



Fraunhofer Institut

Institut Molekularbiologie und Angewandte Oekologie



BIOMARKER IN BIOTAPROBEN DER UMWELTPROBENBANK - MACHBARKEITSSTUDIE -

Förderkennzeichen 301 020 06

Dr. Björn Seidel Dr. Andrea Wenzel Matthias Teigeler

Fraunhofer-Institut für

Molekularbiologie und Angewandte Oekologie (Fraunhofer-IME)

Bereich: Angewandte Oekologie, Schmallenberg

Bereichsleitung: Prof. Dr. Andreas Schäffer

In Zusammenarbeit mit
Universität Trier, FB VI, Biogeographie, Trier
Projektleitung
PD. Dr. Roland Klein

IM AUFTRAG
DES UMWELTBUNDESAMTES

Dezember 2005

Inhaltsverzeichnis

ZUS	SAMMENFASSUNG / ABSTRACT	3
ABK	ÜRZUNGSVERZEICHNIS	4
1.	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	5
2.	RECHERCHE UND IDENTIFIKATION MÖGLICHER RELEVANTER MOLEKULAF	RER
	BIOMARKER IN FISCHEN	7
3.	AUSWAHL UND VERGLEICH DER GENSEQUENZEN AUSGEWÄHLTER BIOMA	ARKER 11
4.	MATERIAL UND METHODEN	11
	4.1. CHEMIKALIEN	11
	4.2. ELEMENTANALYTIK	11
	4.3. DNA/RNA-ANALYTIK	13
	4.4. UNTERSUCHTE PROBEN	13
	4.5. BELASTUNGSVERSUCHE	14
	4.6. PROBENVORBEREITUNG	14
	4.7. ISOLIERUNG VON GESAMT-RNA AUS GEWEBE	14
	4.8. DNA-ISOLATION UND SPEZIESANALYSE	15
	4.9. DIFFERENTIAL DISPLAY (DD RT-PCR)	16
5.	ERGEBNISSE	18
	5.1. RNA-ISOLATION	18
	5.2. PRIMER-TEST	18
	5.3. RT-PCR-ANALYSEN	20
	5.4. ERGEBNISSE DES DIFFERENTIAL DISPLAY	26
	5.5. ZUSÄTZLICHE UNTERSUCHUNGEN	28
	5.5.1. SPEZIESDIFFERENZIERUNG	28
	5.5.2. UNTERSUCHUNG VON PARASITEN, BAKTERIEN UND VIREN	29
	5.6. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	30
6.	DISKUSSION	31
	6.1. METALLOTHIONEIN	31
	6.2. HEAT SHOCK PROTEIN	31
	6.3. VITELLOGENIN	32
	6.4. TRANSFERRIN	33
	6.5. DIFFERENTIAL DISPLAY	33
	6.6. ZUSÄTZLICHE UNTERSUCHUNGEN: PARASITEN	34
7.	AUSBLICK	35
8.	ANHANG	37
9.	LITERATUR	38

Zusammenfassung

Aktuelle Publikationen und Tagungen zum Thema Biomonitoring belegen, dass die Anwendung molekularer Biomarker in Biotaproben zur Identifikation von Umwelteinflüssen auf genetischer Ebene immer mehr an Bedeutung zunimmt. Das Ziel dieser Studie war es daher zu überprüfen, ob die Verwendung von Biomarkern auf genetischer Ebene in Jahreshomogenatproben der Umweltprobenbank (UPB) des Bundes prinzipiell ebenfalls möglich ist. Im Rahmen dieser Machbarkeitsstudie wurden Untersuchungen mit archivierten Muskulatur- und Leberproben von Brassen (Abramis brama) durchgeführt, da diese zum einen im UPB-Programm schon langjährig beprobt werden. Zum anderen sind Fische in der aquatischen Umwelt einer Vielzahl von Schadstoffen ausgesetzt, so dass sich hier viele potentielle Anwendungen ergeben. Weiterhin liegen für Fische umfangreiche Daten aus genetischen Untersuchungen im Labor vor. So ist es durch die Ableitung aus den bekannten Gensequenzen des Zebrabärblings (Danio rerio), einer mit dem Brassen verwandten Spezies, gelungen, Gene zu identifizieren, die im Brassen durch unterschiedliche Stressoren reguliert werden. Es konnten sowohl Marker detektiert werden, die wirkstoff-unspezifisch reguliert werden, als auch solche, die als wirkstoff-spezifisch anzusehen sind. Als Wirkstoff-unspezifischer Marker konnte das Gen des so genannten Hitzeschockproteins (HSP; heat shock protein) identifiziert werden. HSP wird durch die unterschiedlichsten Stressoren sehr schnell reguliert und repräsentiert dahingehend einen Indikator, der Auskunft darüber gibt, in welchem allgemeinen Stresszustand sich der untersuchte Organismus befand. Als Wirkstoffspezifische Marker wurden die Gene des Metallothioneins, das durch verschiedene Schwermetalle, und des Vitellogenins, das durch östrogenwirksame Substanzen in der Expression stark beeinflusst werden, gewählt. Für diese Gene konnte in Brassenlebern eine von den Expositionsbedingungen abhängige Aktivität nachgewiesen werden. So zeigten Fische von belasteten Standorten im Vergleich zu einem Referenzstandort eine höhere Expression dieser Gene. Die vorliegende Studie zeigt damit prinzipiell, dass molekulare Biomarker auch in Brassenproben der Umweltprobenbank des Bundes im Sinne eines retrospektiven Monitoring erfolgreich Anwendung finden können. Mit Hilfe der DNA-Microarray Technik wird es nun möglich, entsprechende Untersuchungen auf eine Vielzahl relevanter Gene auszuweiten und an einer großen Probenzahl durchzuführen. Damit könnten die bisher schon erfolgreich durchgeführten retrospektiven Untersuchungen von UPB-Proben zur Exposition von Fischen gegenüber Schadstoffen mit Daten zu möglichen Effekten auf genetischer Ebene ergänzt werden. Da Biomarker geschlechtsspezifisch unterschiedlich reagieren können (z.B. Vitellogenin), wird empfohlen, insbesondere die Brassen für die UPB zukünftig nach Geschlechtern getrennt zu beproben und einzulagern, um so die Anwendungsmöglichkeiten noch zu erweitern.

Abstract

Several recent publications and conferences indicate an increasing implementation of molecular biomarkers for the identification of environmental stressors in biota samples. For this feasibility study we investigated the potential use of molecular biomarkers in samples of the German environmental specimen bank (ESB). We performed investigations with archived muscle and liver tissue samples of bream (Abramis brama). On the one hand bream were chosen because this fish species is sampled for the ESB program for a long period. On the other hand fish are exposed to a high number of pollutants in the aquatic environment so that there is a large potential for applications. Furthermore, a huge amount of genetic data from laboratory investigations of fish is available. We identified distinct gene markers regulated in bream by different stressors via gene sequence comparison with zebra fish (Danio rerio), a species related to the bream. It was possible to detect gene markers which are expressed in an agent-specific or agent-unspecific way. HSP (heat shock protein) is up-regulated agentunspecifically by a number of stressors and can be used as a general health indicator. Agent-specific genes like those for Metallothionein and Vitellogenin are strongly regulated by heavy metals and endocrine disrupters, respectively. For these genes we could show that the activity in bream liver depends on the exposure conditions. Fish caught at sites with higher pollutant levels had a higher expression of the respective genes as compared to fish from a reference site. Our analyses support the use of molecular biomarkers in bream samples of the ESB for retrospective monitoring. By applying the DNA-microarray technique it now is even possible to expand the investigations to a large number of relevant genes and high number of samples. By this means we would be able to supplement the successful retrospective monitoring studies on the exposure of fish towards pollutants with data to possible effects on a genetic level. Since biomarkers may respond sex-specifically (e. g. Vitellogenin) we recommend a separate sampling and archiving of male and female organisms (especially for bream) to increase the range of applications.

Abkürzungsverzeichnis

μg	Microgramm
μL	Microliter
Abb.	Abbildung
BG	Bestimmungsgrenze
BSA	Bovines Serum Albumin
cDNA	copy DNA
Da	Dalton
DEPC	Diethyl Pyrocarbonat
DD	Differential Display
DD RT-PCR	Differential Display Reverse Transcriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion
DIN	Deutsches Institut für Normung e.V.
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	desoxy-Nucleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
fw	forward
HSP	Heat Shock Protein
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry
m	Männchen
MHC	major histocompatibility complexclass II DAB gene
MM	Millimolar
mRNA	Messenger RNA
MW	Molekulargewicht
nm	Nanometer
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pg	Picogramm
RNA	Ribonucleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptions Polymerase-Ketten-Reaktion
rv	Reverse
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOP	Standard Operation Procedure
TE	Tris-EDTA
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
T-RFLP	Terminaler Restriktions Fragment Längenpolymorphismus
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UPB	Umweltprobenbank des Bundes
VTG	Vitellogenin
W	Weibchen

1. Einleitung und Zielsetzung

Unter Biomarkern versteht man "eine durch Xenobiotika hervorgerufene Veränderung in zellulären oder biochemischen Bestandteilen und Vorgängen, Strukturen oder Funktionen, die in einem biologischen System oder Probe messbar ist" (National Research Council, 1987). Dadurch sind Biomarker in Bezug auf ein aussagekräftiges Umweltmonitoring von immer größerer Bedeutung, da sie eine messbare "biologische Antwort" eines Organismus auf sich verändernde Umwelteinflüsse geben können.

Die biologische Antwort kann sich auf molekularer, zellulärer Ebene oder auf den gesamten Organismus beziehen. Für die Belange der Umweltprobenbank sind insbesondere solche Biomarker von Bedeutung, die aufgrund einer möglichen toxischen Beeinflussung der Organismen messbar sind oder durch andere Stressoren hervorgerufen werden. Die Bedeutung der Biomarker hat aufgrund der Erkenntnis, dass zahlreiche - insbesondere persistente - Kontaminanten wie z.B. Pestizide teilweise gravierende biologische Effekte auch bei niedrigen Konzentrationen bewirken können, stark zugenommen. Daher haben sich auch die derzeitigen Forschungsaktivitäten insofern verschoben, als dass anstatt des ausschließlich auf der Messung von Kontaminationen beruhenden Monitoring (chemischbasierend) nunmehr verstärkt ein Monitoring eingesetzt wird, welches auch auf der Messung von Effekten beruht (biologisch-basierend) und als Biomonitoring bezeichnet wird [1]. Dabei wird zwischen Expositions-Biomarkern und Effekt-Biomarkern unterschieden.

Effekte von Schadstoffen auf Umweltorganismen sind typischerweise sublethal und ereignen sich zuerst auf der molekularen Ebene. Mittlerweile konnte eine Vielzahl von Biomarkern identifiziert werden, die auf molekularer und subzellulärer Ebene messbar sind bzw. eine Beeinflussung des gesamten Organismus anzeigen. Biomarker auf molekularer Ebene zeigen als erste eine Antwort auf veränderte Umweltfaktoren, gefolgt von Antworten auf zellulärer Ebene (biochemisch). Anschließend sind Veränderungen auf gewebe- und organspezifischer Ebene sowie auf der Ebene des Gesamtorganismus messbar.

Zielsetzung

In diesem Forschungsprojekt soll überprüft werden, ob mit den in der Umweltprobenbank eingelagerten Biotaproben, vor allem den Brassenlebern, ein retrospektives Monitoring unter Verwendung molekularer Biomarker und anhand von Untersuchungen möglicher Veränderungen im Genexpressionsmuster prinzipiell durchführbar ist. Deshalb wird dieses Vorhaben als Machbarkeitsstudie bezeichnet.

Vorgehensweise

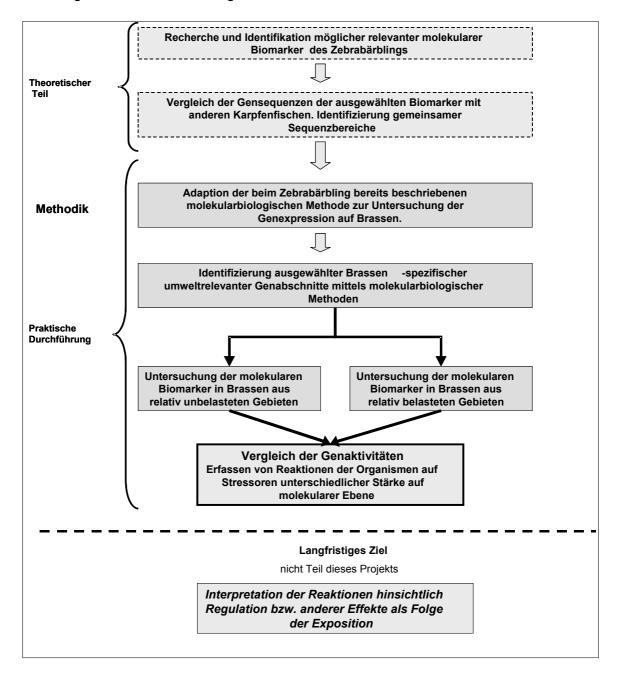
Voraussetzung für die Nutzung molekularer Biomarker ist die Kenntnis der Gensequenzen des zu untersuchenden Organismus bzw. der Gensequenz des zu betrachtenden Gens. Über Brassen (*Abramis Brama*) ist allerdings diesbezüglich wenig bekannt. Die Recherche in der Datenbank Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov; Stand Dezember 2005) ergab mRNA Sequenzen für nur wenige Gene bzw. deren Teilsequenzen: Heat Shock Protein 70, DAB3 gene (MHC class II beta chain) und Cytochrom b.

Das Genom des zur gleichen Familie der Karpfenfische (*Cyprinidae*) gehörenden Zebrabärblings (*Danio rerio*) ist dagegen gut untersucht, weitgehend sequenziert, und die Gensequenzen sind frei erhältlich (Genbank Datenbank).

Für die Anwendung molekularer Biomarker in den Brassenproben der UPB, z.B. zur Messung der Genexpression sollte in einem ersten Schritt untersucht werden, inwieweit sich bekannte Gensequenzen des Zebrabärblings auf Brassen übertragen und sich dadurch bestimmte Genaktivitäten in den

Fischen detektieren lassen. Das Konzept der Machbarkeitsstudie und die schrittweise Vorgehensweise sind in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

Abbildung 1: Schema der Vorgehensweise



2. Recherche und Identifikation möglicher relevanter molekularer Biomarker in Fischen

Bedeutung von Biomarkern im Biomonitoring

Ein effektives Biomonitoring Programm sollte idealerweise in der Lage sein, Effekte auf Individuen bzw. auf Populationen, Lebensgemeinschaften sowie auf das gesamte Ökosystem zu ermitteln. Die bloße Messung umweltrelevanter Substanzen wie z.B. Pestizide oder Schwermetalle in der Umwelt beispielsweise in Wasser und/oder Sedimentproben gibt lediglich Auskunft über die Exposition, jedoch nicht darüber, ob und in welchem Umfang diese Substanzen für Organismen bioverfügbar sind und welche Effekte dadurch im Individuum ausgelöst werden können [45]. Die Messung der Konzentrationen derartiger Substanzen in den Organismen selbst - wie dies in der Umweltprobenbank praktiziert wird - hat den großen Vorteil, dass der bioverfügbare Anteil umweltrelevanter Stoffe quantifiziert werden kann. Eine Aussage darüber, ob bzw. welchen Effekt eine analysierte Konzentration auf den Organismus hat, kann dadurch allerdings nicht getroffen werden. Um dies zu ermöglichen, soll anhand dieser Machbarkeitsstudie überprüft werden, ob molekulare Biomarker bei der Analyse von eingelagerten Proben aus der Umweltprobenbank eingesetzt werden können, um Informationen über eine Beeinflussung der betroffenen Individuen zu erhalten, d.h. lassen sie einen Schluss auf Expositionen zu (Substanzen gleichen Wirktyps) und/oder lassen sich Schädigungen der Organismen erkennen?

