege dienen (Edwards, 2005). Auch im ER α des ABFT konnten hier hoch konservierte Erkennungssequenzen, die von den beiden Proteinkinasen A & C genutzt werden, beschrieben werden. Zwei der drei entdeckten waren in sämtlichen verglichenen ER α -Sequenzen vertreten. Sie befinden sich in Domänen des Rezeptors von denen bekannt ist, dass sie hoch konserviert in allen Lebewesen vorliegen. Dass die Wirkung der ER u.a. von Kinaseaktivitäten reguliert wird, zeigte schon Cho und Katzenellenbogen (1993) für die Proteinkinase C. Sie konnten durch eine verstärkte Aktivierung dieser Proteinkinase ebenfalls eine ligandenabhängige gesteigerte Aktivierung der Transkription durch ER beweisen. Generell können ER die Transkription ihrer Zielgene durch ihre Aktivierungsfunktionen (AF-1 & AF-2) beeinflussen, wobei erstgenannte ligandenunabhängig ihre Funktion ausüben kann, was zuletzt genannte nicht vermag (Edwards, 2005). Letztere konnte auch in der Teilsequenz des ER α von *Thunnus thynnus* gefunden werden. Sie liegt hoch konserviert in sämtlichen ER α der verglichenen Fischarten vor, was ihre wichtige Funktion innerhalb der ER noch einmal deutlich macht.

Die durch den Sequenzvergleich ermittelten prozentualen Unterschiede der ER α Aminosäuresequenz spiegeln sich eindeutig in der Einordnung der verschiedenen Fischgruppen im phylogenetischen Baum wieder. Die meisten Knotenpunkte konnten durch das Bootstrap- Verfahren gut abgesichert werden und geben das generell anerkannte evolutionäre Modell der Fischentwicklung in ihre taxonomischen Gruppen erkennbar wieder. Berücksichtigte man die für die Bewurzelung des Baumes eingesetzte Außengruppe nicht, so waren zwei eindeutig voneinander getrennte Kladen erkennbar. Eine Klade, die Tiere der Überordnung Protacanthopterygii (Salmoniformes) zusammenfasst, und eine weitere, die Vertreter der Überordnung Acanthopterygii (Perciformes und Atherinomorpha) vereinigt. Innerhalb letzter Klade konnte ebenfalls eindeutig zwischen barschartigen und ährenfischartigen Spezies unterschieden werden. Der Rezeptor ER α des ABFT wurde anhand der phylogenetischen Analyse, wie auch zuvor aus den Daten der Sequenzhomologieanalyse, als nah verwandt mit anderen ER α der Echten Barsche (Percoidei) eingestuft. Die entferntesten Verwandten stellen sowohl

nach phylogenetischer als auch durch Sequenzvergleichsanalysen, die Familie der lachsartigen Fische (Salmoniden) dar, was mit der entwicklungsgeschichtlichen Entstehung dieser wohl einhergeht. Dieser Unterschied liegt aber nur bei maximal 8 %, was die oben beschriebene Homologie der ER zwischen den verschiedenen Fischfamilien noch einmal deutlich macht. Da es zurzeit noch keine weiteren Sequenzinformationen für ER α innerhalb der Ordnung makrelenartiger Fische (Scombridae) gibt, konnte die Gruppierung des ER innerhalb dieser nicht weiter verifiziert werden.

4.2 Bedeutung von ER α für den Reproduktionszyklus weiblicher ABFT

Der durch die wissenschaftliche Forschung der letzten Jahrzehnte postulierte kausale Zusammenhang der 17 β -Estradiolwirkung auf die Gametogenese, welche über ER in weiblichen Fischen vermittelt wird (Halm *et al.*, 2004; Edwards, 2005; Nelson & Habibi, 2010) konnte auch in dieser Arbeit für den ABFT auf Basis von molekular- und reproduktionsphysiologischen Parametern gezeigt werden.

Klare Anzeichen für dieses Muster konnten in einer jahreszeitlich- bzw. reproduktionsphasenabhängigen Genexpression von ER α in der Leber der Tiere gefunden werden, die zur Laichzeit und auch noch darüber hinaus signifikant erhöht, im Vergleich zur Vorlaichzeit, vorlag. Desweiteren konnte für die anderen physiologischen Faktoren, die für eine Entwicklung der Geschlechtsorgane während der Vitellogenese stehen, gleiche Verläufe bewiesen werden. Sämtliche hier bestimmten Faktoren wiesen nach einer Korrelationsanalyse starke Abhängigkeiten zueinander auf. Es konnten Korrelationskoeffizienten zwischen 0,61 und 0,82 bestimmt werden (Abb.3.24). Es ergeben sich so die verschiedenen Zusammenhänge, die mit der bisherigen Kenntnis über hormon- und reproduktionsphysiologische Vorgänge in Fischen erklärt werden können (Senthikumar *et al.*, 2004; Lubzens *et al.*, 2010; Zohar, 2010). Die Tatsache das adulte laichbereite ABFT stark erhöhte Expressionslevel in ER α , aber auch von 17 β -Estradiol aufweisen, stärkt dies weiter. Stark erhöhte GSI-Werte, die nur von diesen Tieren erreicht werden und so allgemein anerkannt als eindeutiges Merkmal laichbereiter Thunfische gelten, korrelieren mit dieser erhöhten Genexpression von ER α , aber auch mit sämtlichen anderen Faktoren, die in Folge der zellulären Wirkung von ER α in der Leber gebildet werden.

Der Vergleich juveniler Thunfische in den Altersklassen von 2-4 Jahren konnte klare Hinweise liefern, dass ER α während des Wachstums der Tiere in der Leber altersabhängig zunehmend exprimiert wird, was auch seine naheliegende Rolle während der Entwicklung dieser Jungtiere deutlich macht. Meucci und Arukwe (2006) konnten ebenso einen direkten Zusammenhang von ER α zur der Genexpression von Vtg- und ZrP in jungen Lachsen zeigen, was die generelle Schlüsselrolle dieses Rezeptors in der Entwicklung juveniler Fische spezieübergreifend deutlich macht. In adulten Tieren hingegen konnte keine altersabhängige Expressionsrate festgestellt werden (Abb.3.23 A), was seine Funktion innerhalb des Reproduktionszyklusses bestärkt, da auch relativ kleine Thunfische im Alter zwischen 4-5 Jahren schon voll geschlechtsreif sein können und so eine schon hohe Expression des Genes aufweisen.

Wie die bisher in Fischen beschriebenen ER (Nilsson *et al.*, 2001; Zohar, 2010) ist auch der des ABFT durch Estrogene induzierbar, was seine Rolle als Vermittler zwischen dem als zentralen weiblichen

Geschlechtshormon geltenden 17β -Estradiol, dass für die Steuerung der Vitellogenese verantwortlich ist, auch für diesen Fisch deutlich macht. Ob er aber hauptsächlich allein dafür verantwortlich ist, muss noch geklärt werden. Denn in anderen Fischarten, wie dem Gold- und Zebrafisch, konnten in *in-vivo* und *in-vitro* Studien gezeigt werden, dass ER β höhere Bindungsaffinitäten zu 17β -Estradiol aufwies und so eventuell eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung eines basalen ER α Level mitträgt (Menuet *et al.*, 2004; Nelson & Habibi, 2010).

Auch im Thunfisch zeigen sich geschlechtsbedingte und gewebetypische Verteilungsmuster, die schon in anderen Fischen gezeigt wurden (Pinto *et al.*, 2006). So weisen männliche Tiere eine viel geringere ER α Expression in der Leber auf als es weibliche Tiere tun. Es konnte ein 30facher Unterschied bestimmt werden. Mit der Rolle der Leber, die sie im reproduktiven Zyklus auch in vielen anderen weiblichen Fischen einnimmt, steht dies im Einklang. Während die Leber Hauptsyntheseort der für die Vitellogenese bedeutsamen Proteine Vtg und ZrP ist, deren Bildung 17β -Estradiol und somit auch ER abhängig ist, trägt sie diese Funktion in männlichen Fischen nicht. Nichtsdestotrotz sind auch Männchen in der Lage Vtg und ZrP in der Leber zu bilden (Hara *et al.*, 1993; Roubal *et al.*, 1997; Werawatgoompa *et al.*, 1997; Heppel & Sullivan, 1999) was auch die hier bestimmte geringe Expression von ER α deutlich macht. Dies hat aber andere Ursachen und wird zu einem späteren Zeitpunkt diskutiert (siehe 4.7). Dass die weibliche Gonade nicht nur der Bildungsort, sondern eventuell auch ein wichtiger Wirkungsort von 17β -Estradiol während des reproduktiven Zyklus ist, konnte durch den Vergleich zwischen Käfigtieren und laichbereiten Tieren gezeigt werden. Hier wiesen diese während der Laichzeit eine fast 8fach höhere Expression für ER α auf (Abb.3.22 C). Zudem zeigt der Vergleich von reifen Gonaden zu Leberproben in weiblichen Fischen noch einmal die übergeordnete Rolle der Leber während der Gametogenese, denn hier konnte eine 12fach höhere Expression für ER α bestimmt werden.

Zusammen betrachtet zeigen diese Befunde, dass ER α im ABFT, wie es auch schon für andere Fischarten gezeigt wurde (Nagler *et al.*, 2010), eine wichtige Rolle in reproduktionsbiologischen Prozessen einnimmt. Ob er allein die Rolle als Vermittler in der HPGL-Achse während der Vitellogenese übernimmt, oder ob es ein Zusammenspiel mit anderen Rezeptorformen gibt, sollte in kommenden Studien untersucht werden.

4.3 Reproduktive Fehlfunktionen von in Gefangenschaft lebenden ABFT

Die während des Arbeitsprogrammes Gametogenese im Jahr 2008 genommenen Proben von in Gefangenschaft gehaltenen ABFT, die repräsentativ für den reproduktiven Jahreszeitenverlauf, eingeteilt in Vor-, Laich- und Nachlaichzeit, stehen sollen, zeigen eine eindeutige jahreszeitliche Abhängigkeit der Entwicklung aller Messparameter in weiblichen Fischen, was auch auf eine in Gefangenschaft fortschreitende Entwicklung des Geschlechtsapparates hindeutet. Der Verlauf der Plasmakonzentration für das Steroidhormon 17β -Estradiol wies einen Anstieg während der Wachstumsphase der Gonaden auf (April bis Mai), um seiner Rolle als die Vitellogenese steuerndes Hormon gerecht zu werden. Gegen Ende der Vitellogenese und mit Einleitung der Reifungsphase, nimmt die 17β -Estradiol-

konzentration ab (Abb.3.19). Im Gegenzug steigt die eines anderen wichtigen Hormons, des MIH (Maturation Inducing Hormon) 17,20 β P an. Messungen für 17,20 β P wurden im Rahmen des Projektes ebenfalls gemacht und bestätigen das generelle Muster, das ebenfalls in vielen Fischarten vorzufinden ist (Senthilkumaran *et al.*, 2004; SELFDOTT, 2012). Einhergehend mit dieser phasenbedingten Zu- und Abnahme von 17 β -Estradiol konnte ebenfalls gleiches für die Genexpression von ER α in der Leber festgestellt werden. Nachdem schon in anderen Spezies nachgewiesen wurde, dass ER Estrogen induzierbar sind (Nilsson *et al.*, 2001), scheint dies auch im ABFT der Fall zu sein. Die im weiteren Verlauf des reproduktiven Zyklus vorzufindenden und die auf direkte Folge der Wirkung von aktivierten ER gebildeten Folgeprodukte, wie die Expression von Vtg & ZrP Genen, sowie die aus ihnen entstehenden nativen Proteine, wiesen ebenfalls ein zyklisches Expressionsmuster auf. Generell konnten bei allen Parametern Höchstwerte während der Laichzeit beobachtet werden. Hierbei wich nur ER α geringfügig von diesem Trend ab (Abb.3.20). Mit diesen Änderungen einhergehend zeigt sich auch der GSI-Wert der Tiere als ein jahreszeitenabhängige Größe, die nach der Vollendung des Größenwachstums der Oozyten den Höchstwert erreicht und normalerweise nach dem Ablai-chen der Tiere wieder auf Werte fällt, die vergleichbar mit denen zur Vorlaichzeit sind. Dieser Verlauf konnte auch von beiden Geschlechtern der Thunfische des Gametogenese Programmes beobachtet werden (Abb.3.19). Trotz der anscheinenden auch in Gefangenschaft fortschreitenden reproduktiven Entwicklung zeigt der Vergleich dieser Fische mit Wildtieren, die während der Laichzeit im Mittelmeer gefangen wurden, deutliche Unterschiede in den hier bestimmten Parametern. Dies lässt den Schluss zu, dass auch bei diesen Tieren Fehlfunktionen auftreten, die eine den Wildtieren vergleichbare reproduktive Entwicklung verhindern. Besonders auffällig waren hierbei die 17 β -Estradiolkonzentrationen, sämtliche Werte der Genexpressionsanalysen für ER α und Vtg sowie die GSI-Werte, die bei Wildtieren immer erhöhte Werte aufwiesen, die von Käfigtieren nicht erreicht wurden. Besonders erwähnenswert sind hierbei die Käfigtiere aus Vibo Valentia, deren Proben nachweislich von Tieren stammten, die zwei Tage später mehrere Millionen Eier ablaichten und somit als ideales Vergleichsobjekt herangezogen werden können, um die restlichen Fische bezüglich ihres Entwicklungsstandes einzuordnen. Der Vergleich mit den übrigen Käfigtieren verdeutlichte die sehr wahrscheinlich beeinträchtigte Entwicklung dieser noch einmal. Besonders auffällig waren dabei ihre GSI-Werte, die bei ihnen teilweise 3fach erniedrigt vorlagen, die 17 β -Estradiolkonzentrationen und die Expressionswerte der Vtg & ER α -Gene (Abb.3.21-22). Zuletzt genannte wiesen nicht so deutliche Unterschiede auf, waren im Mittel aber dennoch deutlich gegenüber den anderen Käfigtieren erhöht. Dass in Gefangenschaft lebende ABFT sehr niedrige GSI-Werte aufweisen können, wurde auch schon im Projekt REPRODOTT gezeigt (REPRODOTT, 2006).

Ergänzt man die oben beschriebenen Befunde mit den durch die Projektpartner zusätzlich erforschten Aspekten, so stärken diese das Gesamtbild einer verminderten reproduktiven Entwicklung von in Gefangenschaft gehaltenen Thunfischen. Die histologischen Ergebnisse der weiblichen Gonaden aus dem Programm Gametogenese (1-3) spiegeln die zu den jeweiligen Monaten normalerweise üblichen Entwicklungsstufen der Oozyten (Abascal & Medina, 2005; Heinisch *et al.*, 2008) und die zuvor beschriebene Entwicklung der Hormon- und Proteinkonzentrationen im Plasma der Tiere wieder. Wäh-

rend die Entwicklung der Oozyten im April erst langsam beginnt und durch verschiedene Charakteristika gekennzeichnet ist (perinukleare Oozyte oder cortikale Alveoli), konnten im Mai Oozyten beobachtet werden, die fortgeschrittenen Dottereinlagerungen aufwiesen und einen Durchmesser von bis zu 400 μm besaßen, was für das Stadium einer fortgeschrittenen Vitellogenese steht. Im Juli wiesen die Gonaden der weiblichen Tiere nur noch kleine Oozyten ohne Dottereinlagerungen auf, was einer Rückentwicklung der Oozyten gleichkommt und in der Nachlaichzeit mit der Resorption der zuvor dotterreichen Oozyten (Atresia) einhergeht. Anscheinend traten die Oozyten nicht in das Stadium der FOM ein, denn es konnten keine so gereiften Eizellen bestimmt werden (SELFDOTT, 2012).

Die Bestimmung der Gonadotropine LH & FSH aus dem Plasma und der Hypophyse, deren Bildungs-ort im Gehirn, erbrachten aufschlussreiche Ergebnisse. Während sich das Level an LH im Plasma der Tiere über den gesamten Zeitraum der Gametogenese nicht signifikant änderte und dazu noch relativ gering war ($3,43 \pm 0,56 \text{ ng/ml}$), konnten im Gegensatz dazu stark erhöhte Maximalwerte in der Hypophyse gefunden werden ($11,28 \pm 1,24 \text{ mg/pit}$), die erst gegen Ende der Gametogenese im Juli auftraten. Zuvor (April) waren diese erniedrigt und steigerten sich kontinuierlich bis auf dieses Maximalniveau. FSH in der Hypophyse wies dagegen schon während der Vorlaichzeit hohe Werte auf, die aber im Folgenden rezessiven Charakter annahmen und in der Nachlaichzeit ihr niedrigstes Level erreichten. Gleiches Muster konnte auch für die Genexpression von Untereinheiten des LH & FSH (LH β & FSH β) in der Hypophyse bestimmt werden, so dass die oben beschriebenen Gegebenheiten zusätzlich bekräftigt werden konnten (SELFDOTT, 2012).

Die Kombination aus stark erhöhter LH Konzentration in der Hypophyse und niedrigem LH Gehalt im Plasma, zusammen mit den beobachteten niedrigen GSI-Werten der Fische aus dem Gametogeneseexperiment, deuten auch auf eine in diesen Fischen stattfindende Fehlentwicklung ihrer reproduktiven Entwicklung hin. Dies ermöglichte es den Tieren nicht vollentwickelte und befruchtungsfähige Oozyten zu bilden und diese abzulaichen. Dabei scheint ein Hauptgrund das Ausbleiben der LH Freisetzung aus der Hypophyse zu sein, wie es auch schon für andere Fischarten gezeigt wurde, und nicht an einer gehemmten Synthese von LH in dieser zu liegen (Mylonas *et al.*, 2010). Somit bleibt der nachgewiesene akute Anstieg des LH im Plasma der Tiere nach vollendeter Vitellogenese aus, der in Wildtieren, wie z.B. in dem Streifenbarsch (*Morone saxatilis*), immer mit der OM und letztendlich mit der Ovulation der Eizellen einhergeht (Mylonas *et al.*, 1998; Mylonas & Zohar, 2001 a). Weitere Resultate aus anderen Studien (Steven *et al.*, 2000) konnten Anzeichen dafür finden, dass die Ursache der Akkumulation von LH in der Hypophyse und dessen nicht stattfindender Abgabe in den Blutkreislauf, eher an höher befindlichen Kontrollzentren im Gehirn liegt, die die Funktion dieser Drüse steuern, und nicht an Fehlfunktionen in der Hypophyse selber. Denn das mRNA Level von GnRH-Rezeptoren in der Hypophyse und das von GnRH im Gehirn, ließ keinen Unterschied zwischen Wild- und Käfigtieren erkennen. Da es aber zu einer unterschiedlichen Anhäufung von endogenem GnRH in der Hirnanhangsdrüse (Hypophyse) zwischen Wild- und Käfigtieren kam, unterstützt dies die These, dass der Grund dieser Fehlfunktion in einer vom Hypothalamus nicht ausreichenden Menge ausgeschütteten GnRH liegt.

Ein weiterer Aspekt der innerhalb des Projektes untersucht wurde, war die Genexpression der Gene für VtgA, VtgB und die einer ihrer Rezeptoren in der Form VtgR¹, der überwiegend in Ovarien expriert wird und somit hauptsächlich verantwortlich ist für die rezeptorvermittelte Inkorporation der Vtg Proteine in die heranwachsende Oozyte (Hiramatsu *et al.*, 2004). Während Wildtiere in der Laichzeit signifikant höhere Expressionsmuster für VtgR¹ aufwiesen, als es Käfigtiere taten, konnte dieser Unterschied für die Genexpression der beiden Vtg-Typen im Lebergewebe nicht bestätigt werden (SELFDOTT, 2012). Es konnte hier zwar auch, wie oben schon für andere Parameter beschrieben, eine reproduktionsphasenabhängige Entwicklung gezeigt werden, die Expressionsmuster während der Laichzeit für beide Vtg-Formen wiesen dabei aber keinen Unterschied zwischen Wild- und Käfigtieren auf (Pousis *et al.*, 2010). Dies konnte von den Ergebnissen dieser Dissertation nicht bekräftigt werden. Die Genexpressionsanalyse für Vtg zeigte deutliche Unterschiede zwischen Käfig- und Wildtieren der verschiedenen Standorte während der Laichzeit. Besonders auffällig waren auch hier wieder Tiere aus Vibo Valentia und auch aus Malta, deren Expressionswerte deutlich erhöht vorlagen. Das in dieser Arbeit genutzte Primersystem zur Bestimmung der Vtg Genexpression generierte mit einer Übereinstimmung von 100 % ein Fragment, welches für VtgA codiert (BLAST-Analyse) und war somit identisch mit der von Pousis *et al.* (2010) veröffentlichten Proteinsequenz des VtgA im ABFT (siehe Anhang). Ein Grund für diese unterschiedlichen Ergebnisse, mag in der Datenaufbereitung von Pousis *et al.* (2010) liegen. Er nutzte für den Vergleich zwischen Käfig- und Wildtieren zur Laichzeit der Tiere anscheinend nur gemittelte Daten und unterschied nicht nach Standorten, wie ich es in dieser Arbeit gehandhabt habe. Denn auch hier gab es Thunfischproben, z.B. aus Sardinien und Marokko (Wildtiere), die statistisch keinen Unterschied in der Vtg-Genexpression zu Käfigtieren aufwiesen. Es zeigt sich so, dass man zur Einschätzung des reproduktiven Zyklus von Käfigtieren besondere Sorgfalt in die Datenaufbereitung fließen lassen muss.

