

Überprüfung der Eignung von Apoptose als Biomarker im biologischen Effektmonitoring

DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie
der Universität Hamburg

aus dem

Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie
-Abteilung Lebensmittelchemie-
der Universität Hamburg

und der

Bundesforschungsanstalt für Fischerei
-Institut für Fischereiökologie-
Hamburg

vorgelegt von

Gundula Piechotta
aus Hamburg

Hamburg 1999

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 1996 bis Mai 1999 unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. H. Steinhart (Universität Hamburg, Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Abteilung Lebensmittelchemie) und Dr. H.-St. Jenke in der Bundesforschungsanstalt für Fischerei, Institut für Fischereiökologie, angefertigt.

Sie wurde mit finanzieller Unterstützung des Bundesministeriums für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie im Rahmen des Forschungsprojekts „STRESSTOX“ (Früherkennung toxischer Belastungen bei marinen Organismen; 03F0172) durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. H. Steinhart
2. Gutachter: Prof. Dr. W. Francke

Tag der mündlichen Prüfung: 18.11.1999

Danksagung

Für die Überlassung des Themas und das stete Interesse an dieser Arbeit sowie der Bereitstellung geeigneter Rahmenbedingungen möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. H. Steinhart und bei Herrn Dr. H.-St. Jenke sehr bedanken.

Für die freundliche Übernahme des Co-Referats danke ich Herrn Prof. Dr. W. Francke.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei den Kollegen des Teilprojekts 3 der Universität Hamburg, Herrn M. Lacorn und Frau B. Scheffler, für die umfangreichen Messungen der Schadstoffe und für die nette Zusammenarbeit.

Frau Dr. U. Kammann und Herrn Dr. T. Simat spreche ich meinen herzlichen Dank aus für ihre stetige Diskussionsbereitschaft und fachliche Unterstützung bei den analytischen und statistischen Problemstellungen.

Ferner gebührt mein Dank Herrn Dr. T. Lang und Frau U. Kürschner für ihre tatkräftige und rücksichtsvolle Hilfestellung bei der Durchführung der Labor- und Freilanduntersuchungen sowie beim TUNEL-assay.

Herrn Dr. V. Dethlefsen und Frau J. Weidling-Kumerow danke ich für die Bereitstellung der Aquarienanlage und die gute Versorgung der Klieschen.

Ich danke Herrn Krüner und Herrn Marold von der Biologischen Anstalt Helgoland, daß Sie es uns ermöglichten, auf der „Uthörn“ Proben zu nehmen, und den Mannschaften der „Walther Herwig III“ und der „Uthörn“ für die umfangreichen Probenahmen.

Desgleichen danke ich den Kollegen des Instituts für Fischereiökologie Frau A. Ebert, Herrn G. Nagel und Herrn A. Schulz für ihre Unterstützung bei administrativen und technischen Problemen, und Herrn M. Vobach und Herrn M. Trenk für zahlreiche Probenahmen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau A. Bühringer, die durch ihre engagierte und kompetente Unterstützung wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	:	Abbildung
AIF	:	Apoptosis Inducing Factor
ALA	:	Alanin
APAF	:	Apoptosis Protease Activating Factor
Apopt.	:	Apoptotisch
ATP	:	Adenosin-Tri-Phosphat
BFA	:	Bundesforschungsanstalt
bidest.	:	bidestilliert
BM	:	Biomarker
Bp	:	Basenpaare
BSA	:	Bovine Serum Albumin
BSH	:	Bundesamt für Seeschifffahrt und Hydrographie
CAD	:	Caspase Activated DNase
CD	:	Cluster Domain
CF	:	Konditionsfaktor
CTL	:	Cytotoxischer T-Lymphocyt
DAB	:	Diaminobenzidin
DDE	:	Dichlor-Diphenyl-Dichlorethan
DDT	:	Dichlor-Diphenyl-Trichlorethan
Dest.	:	destilliert
DIG	:	Digoxigenin
DNA	:	Desoxyribonukleinsäure
dUTP	:	desoxyUridintriphosphat
E	:	Extinktion
EDTA	:	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	:	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
ER	:	Endoplasmatisches Reticulum
EROD	:	Ethoxyresorufin-O-deethylase
F	:	Faktor
FADD	:	Fas-Associated Death Domain
FFS	:	Fischereiforschungsschiff
GSI	:	Gonadosomatischer Index
ICAD	:	Inhibitor of CAD
ICE	:	Interleukin Converting Enzyme
IOD	:	Integrierte Optische Dichte
LE	:	Laborexperiment
MT	:	Metallothionein
NF	:	Necrose Factor

NK	:	Natürliche Killerzellen
NS	:	Natürliche Stressoren
P	:	Protein
PARP	:	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	:	Phosphate Buffered Saline
PCB	:	Polychloriertes Biphenyl
Phys.	:	Physiologisch
PK	:	Proteinkinase
POD	:	Peroxidase
R	:	Rezeptor
r	:	Korrelationskoeffizient (Spearman)
RAIDD	:	RIP-Associated ICH-1 Protein with a Death Domain
RIP	:	Receptor Interacting Protein
RNA	:	Ribonukleinsäure
RT	:	Raumtemperatur
S	:	Salzgehalt/Salinität
SDS	:	Natriumdodecylsulfat
T	:	Temperatur
Tab.	:	Tabelle
TBE	:	Tris-Borsäure-EDTA
TBT	:	Tributylzinn
TCDD	:	2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin
TE	:	Tris-EDTA
TNF	:	Tumor Nekrose Faktor
TRADD	:	TNF-R1-Associated Protein with a Death Domain
TRAF	:	TNF-Receptor Associated Factor
TRAIL	:	TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand
TT	:	Terminale Transferase
TUNEL	:	Terminal Transferase mediated dUTP Nick End Labeling
U	:	Unit
Unbeh.	:	Unbehandelt
UV	:	Ultraviolett
WH	:	Walther Herwig III

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung	9
2 Allgemeiner Teil	11
2.1 Apoptose	11
2.1.1 Allgemeines	11
2.1.2 Mechanismus	13
2.1.3 Apoptose durch cytotoxische Substanzen	18
2.1.4 Apoptose in Fischen/Fischzellkulturen	19
2.2 Biomarker	20
2.3 Kliesche	23
3 Zielsetzung und Arbeitsplan	25
4 Material	27
4.1 Laborexperimente	27
4.2 Freilanduntersuchungen	30
4.3 Jahresgang	33
5 Methoden	34
5.1 DNA-Elektrophorese	34
5.1.1 DNA-Extraktion	34
5.1.2 DNA-Elektrophorese	34
5.1.3 Densitometrische Auswertung	35
5.2 TUNEL-assay	36
5.2.1 TUNEL-assay	36
5.2.2 Image Analyse	37
5.3 Statistik	37
6 Ergebnisse	39
6.1 Optimierung der Methoden	39
6.1.1 Quantifizierung apoptotischer DNA-Fragmente im Elektropherogramm	39
6.1.2 TUNEL-assay	40
6.2 Validierung der Methoden	42
6.2.1 DNA-Elektrophorese	42
6.2.2 TUNEL-assay	43

6.3 Laborexperimente	45
6.3.1 Anthropogener Stressor Cadmium	45
6.3.2 Anthropogener Stressor PCB 118	48
6.3.3 Anthropogener Stressor PCB 77	52
6.3.4 Natürliche Stressoren Salzgehalt und Temperatur	55
6.4 Freilanduntersuchungen	58
6.4.1 WH 191	58
6.4.2 WH 195	61
6.4.3 Jahresgang	63
7 Diskussion	64
7.1 Methoden	64
7.2 Laborexperimente	67
7.3 Freilanduntersuchungen	73
7.4 Apoptose als Biomarker?	79
8 Zusammenfassung/Summary	82
8.1 Zusammenfassung	82
8.2 Summary	83
9 Anhang	85
9.1 DNA-Extraktion	85
9.1.1 Lösungen	85
9.1.2 Fertiglösungen und -material	85
9.1.3 Durchführung	85
9.2 DNA-Quantifizierung	85
9.3 DNA-Elektrophorese	86
9.3.1 Lösungen	86
9.3.2 Gelherstellung	86
9.3.3 Durchführung	86
9.3.4 Densitometrie	87
9.3.4.1 Gerätebedingungen	87
9.3.4.2 Kalibrierung	87
9.3.4.3 Durchführung/Berechnung der apoptotischen DNA-Fragmentierung	89

9.4 TUNEL-assay	89
9.4.1 Lösungen	89
9.4.2 Anfertigung der Kryoschnitte	90
9.4.3 Durchführung der TUNEL-Färbung	90
9.4.4 Image Analyse	91
9.4.4.1 Gerätebedingungen	91
9.4.4.2 Durchführung	91
9.5 Geräte und Zubehör	92
9.6 Chemikalienliste	93
9.7 Ergebnistabellen	94
9.8 Korrelationstabellen	121
10 Literaturverzeichnis	125

1 Einleitung

Die Verschmutzung der Umwelt durch den Menschen ist ein zentrales Thema in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts mit ökologischer, wirtschaftlicher und politischer Bedeutung. Zur allgemeinen Verunsicherung trägt bei, daß das Gebiet der Umwelttoxikologie sehr weitläufig ist.

In der Mitte der 70er Jahre wurde die Anzahl der gebräuchlichen, im Umlauf befindlichen Chemikalien auf ca. 63000 geschätzt (MAUGH, 1978), und seitdem beläuft sich die Zunahme an neuen synthetischen Chemikalien auf 200-1000 pro Jahr (MORIARTY, 1993). Zur Erfassung der Schadstoffbelastung im marinen Bereich werden auf nationaler und internationaler Ebene Monitoringprogramme durchgeführt, so daß heute umfangreiche Daten zur Menge und Zusammensetzung von Schadstoffen im Wasser, im Sediment und in den Organismen vorhanden sind. Es hat sich jedoch gezeigt, daß die alleinige Messung von Schadstoffen kaum Rückschlüsse auf Auswirkungen in den Organismen zuläßt. Synergistische und antagonistische Effekte zwischen den Schadstoffen sowie die Bildung von Metaboliten, die ein weit höheres toxisches Potential als die Ausgangssubstanz haben können, bleiben unberücksichtigt (McCARTHY und SHUGART, 1990).

Aus diesem Grund wurde in den letzten Jahren ein Schwerpunkt auf das biologische Effektmonitoring gesetzt, dessen Meßgröße die Biomarker sind. Unter einem Biomarker versteht man die „Antwort“ eines Organismus auf schadstoffinduzierten Streß. Es sind Indikatoren für Veränderungen auf zellulärer oder biochemischer Ebene, deren Auswirkungen sich auf verschiedenen Organisationsebenen – von der Populationsebene hin zur biochemischen Ebene – manifestieren (ANONYMUS, 1989; PEAKALL, 1994).

Charakteristisch für Biomarker auf zellulärer oder biochemischer Ebene ist, daß sie sehr früh zu beobachten sind, im Gegensatz z.B. zu Effekten auf Populationsebene. Sie stellen somit auch ein geeignetes „Frühwarnsystem“ für anthropogenen Streß dar (HYLLAND et al., 1992; PEAKALL und WALKER, 1994).

Die vorliegende Arbeit ist im Rahmen des vom Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (BMBF) geförderten Projekts „STRESSTOX“ (Früherkennung toxischer Belastungen bei marinen Organismen) entstanden.

Das Ziel der Arbeit ist die Überprüfung der Eignung von Apoptose als Biomarker im biologischen Effektmonitoring.

Apoptose, auch als programmierter Zelltod bezeichnet, ist ein physiologischer und irreversibler Prozeß bei der Homöostase von Geweben oder zur Eliminierung alter oder defekter Zellen. Er erfordert aktive metabolische Tätigkeit und unterscheidet sich daher grundlegend vom pathologischen (passiven) Zelltod Nekrose. Typische Charakteristika der Apoptose sind zum einen bestimmte morphologische Veränderungen der Zellen, zum anderen die Aktivierung bzw. Synthese einer Nuklease, die die doppelsträngige DNA der Zellen zwischen den einzelnen Nukleosomen in Vielfache von ca. 180 Basenpaaren (bp) spaltet (KERR et al., 1972; WYLLIE et al., 1980; ARENDS et al., 1990).

Die Annahme der Eignung von Apoptose als Biomarker leitet sich aus zahlreichen Studien ab, in denen eine Induktion von Apoptose aufgrund von chemischen Substanzen, z.B. von Tributylzinn (BATEL et al., 1993), DDT (TEBOURBI et al., 1998), Cadmium (XU et al., 1996; JONES et al., 1997) oder Kupfer (JULLIARD et al., 1996) beschrieben wird.

Im Rahmen dieser Arbeit werden Untersuchungen durchgeführt, die Aufschluß über die Eignung von Apoptose als Biomarker geben sollen. Als Untersuchungsorganismus wurde die Kliesche (*Limanda limanda* L.), eine marine Plattfischart, gewählt, die aufgrund ihres zahlreichen Vorkommens, ihrer Verbreitung und ihrer Empfindlichkeit auf Umweltstreß häufig als Monitoringorganismus dient (ICES, 1989; LANG und DETHLEFSEN, 1996).

Es werden Laborexperimente durchgeführt, um die Wirkung ausgewählter chemischer Stressoren (Cadmium, polychlorierte Biphenyle (PCB)) und natürlicher Stressoren (Salzgehalt- und Temperaturänderungen) auf die Apoptose in Klieschenleber zu untersuchen. Des weiteren werden in Freilandexperimenten Proben von unterschiedlich kontaminierten Stationen in Nord- und Ostsee genommen und analysiert. Ein möglicher Einfluß saisonbedingter physiologischer Schwankungen auf die Apoptose wird durch die Messung eines Jahreszyklus festgestellt.

Die Bestimmung der Apoptose erfolgt mittels DNA-Gelelektrophorese und mittels des TUNEL-assay und anschließender densitometrischer Auswertung.

2 Allgemeiner Teil

2.1 Apoptose

2.1.1 Allgemeines

Apoptose ist ein physiologischer Vorgang von Zellen, der auch als programmierter Zelltod bezeichnet wird. Der Begriff wurde 1972 von den schottischen Wissenschaftlern KERR, WYLLIE und CURRIE aus den griechischen Wörtern apo (ab, weg, los) und ptosis (Fall) gebildet, und bezeichnet im Griechischen das Abfallen der Blätter von den Bäumen.

Zelltod durch Apoptose spielt eine wichtige Rolle bei der Homöostase von Geweben und bei der Eliminierung alter oder defekter Zellen. Sie sorgt als Gegenpart zur Zellproliferation für eine Balance im Organismus an potenten und vitalen Zellen. Der Prozeß der Apoptose setzt die Fähigkeit der Zellen zu aktiven metabolischen Prozessen voraus.

Während der Apoptose kommt es zu typischen morphologischen Veränderungen der betroffenen Zellen (KERR et al., 1972; WYLLIE et al., 1980), welche graphisch in Abb. 1 dargestellt sind.

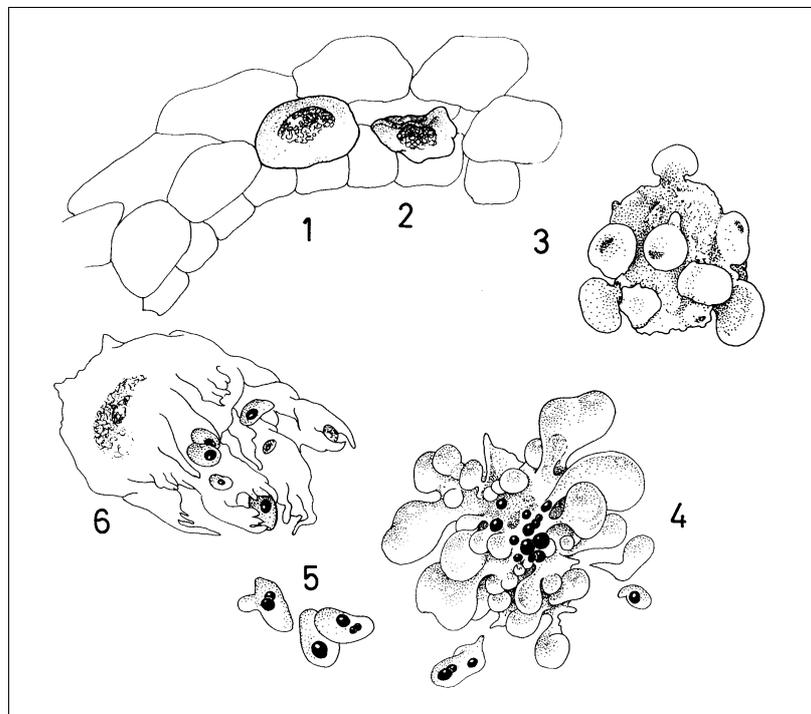


Abb.1: Schematische Darstellung der morphologischen Veränderungen bei der Apoptose

1. Normale Zelle
2. Zu Beginn der Apoptose löst sich die Zelle aus dem Zellverband und beginnt durch Kondensierung des Cytoplasmas zu schrumpfen
3. Das Chromatin verdichtet sich und die Zellmembran bildet Blasen
4. Es kommt zur Abschnürung membranumgebener Vesikel, die als
5. „apoptotic bodies“ bezeichnet werden
6. Eliminierung der „apoptotic bodies“ durch Zellen des Immunsystems (Phagozyten) oder durch benachbarte Zellen, ohne Hervorrufen von Entzündungsreaktionen

Ein Charakteristikum der Apoptose auf der biochemischen Ebene ist, parallel zur Kondensation des Chromatins, die Fragmentierung der DNA durch eine Ca^{2+} -abhängige Endonuklease, welche die DNA zwischen den Nukleosomen, in den sog. Linker-Regionen, spaltet. Da jedes Nukleosom von einem DNA-Strang aus ca. 180 bp umgeben ist, resultieren aus der Endonuklease-Aktivität DNA-Fragmente in Vielfachen von ca. 180 bp, die bei elektrophoretischer Trennung das typische „Strickleitermuster“ (s. Abb. 2) ergeben (WYLLIE et al., 1980; ARENDS et al., 1990; COMPTON, 1992). Nach neuen Erkenntnissen handelt es sich bei der DNase um das Enzym CAD (Caspase Activated DNase).

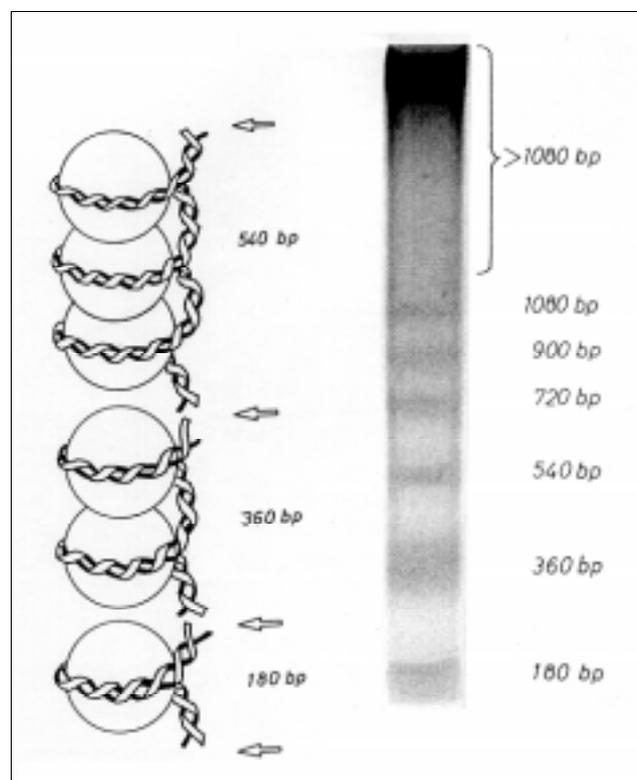


Abb. 2: Fragmentierung eines DNA-Strangs in den Linker-Regionen und daraus resultierende DNA-„Strickleiter“ im Elektropherogramm

Apoptose unterscheidet sich grundsätzlich vom pathologischen Zelltod Nekrose. Nekrose ist ein passiver Vorgang von Zellen, der aufgrund mechanischer oder cytotoxischer (physikalischer oder chemischer) Einwirkung zu einer Verletzung der Zellmembran und damit zu einem osmotischen Ungleichgewicht führt und die Zerstörung der Zelle zur Folge hat. Nekrose von einzelnen Zellen oder Geweben geht einher mit starken Entzündungsreaktionen. Die elektrophoretische Trennung von DNA nekrotischer Zellen resultiert in einem DNA-„Schmier“ auf dem Gel, der durch ungerichtete DNA-Fragmentierung entstanden ist (KERR et al., 1972; WYLLIE et al., 1980).

2.1.2 Mechanismus

In den letzten 20 Jahren hat die Forschung auf dem Gebiet der Apoptose stark zugenommen. Vor allem im Bereich der Medizin ist das Interesse sehr groß, da erkannt wurde, daß eine Erhöhung oder eine Inhibition der Apoptose einzelner Zellen oder Organe im Zusammenhang mit schwerwiegenden Erkrankungen steht. Als Beispiele sind hier die Entstehung von Krebs, AIDS, Alzheimer oder Autoimmunkrankheiten zu nennen (GOUGEON und MONTAGNIER, 1993; THOMPSON, 1995; WHYTE und EVAN, 1995).

Trotz intensiver Forschungstätigkeit sind große Teile des Mechanismus und der Signaltransduktion der Apoptose unbekannt.

Im folgenden werden die zum jetzigen Zeitpunkt bekannten, wichtigen, externen und internen zellulären Signale aufgeführt. Die schematische Darstellung dieser Zusammenhänge ist in Abb. 3 gezeigt.