Molekulare Biomarker

Neben den biochemischen Biomarkern sind inzwischen die molekularen Biomarker von zunehmender Bedeutung [3, 28, 63, 88]. Molekulare Biomarker beziehen sich überwiegend auf die DNA- bzw. RNA-Ebene, auf der Reaktionen durch veränderte Umweltfaktoren hervorgerufen werden. Derartige messbare Effekte können zum einen Schäden am Genom des untersuchten Organismus oder Veränderungen in der Genexpression selbst manifestieren. Veränderungen zellulärer Produkte (z.B. Enzyme, Strukturproteine, Hormone) sind eng mit den Aktivitäten der jeweiligen Gene verknüpft. Zurzeit werden Studien durchgeführt, die Veränderungen in exponierten Organismen anhand veränderter Genexpressionsmuster untersuchen [25, 26]. Es ist davon auszugehen, dass derartige molekularbiologische Untersuchungen in Zukunft spezifizierte Aussagen über Exposition und Wirkung liefern können und einen größeren Stellenwert in Monitoringprogrammen einnehmen werden. Die "Untersuchung der Beziehung zwischen der Struktur und der Aktivität des Genoms und adversen biologischen Effekten von exogen zugeführten Fremdstoffen" kann unter dem Begriff "Toxicogenomics" zusammengefasst werden [1, 15, 57]. Die breite Definition umfasst neben der Untersuchung der Genaktivitäten (Genomics) auch die Studien der zellulären Produkte, die durch Genaktivitäten kontrolliert werden (Proteine: Proteomics, Metabolite: Metabolomics).

Die Umweltprobenbank ist eine Einrichtung für das retrospektive Monitoring in der Bundesrepublik Deutschland. Die eingelagerten Biotaproben werden zurzeit chemisch-analytisch auf organische und anorganische Einzelstoffe untersucht. Zuvor wurden von den Organismen umfangreiche biometrische Daten aufgenommen. Das Ziel der Umweltprobenbank ist es, eine retrospektive Verfolgung von organismischen Belastungen zu ermöglichen, die z. B. zum Zeitpunkt der Probenahme noch nicht bekannt waren oder für deren Detektion zum Probenahmezeitpunkt noch kein Messverfahren zur Verfügung stand. Damit können sowohl Entstehungen neuer Belastungen detektiert als auch die Wirksamkeit von Gesetzesmaßnahmen verfolgt werden.

Neben der Erfassung der Belastung rückt die Frage nach der Bedeutung dieser Belastungen für die exponierten Organismen, d.h. die Detektion von Effekten in den Organismen, zunehmend in den Mit-

telpunkt des Interesses. Hier bieten sich molekulare Biomarker an, die als integrative Parameter das Vorhandensein von Schadstoffgruppen mit gleichen Wirkmechanismen zum Zeitpunkt der Probenahme anzeigen können. Der Einsatz der molekularen Biomarker kann zwei Aspekten dienen, dem Expositions-Monitoring und dem Effekt-Monitoring. Es können somit

- Hinweise auf Exposition gegenüber Stoffen oder Stoffgruppen erhalten werden, die durch die chemische Analytik nicht abgedeckt werden. Dabei kann es sich um bioakkumulierende Stoffe oder kurzzeitig vorhandene, akut wirksame Stoffe handeln
- Hinweise auf Veränderungen in den Organismen erhalten werden, die möglicherweise zu adversen Effekten führen.

Mittlerweile wurde eine Vielzahl unterschiedlicher Techniken entwickelt, die Veränderungen in der Genexpression exponierter Organismen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen nachweisen können, die unterschiedlich weit entwickelt und etabliert sind. Dazu zählen die Untersuchung der Induktion einzelner Gene durch die Bestimmung der entsprechenden mRNA mittels RT (Reverser Transkription)-PCR, Differential Display (Vergleich der Genaktivitätsmuster behandelter und nicht behandelter Organismen) und DNA-Microarrays [29, 38, 50, 51, 52, 54, 69, 72, 73]. Je nach angewendeter Methode kann z.B. gezielt die Über- oder Unterexpression bestimmter Gene untersucht werden, die durch verschiedene Umweltfaktoren reguliert werden. Ein anderer Ansatz besteht in der Untersuchung des gesamten Expressionsmusters des kompletten Genoms (Microarrays).

Molekulare Biomarker in Fischen

Verschiedene biochemische Parameter wurden bisher in Fischen auf ihre Reaktion auf Schadstoffexposition und ihre potentielle Eignung als Biomarker für Exposition oder Effekt untersucht. Der Fokus der Untersuchungen richtete sich auf die Enzyme, die in Detoxifizierungsprozesse involviert sind (Enzyme der Biotransformation, Antioxidative Prozesse). In Fischen ist die Leber das Organ, in dem überwiegend die Detoxifikation von Fremdsubstanzen stattfindet. Deshalb stellen die kryokonservierten Fischleberproben der UPB ein geeignetes Material für ein Biomarker Monitoring dar. Nach Aufnahme von Fremdstoffen in die Leber kann 1) eine Induktion von Enzymen erfolgen, z.B. nach Bindung an einen Rezeptor, oder führen 2) Biotransformationsprozesse zu einer Detoxifizierung oder Toxifizierung der Verbindung. Die Biotransformation läuft in mehreren Phasen ab, wobei die Phase I Enzyme oxidative, reduktive oder hydrolytische Veränderungen der Substanz katalysieren. In Phase II erfolgt die Konjugation mit nachfolgender Exkretion der Verbindungen und in Phase III kann der Katabolismus der Substanz folgen. Die sensitivsten Reaktionen auf Schadstoffexposition sind Änderungen in der Aktivität und im Level der Phase I Biotransformationsenzyme, zu denen die Cytochrom P450 Gruppe gehört. Es wird allgemein angenommen, dass die de novo Enzymsynthese den wichtigsten Enzyminduktionsprozess darstellt [91, 98]. Daneben kann aber auch eine Inhibierung der Enzymaktivität durch Fremdstoffe oder Schädigung des Organismus erfolgen.

In den letzten Jahren wurden von verschiedenen Forschergruppen auf Fremdstoffexposition reagierende Gene in Fischen identifiziert und deren Eignung als Biomarker untersucht [2, 7, 17, 23, 21 32, 35, 42, 60, 78, 89]. Aus der Palette der Biomarker werden für die Untersuchung von Effekten bioakkumulierender Substanzen auf Fische die Phase I Enzyme (CYP1A), Reproduktions-relevante Parameter wie Vitellogenin und Gentoxizitäts-Parameter wie hepatische DNA-Addukte als die geeignetsten Marker angesehen [98]. Daneben wird als Anzeiger von Umweltstress, verursacht durch Schadstoffe oder Milieuveränderungen, die Induktion verschiedener Proteine diskutiert, deren Funktionen im Schutz der Zellschädigungen liegen. Hierzu gehören die Stressproteine (HSPs, heat shock proteins, Metallothioneine und die "Multi-Xenobiotic-Resistance" Transmembran Proteine [48, 63, 98].

Cytochrom P450 1A (CYP1A)

Die CYP1A Gene in der Leber (CYP1A1 und CYP1A2) codieren die Gruppe der P4501A Enzyme - oxidative Enzyme der Biotransformation. Die erhöhte Expression der CYP1A mRNA wird durch die Bindung planarer halogenierter Verbindungen (wie PAHs, PCBs, TCDD) an den zytosolischen Ah-Rezeptor (Aryl hydrocarbon) verursacht und stellt ein gut dokumentiertes Phänomen in Knochenfischen dar. Die Aktivitäten der P4501A Enzyme wurden und werden auch anhand der EROD (Ethoxyresorufin-O-deethylase) Aktivitäten bestimmt. Die Reaktivität der P450 Isoenzyme stellte sich als empfindlicher heraus als die Messung der P450 Gesamtaktivität. Für die Untersuchung der kryokonservierten Proben der UPB ist deshalb die Untersuchung der mRNA Level des CYP1A Isoenzyms die Methode der Wahl.

Quantitative RT-PCR (reverse transcription) Verfahren zur Bestimmung der CYP1A mRNA in Leber und anderen Geweben wurden in letzter Zeit für verschiedene Fischarten etabliert [10, 14, 64, 76, 91].

Rees et al [76] detektierten deutlich erhöhte CYP1A mRNA nicht nur in Lachsen nach Injektion von ß-Naphtoflavonen in Laborversuchen sondern auch in Wildfängen aus mit PCB stark verunreinigten Gewässern. Eine ausführliche Übersicht über Effekte von organischen Fremdstoffen auf Phase I Enzyme in Fischleber findet sich bei van der Oost et al. [98].

Die P450 Aktivitäten variieren in Abhängigkeit von Alter, Jahreszeit, Geschlecht und Spezies. Die Fische der UPB (*Abramis Brama*) werden einmal jährlich im Spätsommer beprobt. Es werden Tiere eines bestimmten Größenbereichs gefangen, so dass in den verschiedenen Probenahmejahren von relativ vergleichbaren Altersgruppen ausgegangen werden kann und die Variabilität der o.g. Parameter akzeptabel sein sollte. Dies bedarf allerdings noch der Überprüfung.

Metallothionein

Metallothionein (MT) kodiert für ein Protein, das sowohl durch essentielle (Cu und Zn) als auch toxische Schwermetalle (z.B. Cd, Co, Ni und Hg) induziert wird. Bei erhöhten Schwermetallgehalten wird es zur zellinternen Entgiftung gebildet. Dabei kann das aufgenommene Metall direkt gebunden werden und/oder das Metall wird von nicht-Thionein Liganden (Zielorte der Toxizität) entfernt und ausgeschieden. Untersuchungen über die Regulation der MT Genexpression bestätigten, dass die Induktion durch Metalle eine direkte Reaktion auf ansteigende intrazelluläre Metallkonzentrationen ist, die durch metallbindende Regulationsfaktoren vermittelt wird [95]. Die Kapazität für MT Induktion ist in solchen Geweben am größten, die eine hohe Aufnahmeaktivität sowie Speicher- und Exkretionsfunktion besitzen (Dünndarm, Leber, und Kiemen von Fischen). Insofern kann in derart betroffenen Organismen eine Über-Expression von Metallothionein nachgewiesen werden. Mehrere Studien mit wildlebenden Fischen haben die Laborbefunde bestätigt, die den metallkonzentrationsabhängigen Anstieg von MT untersuchten [z. B. 23, 30, 90, 99, 100]. Eine Hemmung der MT Induktion wird in Gegenwart hoher Konzentrationen organischer Schadstoffe vermutet aufgrund eines erhöhten Cystein-Bedarfs für die MT Bildung [24]. Die Eignung der Metallothione als Expositions-Biomarker zur Detektion von Schwermetallbelastungen wird von vielen Autoren bestätigt. Da neuere Untersuchungen gezeigt haben, dass die Induktion der MT-Isoformen je nach Schwermetall variiert, erscheint die Entwicklung einer Methode zur Quantifizierung der Expressionsmuster der Isoformen sinnvoll. Darüber hinaus können Variationen in der MT Induktion in Abhängigkeit von Jahreszeit und Spezies auftreten.

Multixenobiotic resistance (MXR)

Viele Fische sind in der Lage, in kontaminierten Gewässern zu überleben und weisen dabei Gewebekonzentration auf, die unter den Gewässerkonzentrationen liegen. Dieses Phänomen wird der "Multixenobiotic resistance" (MXR) zugeschrieben, vergleichbar dem "Multidrug Resistenz Phänomen (MDR)", das bei Säugetieren beobachtet wird. Der MXR Mechanismus agiert als Energie-abhängige Pumpe, die endogene Stoffe und Fremdstoffe aus der Zelle entfernt und dadurch deren Akkumulation und zytotoxische Effekte verhindert [18, 44]. Bei den verantwortlichen Proteinen handelt es sich um transmembrane Phospho-Glykoproteine (PGP), die sich in spezialisierten Epithelgeweben finden, wie in Leber, Darm und Niere [5]. Die PGP können strukturell und funktionell sehr diverse Verbindungen transportieren, die meist schwach hydrophob und planar sind. Für aquatische Organismen wurde das PGP abhängige MXR Phänomen erstmalig von Kurelec [44] beschrieben. Seitdem sind viele Untersuchungen durchgeführt worden und es hat sich gezeigt, dass sowohl natürlich vorkommende und anthropogene Substanzen, als auch Biotransformationsprodukte der Phase I Enzyme den Mechanismus induzieren können [5]. PGP Induktion scheint demnach eine allgemeine Reaktion auf Stress-Bedingungen zu sein. Neben der Induktion können Chemikalien die Bildung der PGPs auch hemmen und damit die Bioakkumulation von Xenobiotika verursachen.

Vitellogenin

Mit Vitellogenin (VTG) besteht ein aussagekräftiger Biomarker für die Einwirkung von endokrin wirksamen Substanzen auf aquatische Vertebraten. Zahlreiche Untersuchungen belegen die Eignung des *VTG* als molekularen Biomarker hinsichtlich einer Belastung durch östrogenwirksame Substanzen [4, 6, 20, 21, 31, 33, 46, 73, 79, 81, 84, 85, 86, 93, 97, 100]. Das *Vitellogenin*-Gen ist für die Bildung des Vitellogenin-Eidotterproteins verantwortlich und deshalb in der Regel nur in Weibchen aktiv. Dieses Protein wird normalerweise ausschließlich in der Leber weiblicher Fische gebildet und in die heranreifenden Eier transportiert, um in Form von Eidotter ein Nährstoffreservoir für den heranreifenden Embryo anzulegen. Unter Einwirkung östrogenwirksamer Substanzen wird die Expression des *Vitellogenin*-Gens auch bei männlichen Individuen aktiviert.

Wie in *in vivo* Kurzzeittests mit Zebrabärbling am Fraunhofer IME gezeigt werden konnte, ist dieser Marker neben den östrogenen auch für weitere sexual-endokrine Wirkmechanismen (Hemmung der Steroid-Synthese, Aromatase-Hemmung) sensitiv und damit anwendbar [79]. In einem OECD Screening Assay mit Zebrabärbling für endokrin wirksame Substanzen ist die Untersuchung von VTG im Blutplasma als Biomarker vorgesehen. Dieser Kurzzeit-Assay steht kurz vor der Validierung.

Heat Shock Protein

Unter der Bezeichnung Heat Shock Proteine (HSP) wird eine Gruppe von Proteinen zusammengefasst, die unter zellulären Stressbedingungen in verstärktem Maße durch *HSP* gebildet werden. Entsprechend kann auf molekularbiologischer Ebene eine verstärkte Expression der *Heat Shock Protein*-Gene beobachtet werden. Der Stress kann verursacht werden durch hohe oder niedrige Temperatur, UV-Licht, oxidative Bedingungen, Sauerstoffmangel, hohe Salzkonzentrationen, Schwermetalle und Xenobiotika wie Teratogene und Hepatokarzinogene [98]. Den Heat Shock Proteinen kommt eine zentrale Funktion bei der Proteinbildung zu, insofern, als dass sie unerwünschte Einflüsse von diesem Prozess fernhalten. Entsprechend dieser Funktion werden sie auch als molekulare Chaperone bezeichnet [2, 17, 42, 83].

3. Auswahl und Vergleich der Gensequenzen ausgewählter Biomarker

Die Auswahl erfolgte unter pragmatischen Gesichtspunkten, da in diesem Projekt die Untersuchung der Übertragbarkeit von Zebrabärbling-spezifischen Gensequenzen/Primern auf die Brasse im Vordergrund stand (bekannte Sequenzen bei *Danio rerio*). Deshalb wurden noch zusätzliche Gene in das Nachweisverfahren aufgenommen, um die Anwendbarkeit der Auswahlmethode für Gensequenzen zu überprüfen (Glutathion-S-Transferase GST, Aromatase CYP19, Transferrin). Die ökotoxikologische Relevanz war für die Fragestellung sekundär.

Gensequenzen des Organismus	Gen Bezeichnung	Accession Number Genbank
Brasse (Abramis brama)	HSP70	AF228042
	Cytochrom b	AJ 555548
Zebrabärbling (Danio rerio)	CYP19	AF 120031
	Vitellogenin	AF 406784
	Metallothionein	NM 131075
	GST	AF 406784
	Transferrin	BC 081600

Für die Untersuchungen wurden Brassenleberproben aus relativ unbelasteten und belasteten Gebieten ausgewählt, um zu klären, ob unterschiedliche Genexpressionen messbar sind. Darüber hinaus wurden lebende Brassen aus Freilandfängen exponiert und anschließend untersucht, um weitere Aufklärung über die Veränderungen im Genexpressionsmuster zu erhalten.

4. Material und Methoden

4.1. Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien (p.a. Qualität, für Elementanalytik in "suprapur" Qualität) und Materialien wurden von folgenden Firmen bezogen: Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (München), PeqLab (Erlangen), Roth (Karlsruhe), Qiagen (Hilden), Serva (Heidelberg), Roche (Mannheim), Millipore (Massachusetts, USA), Nunc (Wiesbaden), Biozym (Hessisch Oldendorf), Eppendorf (Hamburg), Biometra (Göttingen).