Betrachtet man alle Befunde zusammen, lässt dies letztendlich den Schluss zu, dass die in Gefangenschaft gehaltenen ABFT eine nicht ausreichende Entwicklung während der Gametogenese und in den nachfolgenden Entwicklungsstufen der Oozytenreifung (OM und Ovulation) durchlaufen. Weiterhin können durch die in dieser Arbeit erbrachten Ergebnisse die von den verschiedenen Autoren (Agulleiro *et al.*, 2006; Ibarra-Castro *et al.*, 2007; Mylonas *et al.*, 2007) beschriebenen reproduktiven Fehlfunktionen von in Gefangenschaft gehaltenen Fischen auch für den ABFT bestärkt und zudem genauer charakterisiert werden. Die Fehlfunktionen, die sich in zahlreichen Fischarten nur auf die dem Ende gelegenen Entwicklungsschritte, eingeleitet durch das Gonadotropin LH, beziehen, sind anscheinend im ABFT nicht nur in einer beeinträchtigten OM manifestiert. Das Thunfische auch in Gefangenschaft eine gewisse Entwicklung durchlaufen, lässt sich, wie zuvor schon gedeutet, klar erkennen. Durch die Bestimmung der Genexpression von ER α und Vtg in Leber und Gonade, sowie durch die der Proteine Vtg und Zrp im Vergleich zwischen Wild- und Käfigtieren, konnte eine geminderte Entwicklung während der Vitellogenese der Käfigtiere gezeigt werden. Diese konnte bisher immer nur durch die niedrigen GSI-Werte der Käfigtiere vermutet werden.

Die die höher liegenden Teile der HPGL-Achse beeinflussenden Störeffekte, können im ABFT also eine weitgreifende negative Wirkung auf die reproduktive Achse ausüben als bisher gezeigt werden

konnte. Wie dies geschieht, kann hier nur anhand der heutigen Kenntnisse über die HPGL-Achse versucht werden zu deuten. Da die HPGL-Achse in allen Vertebraten ein höchst komplexes Gebilde ist, dass durch eine Vielzahl von Faktoren reguliert und gesteuert wird, scheint es nicht verwunderlich, dass auftretende Dysfunktionen negative Effekte auf alle Teile der Achse ausüben können. Die Vitellogenese stellt innerhalb dieser Achse eine intermediäre Entwicklungsphase dar und ist dabei in größtem Maße von der Bereitstellung der Gonadotropine FSH & LH abhängig. FSH übernimmt dabei in vielen Vertebraten eine entscheidende Rolle für die Einleitung und Regulation der Gametogenese (Roa & Tena-Sempere, 2007). Die Bildung der Gonadotropine ist wiederum abhängig von den GnRH und ihren Rezeptoren, welche als ein zentraler Regulator im Gehirn wirken und nachweislich in ihrem Expressionsmuster durch störende Umwelteinflüsse aber auch durch endogene Faktoren beeinflusst werden können. Zudem werden neben den Gonadotropinen noch zahlreiche andere Hormone, wie die Schilddrüsenhormone T_3 und T_4 und Wachstumshormone mit der Regulation des Oozytenwachstums in Verbindung gebracht (Gomez *et al.*, 1999; Pavlidis *et al.*, 2000). In Teleostern wurde das Muster der FSH und LH Wirkung teilweise bestätigt, es konnten aber auch Abweichungen in einigen Fischarten festgestellt werden. So zeigen verschiedene *in-vitro* Studien, dass die 17β -Estradiolproduktion von FSH aber auch von LH im Follikelepithel der Oozyten ausgelöst werden kann (Young *et al.*, 2005). In Forellen stimuliert FSH *in-vitro* die Aufnahmen von Vtg in die Oozyte (Tyler, 1991), während in der Dorade LH anscheinend diesen Prozess reguliert (Kagawa *et al.*, 1998; Gen *et al.*, 2000; Kagawa *et al.*, 2003). Okada *et al.* (1994) konnte für den Großaugen-Thun (*Thunnus obesus*) zeigen, dass beide GTH für eine Erhöhung der 17β -Estradiolproduktion verantwortlich waren. Man muss also davon ausgehen, dass nicht nur ein Gonadotropin an der Regulation der Vitellogenese beteiligt ist, sondern eher beide, die dabei in den verschiedenen Teilprozessen getrennt aktiv sind oder aber auch zusammen wirken können. Das fein gesteuerte Zusammenspiel von GnRH, FSH und LH führt in weiblichen Fischen zur kontrollierten Bildung von 17β -Estradiol im Follikelepithel der Oozyte, welches hauptsächlich daraufhin eine die Vitellogenese regulierende Funktion übernimmt (Nagahama, 1994; Devlin & Nagahama, 2002). 17β -Estradiol übt dabei seine Funktion über spezifische ER aus, deren Expression von ihm dosisabhängig reguliert wird, was auch die Ergebnisse dieser Arbeit für ER α im ABFT bekräftigen. Ein Anzeichen für die eventuell so vermittelte Fehlfunktion im ABFT, deren Ursprung anscheinend weit zuvor in der HPGL-Achse liegt, kann so in der verminderten Genexpression von ER α und das durch seine Wirkung in der Leber synthetisierte Vtg, sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene gesehen werden, welche ebenfalls erniedrigt vorlagen. Stark verringerte GSI-Werte runden die Vermutung einer in weiblichen Thunfischen beeinträchtigten reproduktiven Entwicklung während der Vitellogenese ab.

4.3.1 Einfluss der Ernährung auf die reproduktive Entwicklung

Durch eine Ernährungsstudie innerhalb des Projektes in der ebenfalls Wild- mit Käfigtieren verglichen wurden, konnte der wichtige Aspekt dieser für eine normale Entwicklung verdeutlicht werden. Durch eine zuvor unternommene Analyse der Gonaden auf ihre Bestandteile an Fettsäuren, Aminosäuren, vorkommende Lipidklassen, Carotinoide und Vitamin C & E, konnten die die Entwicklung limitierenden Nährstoffe in Käfigtieren untersucht werden. Hierbei wurde die Bedeutung der Fettsäuren DHA (Docosahexaensäure) und EPA (Eicosapentaensäure) bestätigt. Das Verhältnis beider zueinander (DHA/EPA) liegt in weiblichen ABFT klar auf Seite des DHA, was Mourente *et al.* (2001) ebenfalls zeigen konnte. Thunfische weisen im Vergleich zu anderen marinen Fischen eine sehr hohe Ratio der DHA/EPA Fettsäuren auf (Sawada *et al.*, 1993). Dies lässt vermuten, dass diese zur Klasse der Omega-3-Fettsäuren gehörende Fettsäure essentiell für die heranreifenden Gonaden sind, zumal diese Klasse Komponenten der Phospholipide bereitstellt. Diese ist wiederum ein Hauptbestandteil des Vtg und in ihm mit einem Anteil von ca. 60% im Lipovitellinteil des Proteins vertreten. Die Konzentration an Vitamin C & E war in weiblichen Wildtiergonaden um ein Vielfaches höher. Die wichtige Rolle beider für die Eiproduktion und somit einer normalen Fertilität, sowie für die Lebensfähigkeit des heranreifenden Embryos in Forellen konnte schon von Dabrowski *et al.* (1995) bestätigt werden. Des Weiteren konnte in Wildbahntieren ein weitaus höherer Anteil der einzelnen Aminosäuren (AS) in ihren Gonaden bestimmt werden als es in Käfigtieren der Fall war. Dies könnte als Resultat einer verminderten Vitellogenese in diesen Tieren gedeutet werden, da während dieser Phase ein Großteil an AS über die Dotterproteine in die Gonade inkorporiert werden.

Umgesetzt wurden diese neuen Erkenntnisse in dem darauffolgenden Experiment, in dem Käfigtiere mit unterschiedlichen Diäten gefüttert wurden. Während die Kontrollgruppe nur Makrelen erhielt, wurde der anderen Gruppe ein reichhaltigeres Nahrungsangebot bestehend aus Makrelen und Kalmaren (1:1) und Paprikapulver verabreicht. Während Makrelen allgemein für ihren hohen Anteil an Fettsäuren, vor allem von DHA, bekannt sind, kommen in Cephalopoden hohe Anteile von Proteinen, hier auch vermehrt Phospholipide und Cholesterol vor (Rodriguez *et al.*, 1998). Paprikapulver wurde als Carotinoidquelle der Diät zugefügt, da diese eine wichtige Rolle als Antioxidant wahrnehmen und somit vor Schädigungen durch reaktive Sauerstoffspezies oder freien Radikalen schützen (Jinno *et al.*, 1998). Die Auswertung der Daten dieser Studie zeigte, dass die Gruppe der Tiere, welche die höherwertige Diät bekam, generell besser entwickelt war. Dies bezog sich vor allem auf Parameter, die den Prozess der Vitellogenese steuern oder durch ihn erst vermehrt gebildet werden. So konnte durch die Behandlung eine generelle und signifikante Erhöhung der Steroidlevel (T und 11-KT) im Plasma der Tiere festgestellt werden (SELFDOTT, 2012). Das in dieser Arbeit bestimmte 17 β -Estradiol konnte diesem Trend nicht folgen. Es zeigte zwar im Mittel eine leichte Erhöhung in behandelten Tieren auf, diese war aber nicht signifikant zur Kontrollgruppe. Trotzdem spiegeln die Unterschiede in den verschiedenen Hormonlevel der beiden Gruppen und die Tatsache eines gesteigerten GSI-Wert in behandelten Tieren, was zu einer besseren Gonadenentwicklung führte, die positive Wirkung der höherwertigen Diät wieder. Histologische Analysen zeigten eine bessere Entwicklung der Gonaden weiblicher ABFT. Es konnten mehr dotterreiche Oozyten und ein geringerer Anteil an

atretischen Follikeln in behandelten Tieren bestimmt werden. Trotz der positiven Wirkung der Behandlung war diese anscheinend nicht in der Lage die reproduktive Entwicklung gänzlich voranzutreiben. Es konnten keine voll gereiften Follikel in den Gonaden der weiblichen Fische vorgefunden werden. Dies steht im Einklang mit der LH/FSH Analyse aus Hypophyse und Plasma, die in beiden Gruppen gleiche Ergebnisse brachte und so auch die in diesen Tieren auftretende Fehlfunktion deutlich machte. Einhergehend mit dieser kann auch der fortgeschrittene Prozess der Atresie erklärt werden. Anscheinend fand die Probennahme zu einem Zeitpunkt statt, in der sich die Oozyten in einem Stadium der post-Vitellogenese befanden, die durch eine starke Degradation der dotterreichen Eizellen gekennzeichnet ist (Atresie). Dies tritt immer dann ein, wenn die voll herangereiften Oozyten nicht das Signal (abrunder LH Anstieg) für den Übergang in die Reifungsphase (OM) erhalten, was charakteristisch für diese reproduktive Fehlfunktion ist (Mylonas *et al.*, 2010).

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten durch die im Mittel in allen Messparametern vorgefundene Erhöhung der Werte auf den fördernden Effekt der besseren Diät hin. Dieser Effekt konnte durch den Vergleich der Genexpression von ER α und Vtg zu Wildbahntieren weiter untermauert werden. Denn wie aus Abbildung 3.22 eindeutig hervorgeht, konnte sich durch das höherwertige Futter eine erhöhte ER α Genexpression einstellen, die vergleichbar mit der der Wildbahntiere war. Die Expressionsraten des Vtg Gens erreichten bei ihnen sogar Dimensionen, die nur von den vorm Ablachen geltenden Tieren aus Vibo Valentia gehalten werden konnten. Andererseits können aber auch die histologischen Befunde einer sich in der atretischen Entwicklungsphase befindlichen ABFT Population gestützt werden. Vor allem die niedrigen Proteinkonzentrationen von Vtg und ZrP im Plasma der Tiere sprechen für dieses Entwicklungsstadium, da beide in dieser Phase nicht mehr in die Oozyten inkorporiert werden und somit deren Bildung herabreguliert wird (Susca *et al.*, 2001). Die im Vergleich zu den anderen Steroiden nicht signifikant gesteigerte 17 β -Estradiolkonzentration in den behandelten Fischen steht ebenfalls im Einklang mit einer atretischen Stufe der Oozytenentwicklung und zudem im Kontext einer verminderten reproduktiven Entwicklung durch auftretende Fehlfunktionen. Die für die Synthese von 17 β -Estradiol aus Testosteron verantwortliche Aromatase (P450Arom oder Cyp-19a), die im Epithel des die Eizelle umgebenden Follikels lokalisiert ist, wird während der normalen Gametogenese nach vollendeter Vitellogenese bevor es zur Einleitung der OM kommt herabreguliert (Bobe *et al.*, 2006), wodurch es zu einem Konzentrationswechsel von zwei Steroidhormonen in dieser Phase kommt (17 β -Estradiol (\downarrow) und 17,20 β P (\uparrow)). Dies wurde schon zuvor im einleitenden Text beschrieben. Dieser Vorgang wird auch eingeleitet, wenn es nicht zu einer OM kommt (Senthilkumaran *et al.*, 2004).

4.4 Hormoninduktion zur möglichen Regulierung der Fehlfunktionen

Schon lange werden in Fischzuchten die verschiedenen Hormonpräparate eingesetzt (Mylonas *et al.*, 2010b), um den in Fischen auftretenden reproduktiven Fehlfunktionen entgegenzuwirken. Da der größte Teil dieser Dysfunktionen, wie zuvor schon beschrieben, eine nicht stattfindende OM von eigentlich gereiften Oozyten betrifft, werden heutzutage meist GnRH-Analoga verwendet, um die

OM auszulösen, was letztendlich dann im Ablachen der Eier endet. Für die Induktion werden Hormonen-Träger-Systeme genutzt, die aus den verschiedenen Materialien gefertigt sein können (genauere Informationen hierzu siehe Mylonas *et al.*, 2010 a, b). Das am häufigsten genutzte System besteht aus einem Kunststoff-Polymer (EVAc: Ethylen-Venyl-Acetat) und weiteren Bestandteilen, die es dem eingesetzten Hormon ermöglichen sich aus diesem zu lösen. Der Einsatz dieser hängt dabei stark von der Fischart ab bzw. von der in ihr vorzufindenden reproduktiven Strategie der Oozytenentwicklung. Während bei Arten, die ihren gesamten Laich auf einmal ablegen eine einmalige GnRHa-Induktion ausreichend ist (Mylonas *et al.*, 1992), benötigen solche die über einen längeren Zeitraum ablaichen (Portionslaicher) am besten mehrere Induktionen. Ursprünglich von Rhine *et al.* (1980) zur Verabreichung von Medikamenten publiziert, wurde es in den darauffolgenden Jahren weiterentwickelt (Brown *et al.*, 1986 a) und ebenfalls von der Arbeitsgruppe Brown erfolgreich in der Behandlung von diabetischen Ratten durch Insulingabe über dieses System genutzt (Brown *et al.*, 1986 b). Der Vorteil des EVAc-Systems besteht darin, dass es das in ihm befindliche Hormon oder Medikament über einen langen Zeitraum, je nachdem in welchem Verhältnis seine Komponenten zusammengefügt wurden, abgibt. Deshalb stellt es ein ideales Instrument für die Hormoninduktion von Portionslaichern, wie dem ABFT, dar. Bisher wurden Induktionsversuche am ABFT mit diesem System mit Erfolg, aber des Öfteren auch ohne Erfolg unternommen (REPRODOTT, 2006; Mylonas *et al.*, 2007). Generell konnte eine positive Wirkung des Hormons auf die HPGL-Achse im ABFT von Rosenfeld *et al.* (2012) nachgewiesen werden, welches die Blockade der LH-Freisetzung aus der Hypophyse aufhob und eine OM zuließ. Ablachvorgänge konnten nicht beobachtet werden und waren nur aus der Tatsache heraus begründbar, dass in histologischen Schnitten der Gonade Follikel gefunden wurden, die ihre Eizellen entlassen zu haben schienen (post-ovulative Follikel). Der Erfolg dieser Methode hängt in großen Teilen davon ab, ob voll ausgereifte Oozyten, die die Vitellogenese bereits erfolgreich durchlaufen haben, in den Gonaden der zu behandelnden Tiere vorliegen. Ist dies nicht oder nur zu einem geringen Maß der Fall, kann die GnRHa-Induktion keinen Erfolg bringen, da von ihr nur bereits im Stadium der fortgeschrittenen Vitellogenese befindliche Oozyten zur OM, über die Freisetzung des LH aus der Hypophyse, angeregt werden können (Aranda *et al.*, 2011).

Aquakulturrelevante Fische neben dem ABFT, die schwerwiegendere Formen von reproduktiven Fehlfunktionen aufweisen, sind derzeit der Süßwasser-Aal (*Anguilla anguilla*) und die Bernsteinmakrele (*Seriola dumerili*). Beide durchlaufen in Gefangenschaft nicht die Vitellogenese und sind somit unfruchtbar. In Aalen scheinen diese Dysfunktionen gravierender zu sein, denn in der Bernsteinmakrele tritt, wie schon zuvor für andere Fischarten bewiesen, nach einigen Jahren eine Gewöhnung ein (Mylonas *et al.*, 2010b). In weiblichen Tieren konnten so Anzeichen dafür gefunden werden, dass zumindest ein Teil ihrer Oozyten in die Vitellogenese eintraten (Micale *et al.*, 1999). Auch diese beiden Arten konnten mittlerweile durch gezielte hormonelle Behandlung zum Ablachen gebracht werden (Kagawa *et al.*, 2005; Vassallo-Agius, persönliche Mitteilung). Im Falle des Aales ist dies eine Behandlung die je nach Geschlecht unterschiedliche Injektionen (über 8-14 Wochen bis zu 13 Injektionen) mit den verschiedenen Hormonen bzw. Hypophysenextrakten bedingt (Kagawa *et al.*,

2005). Für leicht zu handhabende kleine Fische ist dies möglich, handelt es sich aber um Thunfische, kann diese Methodik wegen ihrer Größe und ihrer Stressanfälligkeit nicht angewandt werden.

Bis heute sind so noch keine weiterführenden Versuche bezüglich neuer einzusetzender Hormontherapeutika und ihrer unterstützenden Effekte für eine verbesserte Vitellogenese im ABFT, unternommen worden, da eine solche Behandlung langwierig ist und eigentlich, wie oben beschrieben, für Thunfische nicht anwendbar. Die Resultate dieser Arbeit konnten eindeutig zeigen, dass die bisher genutzte Hormoninduktionsmethode im ABFT aus zuvor genannten Gründen nicht immer die beste Vorgehensweise ist, da auch Aspekte einer geminderten Vitellogenese beachtet werden sollten. Um mit der GnRHa-Methode einen besseren Erfolg zu haben, wäre also bei Tieren mit einer beeinträchtigten Gametogenese der Einsatz von anderen Hormonen bzw. von Hormonen, die nach ihrer Evaluierung in Kombination mit GnRHa eingesetzt werden, vorstellbar. Der gleichzeitige Einsatz von mehreren Komponenten zur Induktion von Ablachvorgängen wurde schon in verschiedenen Fischarten der Cypriniden (karpfenartige) durchgeführt. In diesen Behandlungen wurde durch den kombinierten Einsatz von einem Dopamin-Antagonisten und GnRHa die von Dopamin inhibierte Freisetzung von LH aus der Hypophyse, welche nur in wenigen Fischklassen auftritt, unterbunden und so die Wirkung des Gonadolibarins verstärkt (Yaron *et al.*, 1995; Mikolajczyk *et al.*, 2004).

Auf der Suche nach Faktoren, die in weiblichen Fischen die Gametogenese zu steigern vermögen, und die möglichst geringfügig in ihrer Wirkung durch andere Regelkreise reguliert und inhibiert werden, stellt 17 β -Estradiol einen erfolgsversprechenden Kandidaten dar. Dies liegt in seiner direkten Rolle als die Vitellogenese steuerndes Geschlechtshormon begründet, welches vor Ort die Abläufe, die für ein erfolgreiches Größenwachstum der Oozyten unerlässlich sind, steuert. In anderen Fischarten, wie z.B. in Tilapien, Forellen, Goldfischen und Zebrafischen, wurde seine positive Wirkung auf die Vitellogenese und die sie begünstigenden Faktoren nach künstlicher Stimulation durch 17 β -Estradiol schon beschrieben. Dies umfasste die Steigerung der Genexpression von ER, die Proteinsynthese von Vtg und die durch 17 β -Estradiol erzielte Erhöhung des GSI-Wertes, sowie die Erhöhung des endogenen Plasmalevel von 17 β -Estradiol (De Vlaming *et al.*, 1984; Pankhurst *et al.*, 1986; Brion *et al.*, 2004; Menuet *et al.*, 2004; Nelson & Habibi, 2010).