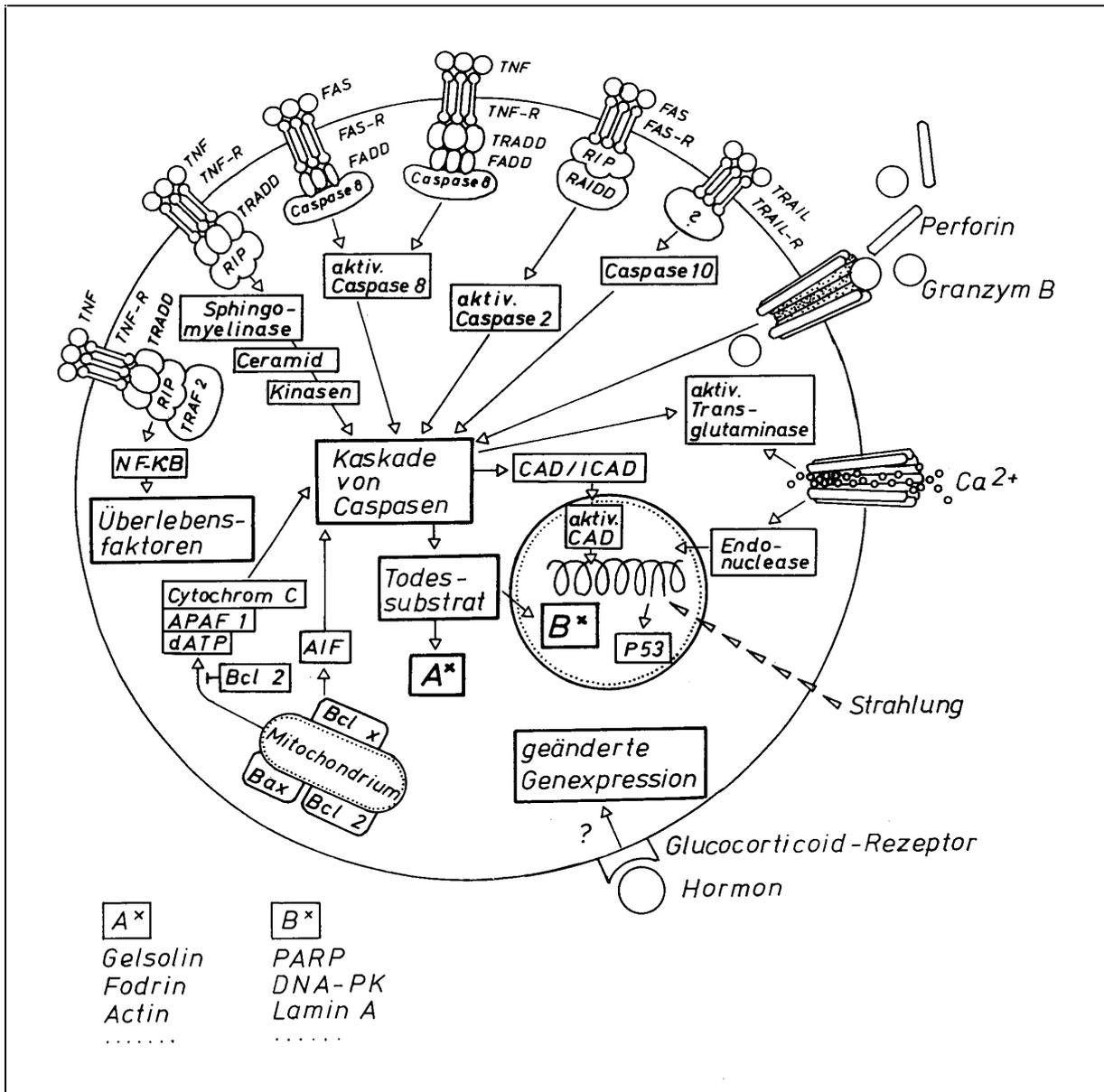


Abb. 3: Signaltransduktionswege bei der Apoptose

Das zentrale Ereignis der Signaltransduktion bei der Apoptose ist die Aktivierung der Caspasen. Der Ausdruck Caspase steht für Cystein Proteasen, die Proteine nach einem Aspartatrest spalten. Sie sind verwandt mit den sog. ICE, den Interleukin Converting Enzymes. Zum jetzigen Zeitpunkt sind 13 verschiedene Caspasen bekannt. Sie sind die wichtigsten Effektor-Moleküle bei der Apoptose. Sie werden als inaktive Proenzyme gebildet und entweder durch autokatalytische Spaltung oder durch Spaltung anderer Proteasen aktiviert. Ein initiales Apoptosesignal wird durch eine ganze Kaskade von verschiedenen Caspasen weitergeleitet (NICHOLSON und THORNBERRY, 1997; COHEN, 1997).

Die Aktivierung der Caspase-Kaskade führt zur Spaltung der cytoplasmatischen und nukleären „Todes“-Substrate. Wichtige cytoplasmatische Substrate sind z.B. die Cytoskelettproteine Gelsolin, Fodrin oder Actin und der Apoptoseinhibitor Bcl-2. Spaltprodukte im Nukleus sind u.a. die DNA-Reparaturenzyme PARP (Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase und DNA-PK (DNA-abhängige Proteinkinase), als auch das Gerüstprotein Lamin A (FESUS et al., 1991; MARTIN und GREEN, 1995).

Ferner kommt es zur Aktivierung einer Transglutaminase, die durch Quervernetzung eine Verstärkung der Zellmembran bewirkt und dadurch bei der Bildung der „apoptotic bodies“ das Auslaufen zellulärer Bestandteile in den extrazellulären Raum verhindert (FESUS et al., 1991).

Die Aktivierung der Endonuklease CAD (Caspase Activated DNase) resultiert ebenfalls aus der Caspase-Kaskade. CAD liegt im Cytoplasma gebunden an das Protein ICAD (Inhibitor of CAD) vor und wird dadurch sowohl stabilisiert als auch inaktiviert. Nach Spaltung von ICAD durch die Caspase 3 wird CAD aktiviert, gelangt in den Nukleus und degradiert dort die DNA (ENARI et al., 1998; SAKAHIRA et al., 1998).

Die Initiation zur Apoptose kann sowohl durch externe als auch durch interne Signale erfolgen. Im folgenden sind bereits bekannte Mechanismen aufgeführt:

Externe Signale:

- CD 95:

Das CD (Cluster Domain) 95 Rezeptor Protein, das auch als FAS oder Apo-1 bezeichnet wird, gehört zur Familie der Tumor Nekrose Faktor-Rezeptor-Familie. CD 95 ist ein Transmembran-Protein, das auf fast allen Zellen, jedoch in unterschiedlichem Maß, exprimiert wird. Der CD 95-Ligand wird hauptsächlich von Natürlichen Killerzellen (NK) und aktivierten T-Zellen exprimiert und spielt daher eine wichtige Rolle in der anti-viralen Immunantwort, bei der Eliminierung von Tumorzellen und bei der Regulierung von Lymphozyten. Das Signal zur Apoptose wird durch die Bindung des Liganden an den Rezeptor, der dabei trimerisiert wird, induziert. Die Weiterleitung des Signals kann durch unterschiedliche Ketten erfolgen. Eine davon ist die Bindung des cytoplasmatischen Proteins FADD (Fas-Associated Death Domain) an den Rezeptor, und an diesen Komplex die Bindung der proenzymatischen Form der Caspase 8, die dadurch aktiviert wird und die weitere Caspase-Kaskade einleitet. Ein anderer Weg verläuft über das Protein RIP (Receptor Interacting Protein), das einen Komplex mit dem CD 95 Rezeptor bilden kann und einem zweiten Adaptermolekül, dem Protein RAIDD (RIP-Associated ICH-1(Caspase 2) Protein with a Death Domain).

Dieser Komplex aktiviert die Caspase 2, welche die weitere Caspase-Kaskade auslöst (SUDA et al., 1993; NAGATA und GOLSTEIN, 1995; DEPRAETERE und GOLSTEIN, 1997).

- TNF:

Initiation der Apoptose kann, ähnlich zum CD 95 (beide haben die gleiche cytoplasmatische Domäne) auch über den TNF (Tumor Nekrose Faktor) Rezeptor 1 erfolgen. Die Bindung des Liganden an den Rezeptor resultiert auch hier in einer Trimerisierung. Auf der cytoplasmatischen Seite sind drei wichtige Signaltransduktionsketten bekannt. Eine davon ist die Bindung von TRADD (TNF-R1-Associated Protein with a Death Domain) und FADD an den Rezeptor, und daran die Bindung von proenzymatischer Caspase 8, die dadurch aktiviert wird und die weitere Caspase-Kaskade auslöst. Die zweite Möglichkeit besteht darin, daß zunächst TRADD an den Rezeptor bindet und daran das Protein RIP. Der gebildete Komplex aktiviert das Enzym Sphingomyelinase, das das Lipid Sphingomyelin zu Ceramid hydrolysiert. Ceramid wiederum agiert als „second messenger“ und aktiviert bestimmte Kinasen, die wiederum in der Aktivierung der Caspase-Kaskade resultieren.

Der dritte mögliche Signalweg entsteht, wenn an den Rezeptor-TRADD-RIP-Komplex das Protein TRAF2 (TNF-Rezeptor Associated Factor) bindet. Dadurch wird der Transkriptionsfaktor NF- κ B, aktiviert, welcher Überlebensfaktoren aktiviert und die Induktion der Apoptose verhindert (TARTAGLIA et al., 1993; OBEID und HANNUN, 1995; LIU et al., 1996).

- TRAIL:

TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand) ist ebenfalls ein Mitglied der TNF Familie und kann in den meisten Zellen Apoptose induzieren. Wie das apoptotische Signal auf der cytoplasmatischen Seite weitergeleitet wird, ist unbekannt, man weiß jedoch, daß die Caspase 10 aktiviert wird und die Caspase-Kaskade einleitet (SHERIDAN et al., 1997).

- Granzym B:

Granzym B ist eine Serin-Protease, die als Teil einer cytolytischen Granula von Cytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) und NK gebildet wird und mittels des Poren bildenden Enzyms Perforin in die Zielzelle gelangt, wo Apoptose durch die Aktivierung von Caspasen induziert wird (DARMON et al., 1995).

- Hormonrezeptor:

Hormone, wie z.B. Glucocorticoide, können in Zellen über den Hormonrezeptor Apoptose auslösen. Der Mechanismus ist unbekannt, es wird aber angenommen, daß der Hormon-Rezeptor-Komplex eine genregulatorische Aktivität hat, die für die Induktion von Apoptose verantwortlich ist (SCHWARTZMAN und CIDLOWSKI, 1994).

Interne Signale:

- AIF und Cytochrom C

Zu einem frühen Zeitpunkt der Apoptose wird die Mitochondrienmembran durchlässig, welches mit einem Zusammenbruch des Membranpotentials einhergeht. In den Mitochondrien vorliegende Enzyme, u.a AIF (Apoptose Inducing Faktor) und Cytochrom C, können in das Cytoplasma gelangen. Da AIF proteolytisch aktiv ist, wird vermutet, daß es direkt die Caspase-Kaskade aktivieren kann, wohingegen Cytochrom C erst unter ATP-Verbrauch an das Protein APAF1 (Apoptosis Protease Activating Factor) bindet (SUSIN et al., 1996; LI et al., 1997)

- Bcl-2/Bcl-x/Bax:

Bcl-2 ist der Prototyp einer großen Genfamilie, die Proteine kodieren, die entweder Apoptose inhibieren (Bcl-2, Bcl-x_L) oder Apoptose induzieren (Bax, Bcl-x_S). Sie befinden sich hauptsächlich auf der Mitochondrienmembran, dem Endoplasmatischen Reticulum (ER) und auf der nukleären Membran und gehen Homo- und Heterodimerisierung ein. Dabei bestimmt das Verhältnis der Proteine zueinander, ob eine Zelle Apoptose eingeht oder nicht. Überexpression von Bcl-2 inhibiert Apoptose, kann damit aber das Tumorwachstum fördern. Auch hier ist der Mechanismus zur Apoptoseinduktion- bzw. inhibition nicht genau bekannt. Zur Funktion von Bcl-2 und Bcl-x_L wird jedoch vermutet, daß sie das Ausströmen von AIF und Cytochrom C aus den Mitochondrien verhindern, indem sie der Durchlässigkeit der Membran entgegenwirken, wohingegen Bax und Bcl-x_S diese anti-apoptotische Wirkung unterdrücken (KORSMEYER et al., 1993; YANG et al., 1995; UMANSKY, 1996).

- P53:

P53 ist ein Tumorsuppressorprotein, das als Transkriptionsregulator auf DNA Schäden und auf auftretende Mutationen reagiert, indem es die DNA Replikation und den Zellzyklus stoppt. Dadurch wird die Zeit, in der DNA-Reparaturmechanismen erfolgen können, verlängert. Die betroffenen Zellen werden davor geschützt, gefährliche Mutationen zu etablieren. Kann die DNA der Zellen in einem bestimmten Zeitraum nicht repariert werden, wird Apoptose induziert.

Der Mechanismus der Apoptoseinduktion über P53 ist nicht geklärt. U.a. kann es aber zu einer Erhöhung der Bax- und zu einer Inhibition der Bcl-2 Expression kommen (CLARKE et al., 1993; UMANSKY, 1996).

2.1.3 Apoptose durch cytotoxische Substanzen

Zusätzlich zu den genannten „programmierten“ Faktoren kann Apoptose in Zellen auch „unprogrammiert“ (EASTMAN 1993), z.B. durch chemische, cytotoxisch wirksame Substanzen induziert werden. In der Literatur sind Studien beschrieben, wo in Zellkulturen oder in Geweben durch Substanzen wie z.B. Tributylzinn (TBT) (CHOW et al., 1992; BATEL et al., 1993; VIVIANI et al., 1995), Cadmium (EI AZZOUZI et al., 1994; XU et al., 1996; YAN et al., 1997) oder Kupfer (JULLIARD et al., 1996) Apoptose induziert wurde.

Die Mechanismen, die zur Induktion von Apoptose durch cytotoxische Substanzen führen, sind zum überwiegenden Teil unbekannt und hängen von der jeweiligen Substanz und ihren Eigenschaften ab.

Ein Faktor, der jedoch eine wichtige Rolle bei der Regulation der Apoptose durch cytotoxische Substanzen spielt, ist die Homöostase des zellulären Calciumspiegels. Eine Erhöhung des intrazellulären Calciumlevels führt zur Induktion von Apoptose in den betreffenden Zellen (KAISER und EDELMANN, 1978).

Die Konzentration an Ca^{2+} im Cytosol liegt im Bereich von 100 nM, im extrazellulären Bereich und im ER dagegen im mM-Bereich. Reaktive Sauerstoffradikale (oxidativer Streß), die durch cytotoxische Substanzen in den Zellen gebildet werden, können das Ca^{2+} -Transportsystem, das zwischen der Zellmembran, den Mitochondrien und dem ER besteht, schädigen und damit die Diffusion von Ca^{2+} in Richtung des Konzentrationsgradienten steuern. Somit ist die Ca^{2+} -Homöostase in der Zelle aufgehoben und die Ca^{2+} -Konzentration im Cytosol wird erhöht.

Es konnte auch gezeigt werden, daß Bcl-2 als Apoptosesuppressor direkt an mehreren intrazellulären Ca^{2+} -Regulationsstellen auf den Mitochondrien, dem ER und dem Nukleus sitzt und den Ausstrom von Ca^{2+} aus dem ER verhindern kann (KORSMEYER et al., 1993; McCONKEY und ORRENIUS, 1996; BERRIDGE et al., 1998).

Im Falle von TBT wurde eine Erhöhung des Ca^{2+} -Spiegels sowohl durch Mobilisierung von Ca^{2+} aus den intrazellulären Lagern als auch durch eine Erhöhung des Ca^{2+} -Einstroms (Öffnung der Ca^{2+} -Kanäle) durch die Zellmembran und die Verringerung des Ca^{2+} -Ausstroms (Inhibition der Plasmamembran Ca^{2+} -ATPase) beobachtet (CHOW et al., 1992; VIVIANI et al., 1995).

Der Mechanismus bei der Induktion von Apoptose durch Cadmium wird in der Literatur dahingehend diskutiert, daß Cadmium, als ebenfalls zweiwertiges Kation, in der Lage ist, durch die Ca^{2+} -Kanäle in die Zelle zu gelangen und dort sowohl die Ca^{2+} -Homöostase zu stören, als auch die Ca^{2+} -abhängige Endonuklease zu aktivieren (SHAIKH et al., 1995; XU et al., 1996). Dieser Effekt kann durch Zink aufgehoben werden (LOHMANN und BEYERSMANN, 1994).

2.1.4 Apoptose in Fischen/Fischzellkulturen

Neben den zahlreichen Untersuchungen zur Apoptose in Säugetieren und Säugetierzellkulturen gibt es auch einige Studien über Apoptose in Fischen und in Fischzellkulturen. Neben mechanistischen Untersuchungen zur Signaltransduktion ist hier auch der Einfluß von Stressoren und Schadstoffen auf die Apoptose Gegenstand der Untersuchungen.

So konnte z.B. gezeigt werden, daß Kupfer in olfaktorischen Epithelzellen (JULLIARD et al. 1996) und in den Kiemen (DAOUST et al., 1984) von Regenbogenforellen Apoptose induziert. Eine Erhöhung der Apoptose konnte ebenfalls durch Cadmium in pronephrischen Zellen des Karpfens (HOOLE, 1997) und in primären Epidermiszellen der Regenbogenforelle (LYONS-ALCANTARA et al., 1998) beobachtet werden. Ferner konnte bei der Regenbogenforelle ein Einfluß von Quecksilber auf die Apoptose in Kiemen (DAOUST et al., 1984) und von Trichlorethylen auf die Apoptose in Kiemen, Leber, Hirn und Niere (HEINING und HOFFMANN, 1993) festgestellt werden.

Des Weiteren sind neben konkreten Schadstoffen wie TCDD (2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin) (CANTRELL et al., 1998) als Induktoren auch Untersuchungen veröffentlicht, die allgemein einen Einfluß von Umweltschadstoffen auf die Apoptose vermuten. Hierzu gehört z.B. die Beobachtung von BODAMMER und MURCHELANO (1990), die in Hepatozyten von Winter-Flundern eine erhöhte Apoptoserate feststellten. JANZ et al. (1997) führen dagegen eine erhöhte Rate von Apoptose in den Ovarien des *Catostomus commersoni* auf die Ausflüsse einer Papiermühle zurück.

Streß aufgrund einer Temperaturerhöhung hatte in der Epidermis von Regenbogenforellen eine Erhöhung der Apoptose zur Folge (BURKHARDT-HOLM et al., 1998), wohingegen eine Netzgefangenschaft von *Ictalurus punctatus* zu einer Erniedrigung der normalen Apoptoserate in den Leukocyten geführt hat (ALFORD et al., 1994).

O.g. Studien bestätigen, als Parallele zu den Ergebnissen an Säugetieren, einen Einfluß von schadstoffbedingtem oder allgemeinem Streß auf die Apoptose in Fischen.

2.2 Biomarker

Der Eintrag von Schadstoffen in die Umwelt stellt eine große Belastung für die unterschiedlichsten ökologischen Systeme, so u.a. auch für das Meer und die darin enthaltene Flora und Fauna, dar.

Der klassische Weg, die Belastungssituation zu erfassen, besteht darin, in Monitoringprogrammen die Schadstoffe anhand chemischer Analytik im Wasser, im Sediment und in den Organismen zu bestimmen und mögliche ökologische Folgen mit der Konzentration und/oder der Zusammensetzung der ermittelten Schadstoffe in Beziehung zu setzen.

Es hat sich gezeigt, daß diese Vorgehensweise nur begrenzt aussagefähig ist. Zum einen gibt es große Unterschiede in der biologischen Verfügbarkeit unterschiedlicher Substanzen aus unterschiedlichen Medien, zum anderen gibt es individuelle und spezies-spezifische Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber Schadstoffen. Des weiteren ist wenig bekannt über die Toxizität von Schadstoffmischungen, über das Auftreten von synergistischen und antagonistischen Effekten und über das Auftreten, die Akkumulation und die Wirkung von Metaboliten. Die Übertragung von Ergebnissen aus Toxizitätsstudien in Laborexperimenten auf die Situation im Freiland ist ebenfalls nicht direkt möglich (McCARTHY und SHUGART, 1990; PEAKALL, 1994).

In den letzten Jahren ist daher das Interesse an Biomarkern zur Beurteilung des ökologischen Zustands stetig gewachsen. Biomarker sind biologische bzw. biochemische Reaktionen auf Schadstoffe und durch diese verursachten Streß. Sie stellen damit eine Meßgröße dar, Veränderungen in biologischen Systemen zu erfassen, die von ökotoxikologischer Relevanz sind. Diese Veränderungen können sich auf allen Ebenen abspielen. Sie reichen in der Hierarchie biologischer Systeme vom Molekül über die Zelle, das Gewebe, den Organismus, die Population bis zum Ökosystem. Dabei gehen Effekte auf einem niedrigeren biologischen Level Veränderungen auf der höheren Ebene voraus (BAYNE et al., 1985; PEAKALL, 1994).

Bei der Klassifizierung von Biomarkern unterscheidet man zwischen Expositions- und Effektbiomarkern (MAYER et al., 1992). PEAKALL definierte 1994 Biomarker als biologische Antwort auf eine Umwelt-Chemikalie oder Chemikalien, die ein Maß für die Exposition oder auch für einen toxischen Effekt sind.

Expositionsbiomarker zeigen an, daß eine Kontaminante in einem Organismus vorhanden ist, während es bei Effektbiomarkern durch das Vorhandensein der Kontaminante zu einer biologischen/biochemischen Veränderung gekommen sein muß. Ein klassisches Beispiel für einen Expositionsbiomarker ist die Induktion von Metallothioneinen durch Schwermetalle und für einen Effektbiomarker die Erhöhung der mischfunktionellen Oxidase-Aktivität durch z.B. polyaromatische Kohlenwasserstoffe.

Das Ziel beim Einsatz von Biomarkern ist die ökologische Risikoabschätzung, die aus zwei Komponenten besteht. Dies ist zum einen rückblickend die Beschreibung und Bewertung des Ökosystems unter dem Aspekt, ob und aus welchen Gründen es sich vom Normalzustand entfernt hat und zum anderen, als Frühwarnsystem, im Hinblick darauf, wie sich eine gegebene Kontamination zukünftig auf das Ökosystem auswirken wird (DEPLEDGE und FOSSI, 1994; PEAKALL und WALKER, 1994).