4.2. Elementanalytik

Probenvorbereitung

Für die Elementanalytik wurden die ausgewählten Proben zunächst mehrere Tage in einer Gefriertrocknungsanlage Alpha 1-2 (Christ, Osterode) bis zur Gewichtskonstanz gefriergetrocknet. Das gefriergetrocknete Probenmaterial wurde dann mittels Hochdruck-Mikrowellenaufschlusses in einem Aufschlussgerät Ultraclave II der Fa. MLS (Leutkirch) in Quarzgefäßen aufgeschlossen (maximal 220 °C und 100 bar). Für den Aufschluss wurden jeweils ca. 200 mg eingesetzt. Als Aufschlusssäure wurde jeweils 5 mL HNO₃ (65 %) verwendet. Die Aufschlusslösungen wurden anschließend mit Reinstwasser auf 20 mL aufgefüllt.

Analysenmethoden

Die Elemente wurden mit der in der IME-SOP V7-522 beschriebenen Methode bestimmt. Zur Bestimmung von Cr, Co, Ni, Cu, As, Se, Cd, Tl, Pb wurde die ICP-MS (7500i, Agilent, Waldbronn) eingesetzt. Die Analysen wurden von Herrn Dr. Stephan Reher, Fraunhofer-IME, durchgeführt.

Kalibrierung

Die Kalibrierung der ICP-MS erfolgte gemäß der entsprechenden IME-SOP V7-522 bzw. des Gerätehandbuchs. Die Arbeitsbereiche der Methode wurden den Konzentrationen der zu untersuchenden Elemente in den Proben angepasst.

Bei den Messserien wurden auch Lösungen von Standards im Konzentrationsbereich der jeweiligen Kalibration mitanalysiert, um so Messprobleme erkennen zu können. Die Wiederfindung der Standards sollte im Bereich der Bestimmungsgrenze zwischen 80 und 120 % des Sollwerts liegen. Im übrigen Bereich der Kalibration sollte eine Wiederfindung von 90 – 110 % erreicht werden.

Weiterhin wurden jeweils parallel Blindwerte untersucht (Aufschlüsse nur mit Säure/Reagenzien), um eventuelle Störungen durch Kontaminationen erkennen zu können. Bei niedrigen Konzentrationen wurde um die Blindwerte korrigiert.

Bestimmungsgrenzen

Die Bestimmungsgrenzen für die ICP-MS wurden über Blindwertmessungen abgeschätzt (Schätzung der Nachweisgrenze mittels Leerwert-Methode nach DIN 32645; die Bestimmungsgrenze wird als dreifacher Wert der Nachweisgrenze berechnet).

Qualitätssicherung der Ergebnisse

Richtigkeit

Um die Richtigkeit der Methoden zu überprüfen, wurden regelmäßig geeignete zertifizierte Referenzmaterialien (CRMs: certified reference materials) zusammen mit den Proben aufgeschlossen und analysiert. Als geeignet werden insbesondere solche CRMs angesehen, die in Probenart und Konzentration an zertifizierten Elementen denen der jeweiligen untersuchten Proben ähneln. Für die Matrix Brassenleber wurde als Referenzmaterial Dogfish Liver DOLT-3 gewählt. Wässrige Referenzmaterialien wurden bei den Messungen zusätzlich mitgeführt, um zwischen Problemen der Messung und des Aufschlusses unterscheiden zu können.

Kriterien für die Wiederfindung bei Referenzmaterialien (Konzentrationsbereiche der relevanten Elemente in Proben- und Referenzmaterialien-Aufschlüssen sollten in der gleichen Größenordnung liegen):

Bei Konzentrationen oberhalb des zehnfachen Werts der Bestimmungsgrenze bei ICP-MS-Messungen sollten folgende Wiederfindungen erreicht werden:

CRM wässrige Lösungen 85 - 115 % der zertifizierten Werte CRM Feststoffe 80 - 120 % der zertifizierten Werte

Bei Konzentrationen zwischen der Bestimmungsgrenze und dem zehnfachen Wert der Bestimmungsgrenze bei der ICP-MS sollten folgende Wiederfindungen erreicht werden:

CRM wässrige Lösungen 80 - 120 % der zertifizierten Werte CRM Feststoffe 75 - 125 % der zertifizierten Werte

Bei der vorliegenden Messserie wurden alle gesetzten Qualitätsanforderungen erreicht.

Messunsicherheit

Die Abschätzung der Messunsicherheit erfolgt in Anlehnung an den EURACHEM/CITAC Guide (2000) nach Fraunhofer IME SOP V7-503.

4.3. DNA/RNA-Analytik

Puffer und Lösungen

Tabelle 1: Bei der Analytik von Nukleinsäuren eingesetzte Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
1 x TE	10 mM Tris HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA in dest. H ₂ O
50 x TAE	242 g Tris-Base; 57,1 ml Eisessig; 100 ml 0,5 M EDTA in 1 l dest. $\rm H_2O$ lösen
DEPC-Wasser	0,1 % Diethlypyrocarbonat in dest. H ₂ O lösen und für 12 h bei 37 °C inkubieren und anschließend autoklavieren
Ethidiumbromid	10 mg/ml in H₂O (Stammlösung)
DNA-RNA-Ladepuffer für TAE-Gele	a) 0,25 % Bromphenolblau; 0,25 % Xylenocyanol FF in 30 %iger wässriger Glycerinlösung b) 0,25 % Bromphenolblau in 40 %iger wässriger
	Saccharoselösung
	(für RNA-Ladepuffer wurde DEPC-Wasser verwendet)
RNA-Probenpuffer	500 μL 50 %iges deionisiertes Formamid; 167 μL, 17 %iges Formaldehyd; 100 μL 10x MOPS-Puffer; 233 μL DEPC-Wasser

4.4. Untersuchte Proben

Neben archivierten Brassenleber-Mischproben aus der UPB wurden Gewebeproben von Brassen (Einzeltiere) untersucht, die 2004 von der Landesanstalt für Fischerei, Albaum, im Rhein und von der Universität Trier in Donau und Saar gefischt wurden. Weiterhin erfolgten Untersuchungen am Zebrabärbling aus der Hälterung am Fh-IME. Folgende Proben wurden in die Untersuchungen einbezogen:

Tabelle 2: Untersuchte Spezies

Herkunft Jahr Lieferant						
Brasse (Abramis brama)						
2004	Universität Trier	Einzeltiere				
2004	Universität Trier	Einzeltiere				
2004	Landesanstalt für Fischerei, Albaum, Hälterung am IME	Einzeltiere				
2003	UPB	Mischprobe				
2003	UPB	Mischprobe				
1993	UPB	Mischprobe				
2003	UPB	Mischprobe				
1998	UPB	Mischprobe				
Zebrabärbling (<i>Danio Rerio</i>)						
2004	Fraunhofer-IME (Züchtung, Hälterung)	Einzeltiere				
Miesmuschel (Mytilus edulis)						
-	National Institute for Standards (NIST)	Mischprobe				
	2004 2004 2004 2003 2003 1993 2003 1998 50 Rerio) 2004	ama) 2004 Universität Trier 2004 Universität Trier 2004 Landesanstalt für Fischerei, Albaum, Hälterung am IME 2003 UPB 2003 UPB 1993 UPB 2003 UPB 1998 UPB 1998 UPB 100 Rerio) 2004 Fraunhofer-IME (Züchtung, Hälterung)				

Von den Brassen wurde überwiegend die Leber untersucht. Rhein-Brassen, die von der Landesanstalt für Fischerei, Albaum, zur Verfügung gestellt wurden, wurden für weitere Versuche am IME lebend gehalten. Nach entsprechenden Versuchen erfolgte nach der Tötung die Entnahme von Gehirn, inneren Organen, Gonaden und Muskelfleisch.

4.5. Belastungsversuche

Um die Belastung der Fische durch Stressoren im Labormaßstab zu simulieren, wurden die Tiere im Labor unter Umwelt- bzw. Chemikalienstress gesetzt.

Tabelle 3: Angewendete Stressoren

Spezies	Induzierter Stress
Zebrabärbling (<i>Danio rerio</i>)	Temperaturerhöhung des Wassers
Zebrabärbling (Danio rerio)	Stress durch starke Strömung
Brasse (Abramis brama)	Bleibelastung des Wassers

4.6. Probenvorbereitung

Proben, die aus dem Lager der UPB direkt entnommen wurden, waren bereits homogenisiert und bedurften keiner weiteren Aufarbeitung.

Gewebeproben, die von der Universität Trier in gefrorenem Zustand zur Verfügung gestellt wurden, mussten unter flüssigem Stickstoff mit Mörser und Pistill homogenisiert werden. Das pulverförmige Probenmaterial wurde anschließend zur DNA- und RNA-Isolierung sowie zur Schwermetallbestimmung eingesetzt.

Die am Institut gehaltenen Fische wurden nach fachgerechter Betäubung und anschließender Tötung präpariert und die einzelnen Organe entnommen. Die entnommenen Organe wurden wie oben beschrieben homogenisiert. Anschließend erfolgte die Isolation von DNA/RNA sowie aus dem Brassenmaterial die Analytik der Schwermetalle.

4.7. Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe

Bei der Isolierung von RNA müssen RNase-freie Lösungen und Geräte verwendet werden. In Lösungen werden RNasen durch die Behandlung mit DEPC zerstört. DEPC inaktiviert RNasen durch kovalente Modifikationen des Histidinrestes im aktiven Zentrum. Allerdings muss DEPC aus den Lösungen durch Autoklavieren entfernt werden, da überschüssiges DEPC zu Modifikationen der RNA durch Carbethoxylierung der Adenine führt. Beim Erhitzen zersetzt sich DEPC in Ethanol und Kohlenstoffdioxid. Verwendete Pipettenspitzen und Geräte wurden zweimal autoklaviert bzw. 3 h bei 180 °C erhitzt, um vorhandene RNasen zu entfernen. Die RNA-Isolation wurde nach dem RNeasy Mini Kit-Protokoll für Animal Tissues der Firma Qiagen durchgeführt und entsprechend des Herstellerprotokolls verfahren. Mittels Gelelektrophorese wurde überprüft, ob eine erfolgreiche Extraktion durchgeführt wurde und ob das erhaltene Eluat frei von DNA war. Die Lagerung des RNA-Isolats erfolgt bei -80 °C.

Photometrische Konzentrationsbestimmung

Zur photometrischen Konzentrationsbestimmung wurden die Proben 1:40 verdünnt und bei einer Wellenlänge von 260 nm an einem herkömmlichen UV/VIS-Spektrophotometer gemessen Die gemessene Extinktion wird mit einem Umrechnungsfaktor (F=40 für RNA) und dem Verdünnungsfaktor multipliziert. Die RNA-Konzentration liegt dann in ng/µL vor.

cDNA Synthese mittels RT-PCR

Die RT-PCR stellt ein sehr sensitives Verfahren zur Detektion der Genexpression dar. Bei dieser Technik wird die messenger-RNA-Konzentration eines bestimmten Gens untersucht. Durch Vergleich der Genexpression von unbelasteten/belasteten Proben kann durch Einbeziehung eines Kontrollgens (House-Keeping-Gen) die Genexpression semiquantitativ analysiert werden. Für die Amplifikation ist es nötig, die zu untersuchende RNA in DNA umzuschreiben, da die Ausgangs-RNA nicht direkt als Matrize von der Taq-Polymerase genutzt werden kann. Den dadurch gebildeten DNA-Strang bezeichnet man als komplementäre DNA (cDNA) und die Reaktion als Reverse Transkription. Die Herstellung

der cDNA erfolgt unter Verwendung von Oligo(dT)-Primern, die eine Erststrang-cDNA-Synthese vom 3'-Ende der Transkripte erlauben.

10 μ L definierte RNA-Konzentration wurden mit 1 μ L Oligo(dt)15 Primer versetzt und bei 70 °C inkubiert. Nach einer Inkubationsdauer von 10 min, wurden je Probeansatz 7 μ L Mastermix (2 μ L 10x RT-Puffer, 2 μ L 25 mM MgCl₂, 2 μ L 0,1 M DTT, 1 μ L 10 mM dNTP-Mix) zugegeben und weitere 5 min bei 42°C inkubiert. Danach wurde 1 μ L Reverse Transkriptase (Fa. PROMEGA) zupipettiert und weitere 50 min bei 42°C sowie 15 min bei 70 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben 20 min lang bei 37 °C mit 1 μ L RNase H (Fa. Promega) verdaut. Die hergestellte cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

4.8. DNA-Isolation und Speziesanalyse

Um sicherzustellen, dass es sich bei dem in der Umweltprobenbank eingelagerten homogenisierten Probenmaterial um reines Brassenleber- bzw. -muskelhomogenat (Abramis brama) handelt, aber auch zur Identifikation von Parasiten, wurde mittels T-RFLP-Methode die jeweilige Spezies analysiert.

Die Tierartenbestimmung mittels T-RFLP repräsentiert eine am Fraunhofer IME entwickelte Methode, die zur Speziesdifferenzierung standardmäßig eingesetzt wird. Die Analytik erfolgt auf Grundlage der PCR mittels degenerierter Universalprimer [87].

Die DNA-Isolation wurde mittels Extraktions-Kit der Fa. Macherey-Nagel durchgeführt. 200 mg +/- 10 mg des homogenisierten Materials wurden gemäß des Protokolls des NucleoSpin Food Kit extrahiert. Die Überprüfung der extrahierten genomischen DNA erfolgte mittels Gelelektrophorese. Die Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer durch Aufkochen in einer Mikrowelle vollständig gelöst. Nach Abkühlen auf ca. 65 °C wurde eine Ethidiumbromidlösung (Stammlösung 10 mg/ml) bis zu einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zugegeben und das Lösungsgemisch in eine Gelkammer mit entsprechendem Kamm gegossen. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Gel mit 1 x TAE überschichtet und der Kamm entfernt. Die zu analysierenden Proben wurden mit 1/10 Probenladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Der Gellauf wurde mit 3-4 mV/cm²-Gelfläche durchgeführt, wobei die Laufzeit anhand der Bromphenolblau-Bande des Probenladepuffers verfolgt wurde, die in einem 1 %igen Gel etwa 300 bp entspricht. Die DNA wurde im UV-Licht (302 nm) durch die Interkalierung des Ethidiumbromides visualisiert und mittels einer Dokumentationsanlage fotografiert und ausgewertet.

PCR

Zur gezielten Amplifikation wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingesetzt. Die Reaktionsansätze für Routineanwendungen sehen wie folgt aus:

 2μ L DNA-Matrize (ca.1 ng); 5 μL 10 x Reaktionspuffer der Taq-Polymerase; 1 μL Primer I (10 pmol); 1 μL Primer II (10 pmol); 1 μL dNTP-Mix (jeweils 10 nM); 0,5 μL DNA Taq-Polymerase; auf 50 μL mit bidest. H₂0 ergänzt PCR-Programm: Das verwendete PCR-Temperaturprofil richtete sich nach den Schmelzpunkten der eingesetzten Primer.

Tabelle 4: PCR-Schema

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
	[°C]	[min]	
1. initiale Denaturierung	94	3:00	einmaliger Schritt
2. Denaturierung	94	0:30	
3. Anlagerung	45	0:30	50
4. Elongation	69	0:30	
5. finale Elongation	69	5:00	einmaliger Schritt
6. Ende	4	bis zu Entnahme der Probe	einmaliger Schritt

Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme sind Endonucleasen bakteriellen Ursprungs. Diese spalten Phosphodiesterbindungen beider Stränge des DNA-Moleküls hydrolytisch auf und unterscheiden sich in ihrer Erkennungssequenz, ihrer Spaltstelle und ihren Ursprungsorganismen. In einem Restriktionsansatz wird die zu analysierende DNA mit dem gewünschten Restriktionsenzym oder einer Kombination mehrerer Enzyme unter definierten Pufferbedingungen und bei bestimmter Temperatur - meist 37 °C - für eine bestimmte Zeit inkubiert. Ein Restriktionspuffer enthält in der Regel Tris, MgCl₂, NaCl oder KCl, der für einen optimalen pH-Wert sorgt (zwischen pH 7,5-8) sowie ein Sulfhydrylreagenz (DTT, DTE oder b-Mercaptoethanol). Ein divalentes Kation (meist Mg^{2^+}) ist für die Enzymaktivität notwendig. Die Restriktion der DNA wurde in einem 50 µL Ansatz durchgeführt. Zu je 20 µL PCR-Produkt wurden jeweils 30 µL Enzymmischung gegeben. Eine anschließende Inkubation für 2,5 h bei 37 °C war ausreichend.