4.4.1 17 β -Estradiol Hormonimplantate: Herstellung und Abgabekinetik in-vitro

Wissenschaftliche Studien über die reproduktionsphysiologischen Vorgänge in Fischen tragen seit langem dazu bei, dass der ständig ansteigende Bedarf nach Fisch von den Aquakulturbetrieben bedient werden kann. Dies wird vor allem durch Fortschritte in Protokollen für die Eiproduktion und die daraus resultierende erhöhte Verfügbarkeit von Larven zur weiteren Aufzucht erreicht. Seitdem die ständig ansteigende Nachfrage nach Meerestieren ihre Existenz stark bedroht, sind viele neue Fischarten aquakulturrelevant geworden. Die Kenntnisse über die molekularen, biochemischen und physiologischen Mechanismen der Reproduktion in den verschiedenen Fischarten sind bis heute nicht völlig aufgeklärt. Verstärkte wissenschaftliche Bemühungen wurden vor allem in der endokrinen Regulation des Ablachens und der Optimierung der Larvenaufzucht gemacht, welche mittlerwei-

le in vielen neuen aquakulturrelevanten Fischen zu erfolgsversprechenden Ergebnissen führte, so dass diese in naher Zukunft in Zuchtbetrieben in großem Maßstab nachgezüchtet werden können. Zwei bedeutende Arten die in diesem Zusammenhang genannt werden sollen, sind die Bernsteinmakrele (*Seriola dumerili*) und der Atlantische Blauflossen Thunfisch (*Thunnus thynnus*). Die Zucht der Bernsteinmakele kann bis heute nur durch einige Experten bewerkstelligt werden und ist wie die des ABFT noch nicht bis zur völligen Marktreife entwickelt. In beiden Arten wurden hormongestützte Methoden genutzt um diese gezielt zum Ablaichen zu bringen (Aranda *et al.*, 2011; Vassollo-Agius, persönliche Mitteilung).

Um die zuvor beschriebenen Fehlfunktionen, die sich u. a. in einer verminderten Vitellogenese ausdrückten zu mindern bzw. zu beseitigen, wurden in dieser Dissertation erstmals 17β -Estradiol Implantate auf Basis der bereits etablierten und zuvor genannten GnRHa-Methodik gefertigt. Innerhalb dieser konnte die Herstellungsart der Implantate verbessert werden, so dass diese nun zu einer effizienteren und ergiebigeren Methode ausgereift ist, welche auch auf die ursprüngliche Anwendung mit GnRHa übertragen werden könnte. Alte Protokolle der Implantatherstellung auf Basis des Kunststoffpolymers EVAc fußten immer in dem finalen Guss der EVAc-Masse in eine quadratische Metallform. Nach Austrocknung bzw. Evaporation des Dichlormethans (Lösungsmittel) erhielt man einen Block aus dem man die Implantate ausstanzen musste (Mylonas *et al.*, 2007). Hieraus ergaben sich zahlreiche negative Aspekte, wie die dadurch teilweise stark verformten und mit einer Vielzahl von Lufteinschlüssen behafteten finalen Implantate, die großen Mengen an Stanzrückständen und die schwierige Berechnung der zu nutzenden Stoffmengen um die gewünschten Verhältnisse und Konzentrationen der Inhaltsstoffe in einem Implantat einzustellen. Dies machte sie zu einer sehr kostspieligen und unwirtschaftlichen Methode, da das eingesetzte GnRHa ein sehr teures synthetisches Hormonanalogen darstellt (1 g bis zu 5000 €).

Die hier neu konzipierte Methodik weist keine dieser negativen Eigenschaften mehr auf, und bringt sogar noch weitere Vorteile mit sich. Durch den Einsatz einer neuen Gusstechnik (siehe 3.5.1) konnten wohlgeformte gerade und zylindrische Implantatstücke hergestellt werden, die nach ihrer Portionierung jeweils mehrere Implantate hervorbrachten. Diese Vorgehensweise bringt einen neuen und innovativen Vorteil zum Tragen. Waren früher hergestellte Implantate aufgrund der Herstellungsweise in ihrer Hormonkonzentration festgelegt, kann dies in den hier produzierten Implantaten, auch nachdem sie gegossen wurden, nachträglich individuell eingestellt werden, denn nur ihr Durchmesser ist von vornherein definiert. Da die Konzentration des verabreichten Hormons immer auch von der Fischart und zusätzlich von dem Gewicht der zu induzierenden Tiere abhängig ist, kann diese durch die Variation der Länge der Implantate gezielt eingestellt werden. Mit einem so zuvor grob definierten Konzentrationsbereich des Implantatstückes können die einzelnen Implantate zielgerichtet in jeder Fischart eingesetzt werden, ohne dies im Vorhinein bei der Herstellung zu berücksichtigen. Durch den Einsatz einer computertomographisch gestützten Analyse der Implantatstruktur und deren Darstellung in einem 3D-Modell konnten weitere Vorteile der hier verwendeten Herstellungsart gegenüber der älteren Methodik deutlich gemacht werden (siehe Abb.3.28 & 29). Wurde die bisher herkömmliche Methode angewandt, so bildeten sich nach dem Aushärten eine Vielzahl von

Lufteinschlüssen innerhalb der Implantatmatrix, die ein Volumen zwischen 0,1 bis 0,35 mm³ besaßen und mit einem Anteil von 11 % am Gesamtvolumen des Implantates auftraten. Dies war zwischen unterschiedlichen Produktionsserien verschieden stark ausgeprägt. Neue Implantate wiesen dagegen nie größere Luftporen als 0,05 mm³ auf und waren dabei in ihrer Struktur viel homogener. Diese Struktur wurde selbst nach einer zweimonatigen Inkubation aufrecht erhalten bzw. die eigentlich zu vermutenden Auswaschungen des BSA-/Inulin-/Hormonanteiles fanden in Größenordnungen statt, die nicht im CT sichtbar gemacht werden konnten.

Durch diese anscheinend für Implantate ideale Struktur konnte in den *in-vitro* Experimenten eine je nach gewählter Hormonkonzentration unterschiedlich starke, aber im Mittel gleichbleibende Abgaberate von 17 β -Estradiol über einen Versuchszeitraum von 21 Tagen bestimmt werden (Abb.3.30). Die kontinuierliche Abgaberate der Implantate über den gesamten Versuchszeitraum beruht auf diffusionsbedingten Prozessen der Bestandteile BSA/Inulin und Hormon, welche homogen in die Polymermatrix (EVAc) eingebettet sind. Die Porenbildung (Quellung) der löslichen Bestandteile, welche durch den Kontakt mit dem sie umgebenden Medium ausgelöst wird, schafft den Weg für das nach außen diffundierende Hormon (Mylonas *et al.*, 2007). Je homogener dabei die innerliche Struktur ist, wie zuvor durch CT gezeigt, desto länger können gleichbleibende Abgaberationen über einen langen Zeitraum aufrechterhalten werden. Implantate mit größeren Luftporen würden dies durch eine enorme Oberflächenvergrößerung und somit verstärkter Diffusion (Fick'sche Gesetze) nicht gewährleisten können. Während der Anteil von Hormonen, die bereits in geringen Dosen Wirkung zeigen (GnRHa: 50-300 μ g/Kg je nach Fischart und Gewicht), in einem Implantat nicht viel an seiner Gesamtmasse ausmacht und somit auch nicht seine Abgabekinetik beeinflusst, haben Hormone wie 17 β -Estradiol, deren Dosierung (1-10 mg/kg) viel höher angesetzt werden muss, einen größeren Effekt der berücksichtigt werden sollte. Deshalb sind die hier zuvor durchgeführten *in-vitro* Experimente unbedingt nötig, um die Abgabekinetik der Implantate mit dem entsprechenden Hormon zu bestimmen. Die Löslichkeit der zu verwendenden Hormone trägt ebenfalls wie sein prozentualer Anteil am Gesamtimplantat, zur Abgaberate bei. Durch die Verwendung unterschiedlicher Inkubationslösungen (Ringer oder 75 %-Ethanol) konnte die minimale und maximale Hormonabgaberate der Implantate bestimmt werden, was auf den lipophilen Charakter von 17 β -Estradiol zurückzuführen ist. Somit zeigte sich eine minimale Löslichkeit in wässriger Lösung (Fisch-Ringer) und eine maximale in Ethanol, die je nach der eingesetzten prozentualen Zusammensetzung von BSA und Inulin unterschiedlich stark ausgeprägt war. Da man nach Versuchsende der *in-vitro* Experimente keine abnehmende Tendenz der Hormonabgabe erkennen konnte (Abb.3.30), kann vermutet werden, dass diese auch noch länger angehalten hätte. Somit stellen sich diese Implantate ideal für den Einsatz in einer Langzeitstudie über eine künstlich erhöhte 17 β -Estradioldosis und deren Wirkung auf die reproduktive Achse während der Vitellogenese in Fischen heraus. Durch diesen möglichen Langzeiteinsatz, der über mehrere Wochen bis Monate vorstellbar ist, brauchen die Fische also nur einmal in ihrer Ruhe gestört werden und nicht etliche Male, wie es in anderen Protokollen beschrieben wird (Kagawa *et al.*, 2005). Die stressbedingte Unterbrechung der gonadalen Entwicklung ist nicht nur im ABFT be-

kannt (Rivier & Rivest, 1991; Milla *et al.*, 2009; REPRODOTT, 2006) und könnte so durch eine sehr frühe Induktion umgangen werden.

4.4.2 *17 β -Estradiol Hormonimplantate: Wirkung auf die HPGL-Achse in-vivo*

Die in sämtlichen weiblichen oviparen Tieren vorkommende ER gestützte Regulation der Vitellogeninproduktion, die durch 17 β -Estradiol reguliert wird, ist die Rolle von ER α in vielen Studien als Hauptakteur, der innerhalb dieser vermittelt, gezeigt worden, da die Expression seines Gens in Fischen durch 17 β -Estradiolinduktion stark erhöht wird. Generell scheint dies aber nicht auf alle Fischarten anwendbar zu sein, denn es sind auch solche bekannt, wie z.B. die Regenbogenforelle, in denen ER β die Hauptaufgabe des Vermittlers übernimmt (Leanos-Castaneda & van der Kraak, 2007) oder sogar die Wirkung von ER α effektiv inhibiert (Sabo-Attwood *et al.*, 2004). Untersuchungen in denen gezeigt werden konnte, dass es von dem spezifischen Verhältnis der verschiedenen ER-Formen abhängig ist, ob und wie eine zelluläre Antwort auf Estrogensignale ausgelöst wird, sind ebenfalls vor kurzem veröffentlicht worden (Davis *et al.*, 2010). Letztendlich konnten Nelson und Habibi (2010) im Goldfisch zeigen, dass die Induktion von ER α auf der Aktivierung von ER β durch 17 β -Estradiol beruht. Es zeigt sich somit, dass die Funktion und Regulation der ER in den verschiedenen Spezies variieren kann, und somit für jede gesondert untersucht werden muss. Die Ergebnisse der in dieser Arbeit vorgenommenen *in-vivo* Experimente an weiblichen Tilapien, Wolfsbarschen und Thunfischen befürworten dies und weisen die ER α der drei Spezies ebenfalls als Estrogen induzierbar aus, was u.a. eine stark erhöhte mRNA Bildung der Vtg-Gene mit sich brachte. Die zuvor *in-vitro* bestimmten Eigenschaften der Implantate konnten auch in den Modellorganismen Tilapia und Wolfsbarsch bestätigt werden. In beiden konnte während der Langzeitversuche die endogene 17 β -Estradiolkonzentration im Plasma der Tiere langfristig erhöht werden, was für eine kontinuierliche Abgabe des Hormons aus den Implantaten spricht (Abb.3.31 & 33). Eine Steigerung des GSI-Wertes in weiblichen Tilapien wies den induzierenden Effekt der Hormonbehandlung, nicht nur für die einzelnen Messparameter, sondern auch auf die gesamte Gonadenentwicklung innerhalb des Versuchszeitraumes es nach. Während in vielen verschiedenen Arten ein homogenes Muster der ER Wirkung und Gewebeverteilung vorgefunden werden kann, konnten aber genauso Arten beschrieben werden, die von diesem abweichen. So konnte Esterhuysen *et al.* (2010), ein übliches Muster einer induzierenden Wirkung von 17 β -Estradiol auf ER α in der Leber von Tilapien (*Oreochromis mossambicus*) nachweisen, für ER β und ER γ konnte dies nicht gezeigt werden. Ein anschließender Korrelationstest der Genexpression von Vtg mit den verschiedenen ER erbrachte aber eher ein sonst nicht übliches Muster. Hier zeigte sich, dass die β - und γ -Formen mit der des Vtg korrelierten. Die in dieser Arbeit am Modellorganismus Tilapia (*Oreochromis niloticus*) durchgeführten Induktionsexperimente mit 17 β -Estradiol brachten ebenfalls eine durch dieses Hormon hervorgerufenen Expressionserhöhung für ER α zum Ausdruck, welche auch noch nach 14 Tagen p.i. deutlich zu erkennen war und zudem noch Höchstwerte im Vergleich zur Kontrollgruppe aufwies (Abb.3.32). Gleichzeitig konnte dasselbe Muster für die Vtg mRNA Expression gefunden werden. Die Korrelationsanalyse beider erbrachte einen hohen r-

Wert und zeigte so die starke Abhängigkeit beider zueinander. Die von Esterhuyse gezeigte Korrelation mit ER β konnte nicht bewiesen werden. Für ER β konnte hier eher eine Minderung festgestellt werden, die aber nicht für alle Inkubationstage signifikant bewiesen werden konnte. ER β scheint hier, wie es in anderen Fischarten auch der Fall ist, eine untergeordnete Rolle für die durch 17 β -Estradiol vermittelten Signalwege in der Leber zu haben. Während ER α oft in der Leber vorherrscht, kommen die anderen ER vermehrt in Gonaden, Gehirn und andern Gewebetypen vor (Menuet *et al.*, 2004; Sabo-Attwood *et al.*, 2004). In männlichen Tilapien konnte die Estrogen Wirkung auf die ER α - und Vtg Expression der Leber erst nach 14tägiger Inkubationszeit gezeigt werden (Abb.3.32). Dies ist nicht verwunderlich, da von Davis *et al.* (2008) bewiesen werden konnte, dass männliche Tiere eine viel höhere ER β Expression in der Leber aufweisen als eine ER α . Es kann so vermutet werden, dass ER α als natives Protein normalerweise nicht so stark in der Leber von männlichen Tilapien vorhanden ist und erst durch die Überstimulation von 17 β -Estradiol vermehrt gebildet wurde, was letztendlich nach 2 Wochen zu einer vermehrten Genexpression von ER α führte.

In Wolfsbarschen konnte die durch 17 β -Estradiol ausgelöste Steigerung der Expression von ER α in beiden untersuchten Gewebetypen (Leber & Gonade) bewiesen werden. Dabei zeigte sich, dass ER α in der Leber 13fach mehr exprimiert wird als in der Gonade. Auch Halm *et al.* (2004) berichtete von einer 8fach höheren Expressionsrate für diese Fische im Vergleich zwischen den beiden Gewebetypen. Unterschiede lagen in dem Verlauf und in der Intensität der ER α Expressionssteigerung. In dem Gewebe der Leber konnte eine 4fach stärkere Erhöhung der Genexpression bestimmt werden, zudem zeigte sich ein glockenförmiger Verlauf mit einem abrupten Anstieg auf Höchstwerte um Tag 9 bis 13 (p.l.). In der Gonade konnte man einen kontinuierlichen Anstieg der Expressionsrate erkennen, welche erst an Tag 16 p.l. Maximalwerte erreicht. Dieser Verlauf könnte ein erster Anhaltspunkt sein, der auf zelluläre Regelmechanismen hindeutet, die die eigentlichen Proteinbiosynthese der ER in den unterschiedlichen Geweben steuern. Das ER α in der Gonade viel geringer exprimiert wird als in der Leber ist für viele Fischarten beschrieben. Wie dies aber zellulär reguliert wird, ist bis heute nur posttranskriptional teilweise in Landwirbeltieren erforscht (O'Mally *et al.*, 2008). Der Autoregulation von ER α auf Proteinebenen durch seinen eigenen Liganden konnte eine wichtige Rolle bei seiner positiven und negativen Regulation zugeschrieben werden. Dabei wird die Proteolyse nach Ligandenbindung ausgelöst (Preisler-Mashek *et al.*, 2002) und ER α nach einer posttranskriptionalen Modifikation (Ubiquitinierung) über 26S Proteasome degradiert (Wijayaratne & Mc Donnell, 2001).

Während die oben beschriebenen Zusammenhänge für Tilapia und Wolfsbarsch schon bewiesen wurden, konnte dies für Thunfische erstmals in dieser Arbeit durch eine 17 β -Estradiolinduktion in verschiedenen Konzentrationen gezeigt werden, denn für Makrelen und Thunfische (Scombridae) ist bis heute sehr wenig auf diesem Gebiet geforscht worden. Die eingesetzten Hormonimplantate zeigten selbst nach 3 Wochen immer noch Wirkung. In männlichen und weiblichen Fischen konnten so signifikante Unterschiede in ihrem Plasmalevel für 17 β -Estradiol bestimmt werden, die in weiblichen Tieren erwartungsgemäß höher lagen. Sämtliche sonst gemessenen Parameter in den induzierten Tieren, wie die ER α - und Vtg-Genexpression und die Proteinkonzentration von Vtg und ZrP im Plasma, wiesen im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe stark erhöhte Werte auf, die alle miteinander

positiv korrelierten. Zudem konnte eine dosisabhängig Regulation der ER α und Vtg-Expression gezeigt werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den hier zuvor für andere Arten beschriebenen Folgen einer 17 β -Estradiolinduktion. Der ABFT stellt somit eine weitere Fischart dar, deren HPGL-Achse durch eine gezielte Hormoninduktion, nicht nur mit dem bisher genutzten GnRH α , beeinflusst werden kann. Dieser Effekt bezieht sich nicht nur auf eine einzelne Ebene der HPGL-Achse, sondern konnte für weiterführende Reaktionen innerhalb dieser gezeigt werden. So führte der 17 β -Estradiol induzierende Effekt nicht nur zu einer Erhöhung der ER α Genexpression in der Leber, es konnte auch eine für das Gen von Vtg und das aus ihm gebildete native Protein Vitellogenin im Plasma nachgewiesen werden. Die normalerweise dadurch bewirkte Erhöhung des GSI-Wertes, wie es in Tilapien gezeigt wurde, konnte in Thunfischen nicht bewiesen werden. Dies ist aber aus der Tatsache begründbar, dass es sich um juvenile Fische handelte, in denen sich die Gonaden noch nicht im Wachstum befanden. Eine histologische Untersuchung sämtlicher Gonaden zeigte dies auch und wies sämtliche Versuchstiere als nicht ausreichend geschlechtsreif aus (SELFDOTT, 2012).

Wegen der leider sehr geringen Probenzahl, die durch eine mangelhafte Induktion der Tiere mit den Implantaten begründet war, können die Ergebnisse so nur Tendenzen zeigen, die nochmals in einer neuen Versuchsreihe bewiesen werden sollten. Die Arbeit mit einem so anspruchsvollen und gleichzeitig wertvollen Fisch bringt immer gleich mehrere Probleme mit sich, die geplante Experimente leider nicht immer durchführbar machen. Die weiteren Studien die von der SELFDOTT-Gruppe mit diesen Tieren unternommen wurden, deuten mögliche Wirkungen der Hormoninduktion in höher liegenden Teilen der HPGL-Achse an. Es konnte so eine Erhöhung der Gonadotropine (LH/FSH) in der Hypophyse in hormoninduzierten Tieren beobachtet werden. Trotz der geringen Probenzahl kann man durch die meist deutlichen Unterschiede zwischen Kontroll- und 17 β -Estradiolbehandelter Gruppe von dem induzierenden Effekt der Hormonbehandlung auf die HPGL-Achse in Thunfischen sprechen. Für oben beschriebene Experimente standen nur juvenile Thunfische zur Verfügung, an adulten Tieren konnte die Hormoninduktion nicht getestet werden. Dennoch konnten interessante Ergebnisse anhand dieser Fische gezeigt werden. Durch den hier möglichen Vergleich der verschiedenen Altersklassen juveniler Thunfische, die sich in einem Alter von 2 bis 4 Jahren befanden, konnte ihre reproduktive Entwicklung in einer Erhöhung der hier bestimmten Parameter deutlich gemacht werden (Abb.3.26 F). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Hormoninduktion von juvenilen bzw. nicht reproduktiv aktiven Tieren künstlich gesteigert werden konnte. Diese Erhöhung reichte in Bereiche, die normalerweise nur von adulten Thunfischen in der Vorlaichzeit erreicht werden. Es konnte somit gezeigt werden, dass sich die Entwicklung von 3 bis 4jährigen Thunfischen künstlich durch die Induktion mit dem Steroidhormon 17 β -Estradiol in den hier untersuchten Parametern vorantreiben lässt.