Für die Eignung eines Biomarkers müssen daher gewisse Anforderungen erfüllt werden (MAYER et al., 1992):

- Die Messung des Biomarkers sollte leicht und relativ schnell durchzuführen sein
- Der Biomarker sollte dosis- oder zeitabhängig auf die Kontaminante reagieren, so daß das Ausmaß der Exposition oder des Effekts bestimmt werden kann
- Der Biomarker sollte sensitiv sein
- Die Variabilität aufgrund anderer Faktoren wie z.B. Jahreszeit, Temperatur, Geschlecht, Gewicht oder Behandlung sollten bekannt und im akzeptablen Rahmen sein
- Die Messungen müssen biologische Bedeutung haben; Es sollten nur Biomarker, die wichtige biologische Prozesse darstellen und deren Schwankungen interpretiert werden können, verwendet werden

Die Etablierung eines Biomarkers benötigt umfassende Forschungstätigkeit in Labor- und Freilanduntersuchungen. Es muß festgestellt werden, ob zwischen der Induktion des Biomarkers und möglichen Stressoren eine Korrelation besteht. Ferner muß der Einfluß natürlicher und physiologischer Stressoren (z.B. Temperaturänderungen, Reproduktionsstatus etc.) auf den Biomarker besonders im Hinblick darauf untersucht werden, ob Effekte durch anthropogene Stressoren von denen natürlicher Stressoren unterscheidbar sind.

Im marinen Bereich hat sich das biologische Effektmonitoring in nationalen und internationalen Monitoringprogrammen etabliert (ICES: International Council for the Exploration of the Sea, OSPARCOM-JAMP: Oslo Paris Commission-Joint Assessment and Monitoring Programme, HELCOM: Helsinki Commission, NMMP: UK National Marine Monitoring Programme).

Häufig gemessene Biomarker, für die jetzt im Rahmen eines EU-Projekts Qualitäts-sicherungsstandards erstellt werden sollen, sind z.B. die folgenden (BEQUALM: Biological Effects Quality Assurance in Monitoring Programmes, EU-Projekt PL97-3587):

- Metallothionein-Induktion
- DNA-Addukte
- ALA-D-Inhibition
- Lysosomenstabilität
- Cytochrom P4501A Induktion
- Imposex/Intersex
- Leberhistopathologie
- Fischkrankheiten
- Reproduktion

Die Eignung von Apoptose als Biomarker gilt es noch festzustellen. In der Literatur gibt es keine Hinweise, daß grundlegende Untersuchungen diesbezüglich bei marinen Vertebraten durchgeführt worden sind, so daß hier noch Forschungsbedarf besteht.

2.3 Kliesche

Die Kliesche (oder Scharbe, *Limanda limanda* L.) ist ein Plattfisch aus der Familie der Pleuronectidae. Sie erreicht im Durchschnitt eine Länge von 25 bis 35 cm und hat einen flachen, ovalen, gelblich braun gefärbten Körper. Die Augen der Kliesche befinden sich auf der rechten Körperhälfte. Als typisches äußerliches Charakteristikum weist die Kliesche die über der Brustflosse halbkreisförmig gebogene Seitenlinie auf, die sich von der anderer Plattfischarten unterscheidet (s. Abb.4). Die Nahrung der Kliesche setzt sich hauptsächlich aus Ophiuroidea (Schlangensterne) und Crustacea (Krebstiere) zusammen (LOZAN, 1988; KNUST, 1996).

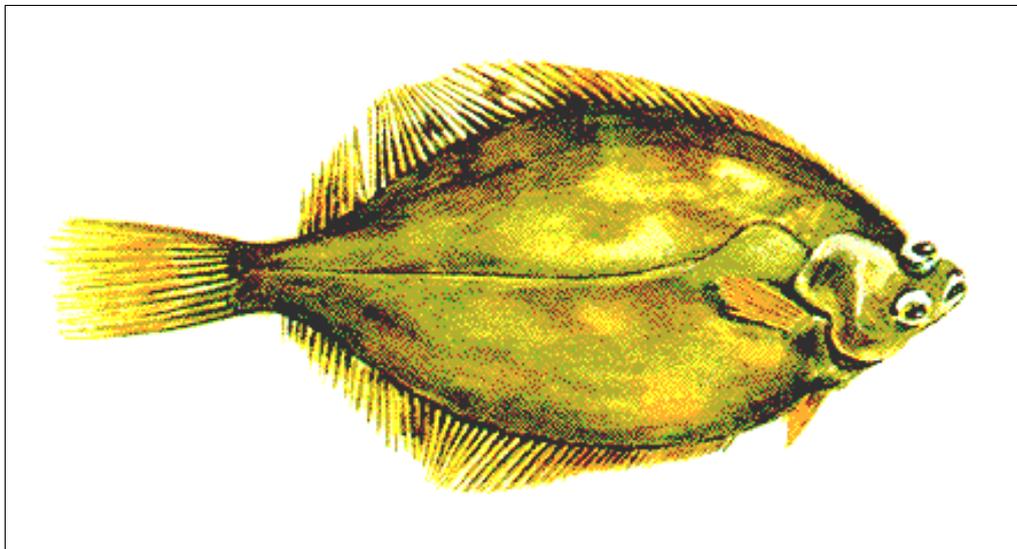


Abb. 4: Die Kliesche

Das Verbreitungsgebiet der Kliesche erstreckt sich über die gesamte Nordsee, das isländische Schelf, die europäischen Westküsten und im Bereich der westlichen und mittleren Ostsee. Als angepaßter Grundfisch bevorzugt die Kliesche sandigen und schlickigen Grund in Tiefen von 6-70 m. Die größte Häufigkeit erreicht sie in der südöstlichen Nordsee in Wassertiefen von 20-40 m.

Die Kliesche ist die häufigste Plattfischart in der Nordsee, besitzt aber aufgrund der mangelhaften Fleischqualität und der geringen Größe keine wirtschaftliche Bedeutung (BOHL, 1957).

Im Vergleich zu anderen Fischarten gilt die Kliesche als relativ standorttreu. Nur die Populationen des Küstengebietes weichen im Winter der sich stark abkühlenden Region und wandern westwärts in tiefere und wärmere Gebiete, um dann im Sommer in die wiedererwärmten Küstengewässer zurückzukehren (BOHL, 1957; RIJNSDORP et al., 1992).

Die Hauptlaichzeit der Kliesche findet in der Nordsee in den Monaten Februar bis April statt, wobei das Gonadenwachstum bereits im Winter beginnt (VAN DER LAND, 1991).

Die weiblichen Tiere erreichen die Geschlechtsreife am Ende des zweiten oder dritten Lebensjahres ab einer Größe von 12,5 cm, die Männchen schon am Ende des zweiten Lebensjahres ab einer Größe von 10,7 cm (BOHL, 1957).

Die Kliesche hat einen ausgeprägten saisonalen Zyklus an Glykogengehalt und Speicherlipiden in der Leber. Im Frühjahr und in den Sommermonaten nimmt sie vermehrt Energie durch Nahrung auf, die in Form von Lipiden in der Leber gespeichert wird, um diese im Winter zu verbrauchen, bzw. die Energie für den Ovarienaufbau zu verwenden. Dementsprechend hat der Lipidgehalt der Leber im Herbst ein Maximum und im Frühjahr nach der Gonadenreife ein Minimum (SABOROWSKI und BUCHHOLZ, 1996; SABOROWSKI, 1996). Parallel zur verstärkten Nahrungsaufnahme im Frühjahr und Sommer kommt es zu einer verstärkten Aufnahme von Schadstoffen über die Nahrung. Bei der Mobilisierung der Speicherlipide während der Gonadenreifung werden neben den Lipiden auch lipophile Schadstoffe aus der Leber in die Ovarien umgelagert (KAMMANN, 1995).

Die Kliesche reagiert besonders empfindlich auf anthropogene Umwelteinflüsse. Dies zeigt sich z.B. in der südlichen Nordsee anhand hoher Raten an Geschwüren, Skelettdeformationen und Leberveränderungen (WAHL et al., 1992).

Aufgrund ihrer Sensibilität auf anthropogene Umwelteinflüsse wurden an Klieschen zahlreiche Untersuchungen (z.B. „ZISCH“ (Zirkulation und Schadstoffumsatz in der Nordsee, MFU 0545) „PRISMA“ (Prozesse im Schadstoffkreislauf Meer-Atmosphäre: Ökosystem Deutsche Bucht, MFU 0620), ICES/IOC-Workshop in Bremerhaven) vorgenommen, die in einem umfangreichen Datenmaterial zur Biologie und Schadstoffbelastung dieser Spezies resultierte (KAMMANN, 1995).

Dieses umfangreiche Datenmaterial und die Eigenschaften der Kliesche, wie z.B. ihre Standorttreue, ihre Empfindlichkeit gegenüber anthropogenen Umwelteinflüssen, ihr großes Vorkommen und ihre weite Verbreitung haben dazu geführt, daß die Kliesche ein wichtiger Monitoringorganismus geworden ist (ICES, 1989; LANG und DETHLEFSEN, 1996).

3 Zielsetzung und Arbeitsplan

Die vorliegende Arbeit ist im Rahmen des BMBF-geförderten Verbundprojekts „STRESSTOX“ (Früherkennung toxischer Belastungen bei marinen Organismen) entstanden und hat zum Ziel, die Eignung von Apoptose in Klieschen als potentiellen Biomarker für das biologische Effektmonitoring zu untersuchen. Um eine positive oder negative Aussage hierüber treffen zu können, müssen folgende Fragen, die sich aus den Bedingungen für die Eignung von Biomarkern (s. 2.2) ergeben, geklärt werden:

- Ist Apoptose in Klieschen induzierbar durch
 - a) anthropogene Stressoren?
 - b) natürliche Stressoren?

Wenn ja:

- Ist die Induktion von Apoptose durch anthropogene Stressoren unterscheidbar von der Induktion durch natürliche Stressoren?
- Ist Apoptose im Freiland an unterschiedlich kontaminierten Stationen unterschiedlich?

Wenn ja:

- Gibt es eine Korrelation zwischen dem Auftreten von Apoptose und der Kontamination dieser Stationen mit bestimmten Schadstoffen?
- Gibt es saisonale Einflüsse auf die Apoptoserate?

Wenn ja:

- Gibt es eine Korrelation zwischen saisonalen biologischen (z.B. Gonadenreifung, Fettstoffwechsel) oder jahreszeitbedingten äußeren Faktoren (z.B. Temperatur) und dem Auftreten von Apoptose?

Zur Beantwortung der gegebenen Fragen werden folgende Untersuchungen durchgeführt:

- Es werden Laborexperimente an Klieschen durchgeführt mit
 - a) 3 anthropogenen, umweltrelevanten, anorganischen und organischen „Modell-Kontaminanten“: Cadmium, PCB 118 und PCB 77
 - b) den natürlichen Stressoren Temperatur- und Salinitätsveränderung
- Es werden Freilanduntersuchungen durchgeführt
 - a) an 6 unterschiedlich kontaminierten Stationen in Nord- und Ostsee
 - b) zu unterschiedlicher Jahreszeit (Dezember und Mai)
- Es werden begleitende Daten zur Schadstoffbelastung und zur Biologie der Klieschen mit aufgenommen
- Es wird ein „Jahresgang“ gemessen, d.h. die monatliche Messung der Apoptose an einer bestimmten Station.

Die Methoden zur Bestimmung der Apoptose sind die DNA-Gelelektrophorese und der TUNEL-assay an Gefrierschnitten. Den geplanten Untersuchungen vorangestellt, erfolgt die Optimierung der Methoden hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit auf das Untersuchungsmaterial Klieschenleber und hinsichtlich der densitometrischen Auswertung und Quantifizierung.

4 Material

4.1 Laborexperimente

Es wurden 6 Laborexperimente in der Außenstelle Cuxhaven der Bundesforschungsanstalt (BFA) für Fischerei durchgeführt. Die Klieschen wurden auf Ausfahrten des Fischereiforschungsschiffs (FFS) „Walther Herwig III“ in 15 min Hols mit einem Grundschleppnetz an der Station N01 (s. 4.2) nordwestlich von Helgoland gefangen und während des Transports nach Cuxhaven in Seewasserbecken gehalten. Für die Experimente wurden nur weibliche Klieschen zwischen 20 und 25 cm Länge verwendet, um die Variabilität aufgrund unterschiedlicher Altersklassen und unterschiedlichen Geschlechts gering zu halten.

Nach dem Transport zur Aquarienanlage in Cuxhaven folgte eine 4 bis 6 wöchige Akklimatisierungsphase für die Klieschen. Die Hälterung erfolgte für je 4-7 Klieschen in 80 l Kunststoffbecken mit Seewasser (Salinität: 33 ‰) im Durchfluß (12-15 ml/min) bei 4 °C und täglicher Fütterung mit kommerziellem Fischfutter (Trouvit pro Aqua 20/2).

Für die Experimente mit den anthropogenen Stressoren wurden exemplarisch das Schwermetall Cadmium und die organischen Substanzen PCB 118 und PCB 77 gewählt. Diese Substanzen sind ökologisch und toxikologisch relevante, persistente, ubiquitäre Kontaminanten, über die zahlreiche Studien zum Vorkommen und zur Wirkung existieren. Die beiden Kongenere PCB 118 und PCB 77 gehören zur Stoffklasse der halogenierten Kohlenwasserstoffe und unterscheiden sich in der Anzahl und in der Stellung der Chloratome am Biphenyl-Ringsystem. PCB 118 ist ein mono-ortho substituiertes PCB mit geringerem toxischen Potential als PCB 77, das kein Chloratom in ortho-Position des Biphenyl-Rings besitzt. Beide Kongenere können aufgrund ihrer non-ortho bzw. mono-ortho substituierten Stellung der Chloratome eine koplanare Konformation einnehmen und entsprechen damit in der räumlichen Ausdehnung den hoch toxischen polychlorierten Dibenzodioxinen und Dibenzofuranen. Die Toxizitäten von PCB-Mischungen oder einzelnen Kongeneren werden als Toxizitätsäquivalente zum TCDD angegeben (SAFE, 1994).

Für die Laborexperimente mit den chemischen Stressoren wurden die Klieschen vor der Injektion für ca. 3 min in einem Betäubungsbad aus 1 g MS 222 (3-Amino-benzoessäureethylester) auf 6 l Seewasser betäubt. Danach wurden ihnen 100 µl der jeweiligen Lösung intraperitoneal injiziert. Das Cadmium war als CdCl_2 in physiologischer Kochsalzlösung gelöst und die PCB in Sonnenblumenöl. Um ausschließen zu können, daß auftretende Effekte durch das Lösungsmittel verursacht werden, wurden zu jedem Versuch Lösungsmittelkontrollen mitgeführt. Darüberhinaus gab es in jedem Versuch unbehandelte Kontrollgruppen, um überprüfen zu können, ob die Injektion oder die Betäubung allein schon einen Streßfaktor darstellen, der zur Induktion von Effekten führt.

Bei den Laborexperimenten mit den natürlichen Stressoren (NS) wurde neben einer unbehandelten Kontrollgruppe ein Teil der Klieschen einer Erhöhung der Temperatur (T) ausgesetzt und ein anderer Teil einer Reduktion der Salinität (S).

Die Temperaturerhöhung wurde durch den Einsatz eines elektrischen Aquarienheizstabs (Tronic, 150 W) in jedem Becken erreicht. Die Temperaturerhöhung betrug 6 °C und wurde in einem Zeitraum von ca. 2h erreicht. Für die Reduktion der Salinität wurde Frischwasser in einen Seewasservorratstank gegeben und auf 25 ‰ eingestellt. Das Seewasser in den Aquarienbecken mit 33 ‰ Salzgehalt wurde, soweit es möglich war, abgelassen und durch das neu gemischte Wasser reduzierter Salinität ersetzt. Der Vorgang des Wasseraustauschs hat ca. 2 h gedauert.

Die Probenahmen aus den Versuchen erfolgten innerhalb von maximal 20 Tagen in unterschiedlichen Zeitintervallen. Die Klieschen wurden dafür wiederum in MS 222-Lösung betäubt und mit einem Schnitt durch die Halswirbelsäule getötet. Als zu untersuchendes Probenmaterial wurde die Leber entnommen, da in ihr als Entgiftungsorgan die größte Akkumulation und Wirkung der Schadstoffe auftritt.

Die Leberproben wurden in flüssigem Stickstoff bei –196 °C bis zur Probenaufarbeitung gelagert. Die Proben für die Gefrierschnitte wurden für ca. 5 sec in Isopentan/Stickstoff durchgefroren und anschließend bei –80 °C gelagert.

Von jedem Fisch wurden Daten bezüglich Länge und Gewicht aufgenommen und die Otolithen zur Altersbestimmung entnommen.

Die begleitende Schadstoffanalytik wurde von Herrn M. Lacorn („STRESSTOX“ Teilprojekt 3, Universität Hamburg, Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Abteilung für Lebensmittelchemie) durchgeführt.

Insgesamt wurden 6 Laborexperimente durchgeführt. Das Laborexperiment 1 (LE 1) war ein Vorversuch, in dem untersucht werden sollte, ob es überhaupt eine Wirkung der drei Kontaminanten Cd, PCB 118 und PCB 77 auf die Apoptose gibt. Die Konzentrationen betragen jeweils 1 mg/kg Fischgewicht. Für jede Kontaminante folgte dann jeweils ein umfassender Versuch (LE Cd, LE PCB 118 und LE PCB 77) mit unterschiedlichen Inkubationskonzentrationen, um genauere Dosis-Wirkungsbeziehungen in einem umweltrelevanten Konzentrationsbereich aufstellen zu können.

LE NS 1 wurde als Vorversuch dem LE NS 2 vorangestellt, um eine zu starke Beeinträchtigung der Klieschen durch die Temperaturerhöhung bzw. die Reduktion der Salinität ausschließen zu können.

In Tab. 1 bis Tab. 6 werden die Versuchsanordnungen der 6 Laborexperimente mit Art und Dauer der Behandlung und Anzahl der Fische pro Behandlung und Dauer gezeigt.

LE 1

Tab 1: Versuchsanordnung LE 1

03.02.-23.02.1997	2 Tage	5 Tage	10 Tage	20 Tage
	Anzahl der Fische			
Cadmium (1mg/kg)	5	5	5	
PCB 118 (1mg/kg)	5	5	5	
PCB 77 (1mg/kg)	5	5	5	5
NaCl 0,9%ig	5	5	5	
Öl	5	5	5	5
Unbeh. Kontrolle	5			

LE Cd

Tab. 2: Versuchsanordnung LE Cd

09.02.-19.02.1998	1 Tag	2 Tage	5 Tage	10 Tage
	Anzahl der Fische			
Cadmium (5mg/kg)	6	6	6	6
Cadmium (1mg/kg)	6	6	6	6
Cadmium (100µg/kg)	6	6	6	6
Cadmium (10µg/kg)	6	6	6	6
NaCl 0,9%ig	7	7	7	6
Unbeh. Kontrolle	7		5	7

LE PCB 118

Tab. 3: Versuchsanordnung LE PCB 118

06.07.-21.07.98	2 Tage	5 Tage	10 Tage	15 Tage
	Anzahl der Fische			
PCB 118 (100µg/kg)	5	5	5	5
PCB 118 (10µg/kg)	5	5	5	5
Öl	5	5	5	5
Unbeh. Kontrolle	5		5	

LE PCB 77

Tab. 4: Versuchsanordnung LE PCB 77

03.07.-13.07.97	1 Tag	2 Tage	5 Tage	10 Tage
	Anzahl der Fische			
PCB 77 (100µg/kg)	5	5	5	5
PCB 77 (10µg/kg)	5	5	5	5
PCB 77 (1µg/kg)	5	5	5	5
Öl	5	5	5	5
Unbeh. Kontrolle	4			

LE NS 1

Tab. 5: Versuchsanordnung LE NS 1

17.11.-24.11.97	7 Tage
	Anzahl der Fische
T (+ 5 °C)	10
S (- 8 ‰)	10
Unbeh. Kontrolle	9

LE NS 2

Tab. 6: Versuchsanordnung LE NS 2

26.03.-05.04.98	1 Tag	5 Tage	10 Tage
	Anzahl der Fische		
T (+ 5 °C)	10	10	10
S (- 8 ‰)	10	10	10
Unbeh. Kontrolle	10	10	10

4.2 Freilanduntersuchungen

Die Proben aus den Freilanduntersuchungen wurden auf Ausfahrten des FFS „Walther Herwig III“ an 4 Stationen in der Nordsee und 2 Stationen in der Ostsee genommen. Die Position der Stationen ist in Abb. 5 und Abb. 6 zu erkennen.

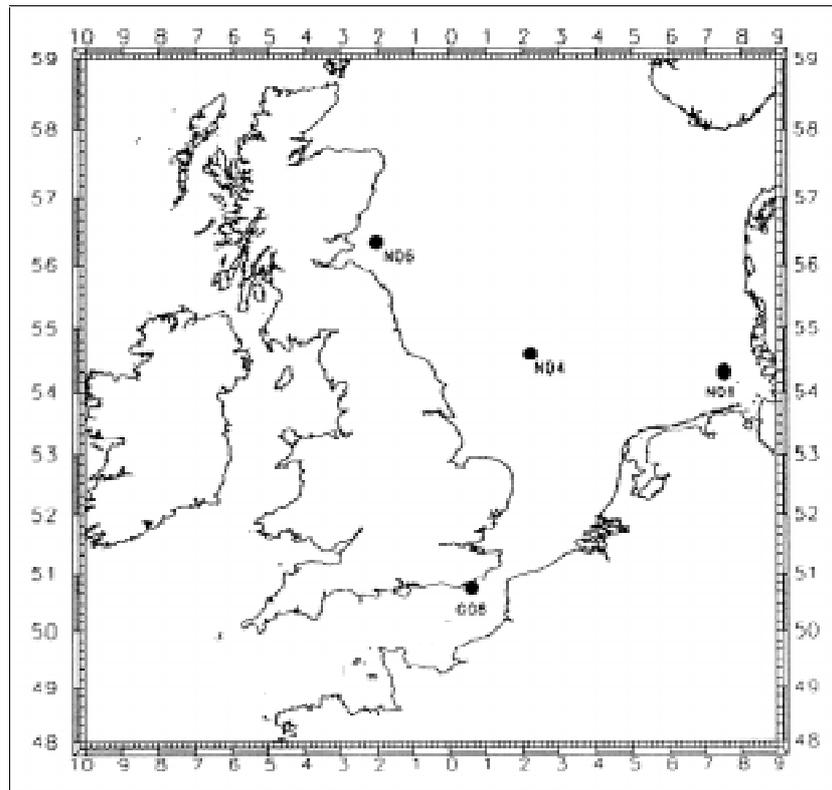


Abb. 5: Stationskarte Nordsee

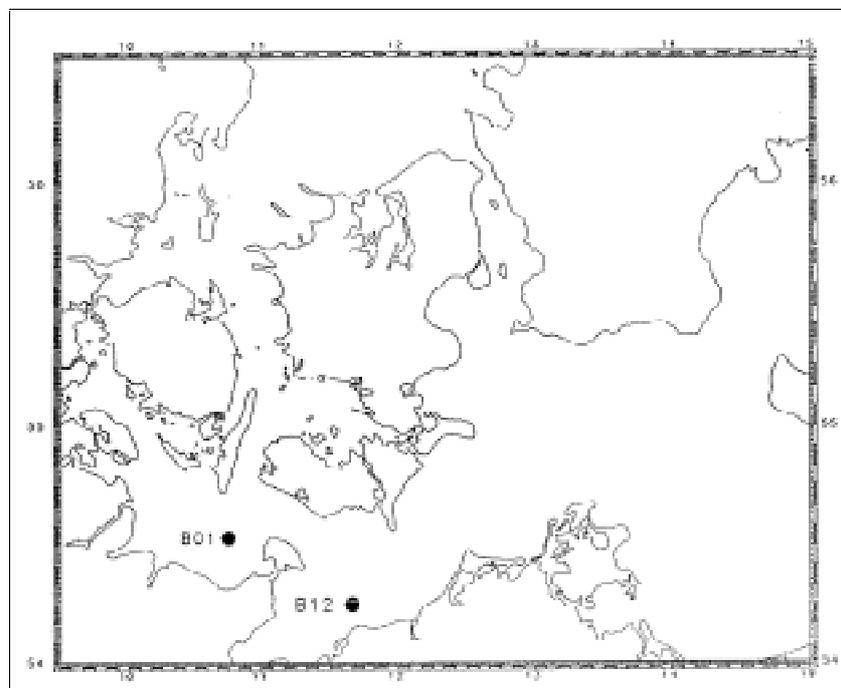


Abb. 6: Stationskarte Ostsee

Tab. 7 zeigt die Koordinaten und Charakteristika der einzelnen Stationen, die für die Auswahl eine Rolle gespielt haben (DETHLEFSEN, 1988; SÜNDERMANN, 1989; CLAUßEN, 1990; COSSA et al., 1992; LANDGRAFF, 1995).