Aufreinigung und Analyse

Für die anschließende Fragmentanalyse müssen die DNA-Fragmente nach dem Restriktionsverdau frei von Nukleotiden, Primerdimeren, Salzen und Polymerasen sein. Zur Aufreinigung wurde das E.Z.N.A-Cycle-PureKit der Fa. Peqlab benutzt. Die Durchführung erfolgte entsprechend des Herstellerprotokolls.

Nach der Aufreinigung wurde die Probe für die Fragmentanalyse vorbereitet. Zu 1-10 μ L Probe wurden 9,5 μ L hochreines Formamid pipettiert, um das PCR-Produkt zu denaturieren. Zusätzlich wurden 0,5 μ L eines internen Längenstandards (ROX 500) zugegeben, um anschließend die Fragmentanalyse durchzuführen. Je nach Verdünnung wurde ein entsprechendes Volumen von Lichrosolv-Wasser (0 bis 9 μ L) zugegeben. Die Fragmentanalyse erfolgte im Genetic Analyzer der Fa. ABI PRISM.

4.9. Differential Display (DD RT-PCR)

Die Methode des "Differential Display" (DD) bezeichnet eine Technik welche die Identifikation verschiedener exprimierter Gene auf Ebene des gesamten Genoms ermöglicht [53, 54, 50, 49]. Im Prinzip repräsentiert dieses Verfahren eine mRNA "Finger-Printing"-Technik, die auf der systematischen Amplifikation der 3'-terminalen Enden der mRNA-Anteile und der anschließend gelelektrophoretischen Auftrennung der gebildeten Fragmente beruht. Dabei werden sogenannte Anchor-Primer eingesetzt, welche für die reverse Transkription am 5'-Ende des Poly-A Schwanzes binden. Anschließend erfolgt eine Amplifikation mittels PCR unter der Verwendung von Zufallsprimern, so genannten Arbitrary-Primern.

Durch diese Technik ist es möglich, direkte Vergleiche zwischen den verschiedenen mRNAs gleichartiger Zellen vorzunehmen. Die Differential-Display-Methode ist bei der Verwendung zahlreicher Primerkombinationen hinsichtlich ihres Potenzials einzigartig, alle exprimierten Gene in eukaryontischen Zellen in einer systematischen Art und Weise zu visualisieren.

Von Bedeutung ist weiterhin, dass durch dieses Verfahren die Möglichkeit besteht funktionelle cDNA-Sequenzen zu identifizieren, welche mittels weiterer molekularbiologischer Verfahren charakterisiert werden können. Aufgrund der Einfachheit, Sensitivität und Reproduzierbarkeit findet die Methode des Differential Display mittlerweile breite Anwendung z.B. in der Krebsforschung und insbesondere auch im Bereich der Umwelttoxikologie, da es möglich ist Wirkung von Stressoren zu identifizieren, deren Wirkungsweise noch unbekannt ist.

Für das Differential Display wurden drei verschiedene Oligo-Primer als Anchorprimer zur ErststrangcDNA-Synthese eingesetzt. So erhielt man für die Amplifikation mit drei weiteren Oligo-dT-Primern (Arbitrary-Primern) neun Primerkombinationen. Je 1 μ L der Erststrang-cDNA wurden in der PCR eingesetzt, bei der mit Hilfe der oben erwähnten Anchor-Primer und der Arbitrary-Primer die exprimierten Gensequenzen amplifiziert werden konnten. Die Amplifikation wurde routinemäßig durchgeführt, wobei die Annealing-Temperatur 40 °C und die Anzahl der zyklischen Wiederholungen 30 betrug.

Primer für die Differential Display RT-PCR

Anchorprimer 1:	5'-AAG CTT TTT TTT TTT G-3'	16-mer
Anchorprimer 2:	5'-AAG CTT TTT TTT TTT A-3'	16-mer
Anchorprimer 3:	5'-AAG CTT TTT TTT TTT C-3'	16-mer
Arbitrary Primer 1:	5'-AAG CTT GAT TGC C-3'	13-mer
•		
Arbitrary Primer 2:	5'-AAG CTT CGA CTG T-3'	13-mer

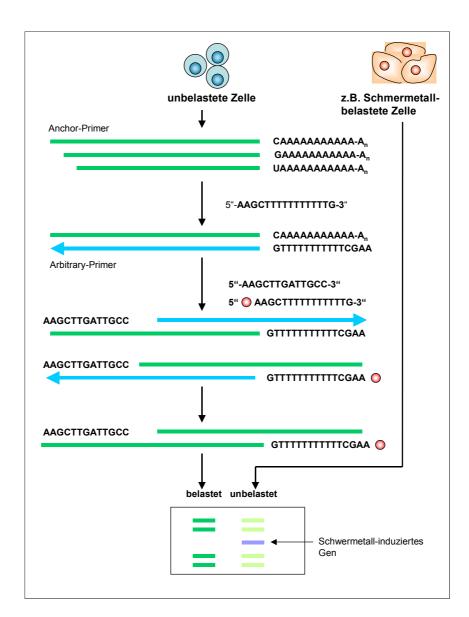


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Differential-Display, am Beispiel unbelasteter/belasteter Zellen verändert nach /journal/v3/n11/images/nrc1214-f3.jpg)

5. Ergebnisse

5.1. RNA-Isolation

In ersten Versuchen wurde aus den in der UPB eingelagerten homogenisierten Brassenlebern RNA extrahiert. Aufgrund der sehr hohen Instabilität von RNA durch z.B. Nukleasen, kann diese leicht degradiert und damit einer weiteren Untersuchung entzogen werden. Um die Qualität der RNA zu überprüfen, wurde aus älteren eingelagerten Proben RNA extrahiert und gelektrophoretisch aufgetrennt. Die Abbildung 3 zeigt exemplarisch, dass auch in Proben, die länger als 10 Jahre über flüssigen Stickstoff gelagert wurden, RNA extrahiert werden konnte, die nur eine geringe Degradation aufwies.

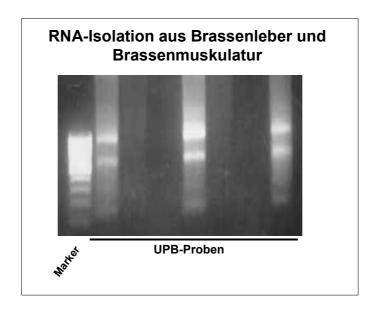


Abbildung 3: RNA-Isolation aus älteren Brassenproben der Umweltprobenbank des Bundes. Die isolierte RNA zeigt nur geringe Degradation auf. Repräsentatives Agarosegel.

Eine funktionelle RNA war für die weiteren Untersuchungen von essentieller Bedeutung. Dementsprechend wurden sämtliche Proben, aus denen RNA isoliert wurde mittels Gelelektrophorese kontrolliert. Hierdurch konnte weiterhin nachgewiesen werden, ob genomische DNA in den Proben vorhanden war. Wenn genomische DNA detektiert wurde, erfolgte ein zusätzlicher Schritt mit DNA zerstörenden Enzymen, um die vollständige Degradation zu gewährleisten.

Aus der isolierten RNA erfolgte die Herstellung der entsprechenden cDNA, welche in der anschließenden PCR eingesetzt wurde.

5.2. Primer-Test

Abgeleitet von den publizierten Sequenzen des Zebrabärblings wurden eine Vielzahl unterschiedlicher Primer an Brassen DNA getestet, um deren Funktionalität zu überprüfen. Die nachfolgende Tabelle zeigt welche Gene analysiert wurden und bei welchen die eingesetzten Primer erfolgreich angewendet werden konnten. Tabelle 5 in Verbindung mit Abbildung 4 zeigt, dass der Versuch, Teilsequenzen von *Cyp19* und *GST* mittels RT-PCR zu detektieren, nicht gelang. Genomische DNA konnte jedoch bei der Verwendung der *Cyp19* und *GST*-Primer detektiert werden (Daten werden nicht gezeigt).

Eingesetzte Oligonucleotide (Primer)

In der nachfolgenden Tabelle sind die Oligonucleotide (Primer) aufgeführt, die an Brassen- und Zebrabärblingproben getestet wurden.

Tabelle 5: Getestete Oligonucleotide (Primer-Test)

Primer	Sequenzen		
HSP 1 fw:	5'-ACA CCA AGT TAT GTA GCA TT-3'		
rv:	5'-AAA CCT CCG ACC AAT AAG-3'		
HSP 2 fw:	5'-GAG AGG CTG ATT GGA GAT-3'		
rv:	5'-CAG AGT CAT CAA ACC TCC-3'		
Transferrin 196 fw:	5'-CAC TGA CTT TGA AAA GTG TAA C-3		
rv:	5'-CAC AGA TCC TTT TAT CTC TT-3		
Transferrin 212 fw:	5'-ATG AAG GTC CTG CTC ATC TC-3'		
rv:	5'-ACA ATA TCC GTT CCA CCA GC-3		
Vitellogenin 3 fw:	5'-TCT TGG GTG GTC TTC CTC AA-3'		
rv:	5'-GCG AAT ACC TT CCA ACC AC-3'		
Vitellogenin 1 fw:	5'-TGA AGA CTC TAA CCC AAA AGA G-3'		
rv:	5'-GCT TTA GTA ATC TGA CCA CC-3'		
Vitellogenin fw:	5'-AGA CCT ATG TGT ACA AGT ATG AGG C-3'		
rv:	5'-TGG GAA TCT GAA GCT GAG CA-3'		
Metallothionein 1fw:	5'-ATG GAT CCT TGC GAA TGC GCC-3'		
rv:	5'-TGC CCT TAC ACA CGC AGC CAG-3'		
Metallothionein 2 fw:	5'-ATG GAC CCC TGC GAA TGT GCC A-3'		
rv:	5'-TTT GCA GAC GCA GCC AGA GGC A-3		
Cyp 19A fw:	5'-AGC CCT GTG GAA TGA AGC CGG T-3'		
rv:	5'-GAT GGT GTC TGA TGG CTA GCA GCA-3'		
GST fw:	5'-ACT TCG CAG TCA AAG GCA GAT GTG G-3'		
rv:	5'-ACA GGA GGG AGA AAG CAC CTT CAG A-3'		
Cytochrom b	Sequenzen werden nicht veröffentlicht		

Die Analyse des *Cytochrom b* erfolgte zur Speziesidentifikation. Daneben wurde es als sogenanntes "House Keeping Gene" eingesetzt, um sicherzustellen, dass bei den RT-PCR Analysen gleiche RNA-Mengen eingesetzt wurden.

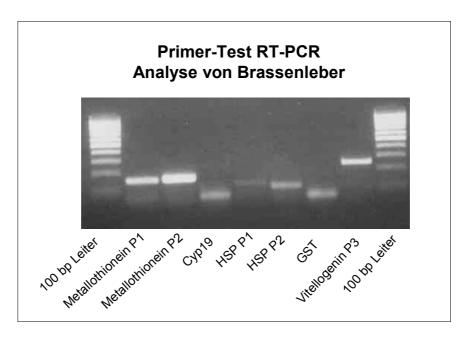


Abbildung 4: Agarosegel des durchgeführten Primer-Tests. Cyp19 und GST konnten mittels RT-PCR in der Brasse nicht amplifiziert werden

5.3. RT-PCR-Analysen

Heat Shock Proteine und Metallothionein

Abbildung 4 zeigt, dass u.a. der Nachweis von *HSP* und *Metallothionein* in der Brasse möglich war. Daraufhin wurden in einem ersten Schritt unterschiedliche Brassenproben analysiert, um die Genexpression des *HSP* und *Metallothionein* näher zu untersuchen.

Abbildung 5 zeigt, dass *HSP* in den Brassen überexprimiert war, die einer Schwermetallbelastung ausgesetzt waren. Von außerordentlichem Interesse sind die Unterschiede der *HSP*-Expression, die in Proben der Umweltprobenbank nachweisbar sind (Abbildung Pfeile). Deutlich zu erkennen ist, dass *HSP* in der Cadmium-belasteten Probe (Mulde/Dessau, 2003, Brassenleber, Cadmiumgehalt 11,245 µg/g) im Vergleich zur gering belasteten Probe (Belauer See, 1990, Brassenleber, Cadmiumgehalt 0,284 µg/g) stark überexprimiert ist. Brassen, die im Labor einer hohen Bleibelastung ausgesetzt waren, bestätigen diese Ergebnisse (Brasse 2 und Brasse 5, bleibelastet, Bleikonzentration in der Leber 15,4 µg/g und 44,2 µg/g). Auch hier ist zu erkennen, dass *HSP* in diesen Proben stark überexprimiert ist. In den unbelasteten Proben konnte *HSP* nur in sehr geringen Konzentrationen nachgewiesen werden. Weiterhin ist ersichtlich, dass die Expression eindeutig konzentrations- und zeitabhängig ist. So weisen die Brassen, die einer höheren Bleikonzentration über einen längeren Zeitraum ausgesetzt waren, eine deutlich erhöhte *HSP*-Expression auf. In Übereinstimmung zu diesen Ergebnissen steht die Analyse des *Metallothioneins*. Deutlich zu erkennen ist, dass eine höhere Genexpression - abhängig von der gemessenen Bleikonzentration - in den schwermetallbelasteten Proben nachweisbar ist.

Als House-Keeping-Gen wurde das *Cytochrom b* analysiert. Die Schwermetallkonzentrationen wurden mittels ICP-MS analysiert.

Tabelle 6: Analysierte Proben und Probenbezeichnung

Probenbezeichnung in Abbildung 5	Bleigehalt (µg/g)	Cadmiumgehalt [µg/g]
"Brasse wenig belastet"	0,115	0,284
Brasse (Brassenleber Belauer See, 1990, UPB		
"Brasse 5A, belastet"	0,230	11,245
Brassenleber Mulde/Dessau, 1993, UPB		
"Brasse 2, bleibelastet"	15,422	0,214
Rhein 2004, im Labor induzierte Bleibelastung		
Brasse 3, bleibelastet	44,202	1,851
Rhein 2004, im Labor induzierte Bleibelastung		
Brasse 4, unbelastet	0,600	0,533
Rhein 2004, im Labor unbelastet		
Brasse 5, unbelastet	nicht nachweisbar	nicht nachweisbar
Rhein 2004, im Labor unbelastet		
Güdingen 1	0,067	0,022
Saar, 2004, Universität Trier, Weibchen		
Güdingen 2	0,147	0,035
Saar, 2004, Universität Trier, Männchen		

Die Analyse von Brassen, die in der Saar bei Güdingen gefangen wurden, zeigen eine deutliche Überexpression von *HSP* (Abbildung 5, Pfeile), *Metallothionein* ist dem gegenüber nur schwach überexprimiert (Abbildung 5, Pfeile). Dies deutet darauf hin, dass die Brassen keiner sehr hohen Konzentration von Schwermetallen ausgesetzt waren. Diese Beobachtungen wurden durch die Analysen der Schwermetallkonzentrationen bestätigt. Die erhöhte *HSP*-Expression lässt jedoch auf andere Stressoren schließen, denen die Tiere ausgesetzt waren.

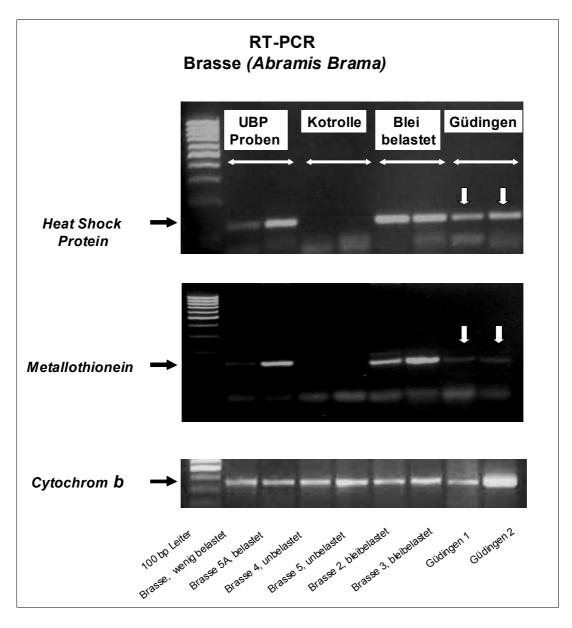


Abbildung 5: RT-PCR verschiedener Brassenproben. Analyse von HSP, Metallothionein und Cytochrom b. Es ist eine deutliche Überexpression von HSP und Metallothionein in den Proben mit einem hohen Schwermetallgehalt nachweisbar.