Dies beweisen, sollten weiterführende Experimente an adulten Thunfischen durchgeführt werden, damit der hier beschriebenen Effekt einer 17 β -Estradiolinduktion auch auf Tiere mit einer „normal“ stattfindenden reproduktiven Entwicklung getestet werden kann. Dies sollte schon mehrere Wochen vor der eigentlichen Laichzeit der Fische geschehen, damit die Wirkung des Hormons ausreichend lange die gesamte HPGL-Achse beeinflussen kann. Zusätzlich sollte die Kombination von Estrogen,

Kiss-Peptiden und GnRHa zusammen getestet werden, da für dieses sein positiver Effekt in Thunfischen schon bewiesen wurde. Ob dies allerdings auch für die Einleitung einer verbesserten Vitellogenese geeignet ist, wurde bis heute noch nicht experimentell geklärt. Hierbei sollten besonders die bisher bekannten, durch Steroidhormone ausgelösten positiven und negativen Rückkopplungseffekte auf die höher liegenden Teile der HPGL- Achse beachtet werden (Roa & Tena-Sempere, 2007), die dem Gehirn normalerweise als Indikatoren des aktuell vorliegenden sexuellen Status der Tiere dienen. Die Mechanismen, die diesem zugrundeliegen, sind sehr komplex und immer noch nicht völlig verstanden. Was aber sicher scheint, sind die in adulten Fischen auftretenden negativen Aspekte bei einer Überdosierung mit Hormonen (Dickey & Swanson, 1998), was von der Fischart und dessen reproduktiven Status ebenfalls abhängig ist (Zohar *et al.*, 2010). Somit sollte die vom Implantat abgegebene Menge des Hormons vorher genau kontrolliert und eingestellt werden, damit dies nicht eintritt. Bei einer genauen Dosierung sollten aber keine negativen Effekte auftreten, da das natürliche Hormon 17β -Estradiol eine zu kurze Halbwertszeit von ca. 20 Minuten aufweist (Forest *et al.*, 1993) und so in niedriger Dosierung nicht zu einer Unterdrückung der hypophysären Gonadotropinsekretion führen sollte.

4.5 Der Einfluss von Xenobiotika auf den ABFT

Schon lange wird der Einfluss von Xenobiotika auf das endokrine System in Fischen und die daraus resultierenden Folgen für die Tiere diskutiert. Trotz einer Vielzahl von Anzeichen auf EDCs (Erklärung siehe 1.5) in Fischen, wird die Interpretation der Ergebnisse erheblich dadurch erschwert, dass es keine Grenzwerte für eine normale bzw. unnormale Vitellogenin- oder Zona radiata Produktion in den Geschlechtern gibt. Wegen der auch in männlichen Fischen existierenden ER in der Leber kann es auch in ihnen zur Bildung von Vtg und ZrP kommen (Hara *et al.*, 1993; Roubal *et al.*, 1997; Werawatgoompa *et al.*, 1997; Heppel & Sullivan, 1999). Dies geschieht allerdings normalerweise nur unerschwerlich in geringen Maße, da im männlichen Sexualzyklus andere Hormone (T & 11-KT) aktiv sind, die keine Liganden der ER darstellen. 17β -Estradiol wird in ihnen nur geringfügig gebildet, da es zusammen mit den anderen Steroiden eine gemeinsame Ausgangsverbindung (Cholesterin) in ihrer Biosynthese hat. Erst Schulz (2006) definierte Schwellenwerte der Proteinkonzentrationen für Vtg und ZrP aus verschiedenen Proben (Plasma ($n=165$), Muskel und Mukus) von männlichen ABFT. Er war so in der Lage auf der Basis der Proteinkonzentrationen einen Geschlechtsunterschied anhand dieser Schwellenwerte zu beweisen. Im Falle von Plasmaproben, die sich am geeignetsten herausstellten, konnte so mit einer Wahrscheinlichkeit von 90% das richtige Geschlecht von über 373 Fischen bestimmt werden. Für beide Proteine wurde hier ein Schwellenwert von ca. $50 \mu\text{g/ml}$ definiert. Für männliche ABFT bestand somit eine Möglichkeit diese auf ihre Belastung mit EDCs zu prüfen, da höhere Werte als dieser Schwellenwert rein statistisch nicht mit einer latenten in männlichen Fischen vorkommenden Proteinbildung einhergehen. Eine weitere Methode dies zu beweisen, konnte durch Resultate dieser Arbeit erstmals gezeigt werden. Während in weiblichen Wildtieren keine Korrelation der $\text{ER}\alpha$ Genexpression in der Leber mit ihrem Alter bzw. ihrer Länge gezeigt werden konnte, war

dies in männlichen Tieren ab einer Körperlänge von 150 cm sehr wohl der Fall. Zusätzlich wiesen einige der größeren männlichen Tiere erhöhte Vtg oder ZrP Level im Plasma auf (Daten nicht gezeigt), was in kleineren ABFT nicht zu erkennen war. Wegen ihrem lipophilen Charakter, den die meisten Xenobiotika haben, akkumulieren sie und ihre Abbauprodukte in fettreichen Geweben (Thomas & Colborn, 1992). und werden von diesen auch wieder in den Blutkreislauf der Tiere abgegeben (Arnold *et al.*, 1995). Eine Vielzahl von in die Umwelt entlassenen EDCs haben estrogenartige Struktur und Wirkung. Sie haben dabei teilweise stärkere Bindungseigenschaften als das natürliche Estrogen (Arukwe *et al.*, 1997). Ein Grund der für die Theorie einer Akkumulation der EDCs im Fettgewebe spricht, ist die von Thunfischen eingeschlagene Wachstumskurve, die ein allometrisches Wachstum darstellt (REPRODOTT, 2006). Betrachtet man diese Kurve genauer, erkennt man, dass das lineare Wachstum (Körperlänge zu Gewicht) ab einer Länge zwischen 120 und 140 cm in ein proportionales Wachstum übergeht. Ab hier wachsen die Fische nicht mehr so stark in die Länge, dafür aber vermehrt in die Breite. Dies bedeutet wiederum, dass sie vermehrt Muskelgewebe aufbauen und auch Fett in gewissen Maßen einlagern. Alle Proben der männlichen Wildtiere wurden während der Laichzeit im Mittelmeer genommen. Die Laichzeit stellt für jede Tierart eine energieraubende Zeit dar, in der Energiereserven mobilisiert werden müssen, die u. a. durch metabolische Fettverbrennung bereitgestellt werden (Lambert & Dutil, 2000). So ist es also naheliegend, dass gerade zu dieser Zeit vermehrt EDCs im Blutkreislauf der Tiere vorliegen, die dann ihre Effekte, wie die hier bewirkte Erhöhung von ER α , auslösen. Die Belastung durch EDCs führt also in männlichen Tieren gerade in dieser wichtigen Phase ihres Reproduktionszyklusses zu einer unnatürlichen Bildung von Proteinen (Vtg & ZrP), so dass die Energiebilanz im Vergleich zu nicht belasteten Tieren eindeutig verschoben vorliegt. Zudem wurde auch schon von Schulz (2006) vermutet, dass die Stellung der ABFT in der Nahrungskette als ein opportunistischer Spitzenprädatoren einen Einfluss auf ihre Belastung mit EDCs haben könnte, zumal die Aufnahme von Xenobiotika über die Nahrung schon lange für Fische diskutiert wird (Pelissero & Sumpter, 1992). Chase *et al.* (2002) zeigte in seiner Studie, dass die Nahrung von Thunfischen ein breites Spektrum hat. In Mageninhalten fand er neben 21 Fischarten auch neun Invertebratenspezies. Neben Quallen und Salpen, waren auch sessile das Benthos belebende Arten, wie Krabben, Octopusse und Schwämme unter den gefundenen Tieren. Besonders bodenlebende Organismen sind besonders mit EDCs kontaminiert, da sich diese an feine Partikel gebunden ablagern, zu Boden sinken und von diesen dann aufgenommen werden (Melwani *et al.*, 2005). Im Allgemeinen fressen junge Thunfische Crustaceen, Cephalopoden und andere kleinere Fische, während ältere Artgenossen größere Fische wie Heringe, Sardinen, Makrelen und Sandaale bevorzugen (Fromentin & Powers, 2005), deren Fettanteil (Speicherort vieler EDCs) um ein vielfaches höher ist. Da das Größenspektrum der hier untersuchten männlichen Tiere aber erst bei 120 cm begann und es sich damit bei allen Tieren der Studie um adulte und eigentlich große ABFT handelte, scheint die Annahme eines nahrungsbedingten Grundes als alleinige Ursache eher unzutreffend zu sein. Um diese These zu stützen, müssten noch jüngere männliche Wildbahntiere in die Kalkulation mit einbezogen werden. Des Weiteren konnte in dieser Arbeit eine im Mittel 8fach höhere ER α Expressionsrate in der Leber von männlichen Wildtieren im Vergleich zu männlichen Käfigtieren bestimmt werden, ohne dabei die

Altersstruktur zu berücksichtigen. Die Fütterung von in Gefangenschaft gehaltenen Thunfischen geschieht nur mit kleinen Fischarten wie Makrelen oder Heringen, die teilweise aus dem Mittelmeer, aber auch aus dem Atlantik stammen. Man könnte also annehmen, dass die Futtertiere nicht so belastet sind wie die von Wildbäuhntieren aufgenommene Nahrung. Die Vitellogenin-Induktion in männlichen Schwertfischen *Xiphias gladius* konnte im Mittelmeer gezeigt werden, während Tiere aus dem pazifischen Ozean keine aufwiesen. Zudem konnten De Metrio *et al.* (2003) in männlichen Schwertfischen deutliche Anzeichen einer Belastung nachweisen, sie konnten zwitterige Gonaden nachweisen. Die Tatsache, dass in der Leber von im Mittelmeer gefangenen Fischen das Enzym CYP1A, welches die Aufgabe der Deaktivierung von Xenobiotika hat, gefunden wurde, bestätigte die Annahme, dass Tiere dieser Orte vermehrt organischen Fremdstoffen ausgesetzt sind (Desantis *et al.*, 2005). Da es im Mittelmeer nur zu einem geringen Austausch von Wassermassen mit dem atlantischen Ozean kommt und da viele Industrienationen am Mittelmeer angrenzen, liegen hier im Vergleich zu anderen Ozeanen erhöhte Mengen bestimmter EDCs vor (Fossi *et al.*, 2001; Licata *et al.*, 2005).

Der Ursprung und die Wirkungsweise einer EDC Belastung sind wahrscheinlich vielseitig und können in sämtlichen zuvor genannten Faktoren begründet sein. Hier genutzte Proben von männlichen Wildbäuhntieren waren nur Stichproben aus dem Mittelmeer. Da bei den meisten dieser Tiere aber ab einer Länge von 150 cm eine anormale ER α Expression auftrat, kann vermutet werden, dass die Belastung mit EDCs ein generelles Problem für die ABFT Population zumindest im Mittelmeer darstellt.

4.6 Kritische Betrachtung

4.6.1 *Forschung am ABFT und der Aufbau einer nachhaltigen Aquakultur*

Durch neue Erkenntnisse aus Forschung und Zuchtversuchen, die in der letzten Zeit in Europa gemacht wurden, ist wohl in den nächsten Jahren damit zu rechnen, dass der Aufbau einer nachhaltigen ABFT Aquakultur im Mittelmeer gelingen wird. So konnten im Projekte SELFDOTT einige Abläichvorgänge von Käfigtieren induziert werden, so dass eine ausreichende Menge von befruchteten Eiern gewonnen werden konnte. Nach Transfer dieser in die auf dem Land befindlichen Aufzuchtanlagen gelang es erstmals in Europa im Jahr 2010 juvenile ABFT bis zu einem Gewicht von 1 kg aufzuziehen. Zurzeit werden weiterführende Aufzuchtversuche mit dem Laich aus dem Sommer 2011 unternommen, die vielversprechend scheinen, so dass die Hürde des kritischen Gewichts von 1kg überwindbar scheint. Das wissenschaftliche Arbeiten an einem so wertvollen und großen Fisch stellt aus mehreren Gründen eine Herausforderung und Besonderheit dar. Die bisherigen Gelder für Forschung wurden immer von der EU bereitgestellt, da sonst keine andere wissenschaftliche Institution diese aufbringen konnte. Hierdurch ergab sich in den Projekten ein starkes Geflecht von unterschiedlichen wissenschaftlichen Interessen der teilnehmenden Partner aus der EU, die alle bestmöglich berücksichtigt werden mussten. Vor allem aber das Zusammentreffen von fast reinen kommerziellen Belanggründen der kooperativen Fischfarmen, ohne deren Mitwirken kein Projekt am ABFT möglich ist, mit den wissenschaftlichen Absichten der Forscher, stellen oft Hindernisse dar, die sich auf geplante Experimente auswirken. Große Flexibilität und Vorausplanung sind nicht nur hierbei gefragt, sondern auch

bei der Planung der mehrtägigen bis wöchigen Forschungsreisen für die Probenahme. Trotz größter Vorsorge und Planung kann der experimentelle Umgang mit einer so großen und stressanfälligen Tierart misslingen und so die geplanten Versuche verzögern. Denn man ist dabei ebenso von unkontrollierbaren Einflüssen wie dem Wetter abhängig, die das Arbeiten auf einem Schiff teilweise unmöglich machen, sowie von den kooperativen Fischfarmen, die das ganze Material (Boote, Käfige, Arbeitskräfte, usw.) bereitstellen. Weitere Hürden bringt die starke Reglementierung durch die ICATT, die auch das experimentelle Arbeiten mit diesen Tieren betrifft und erschwert. Die Forschungsarbeit an dieser Tierart kann also nicht mit sonst üblichen Modellorganismen, wie Maus oder anderen kleinen Fischarten, verglichen werden, die direkt nahe der Forschungseinrichtung gehalten werden können.

Die vielfältigen Verflechtungen und Abhängigkeiten finanzieller Art innerhalb dieses Forschungsgebietes haben das finale Ziel, eine nachhaltige ABFT Aquakultur aufzubauen, teilweise von ihren eigentlichen Idealen, dem Schutz des Fisches, weggeführt. Es treten verbunden mit diesem Ziel immer mehr wirtschaftliche Interessen auf, die die Forschung und schnelle Problemlösung eher behindern als fördern.

Auch wenn es in naher Zukunft gelingen sollte den Lebenszyklus des ABFT in Gefangenschaft zu schließen, bis hin zur Vermarktung der Nachkommen, so dass sich die Wildtierbestände erholen können, trägt dies nicht allein zu einer nachhaltigen und die Umwelt schonenden Aquakultur bei. Beispiele aus der Vergangenheit zeigen, wie z.B. die Lachszucht in Norwegen (Nash, 2001), dass mit dem Aufbau einer Aquakultur im offenen Meer viele negative Aspekte verbunden sind (Pillay, 2005; Goldberg & Naylor, 2005). Diese umfassen u.a. die Eutrophierung der Gewässer durch organisches Material in Form von überschüssigem Futter und Fäkalien der Zuchttiere, was mit der Zerstörung des benthischen Systems im Zuchtgebiet einhergeht oder mit der Belastung der Umwelt und des Menschen durch in der Fischzucht eingesetzte Antibiotika, Pestizide usw. Einen weiteren Aspekt stellt die negative FCR (Food Conversion Ratio) dar. Diese liegt bei Thunfischen teilweise bei 1:25, und beschreibt die einzusetzende Menge an Futterfisch, mit der eine 1kg Gewichtszunahme am Thunfisch erzielt wird (Aguado-Giménez & García-García, 2005).

So kann nur gehofft werden, dass zukünftig Fehler aus der Vergangenheit nicht wiederholt werden, und es so durch die weitere Forschung an Futtermitteln und landbasierten Kreislaufsystemen geschafft wird, eine wirklich nachhaltige und umweltschonende Thunfischaquakultur aufzubauen.

4.6.2 Experimentelle Umsetzung der Hormoninduktion und genutzte Methodik zur Bestimmung der reproduktionsphysiologischen Parameter

Aus oben angedeuteten Gründen war die Erprobung der Hormonimplantate nicht ausreichend, um den Effekt von 17β -Estradiol auch in Thunfischen signifikant zu beweisen. Es konnten aber deutliche Tendenzen festgestellt werden, so dass diese Methode in kommenden Projekten erneut getestet werden sollte, da sie vielversprechend scheint. Zudem war es nur möglich juvenile Thunfische für dieses Experiment zu nutzen. Adulte Tiere standen leider nicht zur Verfügung. Aber gerade diese

wären für den Beweis eines die Vitellogenese steigernden Effektes der Implantate geeigneter gewesen, da ihr Geschlechtsapparat voll entwickelt vorliegt. So war die Induktion mit 17β -Estradiol nicht in der Lage den GSI-Wert in juvenilen Thunfischen zu erhöhen, was eventuell in adulten Tieren der Fall gewesen wäre. In dieser Dissertation konnte diese Wirkung an Tilapien gezeigt werden.

Für Induktionsexperimente an Tilapien bestand obiges Problem nicht. Es trat aber ein anderes, unerwartetes auf. Da für die Zucht in der Tilapia Aquakultur fast nur männliche Fische gezüchtet werden, bestand das Problem darin ausreichend weibliche Versuchstiere zu erhalten. Aus diesem Grund wurde an den einzelnen Versuchstagen (p.l.) nur mit einer geringen Tierzahl ($n=4$) gearbeitet. Trotzdem konnten aber aussagekräftige Ergebnisse erzielt werden. Des Weiteren konnte zu Versuchsbeginn aus Platzgründen nicht allen Tilapien ein Hormonimplantat gleichzeitig eingesetzt werden, um die Versuchsreihe einheitlich zu starten. Den Fischen der verschiedenen Probenahmezeitpunkte (p.l.) wurden so in getrennten Gruppen das 17β -Estradiolimplantat verabreicht. Zu jedem neuen Start einer Induktionsreihe wurden aus diesem Grund Blutproben von Kontrolltieren genommen, um einen möglichst genauen Vergleich der Plasmahormonwerte zu erzielen.

Für die Quantifizierung von genspezifischer mRNA für Genexpressionsanalysen stellt die quantitative real-time PCR (Q-PCR) schon lange eine gängige Methode dar. Für die Analyse, der aus ihr stammenden Daten, gibt es heute eine Vielzahl von Möglichkeiten (Pfaffl, 2004). In dieser Dissertation wurde zur Auswertung der Q-PCR Daten die effizienzkorrigierte, relative Quantifizierung mittels der $\Delta\Delta C_T$ -Methode eingesetzt (Pfaffl, 2002). Hierbei wird die Expression des zu untersuchenden Genes mit der eines nicht regulierten Kontrollgenes (HKG: Housekeeping Gen) normalisiert. Es kommt nicht wie bei der absoluten Quantifizierung zur Bestimmung der Startkopienzahl oder -konzentration mittels einer Standardkurve. Es werden vielmehr Verhältnisse in den verglichenen Gruppen beschrieben, so dass das Endergebnis einen Genexpressionsunterschiede zwischen mehreren Proben (ΔC_T) oder aber auch gemittelt zwischen zwei Gruppen ($\Delta\Delta C_T$) ausdrückt, die unterschiedlich behandelt wurden. Die Vorteile der Normalisierung liegen in der Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse, da Gewebe- und Matrixeffekte, unterschiedliche RNA Extraktionseffizienzen sowie Fehler bei der RT innerhalb einer experimentellen Probe gleichermaßen das Zielgen und das HKG betreffen. In den folgenden Berechnungen des Expressionsunterschiedes heben sich diese individuellen Probeneffekte wieder auf (Pfaffl, 2004). Um diese Methode nutzen zu können und um mit ihr reproduzierbare und verlässliche Daten zu generieren, mussten im Vorfeld einige Tests gemacht werden. Besonders wichtig dabei war die Wahl eines für die experimentelle Fragestellung geeigneten HKG. Da nach Literaturrecherche der Effekt von 17β -Estradiol auf einige schon oft genutzte HKG beschrieben wurde (Schmittgen & Zakrajsek, 2000, Filby & Tyler, 2007), galt es dies auch hier zu berücksichtigen. Wie auch in diesen Studien erwies sich β -Actin als nicht geeignet, es fand eine Regulation des Genes in mit diesem Hormon behandelten Tilapien statt. 18S-rRNA hingegen wurde konstant in induzierten Tieren und in Kontrolltieren exprimiert (Abb.3.11) und wurde deshalb als HKG in dieser Dissertation verwendet. Eine noch sicherere Methode wäre der Einsatz von mehreren HKG gewesen (Pfaffl *et al.*, 2004). Dies wurde wegen dem enormen mehr Aufwand für die Vielzahl an Proben, die in dieser Arbeit untersucht wurden, nicht durchgeführt.

Ein weiterer wichtiger Punkt war die Bestimmung der PCR-Effizienzen der genutzten Primerpaare. Unter optimalen Standardbedingungen wird in der PCR eine Verdoppelung der DNA Menge in jedem Zyklus voraus gesetzt. Man geht also auch in der Q-PCR von dieser Effizienz aus, was natürlich in der Praxis nicht der Fall ist. Geringste Schwankungen in der Effizienzen von Zielgen zu Referenzgen können zu enormen Abweichungen in den Expressionsunterschieden führen (Stratagene, 2001), so dass die Ergebnisse einer Q-PCR Analyse verfälscht würden. Um diesem Umstand Rechnung zu tragen, wurden die Effizienzen, der in dieser Arbeit genutzten Primer, durch zwei unterschiedliche Methoden bestimmt (Abb.3.12) und in der Berechnung der Genexpressionsunterschiede mit berücksichtigt (siehe Anhang). Um größtmögliche Sicherheit zu gewährleisten, dass in jeder Q-PCR Reaktion die zuvor bestimmte Effizienz nicht abweicht, müsste dies für jede Probe bestimmt werden. Das umzusetzen war wegen der hohen Probenanzahl nicht möglich und wurde deshalb nur mit einigen Proben exemplarisch in einem Lauf getestet (Abb.3.12 D-E). Geringe Schwankungen konnten beobachtet werden, diese lagen aber dennoch in dem zuvor bestimmten Bereich der Effizienz einzelner Primer. Unter Einbezug sämtlicher so gewonnener Ergebnisse und daraus gezogener Erkenntnisse konnte die hier genutzte Methode als eine sehr robuste und verlässliche beschrieben werden. Sie erreichte Variationskoeffizienten (CV %) von 8,3-8,9 für Intra-Assay Replikate und 12,1-13,4 für Inter-Assay Replikate zufriedenstellende Werte.