Tab. 7: Koordinaten und Charakteristika der Freilandstationen

Station	Koordinaten	Charakteristika
B01	54°30'N – 54°35'N 10°40'E – 10°50'E	Ostseestation mit Salzgehalt-angepaßten Fischen und Ostseefischen, küstennahe Schadstoffbelastung
B12	54°10'N – 54°20'N 11°35'E – 11°45'E	Aufgrund des Salzgradienten östlichstes Verbreitungsgebiet für Klieschen in der Ostsee
N01	54°15'N – 54°25'N 07°26'E – 07°39'E	Ehemaliges Dünnsäureverklappungsgebiet, Eintrag von Schadstoffen aus der Elbmündung, hohe Belastung mit PCB
N04	54°25'N – 54°50'N 02°00'E – 02°31'E	Doggerbank, relativ flaches Gebiet (13-30 m), erhöhte Befallsraten an Fischkrankheiten
N06	56°15'N – 56°25'N 01°50'W – 02°10'W	Hohe Schwermetallbelastung, erhöhte Befallsraten an Fischkrankheiten
G08	50°40'N – 50°50'N 00°30'E – 00°50'E	Hoher Schadstoffeintrag aus der Seine

Die Probenahmen erfolgten auf 2 Ausfahrten zu 2 verschiedenen Jahreszeiten. Es wurden die numerischen Bezeichnungen für die Ausfahrten der „Walther Herwig III“ übernommen. WH 191 steht dementsprechend für die 191. Ausfahrt der „Walther Herwig III“ und WH 195 für die 195. Ausfahrt.

Eine Übersicht über die beprobten Stationen und ihre hydrographischen Daten (T [°C], S [‰] und Tiefe [m]), aufgenommen mit der Bordsonde der „Walther Herwig III“, sind Tab. 8 zu entnehmen.

Tab. 8: Hydrographische Daten der Freilandstationen; T [°C]; S [‰]; (Tiefe [m])

	B01	B12	N01	N04	N06	G08
WH 191 06.12. – 21.12.97	T: 6,3 S: 18,9 (15,0 m)	T: 6,6 S: 17,8 (20,0 m)	T: 6,7 S: 34,3 (36,0 m)	T: 8,6 S: 34,5 (26,5 m)	T: 9,0 S: 34,8 (49,5 m)	T: 11,6 S: 35,1 (32,0 m)
WH 195 08.05. – 24.05.98	T: 6,4 S: 24,9 (17,2 m)	T: 5,1 S: 20,5 (19,5 m)	T: 9,4 S: 33,8 (38,2 m)	T: 10,5 S: 34,9 (14,1 m)	T: 8,2 S: 34,6 (49,0 m)	T: 11,5 S: 35,1 (20,8 m)

Die Fische wurden mit einem Grundschieppnetz in 60 min Hols gefangen. Für die Untersuchungen wurden nur weibliche Klieschen mit einer Länge ab 25 cm verwendet.

Die Klieschen wurden mit einem Schnitt durch die Halswirbelsäule getötet. Es wurden die Lebern entnommen, in Stücke geschnitten und in flüssigem Stickstoff bis zur Probenaufarbeitung gelagert. Für die Gefrierschnitte wurden die Proben für ca. 5 sec in Isopentan/Stickstoff durchgefroren und ebenfalls in Stickstoff gelagert.

Von jedem Fisch wurde die Länge und das Gewicht aufgenommen und die Otolithen zur Altersbestimmung entnommen.

Die begleitende Schadstoffanalytik wurde von Herrn M. Lacorn („STRESSTOX“ Teilprojekt 3, Universität Hamburg, Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Abteilung für Lebensmittelchemie) durchgeführt.

4.3 Jahresgang

Die Proben für den Jahresgang wurden monatlich an der Station N01 (s. Abb. 5) entnommen. Im Juni war eine Probenahme aus organisatorischen Gründen nicht möglich. In den Monaten Oktober, November und Januar wurden die Proben mit dem FFS „Uthörn“ der Biologischen Anstalt Helgoland genommen, in den restlichen Monaten erfolgte die Probennahme auf Ausfahrten der „Walther Herwig III“. Die Durchführung der Probenahmen erfolgte analog zu den Freiland-Probenahmen (s. 4.2).

5 Methoden

5.1 DNA-Elektrophorese

5.1.1 DNA-Extraktion

Die Extraktion der DNA aus der Klieschenleber erfolgte mit dem DNA-Extraktions-Kit der Firma QIAGEN (QIAamp Tissue Kit). Das Prinzip der Extraktion ist, daß nach Lyse des Gewebes, enzymatischem Abbau der RNA und nach Zugabe eines chaotropen Salzes und Ethanol das Lysat auf eine Silica-Säule gegeben wird, an deren Silanolgruppen die DNA spezifisch bindet. Nach einigen Reinigungsschritten wird die DNA mit einer Pufferlösung oder mit dest. Wasser von der Säule eluiert (s. Anhang 9.1).

Die DNA-Quantifizierung des Extrakts wurde photometrisch durchgeführt (MANIATIS et al., 1982). Die Extinktion der DNA-Lösung wurde bei 260 nm aufgenommen, und daraus wurde der DNA-Gehalt berechnet (s. Anhang 9.2).

Die Bestimmung der Reinheit des Extrakts wurde mittels des 260 nm/280 nm-Koeffizienten bestimmt. Bei 280 nm liegt das Extinktionsmaximum phenolischer Gruppen von Proteinen. Der Koeffizient aus 260/280 nm gibt daher Aufschluß über Verunreinigungen durch Proteine. Ein DNA-Extrakt wird als rein angesehen, wenn der 260/280-Koeffizient über 1,7 liegt (MANIATIS et al., 1982) (s. Anhang 9.2).

Extrakte aus Klieschenlebern, die in den Jahreszeiten Sommer, Herbst und frühem Winter, einer Zeit, die mit starker Fetteinlagerung einhergeht, gewonnen werden, sind häufig sehr unrein (260/280-Koeffizient < 1,7). Die Verunreinigung kann vermindert werden, wenn der Extraktionsschritt über die Silica-Säule wiederholt wird.

5.1.2 DNA-Elektrophorese

Die DNA-Elektrophorese ist eine etablierte Technik zur Trennung von DNA-Molekülen in einem elektrischen Gleichstromfeld. Die Wanderungsrichtung der DNA-Moleküle erfolgt aufgrund ihrer negativen Ladung in Richtung Anode. Die Trennmatrix ist üblicherweise ein Agarosegel, das je nach Konzentration einen bestimmten Vernetzungsgrad aufweist. Da kleinere DNA-Fragmente in der Gelmatrix weniger retardiert werden als größere Moleküle, dementsprechend also eine größere Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld haben, resultiert daraus eine Auftrennung der DNA-Fragmente in Fraktionen unterschiedlicher Molekülgröße.

Die Elektrophorese von Nucleinsäuren erfolgt in horizontalen Gelen unter „submarine“ Bedingung. Das Agarosegel liegt dabei direkt im Puffer, wodurch das Austrocknen der Geloberfläche verhindert wird.

Für den Probenauftrag wird die zu trennende DNA-Lösung mit einem Probenpuffer versetzt, der den blauen, negativ geladenen Farbstoff Bromphenolblau enthält, um die Wanderungsfront im Gel sichtbar zu machen. Zusätzlich besteht der Probenpuffer zu 50 % aus Saccharose, um die Dichte der Probenlösung zu erhöhen und ein Aufschwimmen der Probe beim Auftragen auf das Gel zu verhindern (MANIATIS et al., 1982; WESTERMEIER, 1990; MARTIN, 1996).

Die Färbung der Gele erfolgt anschließend mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid, einer Substanz, die in die DNA interkaliert. Die Visualisierung der DNA ist damit auf einem UV-Transilluminator bei 302 nm möglich (MANIATIS et al., 1982; MARTIN, 1996) (s. Anhang 9.3).

5.1.3 Densitometrische Auswertung

Unter Densitometrie versteht man die Messung der optischen Dichte von Proben. Klassische Densitometer sind bewegliche Photometer, die Elektrophorese- oder Dünnschichtchromatographie-Trennsuren abtasten und die Extinktion der einzelnen Zonen messen. Das Ergebnis dieser Messung ist ein Kurvendiagramm (Densitogramm). Mittels Integration der Flächen unter den Kurven können einzelne Banden quantifiziert werden (WESTERMEIER, 1990).

In den letzten Jahren hat sich die Technik der Densitometrie weiterentwickelt. Das auszuwertende Gel wird mit einer Video-Digitalkamera aufgenommen und als digitales Bild gespeichert. Im Falle von schwarz-weiß Kameras entstehen Bilder, die aus 256 Graustufen bestehen. Das Bild ist, je nach dem Auflösungsvermögen der Kamera, in einzelne Bildpunkte geteilt (ca. 400000), denen jeweils eine Graustufe zugeteilt ist.

Die Auswertung erfolgt mit spezieller Software zur Densitometrie, mittels derer u.a. die Trennsur jeder Probe im Elektropherogramm eingegrenzt, die Integrationsgrenzen der einzelnen Banden festgelegt und die integrierte optische Dichte (IOD) der Banden über die einzelnen Bildpunkte ermittelt werden kann.

Die Quantifizierung der Apoptose (DNA-„Strickleiter“) erfolgt durch Integration der optischen Dichte der Banden zwischen 180 und ca. 1500 bp und Bezug zur IOD eines auf dem Gel mit aufgetragenen DNA-Basenpaar-Markern bekannter Konzentration (s. Anhang 9.3.4). Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Quantifizierungsmethode etabliert. Sie stellt eine Alternative dar zur Quantifizierung mittels kostspieliger enzymatischer oder gesundheitsschädlicher radioaktiver Markierung der DNA-Enden.

Näheres zur Quantifizierung s. unter 6.1.1 Quantifizierung apoptotischer DNA-Fragmente im Elektropherogramm.

5.2 TUNEL-assay

5.2.1 TUNEL-assay

Der TUNEL-assay ist eine Methode zur Anfärbung von DNA-Strangbrüchen im histologischen Präparat. Er wurde erstmals von GAVRIELI et al. (1992) durchgeführt und kann sowohl an Kryoschnitten und Paraffinschnitten von Geweben, als auch an Zellpräparaten durchgeführt werden. TUNEL steht für Terminal Transferase mediated dUTP Nick End Labeling.

Die schematische Darstellung der einzelnen Reaktionsschritte ist in Abb. 7 gezeigt.

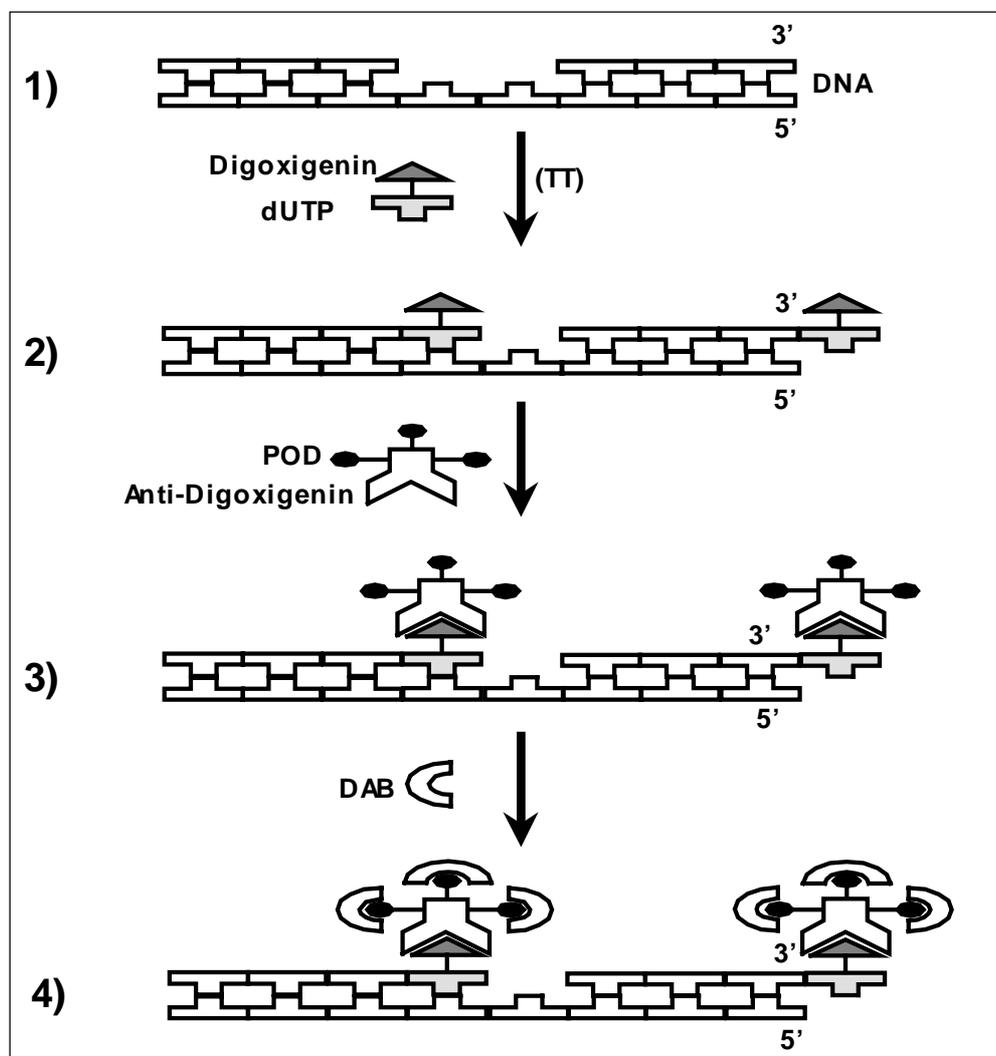


Abb. 7: Schematische Darstellung des TUNEL-assay-Prinzips

Das Prinzip der Methode besteht darin, daß (Abb. 7: 1 → 2) mittels des Enzyms Terminale Transferase (TT) mit Digoxigenin gekoppelte Nukleotide dUTP (desoxyUridintriphosphat) an 3'-OH-Enden von DNA-Einzel- und Doppel-Strangbrüchen gebunden werden. In einer folgenden Antigen-Antikörper-Reaktion (Abb. 7: 2 → 3) wird Anti-Digoxigenin, welches mit dem Enzym Peroxidase gekoppelt ist, an das Digoxigenin gebunden.

Im letzten Reaktionsschritt (Abb. 7: 3 → 4) wird der markierte Strangbruch mittels des an den Antikörper gekoppelten Enzyms Peroxidase (POD) und eines geeigneten Farbsubstrats, z.B. Diaminobenzidin (DAB) visualisiert. Die markierten Zellkerne sind dann im Durchlicht-Mikroskop anhand der braunen Färbung zu erkennen.

Statt mit Digoxigenin können die Nucleotide auch mit Biotin oder Fluorescein gekoppelt sein. Der Antikörper zu Biotin ist Streptavidin. Ebenso kann statt Peroxidase Alkalische Phosphatase verwendet werden, mit einem dafür geeigneten Farbsubstrat (z.B. Fast Red). Nach Koppelung von Fluorescein sind die markierten Strangbrüche direkt im Fluoreszenz-Mikroskop zu erkennen.

Zur detaillierten Durchführung des TUNEL-assays an Klieschenleber-Schnitten s. Anhang 9.4 und zur Optimierung der Methode s. 6.1.2.

5.2.2 Image Analyse

Die Quantifizierung TUNEL-markierter Zellkerne im Schnitt erfolgt mit spezieller Software zur Image Analyse. Analog zur densitometrischen Auswertung von Elektropherogrammen (s. 5.1.3) wird von einem repräsentativen, subjektiv ausgewählten, mikroskopischen Bildausschnitt eines Präparats ein digitales Bild aufgenommen. Mittels Image Analyse können markierte Zellkerne, die sich durch einen bestimmten, definierten Graustufenbereich von nicht markierten Zellkernen unterscheiden, gezählt werden (s. Anhang 9.4.4).

5.3 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit dem Software Programm STATISTIKA 5.0 durchgeführt.

Alle Datensätze wurden mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung geprüft. Da jedoch keine Normalverteilung der Datensätze vorlag, bzw. teilweise der Stichprobenumfang zu gering war ($n < 12$), um die Wahrscheinlichkeit einer Normalverteilung anzunehmen, wurden im weiteren Verlauf hauptsächlich nicht-parametrische Darstellungen und Tests angewandt.

Die beschreibende Darstellung der Ergebnisse erfolgte als Box-Whisker Plot. Dieser zeigt den Median der Daten an, ferner werden über die Box, welche die mittleren 50 % der Werte enthält (25-75 % Quartile) und den Whisker, der die Spannweite der Daten (ohne Ausreißer und Extreme) umfaßt, zahlreiche Informationen über die Verteilung der Daten gegeben.

Die Korrelationen zwischen Variablen wurden mit dem Spearman-Rangkorrelationstest berechnet. Paarweise Vergleiche von Behandlungsgruppen oder Stationen wurden mit dem Mann-Whitney U-Test (Rangsummentest), und der Vergleich mehrerer Gruppen bzw. mehrerer Stationen mit dem Kruskal-Wallis H-Test (ANOVA Rangsummentest), durchgeführt.

War ein nachfolgender Vergleichstest notwendig, wurde mit den Daten aus dem TUNEL-assay der Newman-Keul-Test, ein parametrischer Test, durchgeführt. Der Newman-Keul-Test ist ein post-hoc-Test zum multiplen Vergleich von Mittelwerten.

Für die Datensätzen aus der Elektrophorese konnte aufgrund der Verteilung der Daten (viele Werte unterhalb der Nachweisgrenze, ausgewertet als „0“) kein parametrischer Test durchgeführt werden. Statt eines multiplen Vergleichstests wurden mehrere paarweise Vergleiche mit dem Mann-Whitney U-Test durchgeführt.

Das Signifikanzniveau wurde auf $p = 0,05$ festgelegt, bzw. auf $p = 0,01$ und $0,001$ für hohe Signifikanz (SACHS, 1996).

6 Ergebnisse

6.1 Optimierung der Methoden

6.1.1 Quantifizierung apoptotischer DNA-Fragmente im Elektropherogramm

Eine geeignete Methode zur Bestimmung von Apoptose in Geweben ist die Elektrophorese von DNA und Quantifizierung der apoptotischen Fragmente, da hier im Gegensatz zu anderen Methoden (z.B. ELISA, TUNEL-assay) ausgeschlossen werden kann, ungerichtete DNA-Fragmentierung, z.B. nekrotischer Zellen, zu erfassen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine Methode zur Quantifizierung etabliert werden, die eine schnelle densitometrische Auswertung unter konventionellen Bedingungen, d.h. mit Ethidiumbromid gefärbten Gelen, ermöglicht.

Das Problem der Auswertung war, daß die Bilder bei der Aufnahme der Gele stark belichtet werden mußten, um die im Verhältnis zur hochmolekularen DNA geringe DNA-Menge in den apoptotischen Fragmenten erkennen zu können. Dadurch wurde die hochmolekulare DNA überbelichtet, d.h. das Peak-Maximum des Densitogramms lag oberhalb des linearen Bereichs von 256 Graustufen und konnte somit nicht quantitativ erfaßt werden. Unter Belichtungsbedingungen, bei denen im hochmolekularen Bereich keine Überbelichtung erfolgte, konnten von der Kamera keine apoptotischen Banden aufgenommen werden, da sie zu dunkel waren.

Die Quantifizierung des DNA-Gehalts apoptotischer Fragmente erfolgte daraufhin mit einem externen Standard, einem DNA-Marker bekannten DNA-Gehalts. Da DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge in unterschiedlichem Maß von Ethidiumbromid gefärbt werden, sollte ein Marker verwendet werden, der ähnliche Fragmente wie die zu quantifizierenden Banden der „Strickleiter“ aufweist. Es wurde der PCR-Marker der Fa. Sigma gewählt, ein Marker, der Fragmente zwischen 150 und 2000 bp besitzt.