Die wirkstoffunspezifische Regulation der *HSP* bestätigen die Ergebnisse der Analysen des Zebrabärblings (Abbildung 6). In Laborversuchen wurden diese Fische unter Hitzestress (35 °C, 20 min) gesetzt und anschließend mittels RT-PCR die Genexpression des *HSP* untersucht. Die Ergebnisse belegen eindeutig, dass *HSP* in den Fischen überexprimiert ist, die erhöhten Temperaturen ausgesetzt waren. Bestätigt wurden diese Ergebnisse mit Brassen, die ebenfalls massivem physischen Stress ausgesetzt waren (Transport, neue Umgebung etc. Daten werden nicht gezeigt).

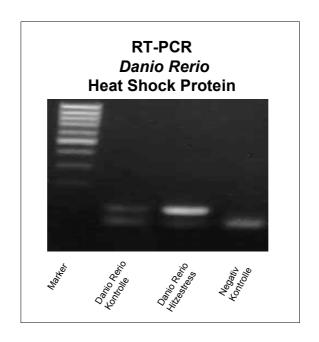


Abbildung 6: RT-PCR-Ergebnisse. Untersuchung von Danio Rerio RNA. RNA wurde aus Kontrollfischen sowie aus einem Fisch isoliert, der Hitzestress ausgesetzt war. Deutlich zu erkennen ist die Überexpression von HSP im Vergleich zur Kontrolle.

Abbildung 7 belegt, dass die Hitzebehandlung nicht zu einer Degradation der RNA führte. Deutlich zu erkennen ist, dass die RNA in unzerstörter Form aus den Proben extrahiert werden konnte.

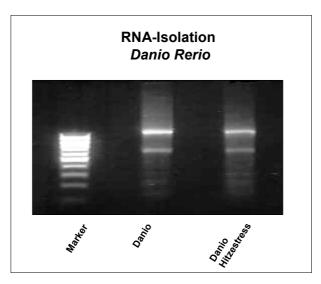


Abbildung 7: RNA-Isolation aus Danio Rerio.

Vitellogenin

Die Analyse des *Vitellogenins* ergab, dass dies fast ausschließlich bei den analysierten Brassenweibchen exprimiert wurde. Wie in Abbildung 8 zu erkennen ist, wird *Vitellogenin* in allen untersuchten Weibchen deutlich exprimiert. In den Männchen konnte *Vitellogenin* mit Ausnahme der männlichen Brasse aus der Saar (Güdingen 2) nicht detektiert werden. In diesem Männchen ist eine sehr schwache *Vitellogenin*-Expression nachweisbar (Abbildung 8, Pfeil). Die schwache Expression von *Vitellogenin*-Expression von

genin in diesen Männchen kann durch die Einwirkung östrogenwirksamer Substanzen induziert worden sein.

Der Nachweis von *Vitellogenin* in Proben der UPB wurde nicht durchgeführt, da es sich bei diesen Proben um Mischhomogenate handelt, bei denen keine Differenzierung nach Geschlechtern erfolgte. Deshalb kann bei diesen Proben *Vitellogenin* nicht als molekularer Biomarker eingesetzt werden.

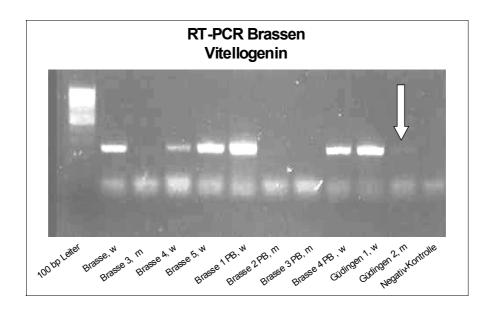


Abbildung 8: RT-PCR Ergebnisse. Analyse der Vitellogenin-Expresion

Vergleich der PCR und ELISA Messungen

Für den Nachweis der Vitellogen-Expression in Fischen stehen prinzipiell zwei Organe zur Verfügung: die Leber und das Blut. Der Nachweis von Vitellogenin kann mit 2 Verfahren erfolgen: Mit RT-PC werden über die mRNA die aktuelle Genaktivität bzw. Syntheseleistung erfasst. Mittels ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) wird das Produkt, das Vitellogenin, nachgewiesen, dass über einen längeren Zeitraum nachweisbar ist und somit integrativ die Effekte eines größeren Expositionszeitraums abbildet.

In dem Teilprojekt der Universität Trier, Fachbereich VI – Biogeographie "Biochemische Biomarker für ein retrospektives Monitoring" wurde Vitellogenin im Blut von Brassen mit ELISA Technik bestimmt. Die Blutentnahme erfolgte sofort nach dem Fang und die Proben wurden nicht vereint, wodurch eine Geschlechtszuordnung der Proben möglich ist.

Aus diesem Projekt wurden Leberproben von Einzeltieren zur Verfügung gestellt, deren Vitellogenin mRNA Gehalt mit RT-PCR untersucht wurde. Die Ergebnisse wurden mit den ELISA-detektierten Blut-Vitellogeningehalten verglichen. Da die Machbarkeitsstudie nur einen begrenzten Arbeitsaufwand zuließ, konnten nur einige Proben aus Trier untersucht werden. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt. Sowohl anhand des Blut-Vitellogeningehaltes als auch anhand der mRNA Menge in der Leber lassen sich die männlichen und weiblichen Brassen deutlich unterschieden. Beide Verfahren deuten auf eine geringe Belastung der männlichen Brasse aus der Saar (Güdingen 2) mit östrogen-wirksamen Substanzen hin und belegen.

Tabelle 7: Ergebnisse der Untersuchungen des Blut-Vitellogeningehaltes und von Genaktivitäten in ausgewählten Brassenleber-Proben

			Vitelle	ogenin		
Herkunft	Proben		Blut ELISA	Leber	Heat Shock	Metallo-
	Nr.	Geschlecht	μg/ml	RT-PCR	Protein	thionein
Freilandfänge						
Saar	Güdingen 2	Männl.	-	(+)	++	+
Saar	Güdingen 1	Weibl.	1911	+++	++	+
Saar	Güdingen 10	Weibl .	2750	+++	n.b.	n.b.
Belauer See	1	Mischprobe	n.b.	++	(+)	(+)
Dessau/Mulde	5a	Mischprobe	n.b.	n.b.	++	++
Rheinbrassen	, im Labor belas	stet				
unbelastet	Brasse 4	Weibl.	n.b.	++	n.b.	n.b.
unbelastet	Brasse 5	Weibl .	n.b.	+++	n.b.	n.b.
Blei belastet	Brasse 1	Weibl.	n.b.	+++	n.b.	n.b.
Blei belastet	Brasse 2	Männl.	n.b.	-	+++	++
Blei belastet	Brasse 3	Männl.	n.b.	-	+++	+++

mRNA Expression wurde eingeteilt in: +++ sehr stark / ++ stark / + mittel / (+) gerade noch erkennbar n.b. nicht bestimmt / - nicht nachweisbar

Transferrin

Als weiteres Gen, das erfolgreich - sowohl in der Brasse als auch im Zebrabärbling - detektiert werden konnte ist das Transferrin anzusehen. Transferrin spielt im Organismus bei Eisenstoffwechsel eine bedeutsame Rolle. Mittlerweile existieren jedoch auch Studien, die die Verwendung als Biomarker diskutieren. Es gibt Hinweise deuten auf eine Unterexpression des Transferrins in Gegenwart von Xenoestrogenen hin [47]. Abbildung 9 zeigt deutlich, das Transferrin in Brassen und *Danio rerio* nachweisbar ist. Die schwächeren Banden in der Brasse deuten jedoch darauf hin, dass die gewählten Primer nicht optimal binden und optimiert werden müssen. Dieses Gen wurde in erster Linie zur Erprobung der Übertragbarkeit der Danio-spezifischen Primersequenzen auf Brassen ausgewählt.

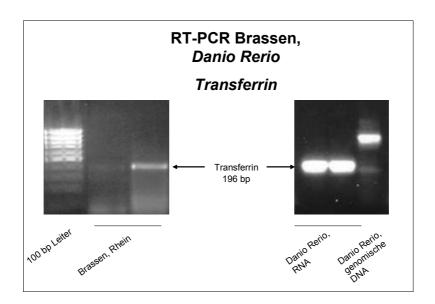


Abbildung 9: RT-PCR Ergebnisse. Analysen der Transferrin-Genexpression in Brassen und Zebrabärbling

5.4. Ergebnisse des Differential Display

Die klassischen Methoden in der Molekularbiologie betrachten meist nur isoliert ein spezielles Gen pro Untersuchung. Mit dieser Vorgehensweise ist es nicht möglich, ein Gesamtbild über das Expressionsmuster eines Genoms zu erhalten. Mittels des "Differential Display" ist es möglich, Unterschiede in der Genexpression auf Ebene des gesamten Genoms zu detektieren.

Abbildung 10 zeigt deutliche Unterschiede in der Genexpression bei dem Vergleich unbelasteter/belasteter Brassenproben. Bei der Primerkombination 03/A1 kann deutlich ein Gen nachgewiesen werden, das in den belasteten Proben überexprimiert ist (Abbildung 10, Pfeile). Gleiche Ergebnisse können bei Verwendung der Primerkombinationen O3/A2 sowie O3/A2 beobachtet werden. Auch in diesen Fällen ist eine deutliche Überexpression bestimmter Gene nachweisbar (Abbildung 10, Pfeile). Von Interesse ist, dass bei der Primerkombination O3/A2 in der unbelasteten Brasse 4, ein Gen exprimiert wird, das in der belasteten Probe (Abbildung 10, Brasse 4, belastet) nicht mehr nachweisbar ist (rote Pfeile). Ebenso ist bei der Kombination O3/A2 im Falle der Brasse 1, belastet eine geringere Expression eines bestimmten Gens nachzuweisen (grüne Pfeile). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass durch die Schwermetallbelastung verschiedene Gene zwar überexprimiert werden, allerdings auch in einigen Fällen eine Unterexpression zu beobachten ist.

Bei Analysen von unbelasteten Brassen, die in der Donau bei Ulm gefangen wurden, konnten nur Unterschiede zwischen den verschiedenen Geschlechtern nachgewiesen werden. Beim untersuchten Weibchen ist im Originalgel deutlich ein Gen zu erkennen, das geschlechtsspezifisch exprimiert wird (Abbildung 11, Pfeil).

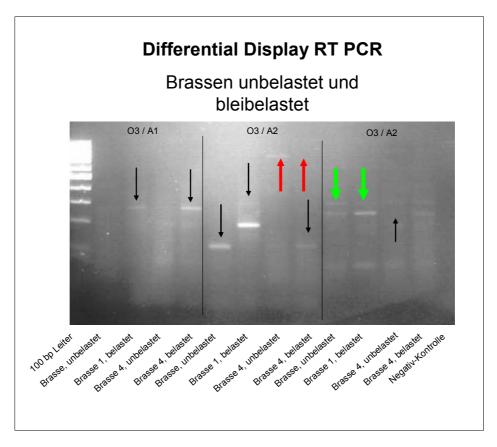


Abbildung 10: Ergebnisse des Differential Display. Anwendung verschiedener Primerkombinationen.
Untersucht wurden unbelastete Rhein-Brassen im Vergleich zu Rhein-Brassen, die einer hohen Schwermetallkonzentration ausgesetzt waren.

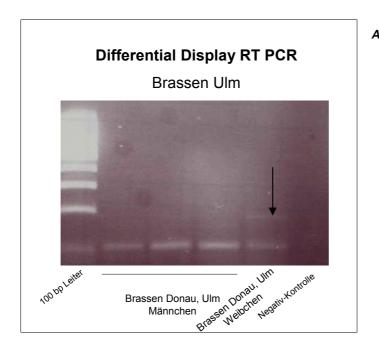


Abbildung 11: Ergebnisse des Differential Display. Untersuchung von Donau-Brassen

5.5. Zusätzliche Untersuchungen

Die Tierartenbestimmung mittels T-RFLP repräsentiert eine am Fraunhofer-IME entwickelte Methode, die zur Speziesdifferenzierung standardmäßig eingesetzt wird. Die Analytik erfolgt auf Grundlage der PCR mittels degenerierter Universalprimer [87].

Um sicherzustellen, dass es sich bei dem in der Umweltprobenbank eingelagerten homogenisierten Probenmaterial um reines Brassenleber- bzw. -muskelhomogenat (*Abramis brama*) handelt, aber auch zur Erprobung der Identifikation von Parasiten, die in den Rheinbrassen beobachtet wurden, wurde mittels T-RFLP-Methode die jeweilige Spezies analysiert.

5.5.1. Speziesdifferenzierung

Basierend auf der Methode des Terminalen-Restriktions-Längen-Polymorphismus (T-RFLP), wurde das homogenisierte Brassenmaterial (Leber und Muskulatur) untersucht. Die Analyse der publizierten Teilsequenz des *Cytochrom b* ergab eine charakteristische Enzymschnittstelle, die zur Speziesdifferenzierung herangezogen wurde (Abbildung 12).

1	CCATCTAACA	TTTCAACACT	ATGAAACTTC	GGATCCCTCC	TAGGATTATG
	GGTAGATTGT	AAAGTTGTGA	TACTTTGAAG	CCTAGGGAGG	ATCCTAATAC
51	TTTAATTACC	CAAATCCTCA	CGGGATTATT	TCTAGCCATA	CACTACACCT
	AAATTAATGG	GTTTAGGAGT	GCCCTAATAA	AGATCGGTAT	GTGATGTGGA
101	CTGATATCTC	CACCGCATTT	TCATCAGTAA	CCCACATCTG	CCGAGACGTT
	GACTATAGAG	GTGGCGTAAA	AGTAGTCATT	GGGTGTAGAC	GGCTCTGCAA
		Restrikt	ionsenzym		
		Schn	ittstelle	,	
151	AACTACGGCT	GACTTATTCG	AAACTTACAT	GCTAATGGAG	CATCATTCTT
	TTGATGCCGA	CTGAATAAGC	TTTGAATGTA	CGATTACCTC	GTAGTAAGAA
201	CTTTATCTGC	CTTTATATAC	ATATTGCACG	AGGCCTATAC	TATGGGTCAT
	GAAATAGACG	GAAATATATG	TATAACGTGC	TCCGGATATG	ATACCCAGTA
251	ATCTTTACAA	AGAAACCTGA	AATATTGGCG	TAGTCCTATT	TCTTCTAGTT
	TAGAAATGTT	TCTTTGGACT	TTATAACCGC	ATCAGGATAA	AGAAGATCAA
301	ATAATAACAG	CCTTCGTCGG	CTACGTACTT	CCATGAGGAC	AAATGTCCTT
	TATTATTGTC	GGAAGCAGCC	GATGCATGAA	GGTACTCCTG	TTTACAGGAA
351	TTGATTTGA				
	AACTAAACT				

Abbildung 12: Teilsequenz des Cytochrom b der Brasse mit entsprechender Restriktionsschnittstelle

Um die publizierte Sequenz in der Praxis zu überprüfen, wurde die entsprechende T-RFLP-Analytik mit DNA-Material durchgeführt welches aus Brassenmuskulatur extrahiert wurde. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass es sich um pure Brassen-DNA handelte. Durch Vergleich mit der DNA, welche aus den entsprechenden Teilhomogenaten der Brasse aus der UPB isoliert wurde, konnte die Reinheit der DNA analysiert werden.

Abbildung 13 zeigt ein Chromatgramm der T-RFLP-Analyse. Es ist zu erkennen, dass es sich bei dem Material aus der UPB - aufgrund der übereinstimmenden Schnittstelle - um reines Brassenhomogenat handelt. Es konnte keine Kontamination von Fremd-DNA detektiert werden. Kleinere Peaks, die zu erkennen sind, stellen Störpeaks dar, die keiner Tierart zugeordnet werden können.