Gleiches galt für den hier genutzten ELISA, der für die Bestimmung der beiden Proteine Vtg & ZrP sowie für das Steroidhormon 17β -Estradiol eingesetzt wurde. Diese Methode wird schon lange routinemäßig für die Konzentrationsbestimmung von Proteinen und Steroiden aus Plasmaproben in der Arbeitsgruppe Ökophysiologie genutzt (Susca *et al.*, 2001; Schulz, 2006; Wesendonk, 2006). Durch die experimentelle Bestimmung der Variationskoeffizienten für die drei eingesetzten Antikörper (siehe Tab. 3.2) konnte der ELISA ebenfalls als zuverlässiges und robustes Messsystem beschrieben werden. Nash *et al.* (2000), der diese ELISA Technik als erster erprobte, bestimmte ebenfalls ähnliche Werte für den Intra- und Inter-Assay-Variationskoeffizienten (CV %) in den verschiedenen ELISA. Zudem wiesen die Bindungskurven (Abb.3.12) der jeweiligen Antikörper kompetitive Bindungseigenschaften (sigmoider Kurvenverlauf) auf, die gleich für den eingesetzten Standard, den seriell verdünnten internen Standard oder Plasmaproben waren, wodurch die Zuverlässigkeit nochmals untermauert wird. Weil diese Methode auf den Einsatz von Protein- oder Steroidstandards angewiesen ist, kann es hierdurch zu verfälschten Messergebnissen kommen. Da aber immer mit größter Sorgfalt mit den Standardlösungen umgegangen wurde, sie immer frisch aufgetaut wurden, scheint dies nicht in Betracht zu kommen. Zudem waren hier gemessene Werte fast alle stets vergleichbar mit den in anderen Fischarten vorzufindenden Protein- und Steroidkonzentrationen im Plasma dieser Tiere. Plasmaproben, die denaturierte Proteine oder Steroide beinhalten sind zwar nicht auszuschließen, können aber durch die langjährig genutzten Standardprotokolle mit großer Sicherheit ausgeschlossen werden. Zudem erbrachte der Vergleich von früher genutzten Standards mit den hier genutzten immer eine sehr hohe Reproduzierbarkeit der Messergebnisse. Eingeschleppte Fehler aufgrund einer nicht exakten Steroidextraktion konnten ausgeschlossen werden (siehe 3.3.2.2).

5 Zusammenfassung

Die große ökonomische Bedeutung der Fischereiwirtschaft und die damit einhergehende Überfischung zahlreicher Arten, wie dem zur Zeit in allen Medien vertretenem Atlantischen Blauflossenthunfisch (ABFT), haben in den letzten Jahren zu einer starken Abnahme der Populationen geführt. Die bisher in Europa existierende „Thunfischaquakultur“ ist nicht nachhaltig und beruht einzig und allein auf der Mästung von im Mittelmeer oder im Atlantik gefangenen Wildtieren. Auf lange Sicht hin betrachtet, werden sich die Bestände sämtlicher Thunfischarten nicht erholen können und im schlechtesten Fall sogar weiter dezimiert werden. Dies kann bis zu einer völligen Ausrottung der Arten führen, wenn nicht weitere Fortschritte im Management der Bestände oder aber in der Zucht der Tiere gemacht werden. Wissenschaftliche Studien über die reproduktionsphysiologischen Vorgänge in Fischen tragen seit langem dazu bei, dass der ständig ansteigende Bedarf nach Fisch von den Aquakulturbetrieben bedient werden kann. Dies hat auch die Europäische Union erkannt und fördert folglich schon lange Zeit die Forschung in diesem Schwerpunktgebiet.

Das Ziel dieser Dissertation, welche im Rahmen der von der EU geförderten Projekte „SELFDOTT“ (Self-sustained Aquaculture and Domestication of Bluefin Tuna *Thunnus thynnus*, 2008-2011) und ALLOTUNA (Set up of an integrate system of the bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) farming in the Gulf of Taranto, 2008-2010) stattfand, war es, einen weiteren Beitrag zur Klärung der Frage zu leisten, warum der weibliche Reproduktionszyklus von in Gefangenschaft gehaltenen Thunfischen nicht vergleichbar mit dem von Wildtieren abläuft, und es so zu einer verminderten Fertilität dieser Tiere kommt.

Durch die Analyse von molekularbiologischen und physiologischen Aspekten des Reproduktionszyklusses weiblicher Thunfische, die an der als zentrales Ereignis geltenden Vitellogenese, dem Wachstum der Oozyten, beteiligt sind, konnte im Vergleich zwischen Wildbahn- und Käfigtieren deutliche Anzeichen einer geminderten Gametogenese von in Gefangenschaft gehaltenen Tieren gezeigt werden. Die bereits bekannten reproduktiven Fehlfunktionen von in Gefangenschaft lebenden ABFT scheinen somit tiefgreifendere Effekte zu haben als bisher gezeigt werden konnte. Besonderes Augenmerk lag dabei auf dem Estrogen Rezeptor alpha ($ER\alpha$), der ein zentrales Bindeglied von endokrinen Signalen und ihrer Weiterleitung in der Zelle während reproduktionsbiologischer Vorgänge ist. Desweiteren wurden die durch seine Aktivität hervorgerufenen zellulären Ereignisse, die normalerweise am Ende der Vitellogenese befruchtungsfähige Eizellen entstehen lassen, untersucht. Die verschiedenen Estrogen Rezeptor Typen sind in einer Vielzahl von Teleostern und Humanoiden bereits nachgewiesen worden. Der ABFT stellt nun den ersten Vertreter der Scombridae (Makrelen und Thunfische) dar, für den die Existenz des Alpha-Typs ebenfalls gezeigt werden konnte.

Um die schlechtere reproduktive Entwicklung von Käfigtieren positiv zu beeinflussen, wurde in dieser Arbeit ein schon für andere Zwecke bekanntes Hormonträgersystem genutzt. Nachdem dieses System durch *in-vitro* Experimente auf das hier genutzte Steroidhormon 17β -Estradiol abgestimmt war, wurde es zuerst an zwei Modellfischen (Tilapia und Wolfsbarsch) *in-vivo* getestet und konnte anschließend am eigentlichen Versuchstier (Thunfisch) eingesetzt werden. In beiden Modellorganismen konnte durch die Verabreichung der Hormonimplantate eine deutliche Erhöhung des Hormonlevels bewirkt werden, welches über die gesamte Versuchsdauer aufrecht erhalten werden konnte. Gleichzeitig wurde durch die Behandlung die Genexpression aller untersuchten Gene gesteigert, was sich letztendlich ebenfalls in einem Anstieg des gonadosomatischen Index (GSI: prozentualer Anteil der Gonade am Gesamtkörpergewicht) in Tilapien widerspiegelte. Dieser gilt generell als ein Indikator für die Güte der reproduktiven Entwicklung in Fischen.

Durch den Einsatz der Implantate an juvenilen Thunfischen in der Altersklasse von drei bis vier Jahren konnten ebenso oben beschriebene Wirkungen auf die reproduktionsphysiologischen Parameter gezeigt werden. Diese waren entsprechend der eingesetzten Hormondosis unterschiedlich stark ausgeprägt. Während Kontrolltiere vergleichbare Level, welche zuvor bereits in zwei bis dreijährigen Thunfischen bestimmt wurden, aufwiesen, konnte in hormoninduzierten weiblichen Fischen ein eindeutiger Trend zu höheren Werten nachgewiesen werden. Diese Erhöhung lag in einem Bereich, der nur von älteren laichbereiten Tieren während der Vorlaich- und Laichzeit erreicht wurde.

In Zukunft könnte durch die Kombination des hier getesteten 17β -Estradiol mit anderen Hormonen, die schon länger erfolgreich für die Induktion des Abblaus in Fischen eingesetzt werden, die reproduktive Entwicklung von adulten weiblichen ABFT gesteigert werden, um somit eine beständige Quelle von Eiern für die weitere Aufzucht zu gewährleisten. Dies ist für den Aufbau einer nachhaltigen Thunfischzucht unabhingbar. Künftig ist aber noch weitere Forschungsarbeit notwendig um diese Methode auszubauen und um sie gegebenenfalls zu kommerzialisieren.

6 Summary

During the last decades increased fishing and farming activity for fish led to a significant depletion of the stocks, especially for bluefin tuna (BFT). It is one of the most endangered fish species, fuelled by the increasing demand for this unique fish by the sushi-sashimi market all over the world. The currently existing "tuna aquaculture" in Europe is not sustainable and is only based on the fattening of captive wild animals caught in the Mediterranean or Atlantic Ocean. If there are no further improvements in managing the stocks or in rearing BFT in captivity, this species will not be able to recover leading perhaps to the reduction in stocks below a sustainable level. Scientific studies on reproductive processes in fish can contribute to the increasing demand for fish from the aquaculture industry. Aware of this the European Union advocates research on this special theme.

The objectives of this dissertation, which was funded by the EU in the projects „SELFDOTT“ (Self-sustained Aquaculture and Domestication of Bluefin Tuna *Thunnus thynnus*, 2008-2011) and ALLOTUNA (Set up of an integrate system of the bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) farming in the Gulf of Taranto, 2008-2010), was to clarify the question, why female captive BFT are not as reproductively active as wild animals, leading to impaired fecundity in captive tuna.

A number of aspects of the reproductive cycle of female tuna, known to be impaired for the central event of Vitellogenesis (oocyte growth), were examined using molecular-biological and physiological analyses. As a result female tunas in captivity exhibited lower levels in all investigated parameters compared to wild individuals; hence, there is strong evidence for an extenuated Gametogenesis in these animals. Previously known dysfunctions occurring in captive female tuna appear to have a more profound impact on the reproductive axis as demonstrated in this species so far. To gain more knowledge the main focus was on the estrogen receptor alpha (ER α), which is known to be a mediator for endocrine signals to cellular responses during reproduction in other fish species. Detecting the cellular responses controlled by ER α , which naturally lead to healthy oocytes capable for fertilisation after spawning at the end of vitellogenesis, were also part of the objectives of this thesis, since various ER forms can be verified in fish and humanoids. This Study is the first showing the existence of the alpha receptor form in Scombridae, using BFT as a model.

To find a mechanism to enhance the reproductive development in caged BFT, a common carrier system for hormone therapies in fish was configured. After readjustment of the components used for the constitution of these hormone implants, their release kinetics of the employed hormone 17 β -Estradiol were first investigated in in-vitro experiments. Consequently, 17 β -Estradiolimplants were tested in-vivo in two model fish, Tilapia (*Oreochromis niloticus*) and Seabass (*Dicentrarchus labrax*), before introducing them in BFT. During experiments both fish showed an elevated plasma estrogen level and, hence, an increased expression profile of all analyzed genes. Additionally, an increase in

the gonadosomatic index (GSI) could be observed in tilapia as a result of the treatment. The GSI is a general indicator for the reproductive performance in fish.

The application of the hormone implants in juvenile BFT (3-4 years old) caused a dose dependent increase of all parameters. These elevated levels were only obtained in wild adult individuals during pre-spawning and spawning. Accordingly, the implants ability to increase the reproductive performance in this species could be demonstrated.

For future studies the combination of 17β -Estradiol with hormones which already showed their capability to induce spawning in BFT could be a powerful tool to enhance reproduction of caged BFT and provide an enduring source of eggs for further breeding activities. For building up a sustainable BFT aquaculture this is a compulsory requirement. Hence further work is now necessary to extend and commercialize this progress.

7 Literaturverzeichnis

- Abascal, F. J., U. Megina, and A. Medina. **2004**. Testicular development in migrant and spawning bluefin tuna (*Thunnus thynnus* (L.)) from the eastern Atlantic and Mediterranean. *Fishery Bulletin* 102:407-417.
- Abascal, F. J., and A. Medina. **2005**. Ultrastructure of oogenesis in the bluefin tuna, *Thunnus thynnus*. *Journal of Morphology* 264:149-160.
- Aguado-Giménez, F., García-García, B. **2005**. Growth, food intake and feed conversion rates in captive Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus* Linnaeus, 1758) under fattening conditions. *Aquaculture Research*, 36: 610–614.
- Agulleiro, M. J., V. Anguis, J. P. Canavate, G. Martinez-Rodriguez, C. C. Mylonas, and J. Cerda. **2006**. Induction of spawning of captive-reared Senegal sole (*Solea senegalensis*) using different administration methods for gonadotropin-releasing hormone agonist. *Aquaculture* 257:511-524.
- Aranda, G., L. Aragon, A. Corriero, C. C. Mylonas, F. de la Gandara, A. Belmonte, and A. Medina. **2011**. GnRHa-induced spawning in cage-reared Atlantic bluefin tuna: An evaluation using stereological quantification of ovarian post-ovulatory follicles. *Aquaculture* 317:255-259.
- Arnold, D. L., Bryce, F., McGuire, P. F., Stapley, R., Tanner, J. R., Wrenshall, E., Mes, J., Fernie, S., Tryphonas, H., Hayward, S. and Malcolm, S. **1995**. Toxicological consequences of Aroclor 1254 ingestion by female Rhesus (*Macaca mulatta*) monkeys. 2. Reproduction and infant findings. *Food and Chemical Toxicology* 33: 457-474.
- Arukwe, A., F. R. Knudsen, and A. Goksoyr. **1997**. Fish zona radiata (eggshell) protein: A sensitive biomarker for environmental estrogens. *Environmental Health Perspectives* 105:418-422.
- Arukwe, A.; Celius, T.; Walther, B. T.; Goksoyr, A. Plasma Levels of Vitellogenin and Eggshell Zona Radiata Proteins in 4-Nonylphenol and O,p'-DDT Treated Juvenile Atlantic Salmon (*Salmo Salar*). *Marine Environmental Research* **1998**, 46, 133-136.
- Arukwe A.; Goksøyr A., Eggshell and egg yolk proteins in fish: hepatic proteins for the next generation: oogenetic, population, and evolutionary implications of endocrine disruption. *Comparative Hepatology* **2003**, 2, 4
- Avvakumov, G. V., A. Cherkasov, Y. A. Muller, and G. L. Hammond. **2010**. Structural analyses of sex hormone-binding globulin reveal novel ligands and function. *Molecular and Cellular Endocrinology* 316:13-23.
- Ball, J. N., and M. Olivereau. **1964**. Role de la Prolactine Dans la Survie en Eau Douce de *Poecilia Latipinna* Hypophysectomise et Arguments en Faveur de Sa Synthese Par les Cellules Erythrosinophiles Eta de Lhypophyse des Teleosteens. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences* 259:1443-&.
- Battaglione, S. C. ILFC Symposium. *Aquaculture: Introduction*. *Marine and Freshwater Research* **1996**, 47, 209-210.
- Berg, A. H., L. Westerlund, and P. E. Olsson. **2004**. Regulation of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) egg shell proteins and vitellogenin during reproduction and in response to 17 beta-estradiol and cortisol. *General and Comparative Endocrinology* 135:276-285.

- Biran, J., S. Ben Dor, and B. Levavi-Sivan. **2008**. Molecular identification and functional characterization of the kisspeptin/kisspeptin receptor system in lower vertebrates. *Biology of Reproduction* 79:776-786.
- Block, B. A., H. Dewar, S. B. Blackwell, T. D. Williams, E. D. Prince, C. J. Farwell, A. Boustany, S. L. H. Teo, A. Seitz, A. Walli, and D. Fudge. **2001**. Migratory movements, depth preferences, and thermal biology of Atlantic bluefin tuna. *Science* 293:1310-1314.
- Block, B. A., S. L. H. Teo, A. Walli, A. Boustany, M. J. W. Stokesbury, C. J. Farwell, K. C. Weng, H. Dewar, and T. D. Williams. **2005**. Electronic tagging and population structure of Atlantic bluefin tuna. *Nature* 434:1121-1127.
- Bobe J., Montfort J., Nguyen T., Fostier A. 2006. Identification of new participants in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) oocyte maturation and ovulation processes using cDNA microarrays. *Reproductive Biology and Endocrinology*, **4**:39
- Boustany, A. M.; Reeb, C. A.; Block, B. A. Mitochondrial DNA and Electronic Tracking Reveal Population Structure of Atlantic Bluefin Tuna (*Thunnus thynnus*). *Marine Biology* **2008**, 156, 13-24.
- Brill, R. W., K. L. Cousins, D. R. Jones, P. G. Bushnell, and J. F. Steffensen. **1998**. Blood volume, plasma volume and circulation time in a high-energy-demand teleost, the yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). *Journal of Experimental Biology* 201:647-654.
- Brion, F., C. R. Tyler, X. Palazzi, B. Laillet, J. M. Porcher, J. Garric, and P. Flammarion. **2004**. Impacts of 17 beta-estradiol, including environmentally relevant concentrations, on reproduction after exposure during embryo-larval-, juvenile- and adult-life stages in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 68:193-217.
- Bromage, N., Roberts R. J. **1995**. Broodstock Management and Egg and Larval Quality. Oxford, Blackwell Science, pp. 424.
- Brown L., Munoz, C., L. Siemer, R. Langer. **1986a**. Controlled Release of Insulin from Polymer Matrices – *In Vitro* kinetics. *Diabetes* 35:684-691.
- Brown L., Munoz, C., L. Siemer, E. Edelman, R. Langer. **1986b**. Controlled Release of Insulin from Polymer Matrices - Control of Diabetes in Rats. *Diabetes* 35:692-697.
- Campbell, P. M., T. G. Pottinger, and J. P. Sumpter. **1994**. Preliminary Evidence That Chronic Confinement Stress Reduces the Quality of Gametes Produced by Brown and Rainbow-Trout. *Aquaculture* 120:151-169.
- Carlsson, J., J. R. McDowell, P. Diaz-Jaimes, J. E. L. Carlsson, S. B. Boles, J. R. Gold, and J. E. Graves. **2004**. Microsatellite and mitochondrial DNA analyses of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus thynnus*) population structure in the Mediterranean Sea. *Molecular Ecology* 13:3345-3356.
- Carlsson, J., J. R. McDowell, J. E. L. Carlsson, and J. E. Graves. **2007**. Genetic identity of YOY bluefin tuna from the eastern and Western Atlantic spawning areas. *Journal of Heredity* 98:23-28.
- Carnevali, O., R. Carletta, A. Cambi, A. Vita, and N. Bromage. **1999**. Yolk formation and degradation during oocyte maturation in seabream *Sparus aurata*: Involvement of two lysosomal proteinases. *Biology of Reproduction* 60:140-146.

- Cavaco, J. E. B., C. Vilroix, V. L. Trudeau, R. W. Schulz, and H. J. T. Goos. **1998**. Sex steroids and the initiation of puberty in male African catfish (*Clarias gariepinus*). *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 275:R1793-R1802.
- Celius, T., and B. T. Walther. **1998**. Differential sensitivity of zonogenesis and vitellogenesis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L) to DDT pesticides. *Journal of Experimental Zoology* 281:346-353.
- Chart, T. E. ; Bergersen, E. P.: **1988** Methods for Long-Term Identification of Salmonids: A Review.: COLORADO STATE UNIV FORT COLLINS DEPT OF FISHERY AND WILDLIFE BIOLOGY
- Cho H., Katzenellenbogen B. S. **1993**: Synergistic activation of estrogen receptor-mediated transcription by estradiol and protein kinase activators. *Molecular Endocrinology* 7: 441-52;
- Corriero, A., S. Desantis, M. Deflorio, F. Acone, C. R. Bridges, J. M. De Serna, P. Megalofonou, and G. De Metrio. **2003**. Histological investigation on the ovarian cycle of the bluefin tuna in the western and central Mediterranean. *Journal of Fish Biology* 63:108-119.
- Corriero, A., Karakulak, S., Santamaria, N., Deflorio, M., Spedicato, D., Addis, P., Desantis, S., Cirillo, F., Fenech-Farrugia, A., Vassallo-Agius, R., de la Serna, J. M., Oray, Y., Cau, A., Megalofonou, P. and De Metrio, G. (**2005**), Size and age at sexual maturity of female bluefin tuna (*Thunnus thynnus* L. 1758) from the Mediterranean Sea. *Journal of Applied Ichthyology*, 21: 483–486.
- Corriero, A., A. Medina, C. C. Mylonas, F. J. Abascal, M. Deflorio, L. Aragon, C. R. Bridges, N. Santarnaria, G. Heinisch, R. Vassallo-Agius, A. Belmonte, C. Fauvel, A. Garcia, H. Gordin, and G. De Metrio. **2007**. Histological study of the effects of treatment with gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRHa) on the reproductive maturation of captive-reared Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus* L.). *Aquaculture* 272:675-686.
- Cort J., Liorzou B. **1991**. Migration eastern Atlantic and Mediterranean, Special Report-Inter-American Tropical Tuna Commission, vol. 7, in: R.B. Deriso, W.H. Bayliff, Editors , World Meeting on Stock Assessment of Bluefin Tunas: Strengths and Weakness , pp. 130–132
- Crowther J.R. **2001**. The ELISA-Guidebook. Humana Press
- Cuisset, B., P. Pradelles, D. E. Kime, E. R. Kuhn, P. Babin, S. Davail, and F. Lemenn. **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 C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology* 108:229-241.
- Dabrowski, K.; Ciereszko, A.; Blom, J. (**1995**). Ascorbic acid (vitamin C) function in fish gametogenesis and fertility, in: Lavens, P. et al. (Ed.) (1995). Larvi '95: Fish & Shellfish Symposium, Gent, Belgium, September 3-7, 1995. EAS Special Publication, 24: pp. 11
- Davis L. K., Pierce A. L., Naoshi Hiramatsu, Craig V. Sullivan, Tetsuya Hirano, E. Gordon Grau. **2008**. Gender-specific expression of multiple estrogen receptors, growth hormone receptors, insulin-like growth factors and vitellogenins, and effects of 17 β -estradiol in the male tilapia (*Oreochromis mossambicus*), *General and Comparative Endocrinology*, Volume 156, Issue 3, 1, Pages 544-551,
- Davis, L. K., Y. Katsu, T. Iguchi, D. T. Lerner, T. Hirano, and E. G. Grau. **2010**. Transcriptional activity and biological effects of mammalian estrogen receptor ligands on three hepatic estrogen receptors in Mozambique tilapia. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 122:272-278.