Da der DNA-Gehalt des PCR-Markers nicht bekannt war und aufgrund von störenden Begleitsubstanzen nicht photometrisch bestimmt werden konnte, wurde der DNA-Gehalt mittels einer Kalibrierreihe eines Standards bekannter Konzentration und mit Fragmenten ähnlicher Länge (100 bp-Marker der Fa. FMC) densitometrisch ermittelt (s. Anhang 9.3.4.2). Zur Quantifizierung der DNA in den apoptotischen Fragmenten wurde eine Kalibriergerade von dem PCR-Marker aufgenommen, die IOD der Probe in Bezug zur IOD des Standards gesetzt und die erhaltene DNA-Menge prozentual zur Gesamt-DNA der Probe, die photometrisch bestimmt wurde, berechnet.

Um Unterschiede in der Belichtung oder im Zoom ausgleichen zu können, die am Objektiv nicht wiederholbar einzustellen sind, und einen Bezug mehrerer Gele zu einer vorher erstellten Kalibriergerade herstellen zu können, müssen die IODs der Proben jedes Gels mit einem Faktor versehen werden.

Dieser ergibt sich aus dem Quotienten der IOD des Markers in der Kalibriergeraden und der IOD des Markers auf dem jeweiligen Gel (s. Anhang 9.3.4.3).

Er ist ein Korrekturfaktor, der innerhalb der linearen Abhängigkeit der Densitometrie gleiche Bedingungen herstellt, die gerätetechnisch nicht einzuhalten sind.

Unter Verwendung eines DNA-Markers als externen Standard zur Quantifizierung und der Einführung eines Korrekturfaktors ist es gelungen, den DNA-Gehalt apoptotischer Fragmente schnell, kostengünstig und reproduzierbar (s. 6.2.1) zu bestimmen.

6.1.2 TUNEL-assay

In der Optimierungsphase wurde der TUNEL-assay sowohl an Paraffinschnitten als auch an Gefrierschnitten durchgeführt. Bei Paraffinschnitten muß vor Beginn der Färbung eine Lysis der Protein-Quervernetzungen, die durch die Konservierung und Lagerung des Gewebes in Formaldehyd entstehen, erfolgen. Die Lysis wurde mittels Proteinase K-Verdau (GAVRIELI et al., 1992), bzw. vorherigem Erhitzen des Gewebes in einem Mikrowellengerät (NEGOESCU et al., 1996) durchgeführt. Es hat sich jedoch gezeigt, daß die Lysis das Ergebnis der TUNEL-Färbung in Paraffinschnitten von Kliesenlebern stark beeinflusst.

Ohne Verdau mit Proteinase K kam es zu keiner Markierung apoptotischer Zellkerne, wohingegen nach Verdau mit Proteinase K (20 µg/ml) es in einer zeitlichen Abhängigkeit zu vermehrt falsch-positiven Ergebnissen kam. Die Kombination aus Mikrowelle und Proteinase-K-Behandlung resultierte in einer starken Färbung aller Zellkerne.

Um den Unsicherheitsfaktor, der sich aus einer Lysis mit Proteinase K ergeben würde, für die Beurteilung und Auswertung der TUNEL-Ergebnisse zu vermeiden, wurde im Rahmen dieser Arbeit der TUNEL-assay an Gefrierschnitten durchgeführt, bei denen keine starke Lysis notwendig ist.

Die Durchführung (s. Anhang 9.4) erfolgte mit Modifikationen nach der Methode von GAVRIELI et al. (1992) und der Anleitung von Boehringer Mannheim (heute: Roche Diagnostics), wobei nicht das von Boehringer Mannheim angebotene Fertig-Test-Kit (*In situ* Cell Death Detection Kit) benutzt wurde, sondern mit Digoxigenin gekoppeltes dUTP, POD-gekoppeltes Anti-Digoxigenin und DAB als Substrat.

Beim anfänglichen Vorgehen nach der Anleitung stellte sich heraus, daß es zu keiner, bzw. nur zu einer sehr schwachen Färbung der Schnitte kam. Die Ursache dafür lag, wie sich später zeigte, an der Abdeckung des Schnitts während der Inkubationsschritte mit einem Deckgläschen, das eine gleichmäßige Verteilung der pipettierten Inkubationslösung auf dem Schnitt gewährleisten soll. Durch das Auflegen des Deckgläschens auf die Inkubationslösung wurde jedoch der Flüssigkeitsfilm über dem Schnitt so gering, daß die Konzentration der Enzyme bzw. Antikörper für eine Färbung nicht ausreichten.

Erst unter Verwendung eines Stifts (DAKO pen), mit dem die Schnitte auf dem Objektträger mit einer hydrophoben Schicht umgeben werden und dadurch ein Verlaufen der pipettierten Lösung auf dem Schnitt verhindert wird, konnten deutliche Färbungen mit dem TUNEL-assay erreicht werden.

Als weitere Optimierungsschritte wurde die Konzentration des Enzyms Terminale Transferase von 25 U¹ auf 12,5 U/Schnitt gesenkt und der Antikörper (Anti-DIG-POD) um 1:200 anstatt 1:100 verdünnt. Dies führte zu einer Reduzierung unspezifischer Färbung, die durch zu hohe Enzym- und Antikörper-Konzentrationen herbeizuführen sind.

Ferner wurde zum Verdünnungspuffer des Antikörpers 5 % Magermilchpulver gegeben, um unspezifische Bindungsstellen abzudecken.

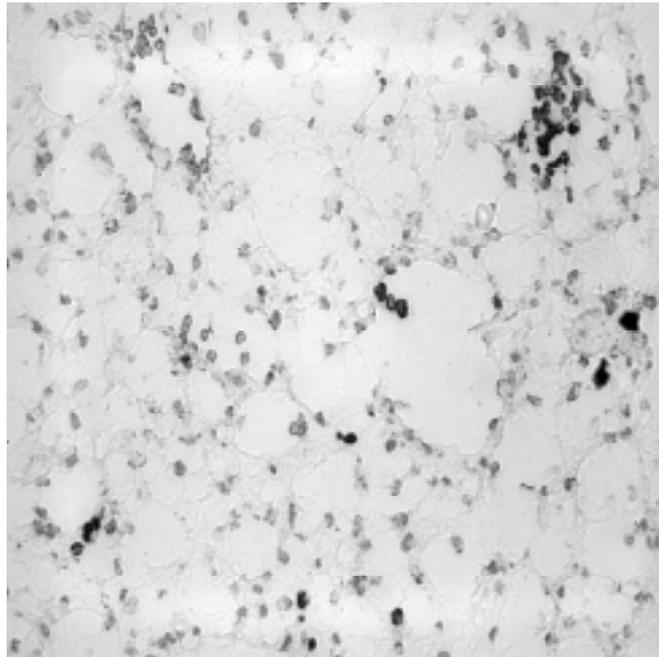


Abb. 8: Gefrierschnitt einer Klieschenleber mit TUNEL-positiv markierten Zellkernen

Die vorgenommenen Optimierungsschritte haben dazu geführt, daß apoptotische Zellkerne reproduzierbar markiert werden können. Ferner konnte mit der Reduzierung der Enzymaktivität eine Minimierung der Anfärbung nekrotischer Zellkerne erreicht werden, welche mittels TUNEL-assay ebenfalls erfaßt werden, da dieser alle Strangbrüche in Zellkernen markiert (KRESSEL und GROSCURTH, 1994; CHARRIAUT-MARLANGUE und BEN-ARI, 1995; YASUDA et al., 1995), nicht nur durch Apoptose verursachte.

Nekrotische Zellen weisen zudem im Gegensatz zu apoptotischen Zellen geringere Mengen an Strangbrüchen auf, da diese schnell enzymatisch verdaut werden. Durch die Minimierung der Enzym- und Antikörper-Konzentration werden bevorzugt Zellkerne mit einer großen Anzahl Strangbrüche gefärbt.

¹ 1 U Terminale Transferase entspricht einer Enzymaktivität von 1 nmol dATP in 60 min bei 37 °C

6.2 Validierung der Methoden

6.2.1 DNA-Elektrophorese

Nachweisgrenze:

Die Nachweisgrenze einer mit Ethidiumbromid gefärbten DNA-Bande liegt bei 10 ng. In Bezug auf die Detektion von Apoptose wurde apoptotische DNA-Fragmentierung angenommen, wenn mindestens 3 Banden in den für die DNA-„Strickleiter“ typischen Fragmentlängen (Vielfache von ca. 180 bp) mit einer Mindest-IOD von insgesamt 1000 (entspricht 54 ng DNA) vorlagen. Mit einem DNA-Gehalt um 100 µg/ml und einem Probenauftrag von 60 µl (entspricht 6000 ng DNA) ergibt sich daraus eine Nachweisgrenze von 0,9 %.

Variationskoeffizient:

Der Variationskoeffizient wurde durch 8-fache Aufarbeitung einer Klieschenleber, die apoptotische Zellen aufwies, bestimmt. Die ermittelten Gehalte sind Tab. 9 zu entnehmen:

Tab. 9: Ermittlung des Variationskoeffizienten

Probe	Apoptotische DNA-Fragmentierung [%]
1	6,1
2	5,4
3	4,5
4	3,5
5	4,4
6	3,4
7	3,7
8	3,9
Mittelwert	4,4
Standardabweichung	0,9
Variationskoeffizient	20,5

Der Variationskoeffizient für die Methode liegt bei 20,5 %. Vorhandene Schwankungen ergeben sich aus allen Aufarbeitungsschritten, von der DNA-Extraktion über die DNA-Quantifizierung des Extrakts bis hin zur densitometrischen Auswertung des Elektropherogramms.

Wiederfindung:

Die Bestimmung einer Wiederfindungsrate ist nicht möglich, da kein zertifiziertes Referenzmaterial zur Verfügung steht.

Linearität bei unterschiedlich starker Belichtung:

Bei der Berechnung der apoptotischen DNA-Fragmentierung wird einem densitometrisch ermittelten Wert (IOD) mittels einer Kalibriergeraden eine DNA-Menge zugeordnet. Der Bezug zur Kalibriergeraden wird über den Korrekturfaktor hergestellt, der Unterschiede in der Belichtung unterschiedlicher Gele ausgleichen soll. Dies ist nur möglich, wenn innerhalb der 256 Graustufen, die den densitometrischen „Range“ ausmachen, Linearität besteht.

Die Linearität wurde anhand von zwei Proben bestimmt, die bei 3 unterschiedlichen Belichtungen aufgenommen wurden. Die Werte (IOD) sind in Tab. 10 aufgezeigt:

Tab. 10: Linearität bei unterschiedlich starker Belichtung

Belichtung	IOD Probe 1 (1806 ng)	IOD Probe 2 (630 ng)
wenig	10345	5540
mittel	18633	9967
stark	37279	19855
Korrelationskoeffizient	0,9999	

Der Korrelationskoeffizient für die beiden Proben mit unterschiedlicher Belichtung beträgt 0,9999. Innerhalb des densitometrischen „Range“ von 256 Graustufen liegt daher Linearität vor.

6.2.2 TUNEL-assay

Variationskoeffizient:

Der Variationskoeffizient für den TUNEL-assay wurde anhand von 5 Gefrierschnitten der gleichen Klieschenleber ermittelt. Tab. 11 zeigt die Anzahl der positiv gezählten Zellkerne in jedem Bildausschnitt:

Tab. 11: Variationskoeffizient des TUNEL-assay

	Anzahl gezählter Zellkerne
Schnitt 1	163
Schnitt 2	142
Schnitt 3	158
Schnitt 4	188
Schnitt 5	134
Mittelwert	157
Standardabweichung	18,7
Variationskoeffizient	11,9 %

Der Variationskoeffizient beträgt 11,9 %. Es ist hier jedoch hinzuzufügen, daß die Auswahl der zu quantifizierenden Bildausschnitte, repräsentativ für den jeweiligen Schnitt, subjektiv erfolgt. Der ermittelte Variationskoeffizient kann daher nur eine Abschätzung über die Qualität der Methode liefern und nicht als absolute Kenngröße betrachtet werden.

6.3 Laborexperimente

6.3.1 Anthropogener Stressor Cadmium

LE 1:

Das LE1 stellt einen Vorversuch dar, in dem u.a. untersucht werden sollte, ob es einen Einfluß von Cadmium auf die Apoptose in Klieschenlebern gibt. Die Ergebnisse aus der Inkubation mit 1 mg/kg Cadmium (s. 4.1; Tab. 1) sind in Abb. 9 dargestellt. Die Messung erfolgte mittels DNA-Elektrophorese.

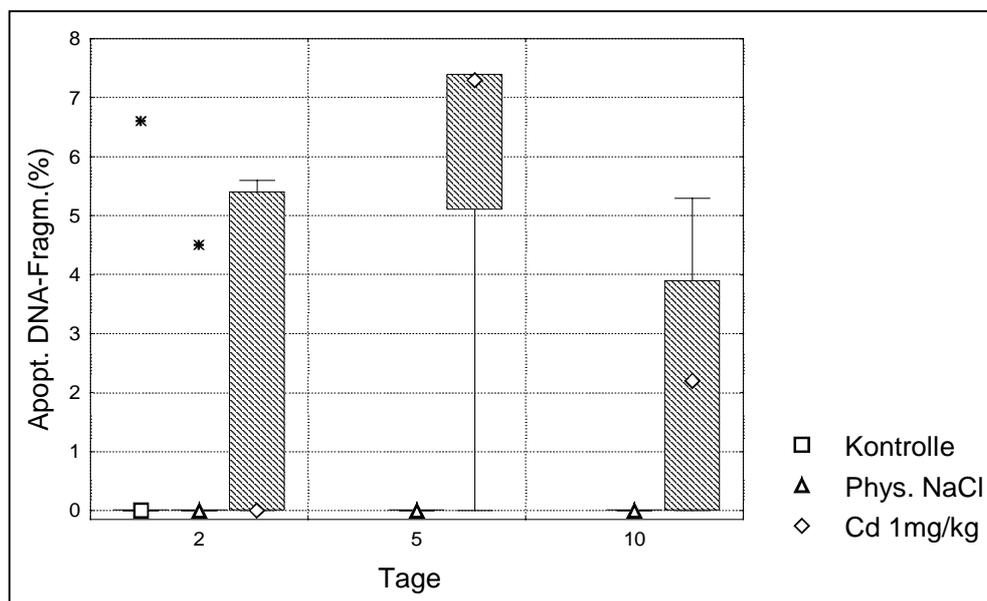


Abb. 9: LE1; Box-Whisker-Plot (* Extremwert) der apoptotischen DNA-Fragmentierung in Klieschenlebern nach Inkubation mit 1 mg/kg Cadmium

Es kommt zu einer Induktion von Apoptose mit einem Maximum am 5. Tag. Die Mediane der unbehandelten Kontrollgruppe und der Lösungsmittel-Kontrollgruppen bleiben über den gesamten Versuchszeitraum bei 0 %. In den Cadmium-Versuchsgruppen steigt der Median von 0 % am 2. Tag auf 7,3 % am 5. Tag und fällt auf 2,2 % am 10. Tag. Die Erhöhung der Apoptose am 5. Tag ist signifikant ($p = 0,037$).

Es besteht eine hoch signifikante Korrelation zwischen der apoptotischen DNA-Fragmentierung und den Cadmium-Gehalten in den Lebern ($p = 0,006$).

Zu den Einzelwerten s. Anhang 9.7; Tab. 15.

LE Cd:

Nachdem im LE1 gezeigt werden konnte, daß Apoptose durch Cadmium induzierbar ist, wurden Kliesen im LE Cd (s. 4.1; Tab. 2) in 4 unterschiedlichen Konzentrationen mit Cadmium inkubiert, wobei auch um den Faktor 100 und 10 niedrigere Konzentrationen (10, bzw. 100 µg Cd/kg) eingesetzt wurden, um den Schwellenwert für die Induktion zu ermitteln. Die Ergebnisse aus dem Versuch, gemessen mittels DNA-Elektrophorese, sind in Abb. 10 gezeigt.

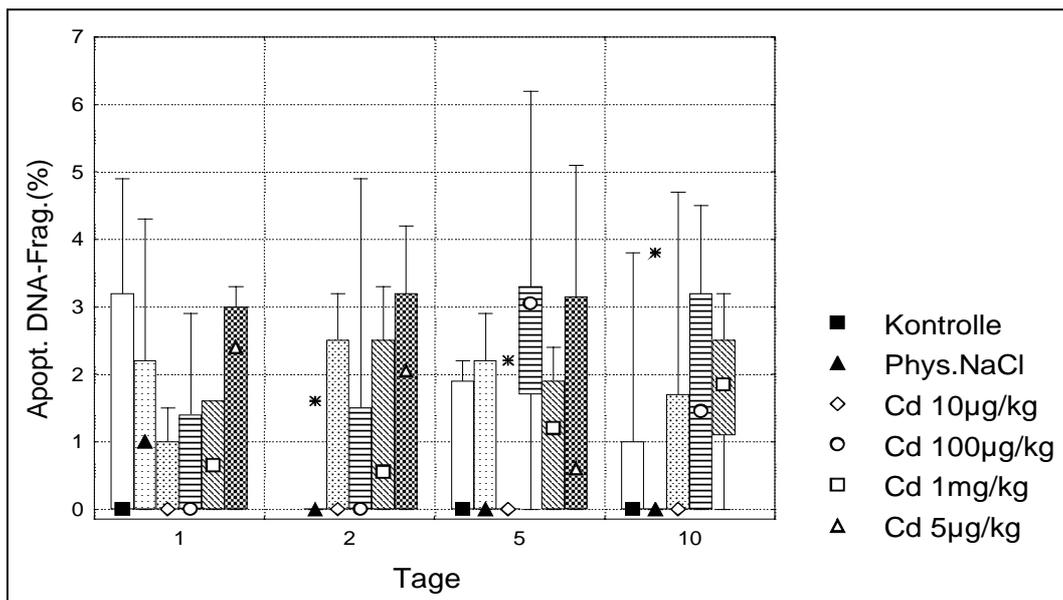


Abb. 10: LE Cd; Box-Whisker-Plot (* Extremwert) der apoptotischen DNA-Fragmentierung in Kliesenlebern nach Inkubation mit Cadmium in unterschiedlichen Konzentrationen

Am 1. Tag wird die höchste Induktion von Apoptose mit der Konzentration von 5 mg/kg erreicht. Der Median beträgt 2,4 % apoptotische DNA-Fragmentierung.

Die Mediane der unbehandelten Kontrollgruppen betragen über den gesamten Versuchszeitraum 0 %. Dies gilt ebenfalls für die mit 10 µg/kg inkubierten Gruppen, für die Lösungsmittel-Kontrollgruppen (phys. NaCl) mit Ausnahme des 1. Tages, und für die 100 µg/kg Gruppen am 1. und 2. Tag.

Die höchste Induktion apoptotischer DNA-Fragmentierung wird mit 100 µg Cadmium/kg erreicht, mit dem Maximum am 5. Tag und einem Median von 3,1 %. Am 10. Tag ist die Apoptoserate ebenfalls erhöht. Der Median beträgt in dieser Gruppe 1,5 %.

Die mit 1 mg/kg inkubierten Versuchsgruppen haben an allen Tagen erhöhte Apoptoseraten. Die Mediane steigen von 0,7 % am 1. Tag auf 1,9 % am 10. Tag.

Die Versuchsreihe mit 5 mg/kg konnte nicht bis zum Ende geführt werden, da bereits am 5. Tag aufgrund der starken Intoxikation 8 Fische gestorben waren.

Am 5. Tag standen daher nur noch 4 Fische für die Untersuchungen zur Verfügung. Die Apoptoseraten waren im Vergleich zu den Kontrollgruppen auch am 2. und 5. Tag erhöht (Mediane = 2,0 und 0,6 %).

Im LE Cd kann gezeigt werden, daß Apoptose ab einer Inkubationskonzentration von 100 µg Cadmium/kg induziert wird. Höhere Konzentrationen führen nicht zu einer weiteren Erhöhung der Apoptoserate. Die gemessene Apoptose korreliert signifikant mit den Cadmiumgehalten in der Leber ($p = 0,013$).

Zu den einzelnen Meßwerten s. Anhang 9.7; Tab. 16.

Parallel zur Elektrophorese wurden die Proben aus dem LE Cd auch mittels TUNEL-assay analysiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 11 gezeigt.

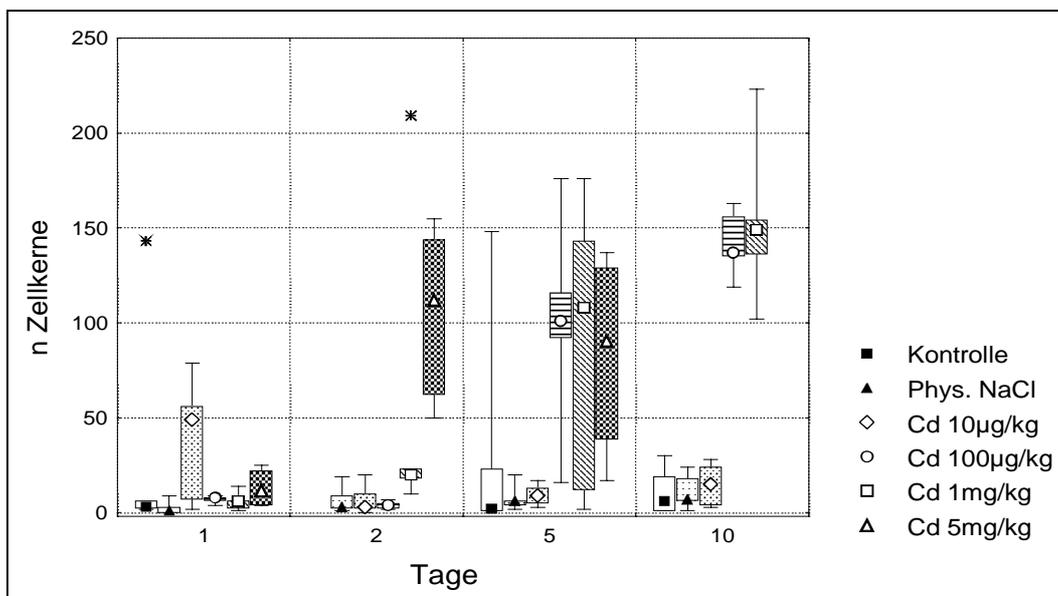


Abb. 11: LE Cd; Box-Whisker Plot (* Extremwert) der mittels TUNEL-assay markierten Zellkerne in Gefrierschnitten von Klieschenlebern nach Inkubation mit Cadmium unterschiedlicher Konzentrationen

Parallel zu den Ergebnissen aus der elektrophoretischen Bestimmung von Apoptose zeigt sich beim TUNEL-assay keine erhöhte Markierung von Zellkernen in Klieschen aus den unbehandelten Kontrollgruppen, den Lösungsmittel-Kontrollgruppen und den 10 µg/kg Inkubationsgruppen. Die Mediane liegen zwischen 1 und 15 gezählten Zellkernen pro Bildausschnitt, bei 10 µg/kg am 1. Tag liegt er sogar bei 49 Zellkernen.