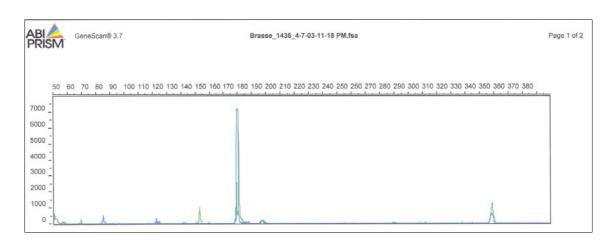


Abbildung 13: Genescan-Ergebnisse. Analyse der Brassen-DNA mittels T-RFLP

5.5.2. Untersuchung von Parasiten, Bakterien und Viren

Die Untersuchung von Fischparasiten sowie Viren und Bakterien in Umweltproben, wird voraussichtlich in der Zukunft einen wichtigen Anteil in der Untersuchung von Biomarkern darstellen. Verschiedene Studien konnten bereits eine Verbindung zwischen Umweltbelastung und der Menge gefundener Parasiten herstellen [41, 96, 37, 55, 80, 58, 39, 70, 56, 65, 61, 66, 94].



Abbildung 14: Fischegel (Piscicola geometra). Bild entnommen von www.angelmax.de

Einen in Süßwasserfischen weit verbreiteten Fischparasiten stellt der Fischegel (*Piscicola geometra*, Abbildung 14) dar. Mittels molekularbiologischer Methoden wurde stellvertretend versucht, ob generell ein Nachweis derartiger Parasiten durch diese Verfahren möglich ist. Durch eine Nested-PCR konnte das *Cytochrom b*-Gen des Fischegels amplifiziert werden. Abbildung 15 zeigt die Genescan-Ergebnisse, die mittels T-RFLP-Analyse erzielt wurden.

Aus Abbildung 15 ist ersichtlich, dass ein genereller Nachweis von Parasiten möglich ist. Hinsichtlich der Analyse von Bakterien wurden verschiedene Miesmuschelproben (*Mytilus edulis*) der UPB näher untersucht. Dazu wurde DNA aus den Homogenaten extrahiert und versucht, unterschiedliche Bakterienspezies zu detektieren. Diesbezüglich konnte jedoch mittels PCR keine Bakterienspezies nachgewiesen werden.

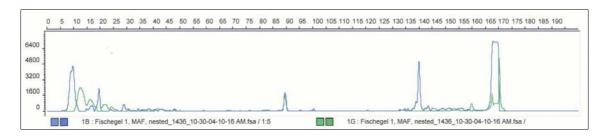


Abbildung 15: Genescan-Ergebnisse. Analyse von Fischegel-DNA mittels T-RFLP

5.6. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Zusammenfassung der Ergebnisse in Tabelle 8 zeigt, dass verschiedene Gene in der Brasse identifiziert werden konnten, die als molekulare Biomarker in der Umweltprobenbank des Bundes eingesetzt werden könnten.

Tabelle 8: Auflistung der untersuchten Gene

Untersuchtes Gen	Spezies	Stressor	Regulation	Verwendung als Biomarker in der UBP
Metallothionein	Brasse/Zebrabärbling	Schwermetall (Cadmium, Blei)	1	Ja
Heat Shock Pro- tein	Brasse/Zebrabärbling	Stress (Strömung, Hitze), Schadstoffe, Schwermetalle	1	nur Verwendung "Zustandssmarker"
Vitellogenin	Brasse/Zebrabärbling	Östrogenwirksame Substanzen	1	Ja, in geschlechts- definierten Proben
Transferrin	Brasse/Zebrabärbling	?	\iff	muss weiter unter- sucht werden*, aber Relevanz fraglich
Cytochrom b	Brasse/Zebrabärbling	Stressor- unabhängig	\iff	Verwendung als House-Keeping Gen

^{*}Literaturhinweise auf eine Unterexpression des *Transferrin* in Gegenwart von Xenoestrogenen [47].

6. Diskussion

Ziel dieses Projektes war die Durchführung einer "Machbarkeitsstudie". Es sollte untersucht werden, ob die Anwendung molekularer Biomarker in den Proben der Umweltprobenbank des Bundes prinzipiell möglich ist.

Eine Schwierigkeit bei der Aufgabenstellung lag u.a. darin begründet, dass von der Brasse nur sehr wenige Gensequenzen publiziert sind und in einem ersten Schritt zunächst geeignete Möglichkeiten gefunden werden mussten, die eine Identifizierung von Biomarker-relevanten Genen erlaubten, welche als molekulare Biomarker geeignet sind. Durch den Vergleich der Gensequenzen mit dem ebenfalls zur Karpfenfamilie gehörigen Zebrabärbling konnten entsprechende Primersequenzen abgeleitet werden, die die Genexpression verschiedener Gene auch in der Brasse ermöglichten. Erfolgreich konnte die Expression von *Metallothionein*, Heat Shock Protein und *Vitellogenin* sowie als "House-Keeping" Gen das *Cytochrom b* untersucht werden. Erste Versuche zeigten weiterhin, dass eventuell auch das Transferrin als molekularer Biomarker Anwendung finden könnte. Dies muss jedoch in weiteren Untersuchungen bestätigt werden.

Die Ergebnisse hinsichtlich der RNA-Isolation belegen außerdem, dass die Einlagerung der Proben in der Umweltprobenbank sehr gut geeignet ist, Nukleaseaktivitäten - die zu einer Degradation der empfindlichen RNA führen würden - vollständig zu unterbinden. Unabhängig von der Lagerungsdauer konnte intakte RNA isoliert werden. Dies stellt die Grundlage hinsichtlich der Bestimmung möglicher molekularer Biomarker dar.

6.1. Metallothionein

Die Ergebnisse der Untersuchung, insbesondere des *Metallothioneins*, zeigten, dass molekulare Biomarker auch in Proben der Umweltprobenbank des Bundes angewendet werden können. So konnten deutliche Expressionsunterschiede zwischen Cadmium-belasteten und Cadmium-unbelasteten Proben nachgewiesen werden. Untersuchungen an Brassen, die einer hohen Bleikonzentration ausgesetzt waren, bestätigten diese Befunde. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit verschiedenen Literaturveröffentlichungen. Auch hier konnte ein direkter Zusammenhang einer Überexpression von *Metallothionein* mit einer erhöhten Schwermetallkonzentration hergestellt werden [13, 22, 34, 67, 89]. Weitere Untersuchungen belegten, dass *Metallothionein* - anderes als *HSP* - als wirkstoffgruppenspezifischer Marker betrachtet werden kann, der nur bei einer Schwermetallbelastung induziert wird. Dem entgegen steht die Analytik von *HSP* als wirkstoffgruppen-unspezifischer molekularer Biomarker. So konnte zwar in Fischen, die massivem Stress ausgesetzt waren, eine Überexpression des *HSP* detektiert werden, die Expression des *Metallothionein* blieb jedoch unverändert.

6.2. Heat Shock Protein

Die Expression des *HSP*-Gens wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. So zeigten die Ergebnisse, dass sowohl Temperatur, physischer Stress, aber auch erhöhte Schwermetallkonzentration zu einer Expression dieses Gens – unabhängig von der untersuchten Spezies - führen können. Ähnliche Ergebnisse wurden von zahlreichen Arbeitsgruppen berichtet [8, 16, 36, 43, 103, 104]. Auch diese Arbeitsgruppen konnten nachweisen, dass *HSP* durch verschiedene Faktoren und nicht nur durch Temperatur induziert werden kann. Insofern ist die Analyse des *HSP* in Proben der UPB im Sinne eines retrospektiven Monitoring als kritisch zu betrachten. Eine nachgewiesene Überexpression von *HSP* weist lediglich darauf hin, dass sich der gefangene Fisch in einer Stresssituation befunden hat.

Diese kann zwar durch eine Schwermetallbelastung des Gewässers aber auch durch den Stress beim Fang und die anschließende Tötung bedingt sein. Versuche mit Zebrabärblingen, die einer erhöhten Wassertemperatur ausgesetzt waren zeigten, dass eine Überexpression von *HSP* bereits nach kurzer Zeit nachweisbar ist, das Gen dementsprechend schnell hochreguliert wird. Die Analyse des *HSP* könnte insofern lediglich als "Vitalitätsmarker" Anwendung finden.

6.3. Vitellogenin

Mit Vitellogenin (VTG) besteht ein aussagekräftiger Biomarker für die Einwirkung von endokrin wirksamen Substanzen auf aquatische Vertebraten. Zahlreiche Untersuchungen belegen die Eignung des VTG als molekularen Biomarker hinsichtlich einer Belastung durch östrogenwirksame Substanzen [4, 6, 20, 21, 31, 33, 46, 73, 79, 84, 85, 86, 93, 97, 100].

Das Vitellogenin-Gen ist für die Bildung des Vitellogenin-Eidotterproteins verantwortlich und deshalb in der Regel nur in Weibchen aktiv. Dieses Protein wird normalerweise ausschließlich in der Leber weiblicher Fische gebildet und in die heranreifenden Eier transportiert, um in Form von Eidotter ein Nährstoffreservoir für den heranreifenden Embryo anzulegen. Unter Einwirkung östrogenwirksamer Substanzen wird die Expression des Vitellogenin-Gens auch bei männlichen Individuen aktiviert. Wie in vivo Kurzzeittests mit Zebrabärbling am Fraunhofer IME zeigten, ist dieser Marker neben den östrogenen auch für weitere sexual-endokrine Wirkmechanismen sensitiv und damit anwendbar (Hemmung der Steroid-Synthese, Aromatase-Hemmung) [79]. In einem OECD Screening Assay mit Zebrabärbling für endokrin wirksame Substanzen ist die Untersuchung von VTG im Blutplasma als Biomarker vorgesehen. Dieser Kurzzeit-Assay steht kurz vor der Validierung.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass auch in der Brasse die Expression des Vitellogenin-Gens mittels einer PCR unter Anwendung von Primern, die vom Zebrabärbling abgeleitet wurden, nachgewiesen werden kann. Bezogen auf ein retrospektives Monitoring mit Proben der Umweltprobenbank kann jedoch dieser sehr interessante Biomarker momentan nicht angewendet werden, da die Brassenleberproben der UPB Mischhomogenate aus Brassen unterschiedlichen Geschlechts darstellen. Insofern kann diesbezüglich - unabhängig der Umweltbelastungen - keine Untersuchung der Vitellogenin-Expression erfolgen.

In Zukunft könnte durch eine geschlechterspezifische Einlagerung der Proben die Analyse des Vitellogenins einen wichtigen molekularen Biomarker darstellen, der Rückschlüsse auf die Einwirkung östrogenwirksamer Substanzen geben kann. Dadurch, dass die Leber-Proben durchgehend im Herbst gesammelt werden ist gewährleistet, dass sich die Tiere in einem ähnlichen Stadium des Reproduktionszyklus befinden und somit extreme Schwankungen in der VTG Expression bzw. des VTG-Gehaltes in Blut und Leber unterdrückt werden könnten.

Die Ergebnisse der molekularen Vitellogenin-Untersuchungen zeigten, dass in Brassen, die nach Geschlechtern analysiert wurden, eine Expression des Vitellogenins deutlich in den Weibchen nachweisbar war. Lediglich in einem untersuchten Männchen, welches aus der Saar bei Güdingen gefangen wurde, konnte eine schwache Expression des Vitellogenins nachgewiesen werden. Es besteht daher die Möglichkeit, dass bedingt durch östrogenwirksame Substanzen das Vitellogenin-Gen aktiviert wurde. Diesbezüglich müssten weitere Untersuchungen mit weiteren Brassenproben durchgeführt werden (es stehen noch Einzeltierproben zur Verfügung).

Da die Untersuchung der VTG-Genexpression meist nur einen Momentanstatus abbildet, sollte zusätzlich eine Untersuchung des VTG-Gehaltes im Blut bzw. im Zielorgan (Leber) erfolgen, da auf der Proteinebene längerfristige Wirkungen besser detektiert werden können. Hierzu bietet sich die sensitive ELISA-Methode an, die von der Universität Trier bereits für Nachweise im Blut angewendet wird.

Das ebenfalls in endokrine Prozesse involvierte Gen CYP19 (Aromatase, ÖstrogenSynthase), das auf entsprechende Umweltkontaminationen anspricht [27] ist als Biomarker für Leberproben nicht geeignet, da es in erster Linie im Gehirn und in den Testes vorkommt. Die DNA Sequenz konnte im Rahmen dieses Projektes in der Leber nachgewiesen werden, aber, wie zu erwarten, keine mRNA Expression.

6.4. Transferrin

Erste Studien zeigten, dass als weiterer interessanter molekularer Biomarker möglicherweise das *Transferrin* bzw. der Transferrin-Rezeptor angesehen werden könnte [z.B. 47]. Allerdings wurden in dieser Arbeit extrem hohe Konzentrationen östrogenwirksamer Substanzen eingesetzt, die keine Umweltrelevanz aufweisen. In anderen Untersuchungen wurde keine Beeinflussung des Transferrinlevels durch 17ß-Ethinyestradiol, dagegen eine Verminderung der Expression in Gegenwart von 17ß-Östradiol gefunden [81]. Insofern müssen diesbezüglich weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Das *Transferrin*-Gen kodiert für ein Protein, das in den Eisenstoffwechsel eingebunden ist. Das in der Leber gebildete Protein Transferrin ist für den Transport von Eisen im Blutplasma verantwortlich. Biochemisch gesehen ist Transferrin ein β1-Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 76.000 Dalton. Jedes Transferrin-Molekül kann 2 Moleküle dreiwertiges Eisen (Fe3+) aufnehmen, was einer Kapazität von 1,4 mg Eisen je Gramm Transferrin entspricht. Als molekularer Biomarker ist das Transferrin insofern interessant, als Untersuchungen von Larkin et al. [48] ergaben, das Transferrin in Edelsteinkärpflingen (Cyprinodon variegatus), durch 17β-Estradiol (E2) unterexprimiert wird. Dadurch würde ein molekularer Biomarker zur Verfügung stehen, der geschlechtsunspezifisch eine Beeinflussung durch östrogenwirksame Substanzen anzeigt. Erste Versuche zeigen, dass Transferrin auf molekularbiologischer Ebene im Zebrabärbling, aber auch in der Brasse nachweisbar ist. Da die Anwendung als Biomarker nicht abgesichert ist, wird dieses Gen als nicht geeignet für vertiefende Untersuchungen im Rahmen der Umweltprobenbankaktivitäten angesehen.

6.5. Differential Display

Die ersten Ergebnisse, die mittels Differential Display erzielt wurden, zeigen, dass deutliche Unterschiede zwischen belasteten/unbelasteten Proben hinsichtlich der Genexpression nachweisbar waren. So konnten deutlich unterschiedliche Genexpressionsmuster mittels dieser "Fingerprinting"-Technolgie aufgezeigt werden. Die Ergebnisse belegen diesbezüglich, dass bei einer Belastung der Organismen mehrere Gene reguliert werden. Es konnte gezeigt werden, dass einige Gene überexprimiert, andere jedoch durch Schwermetalle unterexprimiert werden. Dies belegt, dass z.B. der Einfluss von Schwermetallen zu einer Veränderung der Genexpression verschiedener Gene führt. Welche Gene jedoch reguliert werden, kann nur durch weitere Untersuchungen geklärt werden. Um diese involvierten Gene zu identifizieren, müssten die entsprechenden Fragmente isoliert, vervielfältigt und sequenziert werden. Dies ist mit erheblichem Aufwand verbunden und war nicht Gegenstand dieses Forschungsvorhabens. Eine weitere Untersuchung und Aufklärung dieser Gene ist jedoch von grundlegender Bedeu-

tung. Durch die Identifizierung weiterer Gene, die Rückschlüsse bzgl. einer Umweltbelastung geben können, kann die Anwendung molekularer Biomarker wesentlich fokussiert und verbessert werden.

Die in den letzten Jahren entwickelte Methode der DNA Microarrays eröffnet neue Perspektiven. Mit der DNA Chiptechnologie kann ein komplettes Genom auf nur einem Chip untersucht werden. Da die auf dem Chip enthaltenen Gene bekannt sind, bietet diese Methode in Bezug auf molekulare Biomarker die Möglichkeit, neue Gene mit Umweltrelevanz zu detektieren und Expressionsmuster zu erkennen, die aus einer Belastung durch Umweltchemikalien resultierten. Für den Zebrabärbling, dessen Genom weitgehend entschlüsselt ist, existieren bereits kommerziell erhältliche DNA Chipsysteme (z.B. Affymetrix GENECHIP ®). Nach Durchführung von Expositionsexperimenten mit diesem Modell-Organismus könnten mit Hilfe von DNA Microarrays weitere Gene mit Umweltrelevanz beim Zebrabärbling detektiert werden. Sind weitere molekulare Biomarker evaluiert, können diese mit den oben beschriebenen Methoden der semiquantitativen RT-PCR weitergehend untersucht werden. Anschließend werden die Nachweismethoden für die neuen molekularen Biomarker auf die Anwendbarkeit auf die Brasse hin überprüft.