- De Metrio, G., A. Corriero, S. Desantis, D. Zubani, F. Cirillo, M. Deflorio, C. R. Bridges, J. Eicker, J. M. de la Serna, P. Megalofonou, and D. E. Kime. **2003**. Evidence of a high percentage of intersex in the Mediterranean swordfish (*Xiphias gladius* L.). *Marine Pollution Bulletin* 46:358-361.
- De Metrio, G., C. R. Bridges, C. C. Mylonas, M. Caggiano, M. Deflorio, N. Santamaria, R. Zupa, C. Pousis, R. Vassallo-Agius, H. Gordin, and A. Corriero. **2010**. Spawning induction and large-scale collection of fertilized eggs in captive Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus* L.) and the first larval rearing efforts. *Journal of Applied Ichthyology* 26:596-599.
- Desantis, S.; Corriero, A.; Cirillo, F.; Deflorio, M.; Brill, R.; Gniffiths, M.; Lopata, A. L.; de la Serna, J. M.; Bridges, C. R.; Kime, D. E.; De Metrio, G. Immunohistochemical Localization of CYP1A, Vitellogenin and Zona Radiata Proteins in the Liver of Swordfish (*Xiphias Gladius* L.) Taken From the Mediterranean Sea, South Atlantic, South Western Indian and Central North Pacific Oceans. *Aquatic Toxicology* **2005**, 71, 1-12.
- Desse, J. and Desse-Berset, N. **1994**. Stratégies de pêche au 8^eme millénaire: les poissons de Cap Andreas Kastros (Chypre). In: Fouilles récentes à Khirokitia (eds A. Le Brun). Editions Recherche sur Civilisations, Paris, pp. 335–360.
- De Vlaming, V., R. Fitzgerald, G. Delahunty, J. J. Cech, K. Selman, and M. Barkley. **1984**. Dynamics of Oocyte Development and Related Changes in Serum Estradiol-17-Beta, Yolk Precursor, and Lipid-Levels in the Teleostean Fish, *Leptocottus-Armatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Physiology* 77:599-610.
- Devlin, R. H., and Y. Nagahama. **2002**. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 208:191-364.
- Dickey J.T., Swanson P. **1998**. Effects of sex steroids on gonadotropin (FSH and LH) regulation in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *J Mol Endocrinol* 21, 291-306
- Edwards, D. P. **2005**. Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annual Review of Physiology* 67:335-376.
- Efron, B. 1979. **1977** Rietz Lecture - Bootstrap Methods - Another Look at the Jackknife. *Annals of Statistics* 7:1-26.
- Elizur A., The KiSS1/GPR54 system in fish, *Peptides*, Volume 30, Issue 1, January. **2009**. Pages 164-170
- Esterhuysen, M. M., C. C. Helbing, and J. H. van Wyk. **2010**. Isolation and characterization of three estrogen receptor transcripts in *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 119:26-34.
- FAO. **2004**. Catarci, C. World tuna markets. Rome
- FAO. **2005**. Report of the third meeting of the Ad Hoc GFCM/ICCAT working group on sustainable bluefin tuna farming/fattening practices in the Mediterranean, Rome, 16–18 March 2005, p. 108.
- FAO. **2010**. The State of World Fisheries and Aquaculture, Rome
- Felsenstein, J. **1985**. Confidence-Limits on Phylogenies - An Approach Using the Bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Finn, R. N. **2007**. The maturational disassembly and differential proteolysis of paralogous vitellogenins in a marine pelagophil teleost: A conserved mechanism of oocyte hydration. *Biology of Reproduction* 76:936-948.

- Forest M.G., Saez J.M., Bertrand J. **1993** Biochemistry and physiology of gonadotropic and gonadal hormones. In: Bertrand J, Rappaport R, Sizonenko P, eds. Pediatric endocrinology. Baltimore: William & Wilkins; 351–369.
- Fossi, M. C., S. Casini, L. Marsili, Ausili A., di Sciara G. N. **2001**. Are the Mediterranean top predators exposed to toxicological risk due to endocrine disruptors? *Environmental Hormones: the Scientific Basis of Endocrine Disruption* 948:67-74.
- Fossi, M. C., S. Casini, L. Marsili, G. Neri, G. Mori, S. Ancora, A. Moscatelli, A. Ausili, and G. Notarbartolo-di-Sciara. **2002**. Biomarkers for endocrine disruptors in three species of Mediterranean large pelagic fish. *Marine Environmental Research* 54:667-671.
- Fromentin, J. M., Powers J. E. **2005**. Atlantic bluefin tuna: population dynamics, ecology, fisheries and management. *Fish and Fisheries* 6:281-306.
- Fu, K. Y., C. Y. Chen, C. T. Lin, and W. M. Chang. **2008**. Molecular cloning and tissue distribution of three estrogen receptors from the cyprinid fish *Varicorhinus barbatulus*. *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology* 178:189-197.
- Fuentes J, Guerreiro PM, Modesto T, Rotllant J, Canario AVM, Power DM. A PTH/PTHrP receptor antagonist blocks the hypercalcemic response to estradiol-17beta. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293: R956–R960, **2007**.
- Gen, K., K. Okuzawa, B. Senthilkumaran, H. Tanaka, S. Moriyama, and H. Kagawa. **2000**. Unique expression of gonadotropin-I and -II subunit genes in male and female red seabream (*Pagrus major*) during sexual maturation. *Biology of Reproduction* 63:308-319.
- Giegerich R., Meyer F., Schleiermacher C. **1996**.: *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* ;4:68-77
- Gomez, J. M., C. Weil, M. Ollitrault, P. Y. Le Bail, B. Breton, and F. Le Gac. **1999**. Growth hormone (GH) and gonadotropin subunit gene expression and pituitary and plasma changes during spermatogenesis and oogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology* 113:413-428.
- Graham, J. B., and K. A. Dickson. Anatomical and physiological specialization for endothermy, pp. 121–165. In: *Tuna: Physiology, Ecology, and Evolution*, 19. (Block, B. A., and E. D. Stevens, Eds.). San Diego, Academic Press (**2001**).
- Halm, S., G. Martinez-Rodriguez, L. Rodriguez, F. Prat, C. C. Mylonas, M. Carrillo, and S. Zanuy. **2004**. Cloning, characterisation, and expression of three oestrogen receptors (ER alpha, ER beta 1 and ER beta 2) in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Molecular and Cellular Endocrinology* 223:63-75.
- Hammond, G. L., and W. P. Bocchinfuso. **1995**. Sex Hormone-Binding Globulin Androgen-Binding Protein - Steroid-Binding and Dimerization Domains. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 53:543-552.
- Hara, A., Sullivan, C.V., Dickhoff, W.W. Isolation and Some Characterization of Vitellogenin and Its Related Egg Yolk Proteins from Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Zoological Science* **1993**, 10: 245-256
- Heinisch, G., A. Corriero, A. Medina, F. J. Abascal, J. M. de la Serna, R. Vassallo-Agius, A. B. Rios, A. Garcia, F. de la Gandara, C. Fauvel, C. R. Bridges, C. C. Mylonas, S. F. Karakulak, I. Oray, G. De Metrio, H. Rosenfeld, and H. Gordin. **2008**. Spatial-temporal pattern of bluefin tuna (*Thunnus*

- thynnus* L. 1758) gonad maturation across the Mediterranean Sea. *Marine Biology* 154:623-630.
- Hendry, C. I., D. J. Martin-Robichaud, and T. J. Benfey. **2003**. Hormonal sex reversal of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture* 219:769-781.
- Henry, J. C., E. McLean, I. Mayer, and E. M. Donaldson. **1998**. Induction of precocious maturation in masculinized Atlantic salmon by treatment with sustained-release LHRHa and testosterone. *Aquaculture International* 6:261-268.
- Heppell, S. A., and C. V. Sullivan. **1999**. 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.
- Hiramatsu, N., R. W. Chapman, J. K. Lindzey, M. R. Haynes, and C. V. Sullivan. **2004**. Molecular characterization and expression of vitellogenin receptor from white perch (*Morone americana*). *Biology of Reproduction* 70:1720-1730.
- Hiramatsu, N.; Matsubara, T.; Fujita, T.; Sullivan, C. V.; Hara, A. Multiple Piscine Vitellogenins: Biomarkers of Fish Exposure to Estrogenic Endocrine Disruptors in Aquatic Environments. *Marine Biology* **2006**, 149, 35-47.
- Hoffmeier. **2007**. 3D-Modell der Domänenstruktur eines Estrogen Rezeptors . Wikipedia.
- Ibarra-Castro, L., and N. J. Duncan. **2007**. GnRHa-induced spawning of wild-caught spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. *Aquaculture* 272:737-746.
- ICCAT. Recommendation amending the recommendation by ICCAT to establish a multiannual recovery plan for bluefin tuna in the eastern Atlantic and Mediterranean. Madrid, International Committee for the Conservation of Atlantic Tuna, p. 28 (**2008a**).
- ICCAT. Report of the 2008 Atlantic bluefin tuna stock assesment session (SCI-003/2008).Madrid, International Committee for the Conservation of Atlantic Tuna, p. 105 (**2008b**).
- ICCAT; Rec 09-06 .**2010**: Recommendation by ICCAT amending recommandation 08-05 to establish a multi-annual recovery plan for bluefin tuna in the eastern atlantic and mediterranean
- IUCN. **2011**. Red List of Threatened Species
- Jinno, S., K. Hata, N. Shimidzu, and T. Okita. **1998**. Phaffiaol, a new antioxidant isolated from a yeast *Phaffia rhodozyma*. *Journal of Antibiotics* 51:508-511.
- Johann Radon: Berichte über die Verhandlungen der Königlich-Sächsischen Gesellschaft der Wissenschaften zu Leipzig. Mathematisch-Physische Klasse, Band 69, **1917**, Seiten 262–277
- Jones, D. T., W. R. Taylor, and J. M. Thornton. **1992**. The Rapid Generation of Mutation Data Matrices from Protein Sequences. *Computer Applications in the Biosciences* 8:275-282.
- Kagawa H, Young G, Adachi S and Nagahama Y Estradiol-17 β production in amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) ovarian follicles: role of the thecal and granulosa cells. *Gen Comp Endocrinol* **1982**, 47:440-448
- Kagawa, H., H. Tanaka, K. Okuzawa, and M. Kobayashi. **1998**. GTH II but not GTH I induces final maturation and the development of maturational competence of oocytes of red seabream in vitro. *General and Comparative Endocrinology* 112:80-88.

- Kagawa, H., K. Gen, K. Okuzawa, and H. Tanaka. **2003**. Effects of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor-I on aromatase activity and P450 aromatase gene expression in the ovarian follicles of red seabream, *Pagrus major*. *Biology of Reproduction* 68:1562-1568.
- Kagawa, H., H. Tanaka, H. Ohta, T. Unuma, and K. Nomura. **2005**. The first success of glass eel production in the world: basic biology on fish reproduction advances new applied technology in aquaculture. *Fish Physiology and Biochemistry* 31:193-199.
- Kanda, S., Y. Akazome, T. Matsunaga, N. Yamamoto, S. Yamada, H. Tsukamura, K. I. Maeda, and Y. Oka. **2008**. Identification of KiSS-1 product kisspeptin and steroid-sensitive sexually dimorphic kisspeptin neurons in medaka (*Oryzias latipes*). *Endocrinology* 149:2467-2476.
- Karakulak, S., I. Oray, A. Corriero, M. Deflorio, N. Santamaria, S. Desantis, and G. De Metro. **2004**. Evidence of a spawning area for the bluefin tuna (*Thunnus thynnus* L.) in the eastern Mediterranean. *Journal of Applied Ichthyology* 20:318-320.
- Kaspar F, Klocker H, Denninger A, Cato AC. **1993** A mutant androgen receptor from patients with Reifenstein syndrome: identification of the function of a conserved alanine residue in the D box of steroid receptors. *Mol Cell Biol* 13:7850-7858
- Katsu Y., Kohn S., Narita H., Urushitan H.i, YamaneK., Hara A., Clauss T.M., Walsh M.T, Miyagawa S., Guillette L.J.Jr., IguchiT.: Cloning and functional characterization of Chondrichthyes, cloudy catshark, Scyliorhinus torazame and whale shark, Rhincodon typus estrogen receptors, *General and Comparative Endocrinology*, Volume 168, Issue 3, 15 **2010**, Pages 496-504,
- Kauffman, A. S., D. K. Clifton, and R. A. Steiner. **2007**. Emerging ideas about kisspeptin-GPR54 signaling in the neuroendocrine regulation of reproduction. *Trends in Neurosciences* 30:504-511.
- Kime, D.E. *Endocrine Disruption in Fish*. Kluwer Academic Publishers **1998**: 81-107
- Kirk R.G. A review of recent developments in Tilapia culture, with special reference to fish farming in the heated effluents of power stations: *Aquaculture* Volume 1, May **1972**, Pages 45-60:
- Knopp V., Müller K. **2009**. *Gene Und Stammbäume: Ein Handbuch Zur Molekularen Phylogenetik*
- Kwon, J. Y., F. Prat, C. Randall, and C. R. Tyler. **2001**. Molecular characterization of putative yolk processing enzymes and their expression during oogenesis and embryogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biology of Reproduction* 65:1701-1709.
- Lambert Y., Duti J.D. **2000**. Energetic consequences of reproduction in Atlantic cod (*Gadus morhua*) in relation to spawning level of somatic energy reserves. Yvan, Jean-Denis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 57: 815-825
- Leanos-Castaneda, O., and G. Van der Kraak. **2007**. Functional characterization of estrogen receptor subtypes, ER alpha and ER beta, mediating vitellogenin production in the liver of rainbow trout. *Toxicology and Applied Pharmacology* 224:116-125.
- Le Menn, F., Cerdá, J., Babin, P.J., **2007**. Ultrastructural aspects of the ontogeny and differentiation of ray-finned fish ovarian follicles. In: Babin, P.J., Cerdá, J., Lubzens, E. (Eds.), *The Fish Oocyte: from Basic Studies to Biotechnological Applications*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 1-37.
- Levavi-Sivan, B., Bogerd J., E. L. Mananos, A. Gomez, and J. J. Lareyre. **2010**. Perspectives on fish gonadotropins and their receptors. *General and Comparative Endocrinology* 165:412-437.

- Lewis, JA, Clemens MJ and Tata JR Morphological and biochemical changes in the hepatic endoplasmic reticulum and golgi apparatus of male *Xenopus laevis* after induction of egg-yolk protein synthesis by oestradiol-17 β . *Mol Cell Endocrinol* **1976**, 4, 311-329
- Lioka, C., Kani, K. and Nhhala, H. Present status and prospects of technical development of tuna sea-farming. *Cahiers Options Mediterraneennes* **2000**, 47, 275–285.
- Licata, P., D. Trombetta, M. Cristani, C. Naccari, D. Martino, M. Calo, and F. Naccari. **2005**. Heavy metals in liver and muscle of bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) caught in the straits of Messina (Sicily, Italy). *Environmental Monitoring and Assessment* 107:239-248.
- Lowe, T. E., R. W. Brill, and K. L. Cousins. **2000**. Blood oxygen-binding characteristics of bigeye tuna (*Thunnus obesus*), a high-energy-demand teleost that is tolerant of low ambient oxygen. *Marine Biology* 136:1087-1098.
- Lubzens E., Young G., Bobe J., Cerdà J. **2010**. Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed, *General and Comparative Endocrinology*, Volume 165, Issue 3, Pages 367-389
- Lutcavage, M. E., R. W. Brill, G. B. Skomal, B. C. Chase, and P. W. Howey. **1999**. Results of pop-up satellite tagging of spawning size class fish in the Gulf of Maine: do North Atlantic bluefin tuna spawn in the mid-Atlantic? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 56:173-177.
- Marchler-Bauer, A., S. N. Lu, J. B. Anderson, F. Chitsaz, M. K. Derbyshire, C. DeWeese-Scott, J. H. Fong, L. Y. Geer, R. C. Geer, N. R. Gonzales, M. Gwadz, D. I. Hurwitz, J. D. Jackson, Z. X. Ke, C. J. Lanczycki, F. Lu, G. H. Marchler, M. Mullokandov, M. V. Omelchenko, C. L. Robertson, J. S. Song, N. Thanki, R. A. Yamashita, D. C. Zhang, N. G. Zhang, C. J. Zheng, and S. H. Bryant. **2011**. CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Research* 39:D225-D229.
- Martinez-Chavez, C. C., M. Minghetti, D. Parke, and H. Migaud. **2008**. Kisspeptin in Nile tilapia *O. niloticus*: Receptor expression during the onset of puberty and effects of constant illumination. *Cybiurn* 32:40.
- Martinez-Chavez, C. C., M. Minglietti, and H. Migaud. **2008**. GPR54 and rGnRH I gene expression during the onset of puberty in Nile tilapia. *General and Comparative Endocrinology* 156:224-233.
- Masuma, S., N. Tezuka, M. Koiso, T. Jinbo, T. Takebe, H. Yamazaki, H. Obana, K. Ide, H. Nikaido, and H. Imaizumi. Effects of water temperature on bluefin tuna spawning biology in captivity. *Bull. Fish. Res. Agen. Suppl.*, 4: 157–172 (**2006**).
- Masuma, S., S. Miyashita, H. Yamamoto, and H. Kumai. **2008**. Status of bluefin tuna farming, brood-stock management, breeding and fingerling production in Japan. *Reviews in Fisheries Science* 16:385-390.
- Mather, F.J., Mason Jr, J.M. and Jones, A. Historical document: life history and fisheries of Atlantic bluefin tuna. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-370, Miami **1995**, Fl, 165 pp.
- Matsubara, T., M. Nagae, N. Ohkubo, T. Andoh, S. Sawaguchi, N. Hiramatsu, C. V. Sullivan, and A. Hara. **2003**. Multiple vitellogenins and their unique roles in marine teleosts. *Fish Physiology and Biochemistry* 28:295-299.
- Mc Donnell, D. P., D. L. Clemm, T. Hermann, M. E. Goldman, and J. W. Pike. **1995**. Analysis of Estrogen-Receptor Function In-Vitro Reveals 3 Distinct Classes of Antiestrogens. *Molecular Endocrinology* 9:659-669.