Nach Inkubation mit 100 µg/kg kommt es am 5. und 10. Tag zu einer hoch signifikant ($p < 0,001$) verstärkten TUNEL-Färbung. Die Mediane liegen bei 101 bzw. 137 Zellkernen.

Nach Inkubation mit 1 mg/kg Cadmium kommt es zu einer zeitabhängigen Erhöhung TUNEL-markierter Zellkerne. Der Median beträgt am 2. Tag 20, am 5. Tag 108 und am 10. Tag 149 gezählte Zellkerne. Die Erhöhung am 10. Tag ist hoch signifikant ($p < 0,001$).

Die Inkubation mit 5 mg/kg resultiert bereits am 2. Tag in einer signifikanten ($p = 0,019$) Erhöhung TUNEL-markierter Zellkerne (Median = 112). Am 5. Tag beträgt der Median 91.

Die Ergebnisse des TUNEL-assay korrelieren hoch signifikant ($p < 0,001$) mit den gemessenen Cadmiumgehalten der Klieschenlebern.

Zu den Einzelwerten s. Anhang 9.7; Tab. 16.

Die beiden Methoden Elektrophorese und TUNEL-assay korrelieren nicht signifikant ($p = 0,080$). Die Unterschiede lassen sich dadurch erklären, daß der TUNEL-assay nicht spezifisch apoptotische DNA-Strangbrüche in Zellkernen markiert, sondern auch ungerichtete Strangbrüche, z.B. nekrotischer Zellen.

Die zeitabhängig zunehmende Färbung von Zellkernen in Klieschen, die mit 100 µg/kg, 1 mg/kg bzw. 5 mg/kg Cadmium inkubiert wurden, zeigt an, daß es hier zum starken Auftreten von DNA-Strangbrüchen gekommen ist, die aufgrund von toxischen Effekten im Lebergewebe entstanden sind und nur zu einem geringen Teil durch Apoptose verursacht wurden.

6.3.2 Anthropogener Stressor PCB 118

LE 1:

Im LE1 (s. 4.1; Tab. 1) wurde überprüft, ob es eine Wirkung von PCB 118 auf die Apoptose gibt. Die Konzentration betrug 1 mg/kg Fischgewicht. Die Ergebnisse aus diesem Experiment sind in Abb. 12 dargestellt.

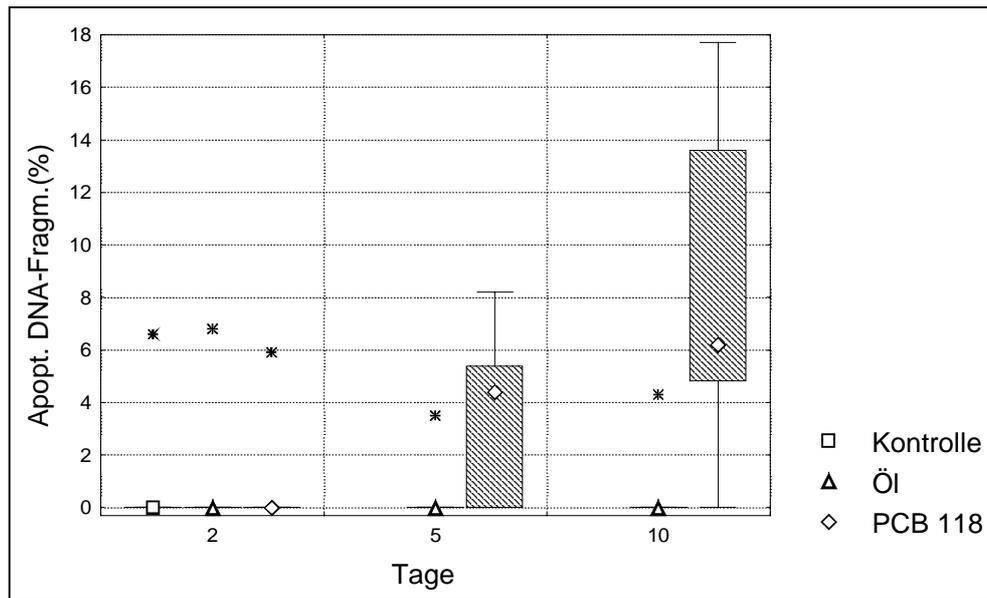


Abb. 12: LE1; Box-Whisker-Plot (* Extremwert) der apoptotischen DNA-Fragmentierung in Klieschenlebern nach Inkubation mit 1 mg/kg PCB 118

Analog zu den im LE1 mit Cadmium inkubierten Fischen (s. Abb. 9) weisen die unbehandelte Kontrollgruppe und die Lösungsmittel-Kontrollgruppen (Öl) mit Medianen von 0 % über den gesamten Versuchszeitraum keine meßbare apoptotische DNA-Fragmentierung auf.

Hingegen resultiert die Injektion mit PCB 118 als Stressor in einer Zunahme der Apoptose. Am 2. Tag liegt der Median noch auf dem Niveau der Kontrollgruppen (Median = 0 %), und steigt dann auf 4,4 % am 5. Tag und auf 6,2 % am 10. Tag. Die Induktion der Apoptose durch PCB 118 am 10. Tag ist signifikant ($p = 0,047$).

Zu den einzelnen Meßwerten s. Anhang 9.7; Tab. 15.

LE PCB 118:

Im LE PCB 118 (s. 4.1; Tab. 3) sollten mögliche Effekte des Stressors PCB 118 in niedrigeren, umweltrelevanteren Konzentrationen auf die Apoptose überprüft werden. Im Gegensatz zu den vorherigen Versuchen fand das LE PCB 118 nicht im Februar statt, sondern im Juli. Die Ergebnisse daraus sind in Abb. 13 und 14 dargestellt.

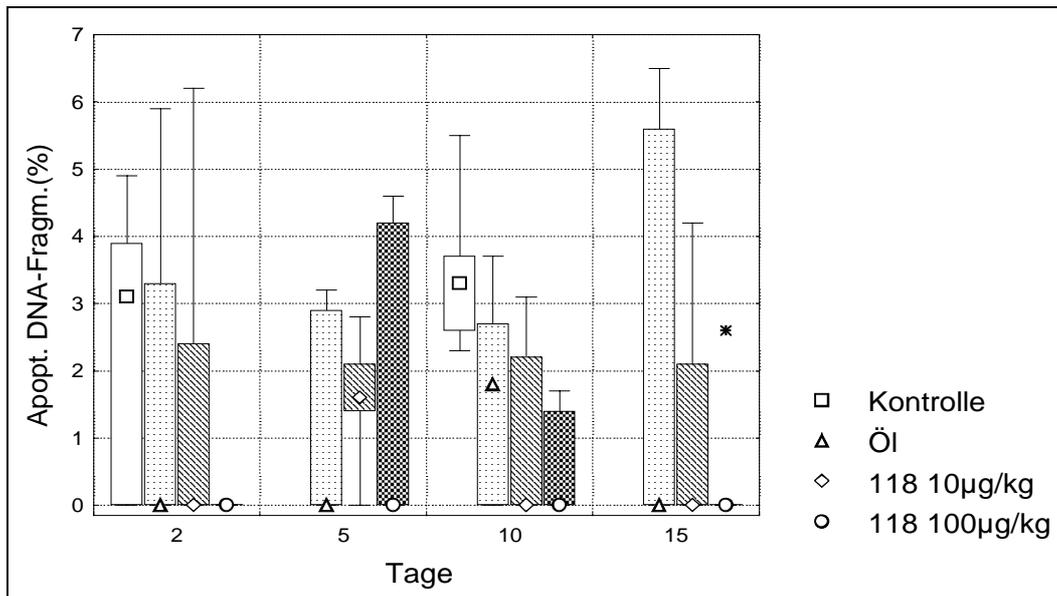


Abb. 13: LE PCB 118; Box-Whisker-Plot (* Extremwert) der apoptotischen DNA-Fragmentierung in Klieschenlebern nach Inkubation mit PCB 118 in unterschiedlichen Konzentrationen

Im Unterschied zu dem im Februar durchgeführten LE 1 führt eine Inkubation mit PCB 118 in einem im Juli durchgeführten Experiment nicht zur Induktion von Apoptose. Wie in Abb. 13 ersichtlich, kommt es zu einer konzentrationsabhängigen Reduzierung der Apoptoserate in den Klieschenlebern, die deutlich durch die Verkleinerung der Boxen angezeigt wird.

Die unbehandelten Kontrollfische weisen sowohl am 2. Tag als auch am 10. Tag die höchsten Werte auf mit Medianen von 3,1 %, bzw. 3,3 %.

Die Lösungsmittel-Kontrollgruppen (Öl) zeigen leicht verminderte Apoptose im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollgruppen. Die Medianen Werte betragen außer am 10. Tag (1,8 %) jeweils 0 %. Die mit 10 µg/kg behandelten Fische haben, außer am 5. Tag (Median = 1,6 %), im Vergleich zu allen Kontrollgruppen reduzierte Apoptoseraten (Mediane = 0 %). Die Abnahme der Apoptose wird in den mit 100 µg/kg inkubierten Fischen fortgeführt. Außer am 5. Tag weisen diese Gruppen an allen anderen Tagen die geringste Apoptose auf. Die Mediane der apoptotischen DNA-Fragmentierung liegen über dem gesamten Versuchszeitraum bei 0 %.

Die Abnahme der Apoptose im Vergleich zur Kontrolle ist bei den mit 10 µg/kg behandelten Fischen am 10. Tag signifikant ($p = 0,028$) und bei den mit 100 µg/kg behandelten sowohl am 10. Tag ($p = 0,009$) als auch am 15. Tag ($p = 0,022$).

Im LE PCB 118 wird deutlich, daß die Jahreszeit, in der die Experimente durchgeführt werden, von entscheidender Bedeutung für die Effekte des Stressors auf die Apoptose ist.

Während es zu einer Induktion von Apoptose kommt, wenn im Februar die Kontrollfische mittels Elektrophorese kaum meßbare Apoptose aufweisen, zeigt sich im Juli, wo die Kontrollfische hohe Raten an Apoptose aufweisen, der gegenteilige Effekt. Es kommt zu einer konzentrationsabhängigen Reduzierung der Apoptoserate.

Zu den einzelnen Meßwerten s. Anhang 9.7; Tab. 17.

Das LE PCB 118 wurde zusätzlich mittels TUNEL-assay ausgewertet. Die Ergebnisse aus dem TUNEL-assay sind in Abb. 14 dargestellt.

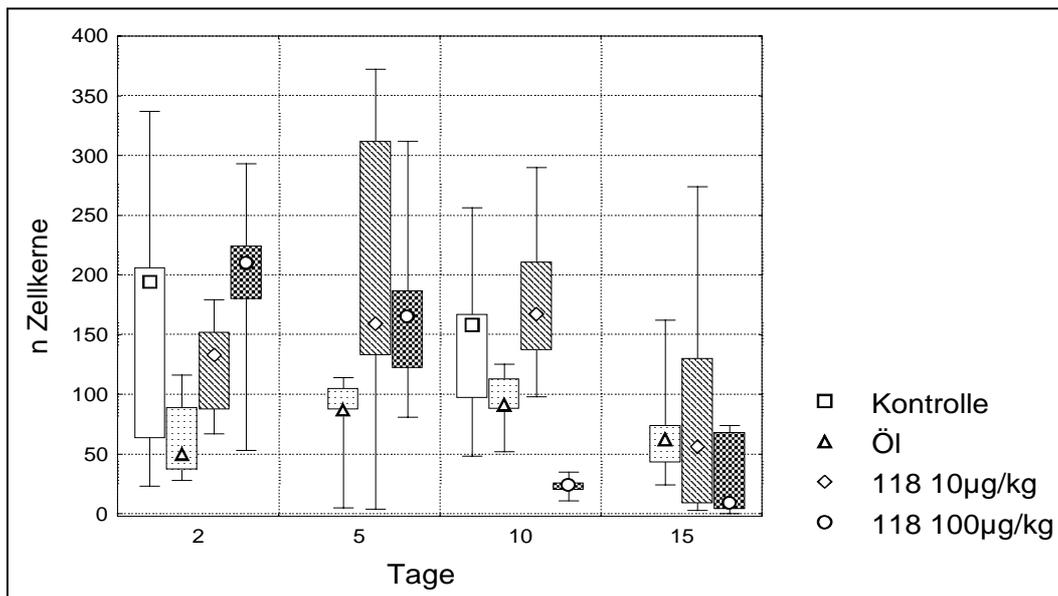


Abb. 14: LE PCB 118; Box-Whisker-Plot der mittels TUNEL-assay gefärbten Zellkerne in Gefrierschnitten von Klieschenlebern nach Inkubation mit PCB 118 in unterschiedlichen Konzentrationen

Analog zu den Ergebnissen der elektrophoretischen Bestimmung ist auch mittels TUNEL-assay innerhalb des Versuchszeitraums von 15 Tagen eine konzentrationsabhängige Abnahme an Strangbrüchen zu beobachten. Am 2. Tag der Inkubation tritt jedoch zusätzlich ein anderer Effekt auf, der mittels Elektrophorese nicht zu erfassen ist. Die unbehandelte Kontrollgruppe zeichnet sich auch hier durch ein hohes Maß an Strangbrüchen aus (Median = 194), wohingegen bei der Lösungsmittel-Kontrollgruppe (Median = 50) eine Abnahme TUNEL-positiver Zellkerne zu beobachten ist.

Diese Effekte decken sich mit den Ergebnissen der Elektrophorese und bestätigen die Abnahme der Apoptose nach Injektion mit dem Lösungsmittel Öl. Die Schadstoffgruppen zeigen dagegen eine konzentrationsabhängige Zunahme TUNEL-positiv markierter Zellkerne. Dies deutet auf eine Induktion von DNA-Strangbrüchen hin, die nicht im Zusammenhang mit Apoptose stehen.

Die medianen Werte betragen für die mit 10 µg/kg inkubierten Fische 133 markierte Zellkerne und für die mit 100 µg/kg inkubierten 210 markierte Zellkerne. Diese Zunahme ist im Vergleich zur Öl-Gruppe signifikant ($p = 0,028$).

Am 5. Tag nivelliert sich dieser Effekt. Die Öl-Kontrolle weist einen Median von 87 auf, die 10 µg/kg-Gruppe einen von 159 und die 100 µg/kg-Gruppe hat im Median 165 positiv gefärbte Zellkerne. Wie im Box-Whisker-Plot deutlich dargestellt, setzt eine vermehrte Induktion von DNA-Strangbrüchen bei den mit 10 µg/kg inkubierten Fischen später, d.h. erst am 5. Tag, ein, als bei den mit 100 µg/kg inkubierten Fischen, die das Maximum bereits am 2. Tag aufweisen.

Nach 10 und 15 Inkubationstagen ist dann die konzentrationsabhängige Abnahme wieder zu beobachten. Die unbehandelte Kontrolle hat am 10. Tag einen unveränderten Level TUNEL-positiver Zellkerne (Median = 158), die Öl-Gruppe liegt leicht darunter (Median = 91, bzw. 62). Die mit 10 µg/kg behandelten Gruppen haben am 10. Tag noch einen Median von 167, der am 15. Tag auf 56 absinkt. Die 100 µg/kg Fische weisen schon am 10. Tag einen im Vergleich zu den Kontrollgruppen hoch signifikant erniedrigten ($p = 0,009$) Median von nur 24 TUNEL-positiven Zellkernen pro Bildausschnitt auf, der am 15. Tag auf den Wert von 9 absinkt. Die Abnahme vom 5. Tag zum 10. und 15. Tag ist hoch signifikant ($p = 0,009$).

Am 15. Tag ist in den Box-Whisker-Plots wieder die eindeutige Korrelation der Ergebnisse beider Methoden zu erkennen. Es ist daher davon auszugehen, daß am 15. Tag mittels TUNEL-assay hauptsächlich apoptotische Zellkerne markiert wurden und andere Formen von Strangbrüchen keine wesentliche Rolle mehr spielen.

Der TUNEL-assay bestätigt somit die Resultate, die mit der Elektrophorese im LE PCB 118 gewonnen wurden. Es kommt nach Inkubation mit PCB 118 zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Apoptose. Zusätzlich zeigt der TUNEL-assay, daß PCB 118 über einen Zeitraum von mindestens 5 Tagen DNA-Strangbrüche induziert, die u.a. aufgrund von Nekrose entstanden sein können.

Zu den einzelnen Meßwerten s. Anhang 9.7; Tab. 17.

6.3.3 Anthropogener Stressor PCB 77

LE 1:

Im LE1 (s. 4.1; Tab. 1) wurde wiederum zuerst geprüft, ob PCB 77 Apoptose in Klieschenlebern induziert. Analog zu den anderen beiden Stressoren war auch hier die Inkubationskonzentration 1 mg/kg Fischgewicht. Im Gegensatz zu Cadmium und PCB 118 kam es durch PCB 77 in der gewählten Konzentration nicht zu einer deutlichen Induktion von Apoptose. Die DNA zeigte dafür nach elektrophoretischer Trennung einen „DNA-Schmier“, der durch ungerichtete DNA-Fragmentierung, wie sie z.B. für nekrotischen Zelltod typisch ist, entsteht (Einzelwerte s. Anhang 9.7; Tab. 15).

Die parallele Durchführung des TUNEL-assay resultierte in einer Vielzahl markierter Zellkerne, wodurch bestätigt wurde, daß im Versuch DNA-Strangbrüche induziert wurden. Es ist zu vermuten, daß die Inkubationskonzentration von 1 mg/kg des stark toxischen PCB 77 zu hoch war, um einen aktiven Vorgang wie die Apoptose zu induzieren, und das Gewebe statt dessen durch das vermehrte Auftreten des passiven Zelltods Nekrose geschädigt wurde.

LE PCB 77:

Im LE PCB 77 (s. 4.1; Tab. 4) wurde die Inkubation mit PCB 77 in niedrigeren und umweltrelevanteren Konzentrationen wiederholt. Die Ergebnisse aus der elektrophoretischen Bestimmung sind in Abb. 15 dargestellt.

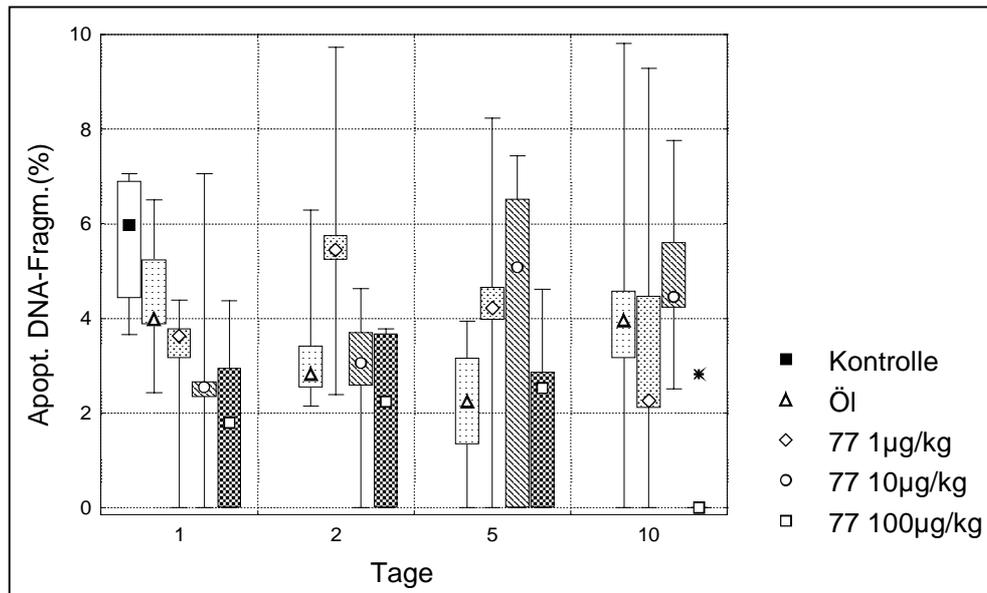


Abb. 15: LE PCB 77; Box-Whisker-Plot (* Extremwert) der apoptotischen DNA-Fragmentierung in Kliesenlebern nach Inkubation mit PCB 77 in unterschiedlichen Konzentrationen

Das LE PCB 77 ist wiederum im Juli durchgeführt worden. Eine unbehandelte Kontrollgruppe konnte nur am 1. Tag mitgeführt werden. Diese zeigt jedoch deutlich eine hohe Rate (Median = 6,0 %) an Apoptose in den Kliesenlebern zu dieser Jahreszeit.

Analog zum LE PCB 118, das ebenfalls im Juli durchgeführt wurde, führt auch die Inkubation mit PCB 77, trotz Schwankungen einzelner Versuchsgruppen an einzelnen Tagen, zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Apoptose.

Die Lösungsmittel-Kontrollgruppen zeigen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine geringfügig verminderte apoptotische DNA-Fragmentierung mit medianen Werten von 4,0 %, 2,8 %, 2,2 % und 4,0 % an den einzelnen Untersuchungstagen.

Die apoptotische DNA-Fragmentierung der mit 1 µg/kg behandelten Fische zeigt am 1. Tag (Median = 3,6 %) und am 10. Tag (Median = 2,3 %) eine Abnahme im Vergleich zu den Kontrollgruppen, am 2. und 5. Tag liegen die Werte mit Medianen von 5,4 % und 4,2 % in Höhe der unbehandelten Kontrollgruppe.

Mit 10 µg/kg inkubierte Fische zeigen am 1. und 2. Tag verminderte Apoptose mit Medianen von 2,5 und 3,1 %. Am 5. und 10. Tag unterscheiden sich die Mediane mit 5,1 und 4,5 % nicht wesentlich von der unbehandelten Kontrollgruppe.