6.6. Zusätzliche Untersuchungen: Parasiten

Die Analyse von Fischparasiten sowie mikrobiellen fischspezifischen Erregern ist generell möglich, wie der molekularbiologische Nachweis des Fischegels zeigte. Von weiterem Interesse wäre diesbezüglich die Analytik von Mikroorganismen wie Bakterien, Viren und Pilzen. Die vorliegenden Publikationen hinsichtlich der Identifikation von Erregern zeigen, dass derartige Organismen in der Umweltprobenbank im Sinne eines retrospektiven Monitorings als Bioindikator nachgewiesen werden könnten. Das Vorhandensein derartiger Erreger würde indirekt den Zustand eines betroffenen Individuums anzeigen, da z.B. durch Umweltbelastungen das Immunsystem geschwächt wird und dadurch die Möglichkeit einer Infektion erleichtert wird. Zum anderen wird das Mikroorganismen- und Parasitenspektrum – analog zu ihren Wirten – ebenfalls direkt von den unterschiedlichen Umweltfaktoren beeinflusst, so dass deren Vorkommen oder Abwesenheit wiederum als Bioindikator herangezogen werden kann [37, 39, 40, 55, 56, 58, 61, 62, 65, 66, 70, 80, 94, 96].

Die Möglichkeit der Verwendung von Parasiten und Mikroorganismen als Bioindikator wird inzwischen von verschiedenen Gruppen erfolgreich untersucht. So konnten z.B. Thielen et al. eine Korrelation zwischen Schwermetallkonzentration und Anzahl gefundener Helminthen (*Pomphorhynchus laevis*) in Donau-Barben belegen [96]. Die Schwierigkeiten bezüglich einer Analytik möglicher Parasiten als Bioindikator an Brassen-Proben der Umweltprobenbank bestehen jedoch darin, dass lediglich Leber und Muskelfleisch als Proben genommen und eingelagert werden. Hier wäre es notwendig, Kiemen und die inneren Verdauungsorgane, welche meist das Ziel von Parasiten sind, zur Verfügung zu haben. Dass die Anwendung von Parasiten als Bioindikator jedoch auch an Proben der Umweltprobenbank anwendbar wären, zeigen die Untersuchungen von Sures et al. [94], die eine höhere Anzahl von Trematoden in belasteten Muscheln im Vergleich zu unbelasteten nachweisen konnten. Da in der Umweltprobenbank Miesmuscheln sowie Dreikantmuscheln gelagert werden ist die Anwendung derartiger Marker dementsprechend auch vorstellbar. Durch die Identifikation derartiger Bioindikatoren würde dann ein breites Spektrum an Nachweismöglichkeiten zur Verfügung stehen, die im Sinne eines retrospektiven Monitorings gerade innerhalb der UPB erfolgreich Anwendung finden könnten.

7. Ausblick

Die ersten Ergebnisse des vorliegenden Forschungsberichtes zeigen deutlich, dass die Anwendung molekularer Biomarker an Proben der Umweltprobenbank des Bundes generell möglich ist. Die Zahl der identifizierten molekularen Biomarkern ist jedoch noch sehr beschränkt. Um diesbezüglich eine größere Anzahl zur Verfügung zu haben, wäre es in einem weiteren Forschungsvorhaben notwendig, weitere Gene zu identifizieren und zu charakterisieren, die in den Brassen erfolgreich zum Einsatz kommen könnten. Eine Ausweitung auf andere Spezies (z.B. Miesmuschel) wäre ebenfalls von großem Interesse.

Für weitere molekularbiologische Untersuchungen wäre es in einem weiteren Schritt notwendig, aus eingelagerten Proben – unabhängig der Spezies – entsprechend genomische DNA und RNA zu extrahieren, damit die essentielle Grundlage für weitere Untersuchungen vorhanden ist.

Hinsichtlich der Identifikation neuer Gene bzw. Gensequenzen wurden in dem vorliegenden Forschungsbericht mittels der Differential Display-Technologie erste Vorarbeiten geleistet. Die Identifikation der identifizierten Gene könnte relativ schnell erfolgen, aber mit wie oben beschrieben entsprechendem Arbeitsaufwand. Die in den letzten Jahren entwickelte Methode der DNA Microarrays eröffnet hier neue Perspektiven. Mit der DNA Chiptechnologie kann ein komplettes Genom auf nur einem Chip untersucht werden. In Bezug auf molekulare Biomarker bietet diese Methode die Möglichkeit, neue Gene mit Umweltrelevanz zu detektieren und Expressionsmuster zu erkennen, die aus einer Belastung durch Umweltchemikalien resultierten.

Für den Zebrabärbling, dessen Genom weitgehend entschlüsselt ist, existieren bereits kommerziell erhältliche DNA Chipsysteme (z.B. Affymetrix GENECHIP®). Nach Durchführung von Expositionsexperimenten mit diesem Modell-Organismus könnten mit Hilfe von DNA Microarrays weitere Gene mit Umweltrelevanz beim Zebrabärbling detektiert werden, die anschließend in Brassen untersucht werden können.

Das Department of Zelltoxikologie am Umweltforschungszentrum in Leipzig wendet die DNA Microarray Technologie bereits auf Embryonen des Zebrabärbling an. Dr. Stefan Scholz verfügt über eine weitreichende Expertise [z.B. 102]. In verschiedenen Projekten werden die Auswirkungen insbesondere von Pharmazeutika auf die Expressionsmuster des Zebrabärbling untersucht¹. Am Fraunhofer IME erfolgten bereits gemeinsame Experimente zur Schadstoffexposition des Zebrabärbling, die in Leipzig ausgewertet werden. Die Zusammenarbeit mit dem Department Zelltoxikologie am Umweltforschungszentrum in Leipzig eröffnet die effiziente Möglichkeit der Nutzung dieser neuen Technologie, die für einzelne Institute nur mit großem zeitlichem und finanziellem Aufwand zu etablieren ist.

Die Identifikation - insbesondere neuer umweltrelevanter Gene – durch molekularbiologische Untersuchungen an Proben der Umweltprobenbank wäre ein weiterer Meilenstein hinsichtlich der Anwendungsmöglichkeiten der Umweltprobenbank.

Projekte: (a) Entwicklung eines Fischembryotests als Alternative für verlängerte und chronische Fischtests: Analyse toxischer Wirkungen auf der Basis veränderter Genexpression im Danio rerio-Embryotest (Gen-DarT)" (Projekt Nummer 0313016) 10/2003 - 09/2006. Sächsisches Landesamt für Umwelt und Geologie

⁽b) "Chip-Detekt - Entwicklung von DNA-Chips zur Detektion hormonartiger Wirkungen in der Umwelt" (Projekt Nummer 56-8811.61/91) 09/2001 - 06/2004

Vorschläge für ein weiteres Vorgehen:

- Absicherung der Befunde: Untersuchung des Vitellogenin-Gehaltes in der Leber der Brassen-Einzeltiere aus dem Teilprojekt der Universität Trier.
- Erprobung des molekularen Biomarkers CYP1A in Brassenleber (Einzeltiere und Misch-Proben)
- Erarbeiten von Quantifizierungsmethoden für geeignete Biomarker (RT-PCR)
- Suche nach neuen Biomarkern in Zusammenarbeit mit dem Department of Zelltoxikologie am Umweltforschungszentrum in Leipzig, Ansprechpartner Dr. Stefan Scholz.

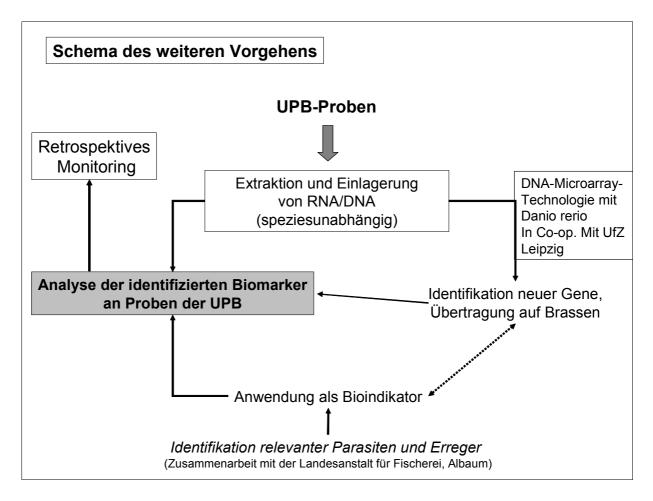


Abbildung 16: Vorschlag - Schema des weiteren Vorgehens

8. Anhang

Tabelle 9: Abgeschätzte Messunsicherheiten der Ergebnisse in Abhängigkeit von der Konzentration und Bestimmungsgrenzen bezogen auf Trockengewichte.

Element	Methode		Messunsicherheit im Be- reich der Bestimmungs- grenze	Typische Bestimmungs- grenze
As	ICP-MS	5 – 10 %	10 – 20 %	0,100 μg/g
Cd	ICP-MS	5 – 10 %	10 – 20 %	0,001 μg/g
Co	ICP-MS	5 – 10 %	10 – 20 %	0,001 μg/g
Cu	ICP-MS	5 – 10 %	10 – 20 %	0,010 μg/g
Ni	ICP-MS	5 – 10 %	10 – 20 %	0,010 μg/g
Pb	ICP-MS	5 – 10 %	10 – 20 %	0,001 μg/g
Se	ICP-MS	5 – 10 %	10 – 20 %	0,100 μg/g
TI	ICP-MS	5 – 10 %	10 – 20 %	1,00 ng/g
Cr	ICP-MS	5 –10 %	10 – 20 %	0,010 μg/g
Ni	ICP-MS	5 –10 %	10 – 20 %	0,010 μg/g

9. Literatur

- 1. Aardema, M.J. and J.T. MacGregor, Toxicology and genetic toxicology in the new era of "toxicogenomics": impact of "-omics" technologies. Mutat Res, 2002. 499(1): p. 13-25.
- 2. Ait-Aissa, S. et al., Biomarker responses in juvenile rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) after single and combined exposure to low doses of cadmium, zinc, PCB77 and 17beta-oestradiol. Biomarkers, 2003. 8(6): p. 491-508.
- 3. Arukwe, A., F.R. Knudsen and A. Goksoyr, Fish zona radiata (eggshell) protein: a sensitive biomarker for environmental estrogens. Environ Health Perspect, 1997. 105(4): p. 418-422.
- 4. Arukwe, A., S.W. Kullman and D.E. Hinton, Differential biomarker gene and protein expressions in nonylphenol and estradiol-17beta treated juvenile rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2001. 129(1): p. 1-10.
- 5. Bard, S.M., Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. Aquat Toxicol, 2000. 48(4): p. 357-389.
- 6. Berg, A.H., L. Westerlund and P.E. Olsson, Regulation of Arctic char (Salvelinus alpinus) egg shell proteins and vitellogenin during reproduction and in response to 17beta-estradiol and cortisol. Gen Comp Endocrinol, 2004. 135(3): p. 276-285.
- 7. Bhaskaran, A. et al., Fish p53 as a possible biomarker for genotoxins in the aquatic environment. Environ Mol Mutagen, 1999. 33(3): p. 177-184.
- 8. Bierkens, J., J. Maes and F.V. Plaetse, Dose-dependent induction of heat shock protein 70 synthesis in Raphidocelis subcapitata following exposure to different classes of environmental pollutants. Environ Pollut, 1998. 101(1): p. 91-97.
- 9. Buckley, B.A., S.P. Place and G.E. Hofmann, Regulation of heat shock genes in isolated hepatocytes from an Antarctic fish, Trematomus bernacchii. J Exp Biol, 2004. 207(Pt 21): p. 3649-3656.
- 10. Campbell, P.M. and R.H. Devlin, Expression of CYP1A1 in livers and gonads of Pacific salmon: quantitation of mRNA levels by RT-cPCR. Aquat Toxicol, 1996. 34(1): p. 47-69.
- 11. Carnevali, O. and F. Maradonna, Exposure to xenobiotic compounds: looking for new biomarkers. Gen Comp Endocrinol, 2003. 131(3): p. 203-208.
- 12. Corporeau, C. and M. Auffret, In situ hybridisation for flow cytometry: a molecular method for monitoring stress-gene expression in hemolymph cells of oysters. Aquat Toxicol, 2003. 64(4): p. 427-435.
- 13. Cosson, R.P., Bivalve metallothionein as a biomarker of aquatic ecosystem pollution by trace metals: limits and perspectives. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2000. 46(2): p. 295-309.
- 14. Cousinou, M., B. Nilsen, J. Lopez-Barea and G. Dorado, New methods to use fish cytochrome P4501A to assess marine organic pollutants. Sci Total Environ, 2000. 247(2-3): p. 213-225.
- 15. Dai, Y. and Y. Zheng, [Toxicogenomics--the research of environment and health at gene expression level]. Wei Sheng Yan Jiu, 2003. 32(4): p. 413-415.
- 16. Damelin, L.H. et al., Hormesis: a stress response in cells exposed to low levels of heavy metals. Hum Exp Toxicol, 2000. 19(7): p. 420-430.
- 17. Dunlap, D.Y. and F. Matsumura, Development of broad spectrum antibodies to heat shock protein 70s as biomarkers for detection of multiple stress by pollutants and environmental factors. Ecotoxicol Environ Saf, 1997. 37(3): p. 238-244.
- 18. Epel, D., Use of multidrug transporters as first line of denfense against toxins in aquatic organisms. Comp Biochem Physiol A, 1998. p. 23-28.
- 19. Fossi, M.C. et al., Biomarkers for endocrine disruptors in three species of Mediterranean large pelagic fish. Mar Environ Res, 2002. 54(3-5): p. 667-671.
- Funkenstein, B. et al., Application of real-time PCR for quantitative determination of hepatic vitellogenin transcript levels in the striped sea bream, Lithognathus mormyrus. Mar Environ Res, 2004. 58(2-5): p. 659-663
- 21. Garcia-Reyero, N. et al., Use of vitellogenin mRNA as a biomarker for endocrine disruption in feral and cultured fish. Anal Bioanal Chem, 2004. 378(3): p. 670-675.