- Medina, A., Abascal, F.J., Megina, C. and Garcí'a, A. Stereological assessment of the reproductive status of female Atlantic northern bluefin tuna during migration to Mediterranean spawning grounds through the Strait of Gibraltar. *Journal of Fish Biology* **2002**, 60, 203–217.
- Melwani A., Thompson B., S. Lowe **2005**. Measuring the Effects of Sediment Contamination on Benthic Communities: A New Method: RMP : regional monitoring news vol 10:1
- Menuet, A., Y. Le Page, O. Torres, L. Kern, O. Kah, and F. Pakdel. **2004**. Analysis of the estrogen regulation of the zebrafish estrogen receptor (ER) reveals distinct effects of ER alpha, ER beta 1 and ER beta 2. *Journal of Molecular Endocrinology* 32:975-986.
- Meucci, V., and A. Arukwe. **2006**. Transcriptional modulation of brain and hepatic estrogen receptor and P450arom isotypes in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) after waterborne exposure to the xenoestrogen, 4-nonylphenol. *Aquatic Toxicology* 77:167-177.
- Micale, V., G. Maricchiolo, and L. Genovese. **1999**. The reproductive biology of the amberjack, *Seriola dumerilii* (Risso 1810). I. Oocyte development in captivity. *Aquaculture Research* 30:349-355.
- Micera, E., Zupa, R., Zarrilli, A., Camarda, A., Moramarco, A. M., Acone, F., De Metrio, G. and Corriero, A. (2010), A rapid latex agglutination test for gender identification in the Atlantic bluefin tuna, *Thunnus thynnus* (Linnaeus). *Aquaculture Research*, 41: 1396–1401.
- Mikolajczyk, T., J. Chyb, P. Szczerbik, M. Sokolowska-Mikolajczyk, P. Epler, W. J. Enright, M. Filipiak, and B. Breton. **2004**. Evaluation of the potency of azagly-nafarelin (GnRH analogue), administered in combination with different formulations of pimozone, on LH secretion, ovulation and egg quality in common carp (*Cyprinus carpio* L.) under laboratory, commercial hatchery and natural conditions. *Aquaculture* 234:447-460.
- Milla, S., Wang, N., Mandiki, S.N.M, Kestemont, P. **2009**. Corticosteroids: Friends or foes of teleost fish reproduction? *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*, Volume 153, Issue 3, , Pages 242-251
- Milla, S., S. Depiereux, and P. Kestemont. **2011**. The effects of estrogenic and androgenic endocrine disruptors on the immune system of fish: a review. *Ecotoxicology* 20:305-319.
- Miyake P. M., J. M. De la Serna, A. Di Natale, A. Farrugia, I. Katavi5, N Miyabe, and V. Ticina **2003**: Col. Vol. Sci. Pap. ICCAT, 55(1): 114-124: GENERAL REVIEW OF BLUEFIN TUNA FARMING IN THE MEDITERRANEAN AREA
- Mourente, G., C. Megina, and E. Diaz-Salvago. **2001**. Lipids in female northern bluefin tuna (*Thunnus thynnus thynnus* L.) during sexual maturation. *Fish Physiology and Biochemistry* 24:351-363.
- Muller, R. E., T. C. Johnston, and H. H. Wotiz. **1979**. Binding of Estradiol to Purified Uterine Plasma-Membranes. *Journal of Biological Chemistry* 254:7895-7900.
- Mylonas, C. C., L. C. Woods, P. Thomas, and Y. Zohar. **1998**. Endocrine profiles of female striped bass (*Morone saxatilis*) in captivity, during postvitellogenesis and induction of final oocyte maturation via controlled-release GnRHa-delivery systems. *General and Comparative Endocrinology* 110:276-289.
- Mylonas, C. C., and Y. Zohar. **2001a**. Use of GnRHa-delivery systems for the control of reproduction in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 10:463-491.
- Mylonas, C. C., and Y. Zohar. **2001b**. Endocrine regulation and artificial induction of oocyte maturation and spermiation in basses of the genus *Morone*. *Aquaculture* 202:205-220.

- Mylonas, C. C., C. Bridges, H. Gordin, A. B. Rios, A. Garcia, F. de la Gandara, C. Fauvel, M. Suquet, A. Medina, M. Papadaki, G. Heinisch, G. De Metro, A. Corriero, R. Vassallo-Agius, J. M. Guzman, E. Mananos, and Y. Zohar. **2007**. Preparation and administration of gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRHa) implants for the artificial control of reproductive maturation in captive-reared Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus thynnus*). *Reviews in Fisheries Science* 15:183-210.
- Mylonas, C. C., F. de la Gandara, A. Corriero, and A. B. Rios. **2010a**. Atlantic Bluefin Tuna (*Thunnus Thynnus*) Farming and Fattening in the Mediterranean Sea. *Reviews in Fisheries Science* 18:266-280.
- Mylonas, C. C., A. Fostier, and S. Zanuy. **2010b**. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and Comparative Endocrinology* 165:516-534.
- Mylonas C.C, Zohar Y., Pankhurst N., Kagawa H., Reproduction and broodstock management, in: M. Pavlidis, C.C. Mylonas (Eds.), *Sparidae: Biology and Aquaculture of Gilthead Sea Bream and Other Species*, Blackwell Science Publishers, London, **2011**, pp. 95–131.
- Nagahama Y., Endocrine regulation of gametogenesis in fish, *Int. J. Dev. Biol.* 38 (**1994**) 217–229.
- Nagahama Y Gonadal steroid hormones: major regulators of gonadal sex differentiation and gametogenesis in fish. In *Proceedings of the 6th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish: 2000 July 4–9; Bergen* (Edited by: Norberg B, Kjesbu OS, Taranger GL, Andersson E, Stefansson SO) John Grieg A/S, Bergen, Norway **2000**, 211- 222
- Nagler J. J., Cavileer T., Jack Sullivan, Daniel G. Cyr, Caird Rexroad III, The complete nuclear estrogen receptor family in the rainbow trout: Discovery of the novel ER α 2 and both ER β isoforms, *Gene*, Volume 392, Issues 1–2, 1 **2007**, Pages 164-173
- Nagler, J. J., T. L. Davis, N. Modi, M. M. Vijayan, and I. Schultz. **2010**. Intracellular, not membrane, estrogen receptors control vitellogenin synthesis in the rainbow trout. *General and Comparative Endocrinology* 167:326-330.
- Nash, J. P., Cuisset, B. D., Bhattacharyya, S., Suter, H. C., Le Menn, F., and Kime, D. E. (**2000**). An enzyme linked immunosorbant assay (ELISA) for testosterone, estradiol, and 17,20 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.
- Nash, C.E. (ed.) **2001**: The net-pen salmon farming Industry in the Pacific Northwest. U.S.Dept. Commer., NOAA Tech. Memo. NMFS-NWFSC-49, 125p.
- Neiffer, D. L., and M. A. Stamper. **2009**. Fish Sedation, Anesthesia, Analgesia, and Euthanasia: Considerations, Methods, and Types of Drugs. *Ilar Journal* 50:343-360.
- Neilson, J. D., and S. E. Campana. **2008**. A validated description of age and growth of western Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 65:1523-1527.
- Nelson, E. R., and H. R. Habibi. **2010**. Functional Significance of Nuclear Estrogen Receptor Subtypes in the Liver of Goldfish. *Endocrinology* 151:1668-1676.
- Nilsen, B. M., K. Berg, J. K. Eidem, S. I. Kristiansen, F. Brion, J. M. Porcher, and A. Goksoyr. **2004**. Development of quantitative vitellogenin-ELISAs for fish test species used in endocrine disruptor screening. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378:621-633.

- Nilsson, S., S. Makela, E. Treuter, M. Tujague, J. Thomsen, G. Andersson, E. Enmark, K. Pettersson, M. Warner, and J. A. Gustafsson. **2001**. Mechanisms of estrogen action. *Physiological Reviews* 81:1535-1565.
- Nishida, T., S. Tsuji, and K. Segawa. Spatial data analyses of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus* L., 1758) larval surveys in the 1994. ICCAT Coll. Vol. Sci. Pap., 48: 107–110 (**1997**).
- O'Malley, B. W., J. Qin, and R. B. Lanz. **2008**. Cracking the coregulator codes. *Current Opinion in Cell Biology* 20:310-315.
- Oakley, A. E., D. K. Clifton, and R. A. Steiner. **2009**. Kisspeptin Signaling in the Brain. *Endocrine Reviews* 30:713-743.
- Okada, T., I. Kawazoe, S. Kimura, Y. Sasamoto, K. Aida, and H. Kawauchi. **1994**. Purification and Characterization of Gonadotropin-I and Gonadotropin-II from Pituitary-Glands of Tuna (*Thunnus-Obesus*). *International Journal of Peptide and Protein Research* 43:69-80.
- Oppen-Berntsen, D.O., Helvik, J.V., Walther, B.T. The Major Structural Proteins of Cod (*Gadus morhua*) Eggshells and Protein Crosslinking during Teleost Egg Hardening. *Developmental Biology*, **1990** 137; 258-265
- Ottolenghi, F., C. Silvestri, P. Giordano, A. Lovatelli, and M. B. New. Capture-Based Aquaculture. The Fattening of Eels, Groupers, Tunas and Yellowtails. Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations, p. 308 (**2004**).
- Ottolenghi, F. Capture-based aquaculture of bluefin tuna, pp. 169– 182. **In:** Capture-Based Aquaculture, 508. (Lovatelli, A., and P. F. Holthus, Eds.). Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations (**2008**).
- Ovrevik J, Stenersen J, Nilssen K and Tollefsen K-E Partial characterisation of a sex steroid-binding protein in plasma from Svalbard Charr (*Salvelinus alpinus* L). *Gen Comp Endocrinol* **2001**, 122:31-39
- Pakdel, F., S. Feon, F. Legac, F. Lemenn, and Y. Valotaire. **1991**. In vivo Estrogen Induction of Hepatic Estrogen-Receptor Messenger-Rna and Correlation with Vitellogenin Messenger-Rna in Rainbow-Trout. *Molecular and Cellular Endocrinology* 75:205-212.
- Pankhurst N.W., Stacey N.E., Peter R.E., An evaluation of techniques for the administration of 17 β -extradiol to teleosts, *Aquaculture*, Volume 52, Issue 2, 15 February **1986**, Pages 145-155
- Pankhurst, N.W. & Van Der Kraak, G. Effects of stress on reproduction and growth of fish. *Fish Stress and Health in Aquaculture* **1997**, 73–93.
- Parhar, I. S., S. Ogawa, and Y. Sakuma. **2004**. Laser-captured single digoxigenin-labeled neurons of gonadotropin-releasing hormone types reveal a novel G protein-coupled receptor (Gpr54) during maturation in cichlid fish. *Endocrinology* 145:3613-3618.
- Pavlidis, M., L. Greenwood, B. Mourot, C. Kokkari, F. Le Menn, P. Divanach, and A. P. Scott. **2000**. Seasonal variations and maturity stages in relation to differences in serum levels of gonadal steroids, vitellogenin, and thyroid hormones in the common Dentex (*Dentex dentex*). *General and Comparative Endocrinology* 118:14-25.
- Perazzolo, L. M., K. Coward, B. Davail, E. Normand, C. R. Tyler, F. Pakdel, W. J. Schneider, and F. Le Menn. **1999**. Expression and localization of messenger ribonucleic acid for the vitellogenin

- receptor in ovarian follicles throughout oogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biology of Reproduction* 60:1057-1068.
- Peter, R. E., and K. L. Yu. **1997**. Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: Basic and applied aspects. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 7:173-197.
- Perazzolo, L. M.; Coward, K.; Davail, B.; Normand, E.; Tyler, C. R.; Pakdel, F.; Schneider, W. J.; Le Menn, F. Expression and Localization of Messenger Ribonucleic Acid for the Vitellogenin Receptor in Ovarian Follicles Throughout Oogenesis in the Rainbow Trout, *Oncorhynchus Mykiss*. *Biology of Reproduction* **1999**, 60, 1057-1068.
- Pfaffl, M. W. **2001**. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29.
- Pfaffl, M. W., G. W. Horgan, and L. Dempfle. **2002**. Relative expression software tool (REST for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 30.
- Pfaffl M.W., Tichopad A., Prgomet C., Neuvians T. P. **2004**. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters* 26(6): 509-515.
- Pfaffel M.W. **2004**. Quantification strategies in real-time PCR. International University Line (IUL)
- Piferrer, F. **2001**. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture* 197:229-281.
- Pillay, T.V.R. **2005**: Aquaculture and the environment. 2nd ed. Blackwell Publishing, Oxford, 196 pp. Goldberg, R. & Naylor, R.: Future seascapes, fishing and fish farming. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 3(1), 21-28.
- Pinto, P. I. S., A. L. Passos, R. S. Martins, D. M. Power, and A. V. M. Canario. **2006**. Characterization of estrogen receptor beta b in sea bream (*Sparus auratus*): Phylogeny, ligand-binding, and comparative analysis of expression. *General and Comparative Endocrinology* 145:197-207.
- Pousis, C., C. De Giorgi, C. C. Mylonas, C. R. Bridges, R. Zupa, R. Vassallo-Agius, F. de la Gandara, C. Dileo, G. De Metrio, and A. Corriero. **2011**. Comparative study of liver vitellogenin gene expression and oocyte yolk accumulation in wild and captive Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus* L.). *Animal Reproduction Science* 123:98-105.
- Preisler-Mashek, M. T., N. Solodin, B. L. Stark, M. K. Tyrivier, and E. T. Alarid. **2002**. Ligand-specific regulation of proteasome-mediated proteolysis of estrogen receptor-alpha. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 282:E891-E898.
- Prossnitz, E. R., and M. Maggiolini. **2009**. Mechanisms of estrogen signaling and gene expression via GPR30. *Molecular and Cellular Endocrinology* 308:32-38.
- Ravi, V., and B. Venkatesh. **2008**. Rapidly evolving fish genomes and teleost diversity. *Current Opinion in Genetics & Development* 18:544-550.
- Ravier, C. and Fromentin, J.-M. Long-term fluctuations in the Eastern Atlantic and Mediterranean bluefin tuna population. *ICES Journal of Marine Science* **2001**, 58, 1299–1317.
- Ravier, C. and Fromentin, J.-M. Eastern Atlantic bluefin tuna: what we learnt from historical time-series of trap catches. *Collective Volume of Scientific Papers ICCAT* **2002**, 54, 507–516

- Rehm, H. **2002**. Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics.4., überarb. Aufl.-Heidelberg: Berlin: Spektrum, Akad. Verl. pp. 105.
- REPRODOTT. **2006**. Reproduction and domestication of *Thunnus thynnus*, 2003-2006. Final Report
- Rhine, W. D., D. S. T. Hsieh, and R. Langer. **1980**. Polymers for Sustained Macromolecule Release - Procedures to Fabricate Reproducible Delivery Systems and Control Release Kinetics. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 69:265-270.
- Riehl, R. Die Eier und Eihüllen von Knochenfischen. Im Symposiumsband: Fortpflanzungsbiologie der Aquarienfische, (Greven, H. & Riehl, eds), 11-26, Bornheim: Schmettkamp **1995**
- Rivier, C., Rivest, S. **1991**. Effect of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: peripheral and central mechanisms. *45 (4)* 523-532
- Roa J., Tena-Sempere M. **2007**. KiSS-1 system and reproduction: Comparative aspects and roles in the control of female gonadotropic axis in mammals, *General and Comparative Endocrinology*, Volume 153, Issues 1–3, Pages 132-140
- Rochette-Egly, C. **2003**. Nuclear receptors: integration of multiple signalling pathways through phosphorylation. *Cellular Signalling* 15:355-366.
- Rodriguez, C., J. A. Perez, P. Badia, M. S. Izquierdo, H. Fernandez-Palacios, and A. L. Hernandez. **1998**. The n-3 highly unsaturated fatty acids requirements of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) larvae when using an appropriate DHA/EPA ratio in the diet. *Aquaculture* 169:9-23.
- Rooker, J. R., J. P. Turner, and S. A. Holt. **2006**. Trophic ecology of Sargassum-associated fishes in the Gulf of Mexico determined from stable isotopes and fatty acids. *Marine Ecology-Progress Series* 313:249-259.
- Rooker, J. R., D. H. Secor, G. DeMetrio, A. J. Kaufman, A. B. Rios, and V. Ticina. **2008a**. Evidence of trans-Atlantic movement and natal homing of bluefin tuna from stable isotopes in otoliths. *Marine Ecology-Progress Series* 368:231-239.
- Rooker, J. R., D. H. Secor, G. De Metrio, R. Schloesser, B. A. Block, and J. D. Neilson. **2008 b**. Natal Homing and Connectivity in Atlantic Bluefin Tuna Populations. *Science* 322:742-744.
- Rosenfeld H., Mylonas C.C., Bridges C.R., Heinisch G., A. Corriero, R. Vassallo-Aguis, A. Medina, A. Belmonte, A. Garcia, F. De la Gándara, C. Fauvel, G. De Metrio, I. Meiri-Ashkenazi, H. Gordin, Y. Zohar, GnRHa-mediated stimulation of the reproductive endocrine axis in captive Atlantic bluefin tuna, *Thunnus thynnus*, *General and Comparative Endocrinology*, Volume 175, Issue 1, 1 **2012**, Pages 55-64
- Roubal, W.T., Lomax, D.P., Willis, M.L., Johnson, L.L. (1997) Purification and Partial Characterization of English sole (*Pleuronectus netulus*) Vitellogenin. *Comp. Biochem. Physiol* 118B **1997**, 3: 613-622
- Sabo-Attwood, T., K. J. Kroll, and N. D. Denslow. **2004**. Differential expression of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) estrogen receptor isotypes alpha, beta, and gamma by estradiol. *Molecular and Cellular Endocrinology* 218:107-118.
- Safina, C. **1995**. The Worlds Imperiled Fish. *Scientific American* 273:46-53.

- Santamaria, N., G. Bello, A. Corriero, M. Deflorio, R. Vassallo-Agius, T. Bok, and G. De Metro. **2009**. Age and growth of Atlantic bluefin tuna, *Thunnus thynnus* (*Osteichthyes: Thunnidae*), in the Mediterranean Sea. *Journal of Applied Ichthyology* 25:38-45.
- Sarà, R. **1999**. 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).
- Sawada T., Takahash K., Hatano M. 1993. Triglyceride composition of tuna and bonito orbital fats. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. V. 59(2) p. 285-290
- Sawada, Y., T. Okada, S. Miyashita, O. Murata, and H. Kumai. **2005**. Completion of the Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* life cycle. *Aquaculture Research* 36:413-421.
- Schaefer, K. M. **2001**. Assessment of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) spawning activity in the eastern Pacific Ocean. *Fishery Bulletin* 99:343-350.
- Scheffe, J. H., K. E. Lehmann, I. R. Buschmann, T. Unger, and H. Funke-Kaiser. **2006**. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's C(T) difference" formula. *Journal of Molecular Medicine-Jmm* 84:901-910.
- Schmidt-Nielsen, K. *Physiologie der Tiere*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg – Berlin **1999**, pp. 255.
- Schmittgen, T. D.; Livak, K. J. Analyzing Real-Time PCR Data by the Comparative CT Method. *Nat. Protocols* **2008**, 3, 1101-1108.
- Schulz S.K. **2006**. Bestimmung der geschlechtsspezifischen Proteine Vitellogenin und Zona radiata im Roten Thun *Thunnus thynnus* mittels immunologischer Nachweisverfahren. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Inst. für Zoophysiologie
- SELFDOTT. **2012**. Self-sustained Aquaculture and Domestication of Bluefin Tuna *Thunnus thynnus*, 2008-2011. Final Report
- Senthilkumaran, B., M. Yoshikuni, and Y. Nagahama. **2004**. A shift in steroidogenesis occurring in ovarian follicles prior to oocyte maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology* 215:11-18.
- Stéquert B., Marsac F. 2003. Tropical tuna: Surface fisheries in the Indian Ocean. FAO fisherys technical paper 282
- Steven, C.; Gothilf, Y.; Holland, M.C.; Stubblefield, J.; Mylonas, C.C.; Zohar, Y. (**2000**). Differential expression of the three GnRH genes in wild and captive striped bass, *Morone saxatilis* in response to natural and hormonally induced maturation, in: Norberg, B. et al. (Ed.) (2000). Proceedings of the 6th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish, Bergen, Norway, July 4-9, 1999. pp. 66
- Shareef, A., M. J. Angove, J. D. Wells, and B. B. Johnson. **2006**. Aqueous solubilities of estrone, 17 beta-estradiol, 17 alpha-ethynylestradiol, and bisphenol A. *Journal of Chemical and Engineering Data* 51:879-881.
- Sims, D. W., N. Queiroz, T. K. Doyle, J. D. R. Houghton, and G. C. Hays. **2009**. Satellite tracking of the World's largest bony fish, the ocean sunfish (*Mola mola* L.) in the North East Atlantic. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 370:127-133.