Die stärkste Abnahme an Apoptose wird mit der höchsten Konzentration von 100 µg/kg erreicht. Der Effekt erstreckt sich über den ganzen Versuchszeitraum von 10 Tagen. Am 1. Tag sinkt die Apoptoserate (Median = 1,8 %) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikant ($p = 0,027$). An den anderen Untersuchungstagen ist sie ebenfalls mit Medianen von 2,2 % (2. Tag), 2,5 % (5. Tag) und 0 % am 10. Tag deutlich niedriger als die anderen Versuchsgruppen. Am 10. Tag ist die Abnahme an apoptotischer DNA-Fragmentierung signifikant im Vergleich zur Lösungsmittel-Kontrollgruppe ($p = 0,047$) und zur 10 µg/kg Gruppe ($p = 0,016$) (Einzelwerte s. Anhang 9.7; Tab. 18).

Zum LE PCB 77 wurden auch einige Proben mittels TUNEL-assay analysiert. Es standen dafür nur die Proben der 1 µg/kg- und der 10 µg/kg-Gruppen zur Verfügung. Die Ergebnisse sind in Abb. 16 dargestellt.

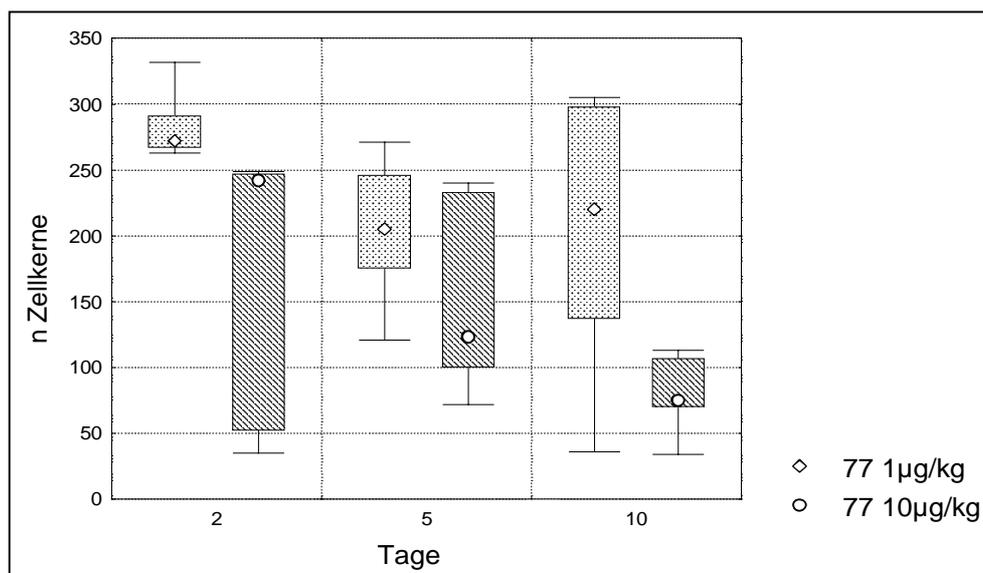


Abb. 16: LE PCB 77; Box-Whisker-Plot der mittels TUNEL-assay gefärbten Zellkerne in Gefrierschnitten von Klieschenlebern nach Inkubation mit PCB 77 in unterschiedlichen Konzentrationen

Die Färbung der Schnitte im LE PCB 77 mittels Tunel-assay zeigt für die mit 1 µg/kg und 10 µg/kg PCB 77 inkubierten Fische wieder eine konzentrationsabhängige Abnahme markierter Zellkerne über den gesamten Versuchszeitraum. Die medianen Werte betragen 272 (1 µg/kg) und 242 (10 µg/kg) markierte Zellkerne pro Bildausschnitt am 2. Tag.

Am 5. Tag betragen die Mediane der 1 µg/kg-Gruppe 205 und der 10 µg/kg-Gruppe 123 markierte Zellkerne, und am 10. Tag liegen sie bei 220, bzw. 75 positiven Zellkernen.

Zu den Einzelwerten s. Anhang 9.7; Tab. 18.

6.3.4 Natürliche Stressoren Salzgehalt und Temperatur

LE NS 1:

Im LE NS 1 wurden Klieschen für einen Zeitraum von 7 Tagen einer Temperaturerhöhung von 5 °C oder einer Reduktion der Salinität um 8 ‰ ausgesetzt (s. 4.1; Tab. 5). Die mittels Elektrophorese erhaltenen Ergebnisse sind in Abb. 17 dargestellt.

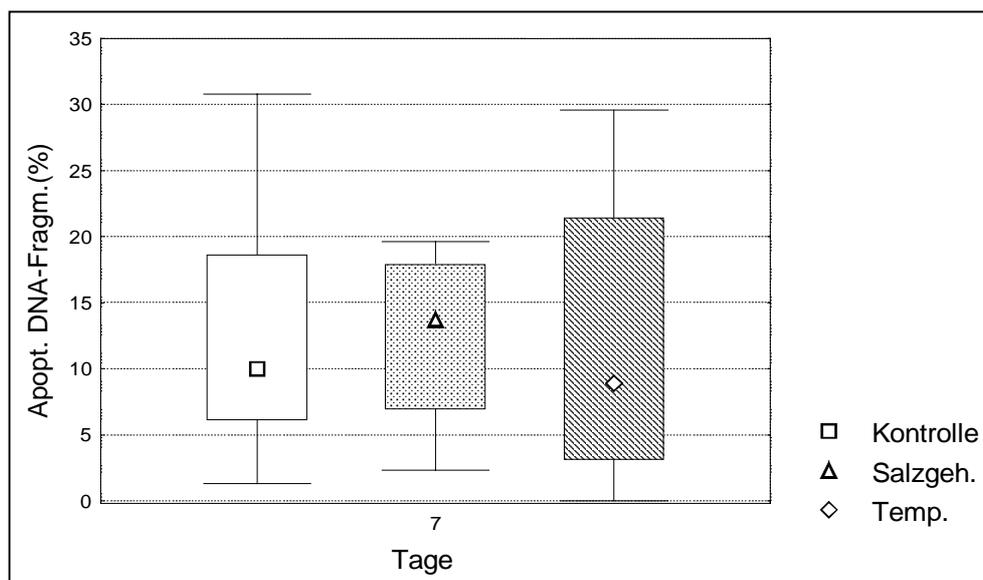


Abb. 17: LE NS 1; Box-Whisker-Plot der apoptotischen DNA-Fragmentierung in Klieschenlebern nach Erhöhung der Temperatur um 5 °C oder Reduzierung der Salinität um 8 ‰

Der Versuch wurde im November durchgeführt. Sowohl die unbehandelten Kontrollfische als auch die den natürlichen Stressoren ausgesetzten Fische haben hohe Apoptoseraten. Es gibt keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen. Der Median der Kontrolle liegt bei 10,0 %, der der Salzgehalt-Gruppe bei 13,8 % und der der Temperatur-Gruppe bei 8,9 % apoptotischer DNA-Fragmentierung.

Die Erhöhung der Temperatur um 5 °C und die Reduzierung des Salzgehalts um 8 ‰ hatten keinen Einfluß auf die Apoptose.

Zu den Einzelwerten s. Anhang 9.7; Tab. 19.

LE NS 2:

Im LE NS 2 wurden zu einer anderen Jahreszeit (April) die Bedingungen des LE NS 1 der natürlichen Stressoren wiederholt. Die Probenahme erfolgte in drei Zeitintervallen (s. 4.1; Tab. 6).

Abb. 18 zeigt die mittels Elektrophorese erhaltenen Ergebnisse.

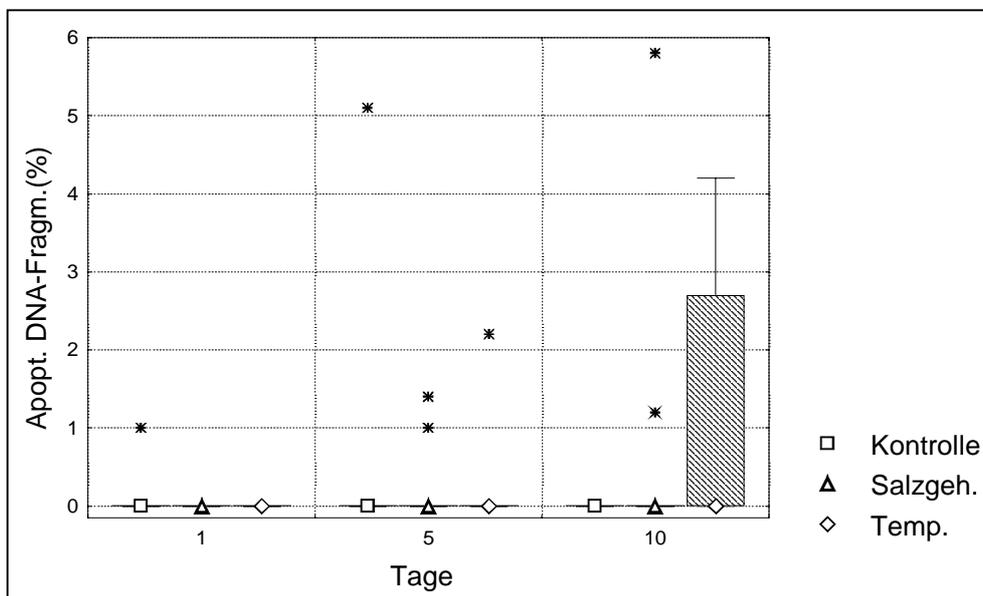


Abb. 18: LE NS 2; Box-Whisker-Plot (* Extremwert) der apoptotischen DNA-Fragmentierung in Klieschenlebern nach Erhöhung der Temperatur um 5 °C oder Reduzierung der Salinität um 8 ‰

Wie in Abb. 18 ersichtlich, resultieren auch im April die natürlichen Stressoren Temperaturerhöhung und Reduktion des Salzgehalts nicht in einer signifikanten Erhöhung der apoptotischen DNA-Fragmentierung. Die Mediane aller Gruppen betragen 0 %.

Die Box in der Temperatur-Gruppe am 10. Tag ergibt sich aus drei Meßwerten über 0 % und unterscheidet sich damit nicht von den anderen Gruppen, die bis zu zwei Fischen (Extremwerte) über der Nachweisgrenze aufweisen.

Zu den einzelnen Meßwerten s. Anhang 9.7; Tab. 20.

LE NS 2 wurde zusätzlich mittels TUNEL-assay ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Abb. 19 dargestellt.

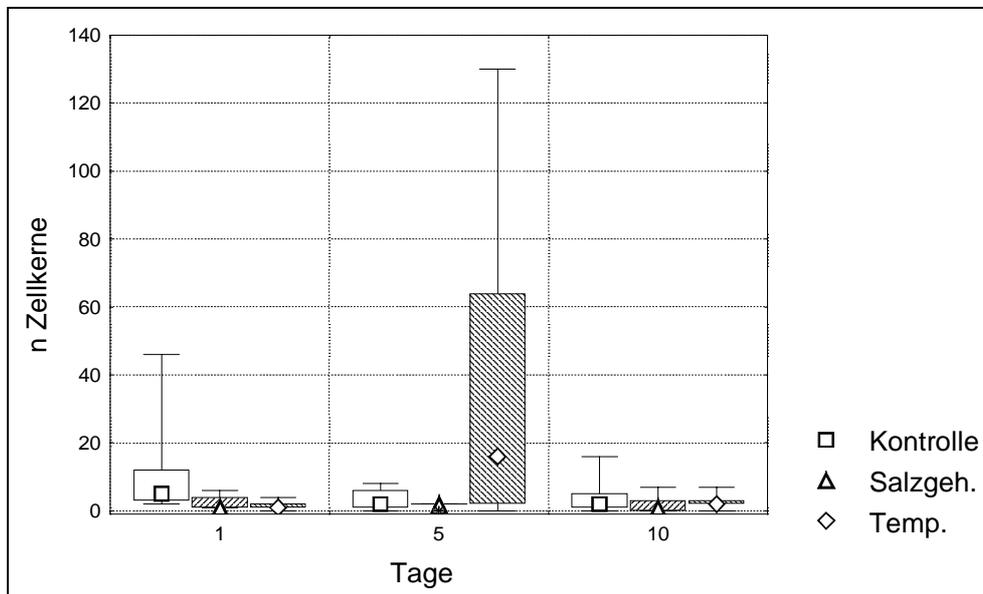


Abb. 19: LE NS 2; Box-Whisker-Plot der mittels TUNEL-assay gefärbten Zellkerne in Gefrierschnitten von Klieschenlebern nach Erhöhung der Temperatur um 5 °C oder Reduzierung des Salzgehalts um 8 ‰

Wie in Abb. 19 ersichtlich, sind analog zu den niedrigen Werten der Apoptose aus der Elektrophorese (s. Abb. 18) auch die mittels TUNEL-assay markierten Zellkerne sehr gering. (Einzelwerte: s. Anhang 9.7; Tab. 20). Es wird damit bestätigt, daß im April kaum Apoptose und damit kaum apoptotische Fragmente in den Klieschenlebern vorkommen. Die medianen Werte der einzelnen Gruppen betragen für die Kontrollen 5 (1. Tag) und 2 (5. und 10. Tag) markierte Zellkerne pro Bildausschnitt, für die Salzgehalt-Gruppen 1 (1. und 10. Tag) und 2 (5. Tag) Zellkerne und für die Temperatur-Gruppen 1 (1. Tag), 16 (5. Tag) und 2 (10. Tag) markierte Zellkerne.

Am 5. Tag kommt es nach Erhöhung der Temperatur um 5 °C zu einer signifikanten Erhöhung ($p = 0,031$) TUNEL-positiver Zellkerne, die am 10. Tag nicht mehr besteht.

Diese Erhöhung ist mittels Elektrophorese nicht zu erkennen. Es ist daher anzunehmen, daß es sich bei den mittels TUNEL-assay markierten Zellen entweder um apoptotische Zellen handelt, die unter der Nachweisgrenze der elektrophoretischen Bestimmung liegen, oder daß während der Temperaturerhöhung ungerichtete DNA-Strangbrüche induziert wurden, die mittels Elektrophorese nicht detektiert werden.

6.4 Freilanduntersuchungen

6.4.1 WH 191

Die 191. Reise der „Walther Herwig III“ fand im Dezember 1997 statt. Zur Lage und Charakteristika der Stationen s. Kapitel 4.2.

In Abb. 24 sind die Ergebnisse aus der elektrophoretischen Bestimmung dargestellt.

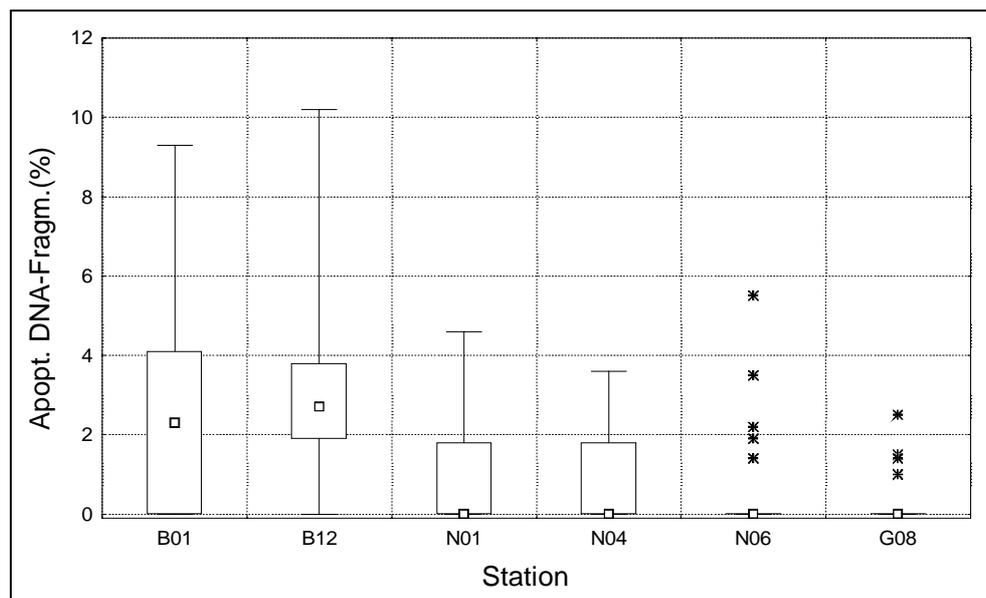


Abb. 20: WH 191; Box-Whisker-Plot (* Extremwert) der apoptotischen DNA-Fragmentierung in Klieschenlebern an 6 Stationen in Nord- und Ostsee; Dezember 1997

Wie in Abb. 20 ersichtlich, weisen die Ostsee-Stationen höhere Apoptoseraten auf, als die Nordsee-Stationen, wobei die Apoptoserate der Station B12 etwas höher ist als die der Station B01. Der Median der apoptotischen DNA-Fragmentierung beträgt an B01 2,3 % und an B12 2,7 %. An allen Nordsee-Stationen dagegen liegt er bei 0 %.

Die Ostsee-Station B01 unterscheidet sich signifikant von den Stationen N01 ($p = 0,031$) und N04 ($p = 0,028$) und hoch signifikant von den Stationen N06 ($p = 0,008$) und G08 ($p = 0,003$). Die Ostsee-Station B12 unterscheidet sich von allen Nordsee-Stationen hoch signifikant ($p = 0,001$ (N01); $p < 0,001$ (N04, N06, G08)).

Zwischen den beiden Ostsee-Stationen und zwischen den vier Nordsee-Stationen gibt es keine signifikanten Unterschiede.

An den Stationen N06 und G08 ist die geringste Apoptoserate zu messen.

Zu den Einzelergebnissen s. Anhang 9.7; Tab. 21.

Die mittels Elektrophorese gemessene Apoptose korreliert invers signifikant ($p = 0,020$) mit den Cadmium-Gehalten der Leber und invers hoch signifikant mit den Zink-Gehalten ($p = 0,001$).

Ferner korreliert sie invers signifikant mit dem Gonadosomatischen Index (GSI)¹ ($p = 0,022$) und mit der Länge ($p = 0,039$) der Fische. Hoch signifikante negative Korrelation besteht ebenfalls zur gemessenen Wassertemperatur ($p < 0,001$).

Die Apoptose korreliert im Dezember dagegen nicht mit den exemplarisch ausgewählten organischen Schadstoffen PCB 28, PCB 153 und DDE.

Die Lebern der Klieschen von der 191. Reise wurden ebenfalls mittels TUNEL-assay in Gefrierschnitten analysiert. Die Ergebnisse dieser Reise sind in Abb. 21 gezeigt.

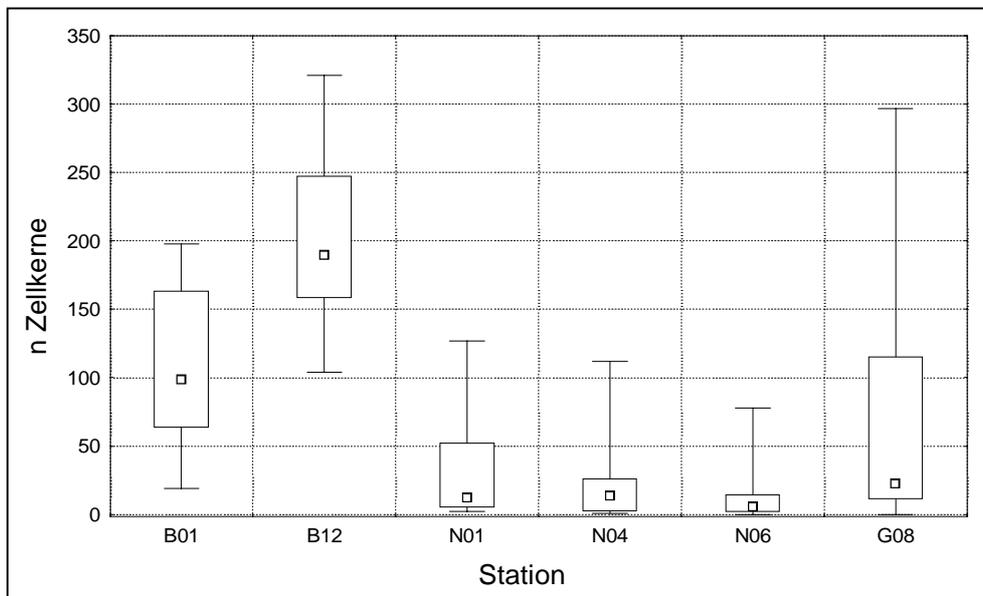


Abb. 21: Box-Whisker-Plot der mittels TUNEL-assay gefärbten Zellkerne in Gefrierschnitten von Klieschenlebern an 6 Stationen in Nord- und Ostsee; Dezember 1997

Die Ergebnisse aus dem TUNEL-assay zeigen mit Ausnahme der Station G08 die gleiche Verteilung wie die Ergebnisse der elektrophoretischen Trennung. Die Ostsee-Stationen haben erhöhte Werte mit Medianen von 99 (B01) und 190 (B12) markierten Zellkernen. Die Station B12 unterscheidet sich hoch signifikant ($p = 0,008$) von der Station B01.

¹ GSI (Gonadosomatischer Index):

$\frac{\text{Gonadengewicht} \times 100}{\text{Fischgewicht (ohne Gonaden und Verdauungsorgane)}}$

Von den Nordsee-Stationen unterscheidet sich die Station B01 signifikant, bzw. hoch signifikant von den Stationen N01 ($p = 0,014$), N04 ($p = 0,010$) und N06 ($p = 0,005$), und die Station B12 hoch signifikant von allen anderen ($p < 0,001$).

Die medianen Werte der Nordsee-Stationen betragen für N01 12, für N04 14, für N06 6 und für G08 23 TUNEL-positive Zellkerne.

Zu den einzelnen Meßwerten s. Anhang 9.7; Tab. 21.

Die Ergebnisse der elektrophoretischen Bestimmung und des TUNEL-assay korrelieren signifikant ($p = 0,008$). Aufgrund dieser Tatsache kann davon ausgegangen werden, daß mit der TUNEL-Färbung im wesentlichen apoptotische Zellkerne erfaßt wurden und der TUNEL-assay eine reproduzierbare und empfindliche Methode ist, in Freilandproben Apoptose zu messen. Ein vermehrtes Auftreten von zufälligen DNA-Strangbrüchen und Nekrose ist in Freilandfischen im Gegensatz zu solchen aus Laborexperimenten, die mit höheren Konzentrationen an Schadstoffen inkubiert wurden, nicht wahrscheinlich.

Ein Unterschied, der sich aus den beiden Methoden ergibt, ist das Ergebnis der Station G08. Während in der Elektrophorese kaum apoptotische DNA-Fragmentierung gemessen werden konnte, sind die Werte mittels TUNEL-assay die höchsten in der Nordsee.