- 22. Geffard, A., J.C. Amiard and C. Amiard-Triquet, Use of metallothionein in gills from oysters (Crassostrea gigas) as a biomarker: seasonal and intersite fluctuations. Biomarkers, 2002. 7(2): p. 123-137.
- 23. George, S., M. Gubbins, A. MacIntosh W. Reynolds, V. Sabine, A. Scott and J.A. Thain, A comparison of pollutant biomarker responses with transcriptional responses in European flounders (Platicthys flesus) subjected to estuarine pollution. Mar Environ Res, 2004. 58(2-5): p. 571-575.
- Gerpe, M., P. Kling, A. Håkan Berg and P.E. Olsson, Arctic Char (Salvelinus alpinus) Metallothionein: cDNA Sequence, Expression, and Tissue-Specific Inhibition of Cadmium-Mediated Metallothionein Induction by 17ss-Estradiol, 4-OH-PCB 30, and PCB 104. Environ Toxicol Chem, 2000. Vol. 19, No. 3, p. 638–645.
- Giesy, J.P. et al., Examination of reproductive endpoints in goldfish (Carassius auratus) exposed in situ to municipal sewage treatment plant effluent discharges in Michigan, USA. Environ Toxicol Chem, 2003. 22(10): p. 2416-2431.
- 26. Gray, S.L. et al., Transcription and translation of the salmon gonadotropin-releasing hormone genes in brain and gonads of sexually maturing rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Biol Reprod, 2002. 67(5): p. 1621-1627.
- 27. Greyrak, S.R., D. Champlin and G.V. Callard, Isolation and characterization of two P450 aromatase forms in killifish (*Fundulus heteroclitus*): Differential expression in fish from polluted and unpolluted environments. Aquat. Toxicol. 2005. p. 371-389.
- 28. Gundert-Remy, U., S. G. Dahl, A. Boobis, P. Kremers, A. Kopp-Schneider, A. Oberemm, A. Renwick and O. Pelkonen, Molecular approaches to the identification of biomarkers of exposure and effect--report of an expert meeting organized by COST Action B15. Toxicology Letters, 2005. 156(2): p. 227-240.
- 29. Hamadeh, H.K. et al., Gene expression analysis reveals chemical-specific profiles. Toxicol Sci, 2002. 67(2): p. 219-231.
- 30. Hamza-Chaffai, A., J.C. Amiard, J. Pellerin, L. Joux and B. Berthet, The potential use of metallothionein in the clam Ruditapes decussatus as a biomarker of in situ metal exposure. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2000. 127(2): p. 185-197.
- 31. Harries, J.E., S. Jobling and P. Matthiessen, Estrogenic activity in five united kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. Environ Toxicol Chem, 1997. 16(3): p. 534-542.
- 32. Hayes, R.A. et al., Cloning of a chub metallothionein cDNA and development of competitive RT-PCR of chub metallothionein mRNA as a potential biomarker of heavy metal exposure. Mar Environ Res, 2004. 58(2-5): p. 665-669.
- 33. Hecker, M., C. R. Tyler, M. Hoffmann, S. Maddix and L. Karbe, Plasma biomarkers in fish provide evidence for endocrine modulation in the Elbe River, Germany. Environ Sci Technol, 2002. 36(11): p. 2311-2321.
- 34. Heikkila, J.J. et al., Expression of a set of fish genes following heat or metal ion exposure. J Biol Chem, 1982. 257(20): p. 12000-5.
- 35. Heppell, S.A. et al., Universal assay of vitellogenin as a biomarker for environmental estrogens. Environ Health Perspect, 1995. 103 Suppl 7: p. 9-15.
- 36. Hofmann, G.E. et al., Heat-shock protein expression is absent in the antarctic fish Trematomus bernacchii (family Nototheniidae). J Exp Biol, 2000. 203 Pt 15: p. 2331-2339.
- 37. Hoole, D. et al., Inflammatory interactions in fish exposed to pollutants and parasites: a role for apoptosis and C reactive protein. Parasitology, 2003. 126 Suppl: p. S71-85.
- 38. Irwin, R.D. et al., Application of Toxicogenomics to Toxicology: Basic Concepts in the Analysis of Microarray Data. Toxicol Pathol, 2004. 32(Supplement 1): p. 72-83.
- 39. Jones, C.S. et al., Towards selective breeding of Atlantic salmon for sea louse resistance: approaches to identify trait markers. Pest Manag Sci, 2002. 58(6): p. 559-568.
- 40. Khan, R.A. and J.F. Payne, A multidisciplinary approach using several biomarkers, including a parasite, as indicators of pollution: a case history from a paper mill in Newfoundland. Parassitologia, 1997. 39(3): p. 183-188.
- 41. Khan, R.A., Parasites of fish as biomarkers of environmental degradation: a field study. Bull Environ Contam Toxicol, 2004. 72(2): p. 394-400.

- 42. Kilemade, M. and C. Mothersill, Heat shock protein 70 levels in rainbow trout primary epidermal cultures in response to 2,4-dichloroaniline exposure: a novel in vitro aquatic toxicity marker. Environ Toxicol, 2001. 16(3): p. 253-259.
- 43. Köhler, H.R. et al., The 70 kD heat shock protein (hsp 70) in soil invertebrates: a possible tool for monitoring environmental toxicants. Arch Environ Contam Toxicol, 1992. 22(3): p. 334-338.
- 44. Kurelec, B., A new type of hazardous chemical: the chemosensitizers of multixenobiotic resistance. Environ Health Perspect, 1992. 105 (suppl. 4): p. 855-860.
- 45. LAM, P., R.S. and R.S.S. WU, Use of Biomarkers in Environmental Monitoring. in STAP Workshop on The Use of Bioindicators, Biomarkers and Analytical Methods for the Analysis of POPs in Developing Countries. 2003. Japan: Ministry of Environment, Government of Japan.
- 46. Länge, R., T.H. Hutchinson, C.P. Croudace, F. Siegmund, H. Schweinfurth, P. Hampe, G.H. Panter and J.P. Sumpter, Effects of the synthetic estraogen 17{alpha}-ethinylestradiol on the life-cycle of the fathead minnow (Pimephales promelas). Environ Tox Chem, 2001. 20(6): p. 1216-1227.
- 47. Larkin, P. et al., Array technology as a tool to monitor exposure of fish to xenoestrogens. Mar Environ Res, 2002. 54(3-5): p. 395-399.
- 48. Larkin, P., I. Knoebl, and N.D. Denslow, Differential gene expression analysis in fish exposed to endocrine disrupting compounds. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2003. 136(2): p. 149-161.
- 49. Liang, P. and A.B. Pardee, Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. Science, 1992. 257(5072): p. 967-971.
- 50. Liang, P. and A.B. Pardee, Differential display. A general protocol. Methods Mol Biol, 1997. 85: p. 3-11.
- 51. Liang, P. and A.B. Pardee, Differential display. A general protocol. Mol Biotechnol, 1998. 10(3): p. 261-267.
- 52. Liang, P. et al., Analysis of altered gene expression by differential display. Methods Enzymol, 1995. 254: p. 304-321.
- 53. Liang, P. et al., Differential display and cloning of messenger RNAs from human breast cancer versus mammary epithelial cells. Cancer Res, 1992. 52(24): p. 6966-6968.
- 54. Liang, P. et al., Differential display using one-base anchored oligo-dT primers. Nucleic Acids Res, 1994. 22(25): p. 5763-5764.
- 55. Lindenstrom, T., K. Buchmann, and C.J. Secombes, Gyrodactylus derjavini infection elicits IL-1beta expression in rainbow trout skin. Fish Shellfish Immunol, 2003. 15(2): p. 107-115.
- 56. Lohner, T.W. et al., Assessment of tolerant sunfish populations (Lepomis sp.) inhabiting selenium-laden coal ash effluents. 3. Serum chemistry and fish health indicators. Ecotoxicol Environ Saf, 2001. 50(3): p. 225-232.
- 57. Lutz, W. and B. Kur, [Toxicogenomics. New perspectives for the molecular toxicology]. Med Pr, 2004. 55(2): p. 193-202.
- 58. MacKenzie, K., Parasites as biological tags in population studies of marine organisms: an update. Parasitology, 2002. 124 Suppl: p. S153-163.
- 59. Majumder, S. et al., Chromium(VI) down-regulates heavy metal-induced metallothionein gene transcription by modifying transactivation potential of the key transcription factor, metal-responsive transcription factor 1. J Biol Chem, 2003. 278(28): p. 26216-26226.
- 60. Marin, M.G. and V. Matozzo, Vitellogenin induction as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic environments. Mar Pollut Bull, 2004. 48(9-10): p. 835-839.
- 61. Matejusova, I. et al., Molecular markers for gyrodactylids (Gyrodactylidae: Monogenea) from five fish families (Teleostei). Int J Parasitol, 2001. 31(7): p. 738-745.
- 62. Mattiucci, S., S. D'Amelio and J. Rokicki, Electrophoretic identification of Anisakis sp. larvae (Ascaridida: Anisakidae) from Clupea harengus L. in Baltic Sea. Parassitologia, 1989. 31(1): p. 45-49.
- 63. McClain, J.S., J.T. Oris, G.A. Burton and D. Lattier, Laboratory and field validation of multiple molecular biomarkers of contaminant exposure in rainbow trout. Environ Toxicol Chem, 2003. 22(2): p. 361-370.
- 64. Miller, H.C., G.N. Mills, D.G. Bembo, J.A. Macdonald and C.W. Evans, Induction of cytochrome P4501A (CYP1A) in Trematomus bernacchii as an indicator of environmental pollution in Antarctica: assessment by quantitative RT-PCR. Aquat Toxicol, 1998. 44(3): p. 183-193.

- 65. Moles, A. and T.L. Wade, Parasitism and phagocytic function among sand lance Ammodytes hexapterus Pallas exposed to crude oil-laden sediments. Bull Environ Contam Toxicol, 2001. 66(4): p. 528-35.
- 66. Mosquera, J., M. Gomez-Gesteira and V. Perez-Villar, Using parasites as biological tags of fish populations: a dynamical model. Bull Math Biol, 2000. 62(1): p. 87-99.
- 67. Mourgaud, Y. et al., Metallothionein concentration in the mussel Mytilus galloprovincialis as a biomarker of response to metal contamination: validation in the field. Biomarkers, 2002. 7(6): p. 479-90.
- 68. Nadeau, D. et al., Evaluation for Hsp70 as a biomarker of effect of pollutants on the earthworm Lumbricus terrestris. Cell Stress Chaperones, 2001. 6(2): p. 153-63.
- 69. Neumann, N.F. and F. Galvez, DNA microarrays and toxicogenomics: applications for ecotoxicology? Biotechnol Adv, 2002. 20(5-6): p. 391-419.
- Nolan, D.T. et al., Characterization of primary culture of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) skin explants: growth, cell composition, proliferation, and apoptosis. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2002. 38(1): p. 14-24.
- 71. Nordlind, K., Expression of heat shock proteins in heavy metal-provoked inflamed human skin. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2002. 24(3): p. 383-394.
- 72. Nuwaysir, E.F. et al., Microarrays and toxicology: the advent of toxicogenomics. Mol Carcinog, 1999. 24(3): p. 153-159.
- 73. Pennie, W.D., Custom cDNA microarrays; technologies and applications. Toxicology, 2002. 181-182: p. 551-554.
- 74. Piano, A., P. Valbonesi, and E. Fabbri, Expression of cytoprotective proteins, heat shock protein 70 and metallothioneins, in tissues of Ostrea edulis exposed to heat and heavy metals. Cell Stress Chaperones, 2004. 9(2): p. 134-142.
- 75. Purdom, C.E., P.A. Hardiman, V.J. Bye, N.C. Eno, C.R. Tyler and J.P. Sumpter, Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. Chemistry and Ecology, 1994. 8: p. 275-285.
- Rees, C.B., S.D. McCormick and W. Li, A non-lethal method to estimate CYP1A expression in laboratory and wild Atlantic salmon (Salmo salar). Comp Biochem Phys Part C: Toxicol Pharmacol, 2005. 141(3): p. 217-224
- 77. Rotchell, J.M. and G.K. Ostrander, Molecular markers of endocrine disruption in aquatic organisms. J Toxicol Environ Health B Crit Rev, 2003. 6(5): p. 453-496.
- 78. Sanders, B.M. and L.S. Martin, Stress proteins as biomarkers of contaminant exposure in archived environmental samples. Sci Total Environ, 1993. 139-140: p. 459-470.
- Schäfers, C. and Teigeler, M., Testen und Bewerten eine Teststrategie für Fische. Tagungsband, Umweltbundesamt (Hrsg) "3. Statusseminar: Chemikalien in der Umwelt mit Wirkung auf das endokrine System Wissenschaftliche Grundlage der Bewertung und Regulierung. Workshop, Berlin, June 2, 2005". Fraunhofer IRB Verlag, Stuttgart 2005, ISBN 3-8167-6968-3, 105-115.
- 80. Schmalz, W.F., A.D. Hernandez and P. Weis, Hepatic histopathology in two populations of the mummichog, Fundulus heteroclitus. Mar Environ Res, 2002. 54(3-5): p. 539-42.
- 81. Schreer, A, Application of rainbow trout hepatocyte cultures to study gene expression due to estrogenic compounds. Dissertation, UFZ Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle, Department Zelltoxikologie (2005) [http://www.ufz.de/data/diss_02_20052855.pdf].
- 82. Schroder, H.C. et al., Correlation between the level of the potential biomarker, heat-shock protein, and the occurrence of DNA damage in the dab, Limanda limanda: a field study in the North Sea and the English Channel. Mar Environ Res, 2000. 49(3): p. 201-215.
- 83. Scofield, E., R.T. Bowyer and L.K. Duffy, Baseline levels of Hsp 70, a stress protein and biomarker, in halibut from the Cook Inlet region of Alaska. Sci Total Environ, 1999. 226(1): p. 85-88.
- 84. Schäfers, C., Teigeler, M., Wenzel, A., Maack, G., Fenske, M. and Segner, H., Concentration- and time-dependent effects of the synthetic estrogen, 17alpha-ethinylestradiol, on reproductive capabilities of the zebrafish, Danio rerio. Journal of Toxicology and Environmental health, Part A (submitted).
- 85. Segner, H., J. M. Navas, C. Schaefers and A. Wenzel, Potencies of estrogenic compounds in in vitro screening assays and in life cycle tests with zebrafish in vivo. Ecotox Environ Safety, 2003. 54(3): p. 315-322.

- Segner, H., K. Caroll, M. Fenske, C. R. Janssen, G. Maack, D. Pascoe, C. Schafers, G. F. Vandenbergh,
 M. Watts and A. Wenzel, Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA project. Ecotox Environ Safety, 2003. 54(3): p. 302-314.
- 87. Seidel, B., R. Peters and W. Kördel, Die Methode des Terminalen-Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (T-RFLP) in der Lebens- und Futtermittelanalytik: Entwicklung eines universellen Verfahrens zur Tierartendifferenzierung. Lebensmittelchemie, 2004. 58.
- 88. Silbiger, R.N. et al., Use of molecular markers to study the effects of environmental impacts on genetic diversity in brown bullhead (Ameirus nebulosus) populations. Environ Toxicol Chem, 2001. 20(11): p. 2580-2587.
- Soazig, L. and L. Marc, Potential use of the levels of the mRNA of a specific metallothionein isoform (MT-20) in mussel (Mytilus edulis) as a biomarker of cadmium contamination. Mar Pollut Bull, 2003. 46(11): p. 1450-1455.
- 90. Soimasuo, M.R. et al., Biomarker responses in whitefish (Coregonus lavaretus L. s.l.) experimentally exposed in a large lake receiving effluents from pulp and paper industry. Arch Environ Contam Toxicol, 1998. 34(1): p. 69-80.
- 91. Stegemann, J. J. and M. E. Hahn, Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: current perspectives on forms, functions and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. In: Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives D.C. Malins and G.K. Ostrander, Eds, 1994. p. 87-206. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida.
- 92. Stephensen, E., M. Adolfsson-Erici, M. Celander, M. Hulander, J. Parkkonen, T. Hegelund, J. Sturve, L. Hasselberg, M. Bengtsson and L. Förlin, Biomarker responses and chemical analyses in fish indicate leakage of polycyclic aromatic hydrocarbons and other compounds from car tire rubber. Environ Toxicol Chem, 2003. 22(12): p. 2926-2931.
- 93. Sumpter, J.P. and S. Jobling, Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. Environ Health Perspect, 1995. 103(SUPPL. 7): p. 173-178.
- 94. Sures, B., H. Taraschewski, and R. Siddall, Heavy metal concentrations in adult acanthocephalans and cestodes compared to their fish hosts and to established free-living bioindicators. Parassitologia, 1997. 39(3): p. 213-218.
- 95. Thiele, D. J., Metal-regulated transcription in eukaryotes. Nucleic Acids Res, 1992. 20(6): p. 1183-1191.
- 96. Thielen, F. et al., The intestinal parasite Pomphorhynchus laevis (Acanthocephala) from barbel as a bioin-dicator for metal pollution in the Danube River near Budapest, Hungary Environ Pollut, 2004. 129(3): p. 421-429.
- 97. Tyler, C. R., R. van Aerle, T. H. Hutchinson, S. Maddix and H. Trip, An in vivo testing system for endocrine disruptors in fish early life stages using induction of vitellogenin. Environ Tox Chem,1999. 18(2): p.337-347
- 98. van der Oost, R., J. Beyer and N.P.E. Vermeulen, Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment. Environ Tox Pharmacol, 2003. 13: p. 57-149.
- 99. Vergani, L., M. Grattarola, C. Borghi, F. Dondero and A. Viarengo, Fish and molluscan metallothioneins. FEBS J, 2005. 272(23): p. 6014-6023.
- 100. Viarengo, A., B. Burlando, N. Ceratto and I. Panfoli, Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2000. 46(2): p. 407-417.
- 101. Vijayan, M.M. et al., Handling stress does not affect the expression of hepatic heat shock protein 70 and conjugation enzymes in rainbow trout treated with beta-naphthoflavone. Life Sci, 1997. 61(2): p. 117-127.
- 102. Völker, D.M., C. Vess, M. Tillmann, R. Nagel, K. Schirmer and S. Scholz, Differential Gene Expression during zebrafish (Danio rerio) early development as sub-acute marker for potential hazardous impact of environmental chemicals. Vortrag Setac Lille, May 25th, 2005.
- 103. Wagner, M. et al., Induction of stress proteins in human endothelial cells by heavy metal ions and heat shock. Am J Physiol, 1999. 277(5 Pt 1): p. L1026-1033.
- 104. Washburn, B.S. et al., Effects of handling on heat shock protein expression in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Environ Toxicol Chem, 2002. 21(3): p. 557-560.