- Smith, J. T., B. V. Acohido, D. K. Clifton, and R. A. Steiner. **2006**. KiSS-1 neurones are direct targets for leptin in the ob/ob mouse. *Journal of Neuroendocrinology* 18:298-303.
- Socorro S., Power D.M., PE Olsson, Canario A.V. ; 1, **2000** Two estrogen receptors expressed in the teleost fish, *Sparus aurata*: cDNA cloning, characterization and tissue distribution *J Endocrinol*; Vol166; 293-306
- Stratagene. **2001**. Introduction to Quantitative PCR: Methods and Applications Guide
- Susca, V., A. Corriero, C. R. Bridges, and G. De Metro. **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.
- Swanson P Salmon gonadotropins: reconciling old and new data. In: Proceedings of the 4th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish: **1991**; Sheffeld (Edited by: Scott AP, Sumpter JP, Kime DE, Rolfe MS) Sheffeld, UK 1991, 2-7
- Tamura K. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. Peterson D., Peterson N. Stecher G. Nei M. and Kumar S. **2011**.
- Teitsma, C. A., I. Anglade, C. Lethimonier, G. Le Drean, D. Saligaut, B. Ducouret, and O. Kah. **1999**. Glucocorticoid receptor immunoreactivity in neurons and pituitary cells implicated in reproductive functions in rainbow trout: A double immunohistochemical study. *Biology of Reproduction* 60:642-650.
- Teo, S. L. H., A. Boustany, H. Dewar, M. J. W. Stokesbury, K. C. Weng, S. Beemer, A. C. Seitz, C. J. Farwell, E. D. Prince, and B. A. Block. **2007**. Annual migrations, diving behavior, and thermal biology of Atlantic bluefin tuna, *Thunnus thynnus*, on their Gulf of Mexico breeding grounds. *Marine Biology* 151:1-18.
- Teo, S. L. H., A. M. Boustany, and B. A. Block. **2007**. Oceanographic preferences of Atlantic bluefin tuna, *Thunnus thynnus*, on their Gulf of Mexico breeding grounds. *Marine Biology* 152:1105-1119.
- Thomas, K. B. and Colborn, T. **1992**. Organochlorine endocrine disruptors in human tissue. In Chemically-induced alteration in sexual and functional development: the wildlife/ human connection (ed. T. Colborn and T. Clement) *Advances in Modelling Environmental Toxicology* vol. 21, pp. 365-394.
- Thornton, J. W. **2001**. Evolution of vertebrate steroid receptors from an ancestral estrogen receptor by ligand exploitation and serial genome expansions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:5671-5676.
- Tyler, C. R., B. van der Eerden, S. Jobling, G. Panter, and J. P. Sumpter. **1996**. Measurement of vitellogenin, a biomarker for exposure to oestrogenic chemicals, in a wide variety of cyprinid fish. *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology* 166:418-426.
- Ulloa-Aguirre A., Timossi C. **2000**. Biochemical and functional aspects of gonadotrophin-releasing hormone and gonadotrophins, *Reproductive BioMedicine Online*, Volume 1, Issue 2, Pages 48-62, (10)61901-3.
- Vincenzo De S., van der Heijden, P. **2007**. Bluefin tuna fishing and ranching: a difficult management problem: *New Medit N.* 2/2007

- Wang, D. S., B. Senthilkumaran, C. C. Sudhakumari, F. Sakai, M. Matsuda, T. Kobayashi, M. Yoshikuni, and Y. Nagahama. **2005**. Molecular cloning, gene expression and characterization of the third estrogen receptor of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish Physiology and Biochemistry* 31:255-266.
- Watanabe, T., Vassallo-Agius, R. **2003**. Broodstock nutrition research on marine finfish in Japan. *Aquaculture* 227:35-61.
- Werawatgoompa S., Piyatiratitivorakul S, Nitithamyong C., Aranyakanonda P., Moree N., Vajanmarhutue C., Ruangvejivorachai P., Menasveta P.: Plasma vitellogenin and growing oocytes of grouper (*Cephalopholia pachycentron*) **1997**:*Journal of Marine Biotechnology* Vol 5, Issue 2; 137-141
- Wesendonk, H. **2006**. Untersuchung zur Hormonphysiologie des Roten Thuns *Thunnus thynnus* mittels immunologischer Nachweisverfahren. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Inst. für Zoophysiologie
- Wheeler, J. R., S. Gimeno, M. Crane, E. Lopez-Juez, and D. Morritt. **2005**. Vitellogenin: A review of analytical methods to detect (anti) estrogenic activity in fish. *Toxicology Mechanisms and Methods* 15 :293-306.
- Williams, N. Profit of Gloom. *Current Biology* **2011**, 21, R97-R98.
- Wijayaratne, A. L., D. P. McDonnell. **2001**. The human estrogen receptor-alpha is a ubiquitinated protein whose stability is affected differentially by agonists, antagonists, and selective estrogen receptor modulators. *Journal of Biological Chemistry* 276:35684-35692.
- Xu, L., Q. Pan-Hammarstrom, A. Forsti, K. Hemminki, L. Hammarstrom, D. Labuda, J. A. Gustafsson, and K. Dahlman-Wright. **2003**. Human estrogen receptor beta 548 is not a common variant in three distinct populations. *Endocrinology* 144:3541-3546.
- Yaron, Z. **1995**. Endocrine Control of Gametogenesis and Spawning Induction in the Carp. *Aquaculture* 129:49-73.
- Young, G., Lokman, P.M., Kusakabe, M., Nakamura, I., Goetz, F.W., **2005**. Gonadal steroidogenesis in teleost fish. In: Hew, C. (Ed.), *Molecular Aspects of Fish and Marine Biology*, vol. 2. In: Sherwood, N., Melamed, P. (Eds.), *Hormones and their Receptors in Fish Reproduction*. World Scientific Press, Singapore, pp. 155–223.
- Zohar, Y. **1989**. Endocrinology and Fish Farming - Aspects in Reproduction, Growth, and Smoltification. *Fish Physiology and Biochemistry* 7:395-405.
- Zohar, Y., J. A. Munoz-Cueto, A. Elizur, and O. Kah. **2010**. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology* 165:438-455.

8 Anhang

Weitere Sequenzierungsergebnisse & Alignments

Thunnus thynnus:

>Fragment 18S-rRNA (T.t.)

CATAAACGATGCCAACTAGCGATCCGGCGGGCTTATTCCCATGACCCGCCGGCAGCGTCCGGGAAACCAA
 GTCTTTGGGTTCCGGGGGGAGTATGGTTGCAAAGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAG
 AGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAACCTCACCCGGCCGGACACGGAAAGGATTGACAG
 ATTGATAGCTCTTTCTCGATTCTGTGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGCGATTTGTCTGGTT
 AATCCGATAACGAACGAGACTCCGGCATGCTAACTAGTTACGCGGCCCGTGCGGTGGCGTCCAACCTTCTT
 AGAGGGACAAGTGGCGTTCAGCCACACGAGATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCC

```

      1030      1040      1050      1060      1070
Fragment Primer 18S rRNA (T.t)  ---CATAAA CGATGCCAAC TAGCGATCCG GCGGCGTTAT TCCCATGACC C
Bullet tuna 18S rRNA           GACCATAAA CGATGCCAAC TAGCGATCCG GCGGCGTTAT TCCCATGACC C

      1080      1090      1100      1110      1120
Fragment Primer 18S rRNA (T.t)  GCCGGGCAG CGTCCGGGAA ACCAAAGTCT TTGGGTTCCG GGGGGAGTAT G
Bullet tuna 18S rRNA           GCCGGGCAG CGTCCGGGAA ACCAAAGTCT TTGGGTTCCG GGGGGAGTAT G

      1130      1140      1150      1160      1170
Fragment Primer 18S rRNA (T.t)  GTTGCAAAG CTGAAACTTA AAGGAATTGA CGGAAGGGCA CCACCAGGAG T
Bullet tuna 18S rRNA           GTTGCAAAG CTGAAACTTA AAGGAATTGA CGGAAGGGCA CCACCAGGAG T

      1180      1190      1200      1210      1220
Fragment Primer 18S rRNA (T.t)  GGAGCCTGC GGCTTAATTT GACTCAACAC GGGAAACCTC ACCCGGCCCG G
Bullet tuna 18S rRNA           GGAGCCTGC GGCTTAATTT GACTCAACAC GGGAAACCTC ACCCGGCCCG G

      1230      1240      1250      1260      1270
Fragment Primer 18S rRNA (T.t)  ACACGGAAA GGATTGACAG ATTGATAGCT CTTTCTCGAT TCTGTGGGTG G
Bullet tuna 18S rRNA           ACACGGAAA GGATTGACAG ATTGATAGCT CTTTCTCGAT TCTGTGGGTG G

      1280      1290      1300      1310      1320
Fragment Primer 18S rRNA (T.t)  TGGTGCATG GCCGTTCTTA GTTGGTGGAG CGATTTGTCT GGTTAATTCC G
Bullet tuna 18S rRNA           TGGTGCATG GCCGTTCTTA GTTGGTGGAG CGATTTGTCT GGTTAATTCC G

      1330      1340      1350      1360      1370
Fragment Primer 18S rRNA (T.t)  ATAACGAAC GAGACTCCGG CATGCTAACT AGTTACGCGG CCCCCTGCGG T
Bullet tuna 18S rRNA           ATAACGAAC GAGACTCCGG CATGCTAACT AGTTACGCGG CCCCCTGCGG T

      1380      1390      1400      1410      1420
Fragment Primer 18S rRNA (T.t)  CGGCGTCCA ACTTCTTAGA GGGACAAGTG GCGTTCAGCC ACACGAGATT G
Bullet tuna 18S rRNA           CGGCGTCCA ACTTCTTAGA GGGACAAGTG GCGTTCAGCC ACACGAGATT G

      1430      1440
Fragment Primer 18S rRNA (T.t)  AGCAATAAC AGGTCTGTGA TGCC---
Bullet tuna 18S rRNA           AGCAATAAC AGGTCTGTGA TGCCCTT

```

Abb.8.1: Alignment von dem durch Sequenzierung erhaltenem Fragment des Primerpaares für T.t. 18S-rRNA mit der Sequenz der Fregattenmakrele (*Auxis Rochei*, engl. Bullet tuna; AB193747.1) Es konnte eine 100 %ige Übereinstimmung gezeigt werden.

>Fragment 18S-rRNA (O.n.)

CCNTAAACGATGCCNACTAGCGATCCGGCGGCGTTATCCCATGACCCGCCGGGCGAGCGTCCGGGAAACCAA
 AGTCTTTGGGTTCCGGGGGGAGTATGGTTGCAAAGCTGAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAG
 GAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACNCAACACGGGAAACCTCACCCGGCCCCGGACACGGAAAGGATTGACA
 GATTGATAGCTCTTTCTCGATTCTGTGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGCGATTTGTCTGGT
 TAATTCCGATAACNAACGAGACTCCGACATGCTAACTAGTTACTCGACCCCGTGGGTCCGAGTCCAATTCTT
 AGAGGGACAAGTGGCGTTCANCCACACGAGATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGC

```

      10      20      30      40      50
Fragment Primer 18S (O.n.)  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
Oreochromis niloticus 18S-rRNA  CCNTAAACGA TGCCNACTAG CGATCCGGCG GCGTTATTCC CATGACCCGC

      60      70      80      90     100
Fragment Primer 18S (O.n.)  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
Oreochromis niloticus 18S-rRNA  CGGGCAGCGT CCGGGAAACC AAAGTCTTTG GGTCCGGGG GGAGTATGGT

     110     120     130     140     150
Fragment Primer 18S (O.n.)  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
Oreochromis niloticus 18S-rRNA  TGCAAGCTG  AAACCTAAG  GAATTGACGG AAGGGCACCA CCAGGAGTGG
                                -----AG GAATTGACGG AAGGGCACCA CCAGGAGTGG

     160     170     180     190     200
Fragment Primer 18S (O.n.)  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
Oreochromis niloticus 18S-rRNA  AGCCTGCGGC TTAATTTGAC NCAACACGGG AAACCTCACC CGGCCCGGAC
                                -----AGCCTGCGGC TTAATTTGAC TCAACACGGG GAACCTCACC CGGCCCGGAC

     210     220     230     240     250
Fragment Primer 18S (O.n.)  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
Oreochromis niloticus 18S-rRNA  ACGGAAAGGA TTGACAGATT GATAGCTCTT TCTCGATTCT GTGGGTGGTG
                                ACGGAAAGGA TTGACAGATT GATAGCTCTT TCTCGATTCT GTGGGTGGTG

     260     270     280     290     300
Fragment Primer 18S (O.n.)  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
Oreochromis niloticus 18S-rRNA  GTGCATGGCC GTTCTTAGTT GGTGGAGCGA TTTGTCTGGT TAATTCCGAT
                                GTGCATGGCC GTTCTTAGTT GGTGGAGCGA TTTGTCTGGT TAATTCCGAT

     310     320     330     340     350
Fragment Primer 18S (O.n.)  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
Oreochromis niloticus 18S-rRNA  AACNAACGAG ACTCCGACAT GCTAACTAGT TACTCGACCC CGTGCGGTCC
                                AACGAACGAG ACTCCGACAT GCTAACTAGT TACTCGACCC CGTGCGGTCC

     360     370     380     390     400
Fragment Primer 18S (O.n.)  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
Oreochromis niloticus 18S-rRNA  GAGTCCAACT TCTTAGAGGG ACAAGTGGCG TTCANCCACA CGAGATTGAG
                                GAGTCCAACT TCTTAGAGGG ACAAGTGGCG TTCAGCCACA CGAGATTGAG

     410     420     430
Fragment Primer 18S (O.n.)  ....|....| ....|....| ..
Oreochromis niloticus 18S-rRNA  CAATAACAGG TCTGTGATGC -----
                                CAATAACAGG TCTGTGATGC CCTTAGATGT CC

```

Abb.8.4: Alignment von dem durch Sequenzierung erhaltenem Fragment des Primerpaares für O.n. 18S-rRNA mit der Sequenz (JF698683.1) ebenfalls aus *Oreochromis niloticus*. Es konnte eine 100 %ige Übereinstimmung gezeigt werden.

>Fragment Vtg (O.n.)

CGGCGTTGTTGGGAGACTGGCTGCACCTCCTGGGGTCTCCACAACAGTGCTGAATATCTACAGGGGCATCATC
AACCTCCTGCAGCTGAATGTAAAGAAGACACAGAATGTCTACGAGATGCAAGAGTCTGGAGCTCATGGTGTGT
GCAAGACCAACTATGTG

```

      150      160      170      180      190
  ..|...|   ..|...|   ..|...|   ..|...|   ..|...|   ..
Fragment Primer Vtg (O.n.) ---CGGCG TTGTTGGGAG ACTGGCTGCA CCTCCTGGGG TCTCCACAAC AG
Oreochromis niloticus Vtg  AAACGGCG TTGTTGGGAG ACTGGCTGCA CCTCCTGGGG TCTCCACAAC AG

      200      210      220      230      240
  ..|...|   ..|...|   ..|...|   ..|...|   ..|...|   ..
Fragment Primer Vtg (O.n.) TGCTGAAT ATCTACAGGG GCATCATCAA CCTCCTGCAG CTGAATGTAA AG
Oreochromis niloticus Vtg  TGCTGAAT ATCTACAGGG GCATCATCAA CCTCCTGCAG CTGAATGTAA AG

      250      260      270      280      290
  ..|...|   ..|...|   ..|...|   ..|...|   ..|...|   ..
Fragment Primer Vtg (O.n.) AAGACACA GAATGTCTAC GAGATGCAAG AGTCTGGAGC TCATGGTGTG TG
Oreochromis niloticus Vtg  AAGACACA GAATGTCTAC GAGATGCAAG AGTCTGGAGC TCATGGTGTG TG

      300      310
  ..|...|   ..|...|   ..
Fragment Primer Vtg (O.n.) CAAGACCA ACTATGTG--
Oreochromis niloticus Vtg  CAAGACCA ACTATGTGAT C

```

Abb.8.5: Alignment von dem durch Sequenzierung erhaltenem Fragment des Primerpaares für O.n. Vtg mit der Sequenz (FJ709597.1) ebenfalls aus *Oreochromis niloticus*. Es konnte eine 100 %ige Übereinstimmung gezeigt werden.

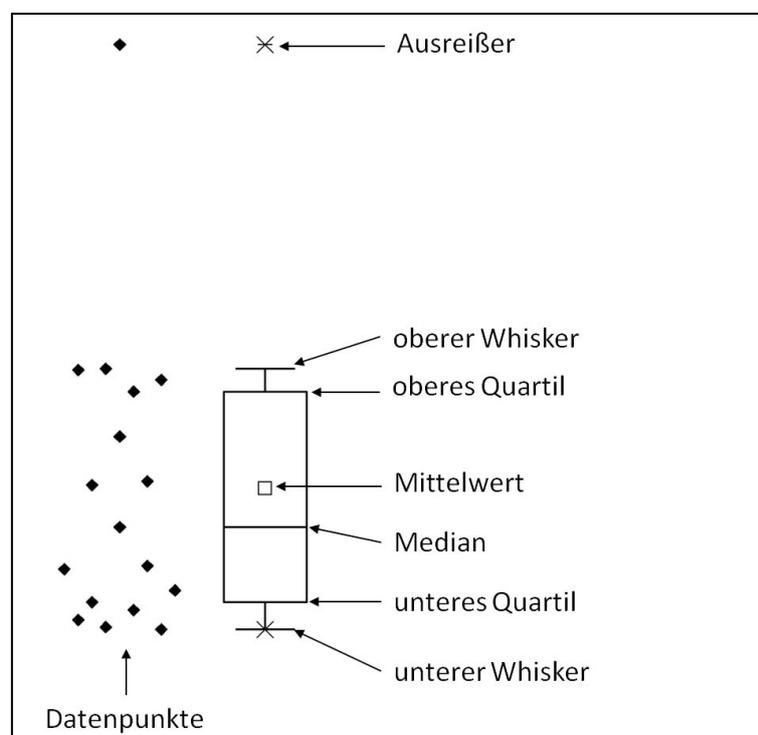
Box-Whisker-Plot

Abb.8.7: Erklärung des Box-Whisker-Plot Diagrammtyps der in dieser Arbeit verwendet wurde.

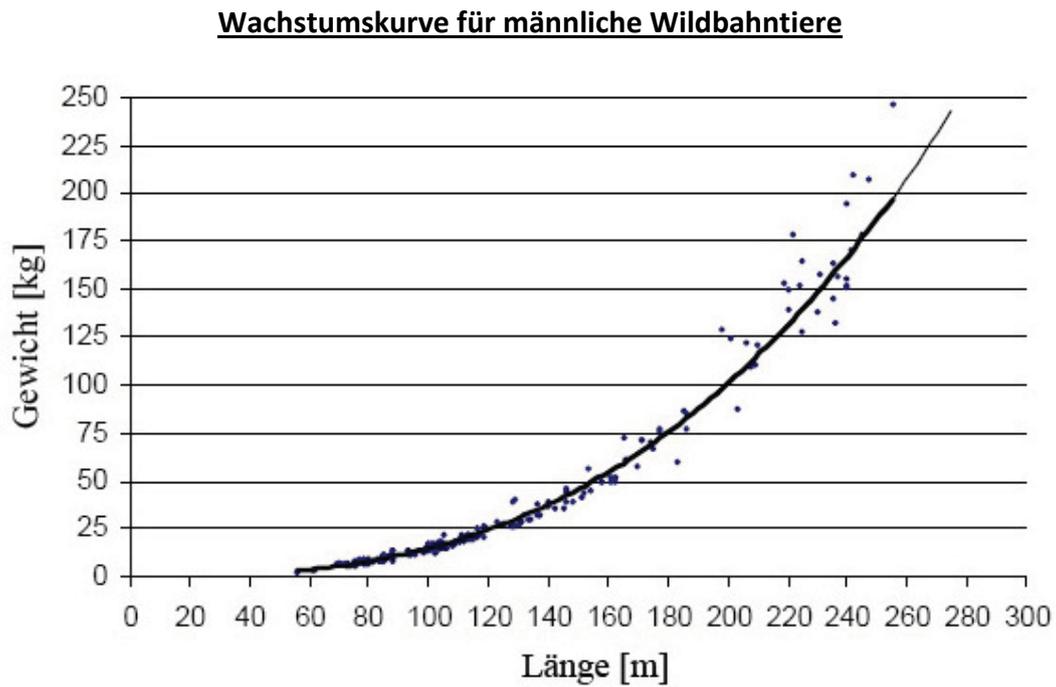


Abb.8.6: Wachstumskurve männlicher ABFT die im Zeitraum von 1998-2005 (N= 338) im Mittelmeer gefangen wurden (Quelle: REPRODOTT, 2006).

9 Danksagung

Vielen Dank

- Prof. Dr. Christopher Bridges, für die nunmehr jahrelange Unterstützung und für die Möglichkeit an einem so interessanten und einmaligen Projekt zu arbeiten. Die vielen Forschungsreisen und die dadurch gewonnenen neuen Einblicke werden mir immer in Erinnerung bleiben.
- Prof. Dr. Eckhard Lammert, für die Übernahme des Korreferats und für die nette Aufnahme in das neu gegründete Institut für Stoffwechselphysiologie.
- Allen Mitarbeitern des Institutes für Stoffwechselphysiologie. Besonders Andrea Köster, die mir im Labor mit helfender Hand zur Seite stand. Aber auch Silke Jakob, Barbara Bartosinska und Oliver Krohn, die immer ein offenes Ohr für Probleme und Wünsche hatten.
- Meinen Doktorandenkollegen Florian Borutta, Janina Kraft und Eva Klumpen für ihre Hilfe und die nette Arbeitsatmosphäre.
- Den Mitarbeitern der feinmechanischen Werkstatt Biologie, hier besonders Waldemar Seidel ohne den die Umsetzung meiner Ideen nicht so reibungslos möglich gewesen wären.
- Dem SELFDOTT- und ALLOTUNA Team, vor allem Dr. Robert Vassallo-Agius, Dr. Fernando De La Gandara, Dr. C. C. Mylonas, Prof. Dr. Gregorio De Metrio, Dr. Aldo Corriero, Dr. Riccardo Caprioli und Hillel Gordin. Zudem Salvu Ellul und Vincenzo Ceravolo sowie den angestellten Tauchern und Arbeitern der jeweiligen Fischfarmen ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.
- Dem Leiter des CCMAR in Faro (Portugal) Adelino Canario, der es mir ermöglichte erste Einblicke in das molekularbiologische Arbeiten mit Fischen zu erlangen. Seinen Mitarbeitern für die Unterstützung im Labor und für nette Abende in Faro.
- Dem TPW Prüfzentrum für die Bereitstellung der computertomographischen Anlagen.
- Meinen Freunden für ihre Freundschaft und die Ablenkungen die ihr mir dadurch an manchen Abenden beschert habt. Besonders Hendrik Wesendonk ohne den die Umsetzung meiner Ideen am Computertomographen nicht möglich gewesen wäre und Markus Pauly für dessen Nachhilfe in der weiten Welt der Stochastik.

Mein tiefster Dank gilt aber meinen Eltern und meiner Schwester, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht realisierbar gewesen wäre. Diese Arbeit ist nicht minder ihr Verdienst.

Danke für alles!