Ob es sich bei den TUNEL-markierten Zellkernen um apoptotische handelt, die eventuell mittels Elektrophorese nicht erfaßt werden konnten, oder ob in diesen Zellen vermehrt ungerichtete Strangbrüche auftreten, kann ohne morphologische Betrachtung im Elektronenmikroskop nicht eindeutig gesagt werden.

Bezüglich der anderen Parametern besteht eine inverse signifikante Korrelation zu den Cadmium-Gehalten ($p = 0,002$) und zu den Zink-Gehalten ($p = 0,068$) der Lebern. Die Wassertemperatur korreliert invers hoch signifikant ($p < 0,001$) zu den Werten des TUNEL-assay.

6.4.2 WH 195

Die 195. Reise der „Walther Herwig III“ erfolgte im Mai 1998. Es wurden die gleichen Stationen wie auf der 191. Reise beprobt (s. 4.2).

Die Ergebnisse aus der elektrophoretischen Bestimmung der Apoptose sind in Abb. 22 dargestellt.

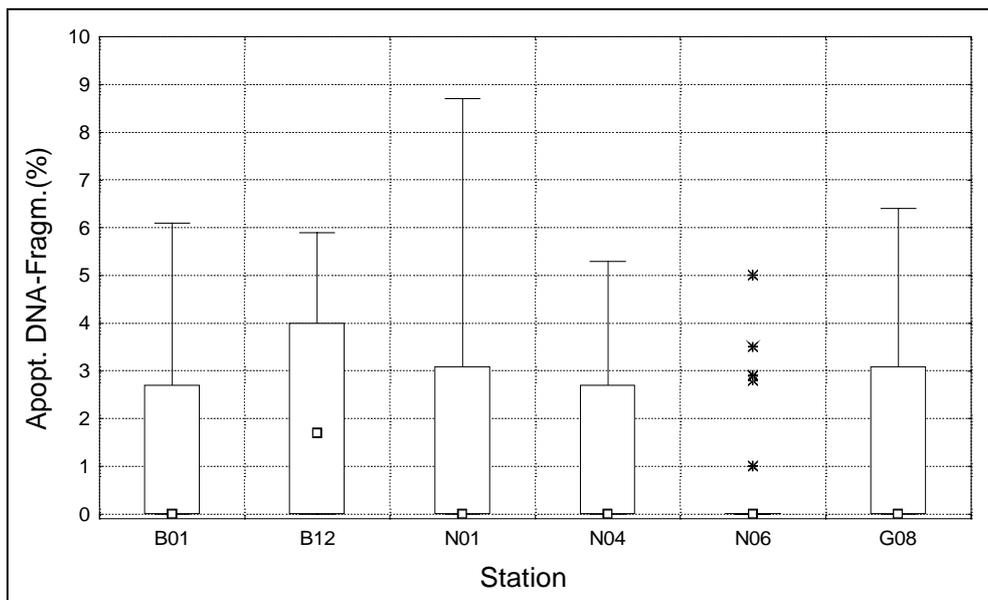


Abb. 22: WH 195; Box-Whisker-Plot (* Extremwert) der apoptotischen DNA-Fragmentierung in Klieschenlebern an 6 Stationen in Nord- und Ostsee; Mai 1998

Im Mai sind die Werte der apoptotischen DNA-Fragmentierung in den Lebern der Ostseefische niedriger als im Dezember. Die höchste Apoptoserate hat die Station B12 mit einem Median von 1,7 %. Die Mediane der anderen Stationen betragen 0 % apoptotische DNA-Fragmentierung, wobei die Fische von N06 die geringste Apoptoserate aufweisen.

Die Station B12 unterscheidet sich signifikant von der Station N06 ($p = 0,021$), die anderen Stationen sind jedoch statistisch nicht unterscheidbar.

Analog zu den Ergebnissen der 191. Reise tritt an der Station B12 die höchste Apoptoserate auf, und es bleibt die Abstufung in der Größenordnung der Apoptoseraten von N01 über N04 bis zu N06 erhalten.

Zu den einzelnen Meßwerten s. Anhang 9.7; Tab. 21.

Die gemessene Apoptose korreliert invers signifikant zu den Cadmium-Gehalten ($p = 0,048$) und positiv zu den Fett-Gehalten ($p = 0,013$) der Klieschenlebern.

Auch von der 195. Reise wurden die Proben parallel mittels TUNEL-assay analysiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 23 dargestellt.

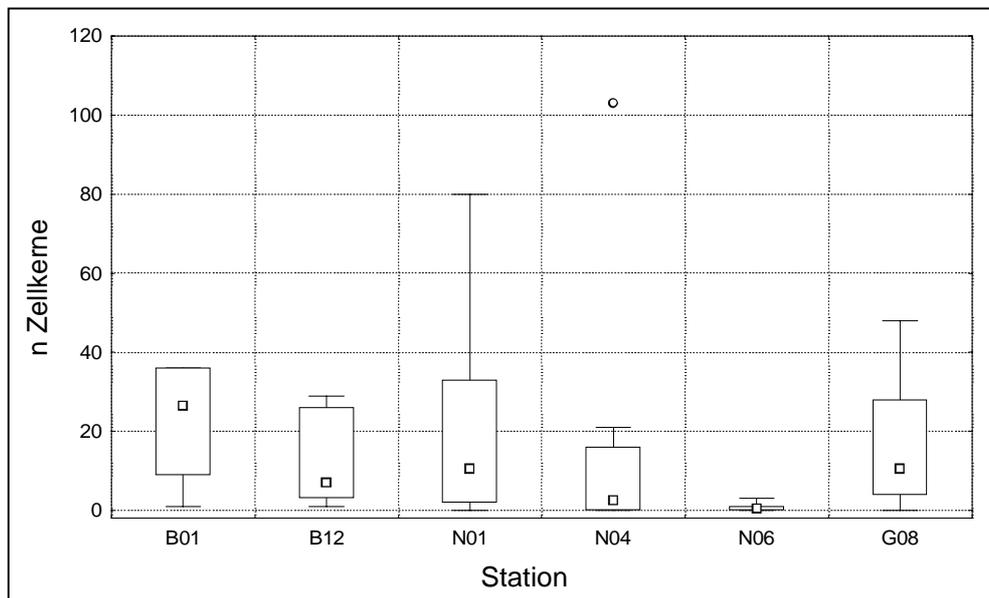


Abb. 23: WH 195; Box-Whisker-Plot (° Ausreißer) der mittels TUNEL-assay gefärbten Zellkerne in Gefrierschnitten von Klieschenlebern an 6 Stationen in Nord- und Ostsee; Mai 1998; Extremwert bei B01 (216; s. Anhang 9.7; Tab. 18) nicht dargestellt

Die Anzahl TUNEL-markierter Zellkerne ist im Mai deutlich geringer als im Dezember (s. Abb. 21). Die Ostsee-Station B01 weist den höchsten Median mit 27 TUNEL-positiven Zellkernen auf. Die Mediane der anderen Stationen betragen 7 (B12), 11 (N01), 3 (N04), 1 (N06) und 11 (G08) Zellkerne. Die Verteilung der Nordsee-Stationen stimmt mit der elektrophoretischen Bestimmung überein.

Die Station N06 unterscheidet sich signifikant von der Station N01 ($p = 0,011$) und hoch signifikant von den beiden Ostsee-Stationen (B01: $p < 0,001$; B12: $p = 0,001$).

Zu den einzelnen Meßwerten s. Anhang 9.7; Tab. 22.

Die Ergebnisse der beiden Bestimmungsmethoden korrelieren auch bei diesen Freilandproben signifikant ($p = 0,048$), woraus geschlossen werden kann, daß beide Methoden das gleiche, nämlich apoptotische DNA-Fragmentierung, messen.

Ein Unterschied besteht allerdings in den Werten der beiden Ostsee-Stationen. Bei der elektrophoretischen Bestimmung hat B12 die höchste Apoptoserate, und beim TUNEL-assay ist es die Station B01.

Die Ergebnisse aus dem TUNEL-assay korrelieren invers signifikant mit den Cadmium-Gehalten ($p = 0,006$) und den Zink-Gehalten ($p = 0,019$), und positiv signifikant mit den Fett-Gehalten ($p = 0,015$) der Lebern.

6.4.3 Jahrgang

Im Jahrgang (s. 4.3) sollte überprüft werden, ob die Apoptoserate in Klieschenlebern jahreszeitlichen Schwankungen unterworfen ist, die aufgrund von physiologischen und/oder saisonalen Faktoren abhängen. Dazu wurden monatlich (außer Juni) an der Station N01 (s. Abb. 5) 10 Proben genommen und mittels Elektrophorese analysiert. Die Ergebnisse daraus sind in Abb. 24 dargestellt.

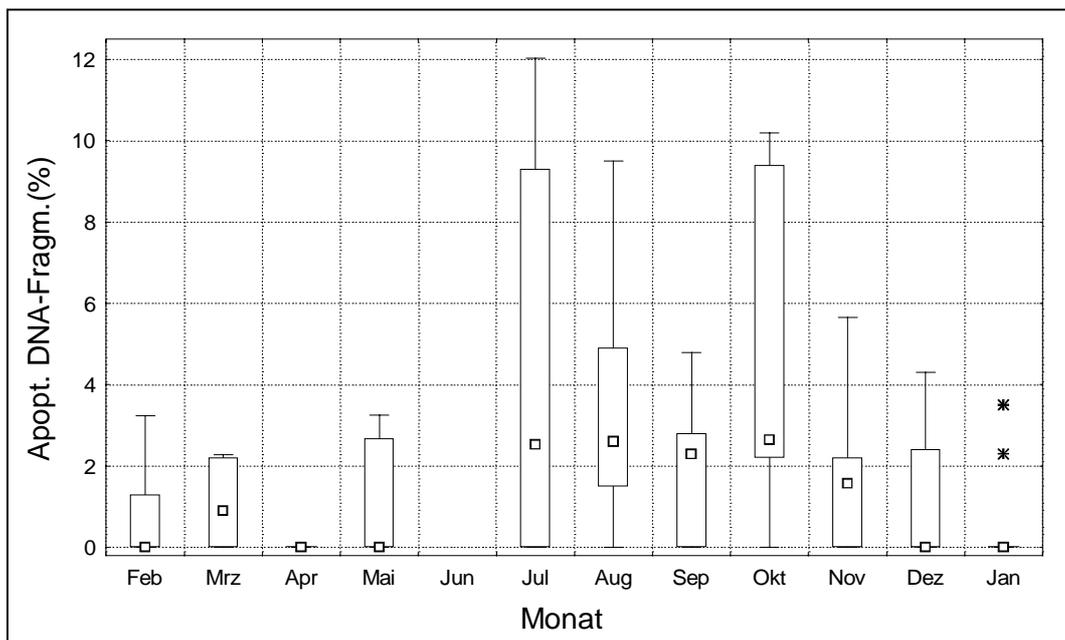


Abb. 24: Jahrgang; Box-Whisker-Plot (* Extremwert) der apoptotischen DNA-Fragmentierung in Klieschenlebern; monatliche Messung an der Station N01; Feb 1998 – Jan 1999

In Abb. 24 wird deutlich, daß die Apoptose in Klieschen jahreszeitbedingten Schwankungen unterliegt. Das Minimum wird in den Monaten Januar bis April erreicht, und das Maximum liegt im späten Sommer in den Monaten Juli bis Oktober. Die Monate Juli und Oktober haben eine signifikant höhere Apoptoserate als die Monate Januar bis Mai ($p \leq 0,039$). Zu den einzelnen Meßwerten s. Anhang 9.7; Tab. 23.

Die im Jahrgang gemessene Apoptose korreliert hoch signifikant mit der Wassertemperatur ($p < 0,001$) und dem Fettgehalt der Lebern ($p = 0,003$).

Es bestätigen sich damit sowohl die Unterschiede, die in der Apoptoserate der Kontrollfische in den Laborexperimenten zu den verschiedenen Jahreszeiten festgestellt wurden, als auch in den Freilandfischen im Dezember und im Mai.

7 Diskussion

7.1 Methoden

Methoden zur Bestimmung von Apoptose in Geweben basieren einerseits auf einer morphologischen Beurteilung der Zellen im Elektronenmikroskop, andererseits auf der Quantifizierung der bei der Apoptose charakteristischen, gerichteten DNA-Fragmentierung. Zu den letzteren gehören die Elektrophorese von DNA, der TUNEL-assay und der ELISA. Während beim TUNEL-assay im histologischen Präparat 3'OH-Enden von DNA-Strangbrüchen enzymatisch markiert werden (s. 5.2) werden beim ELISA in Mikrotiterplatten histongebundene DNA-Fragmente im Sandwich-System mittels Histon-Antikörper und DNA-Antikörper erfaßt. Die beiden Methoden sind sehr empfindlich, es lassen sich mit ihnen geringste Mengen an Strangbrüchen nachweisen.

Das Problem beider Methoden besteht jedoch darin, daß sie nicht spezifisch für apoptotische DNA-Fragmente sind. Das Enzym Terminale Transferase im TUNEL-assay bindet Nukleotide an alle 3'OH-Enden von DNA-Fragmenten, auch durch Nekrose entstandene, und genauso können im ELISA durch Nekrose entstandene histongebundene Fragmente detektiert werden.

Die einzige Methode, die neben der morphologischen Betrachtung im Elektronenmikroskop (CHARRIAUT-MARLANGUE und BEN-ARI, 1995) spezifisch für Apoptose ist, ist die Elektrophorese von DNA und Quantifizierung der DNA-„Strickleiter“ (s. 5.1). Im Gegensatz zu den beiden anderen Methoden, mit denen kleinste Mengen an Strangbrüchen erfaßt werden können, ist diese Methode jedoch sehr unempfindlich. Da nur Fragmente zwischen 180 und 1500 bp quantifiziert werden können, werden Zellen, die im Anfangsstadium der Apoptose noch keine kleinen Fragmente aufweisen, nicht mit berücksichtigt. Zu einem späteren Zeitpunkt der Apoptose werden die Fragmente von Nachbarzellen oder Phagozyten eliminiert und damit ebenfalls nicht erfaßt. Darüber hinaus liegt die Apoptoserate in gesunden Geweben nur bei 5 %.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bestimmung der Apoptose mittels DNA-Elektrophorese und TUNEL-assay durchgeführt, um mit der gegebenen Geräteausstattung sowohl eine spezifische, als auch eine empfindliche Methode anzuwenden. Den Messungen der Proben voran erfolgte die Optimierung der Methoden.

Bei der Elektrophorese stand dabei die Quantifizierung der apoptotischen Fragmente im Vordergrund. Die Quantifizierung der apoptotischen Fragmente im Elektropherogramm stellt jedoch ein Problem dar. Zwar ist es möglich, DNA-Enden enzymatisch (LAUC et al., 1994) oder radioaktiv (HUANG und PLUNKETT, 1992; BILLIG et al., 1994; JANZ und VAN DER KRAAK, 1997) zu markieren und die DNA dann zu quantifizieren.

Im Hinblick auf eine routinemäßige Anwendung der Methode beim Monitoring mit einem großen Probenumfang ist die Verwendung von Enzymen jedoch sehr kostspielig und zeitintensiv. Zudem ist die Markierung mit einer radioaktiven Substanz nicht nur mit dem Vorhandensein eines Phospho-Imagers, sondern auch mit vermeidbarer Gesundheitsgefährdung verbunden.

Es konnte daher eine Methode zur Quantifizierung apoptotischer DNA-Fragmente Ethidiumbromid-gefärbter Gele etabliert werden. Das Problem bestand darin, daß die Gele, um die teilweise geringen Mengen an DNA-Fragmenten zu visualisieren, stark überbelichtet werden mußten, wodurch die Peakspitze der hauptsächlich vorhandenen, hochmolekularen DNA im Densitogramm aus dem linearen Bereich von 256 Graustufen herausragt und damit einer Quantifizierung nicht mehr zur Verfügung steht. Durch Verwendung eines auf jedem Gel mit aufgetragenem DNA-bp-Markers als externen Quantifizierungsstandard konnte auf eine quantitative Erfassung der hochmolekularen DNA verzichtet werden und die apoptotische DNA-Fragmentierung über die IOD der Banden zwischen 180 und 1500 bp ermittelt werden. Ferner wurde die Verwendung eines Korrekturfaktors etabliert, um den Bezug zu der vorher erstellten Kalibriergeraden zu ermöglichen. Als Berechnungsgröße diente dazu ebenfalls der DNA-bp-Marker.

Die verwendete Methode erlaubt es, apoptotische DNA-Fragmentierung im Elektropherogramm spezifisch, schnell, kostengünstig und reproduzierbar zu quantifizieren, was im Hinblick auf eine Anwendung im Monitoring von großer Bedeutung ist. Der Nachteil liegt in der sowohl geringen methodischen Empfindlichkeit, als auch darin, daß nur ein kurzer Abschnitt in der Kinetik einer apoptotischen Zelle erfaßt wird. In Klieschenlebern, die nur eine geringe Apoptoserate aufwiesen, konnte deshalb häufig keine apoptotische „Strickleiter“ nachgewiesen werden und die Apoptose somit nicht quantifiziert werden.

Bei der zweiten Methode, dem TUNEL-assay, wurde die Durchführung der Färbung optimiert. Der TUNEL-assay ist sowohl an Paraffinschnitten, als auch an Gefrierschnitten von Geweben möglich. Die Verwendung von Paraffinschnitten hat den Vorteil, daß Gewebestrukturen besser zu erkennen sind als bei Gefrierschnitten, der Nachteil ist jedoch, daß es durch die Konservierung und Lagerung des Gewebes in Formaldehyd zu Quervernetzungen zwischen Proteinen kommt (FOX et al., 1985; MASON und O`LEARY, 1991). Diese Quervernetzungen verhindern den Zugang von Enzymen und Antikörpern bei histologischen Verfahren und müssen daher vor deren Zugabe aufgebrochen werden. Neben der Behandlung mit Proteinase K (GAVRIELI et al., 1992; MIGHELI et al., 1994) oder Pepsin (WIJSMAN et al., 1993) wird zusätzlich auch die Erhitzung des Gewebes in einem Mikrowellengerät in Citratpuffer (WIJSMAN et al., 1993; NEGOESCU et al., 1996) praktiziert, um die Vernetzungen zu lysieren. Es hat sich jedoch gezeigt, daß unterschiedliche Fixierungsmethoden und unterschiedliche Lysismethoden das Ergebnis der TUNEL-Färbung stark beeinflussen (NEGOESCU et al., 1996).

In eigenen Untersuchungen konnten diese Effekte ebenfalls beobachtet werden. Lysis mit einem Detergenz resultierte in keinerlei TUNEL-Markierung und Lysis mit Proteinase K führte in einer zeitlichen Abhängigkeit zu nicht reproduzierbaren, falsch-positiven Ergebnissen. Mittels einer schonenden Erhitzung in einem Mikrowellengerät wurde entgegen NEGOESCU et al. (1996) keine optimale Lysis erreicht, sondern es wurden ebenfalls zahlreiche Zellkerne falsch-positiv markiert.

Bei Verwendung von Gefrierschnitten ist eine schonende Lysis mit dem Detergenz Triton X-100 ausreichend, da durch die kurze Fixierung mit Paraformaldehyd kaum Protein-Quervernetzungen auftreten. An Gefrierschnitten lassen sich somit unter Umgehung aufwendiger Lysisschritte reproduzierbare TUNEL-Ergebnisse erzielen.

Die weitere Durchführung und Optimierung wurde daher an Gefrierschnitten durchgeführt. Wichtige Schritte waren dabei einerseits die Verwendung des DAKO-pen, der im Gegensatz zu einer Abdeckung der inkubierten Schnitte mit einem Deckgläschen, einen genügenden Flüssigkeitsfilm der Enzym- bzw. Antikörper-Lösungen über dem Schnitt beließ und somit überhaupt erst eine TUNEL-Reaktion ermöglichte. Des Weiteren konnten durch die Halbierung der Konzentrationen des Enzyms Terminale Transferase von 25 U auf 12,5 U/Schnitt und des Antikörpers (Anti-DIG-POD) von 0,5 auf 0,25 nM/Schnitt vereinzelte unspezifische TUNEL-Färbungen reduziert werden. Das Risiko unspezifischer Bindung des Antikörpers wurde durch Zusatz von Magermilchpulver (5 %) zum Puffer ebenfalls gesenkt. Diese Resultate sind parallel zu Ergebnissen von MIGHELI et al. (1994), die bei höheren Konzentrationen ebenfalls starke unspezifische Färbungen auf dem Schnitt erhielten, welche nach Senkung der Enzym- und der Antikörper-Konzentration nicht mehr beobachtet wurden.

Nach den Optimierungsschritten konnten mit dem TUNEL-assay an Gefrierschnitten reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden. Der TUNEL-assay hat sich dabei als sehr empfindliche Methode erwiesen. Ein weiterer Vorteil gegenüber den anderen Verfahren besteht darin, daß im histologischen Präparat TUNEL-positive Zellen näher lokalisiert werden können.

Es hat sich jedoch die in der Literatur beschriebene Beobachtung bestätigt, daß der TUNEL-assay alle Strangbrüche, und damit auch nekrotische Zellen anfärbt (CHARRIAUT-MARLANGUE und BEN-ARI, 1995; YASUDA et al., 1995). Diese Effekte traten besonders in den Laborexperimenten mit hohen Konzentrationen an anthropogenen Schadstoffen auf, wo auch vermehrt mit Nekrose zu rechnen war. Hier korrelierten die beiden Methoden Elektrophorese und TUNEL-assay nicht. Diese Ergebnisse stehen damit im Gegensatz zu GOLD et al. (1994), die mittels des Enzyms Terminale Transferase bevorzugt apoptotische Zellen detektiert hatten, wohingegen mittels Polymerase hauptsächlich nekrotische Zellen gefärbt wurden.

In den Freiland-Untersuchungen, wo nur mit einem geringen Vorkommen von Nekrose zu rechnen ist, wurde eine Korrelation der beiden Methoden erreicht. Durch die Reduzierung des Enzyms und des Antikörpers ist nicht nur die unspezifische Färbung vermindert worden, sondern auch die Empfindlichkeit, wodurch eine gewisse Anzahl Fragmente in den Zellkernen vorhanden sein müssen, damit es zu einer Bindung der TUNEL-Reagentien kommt. Der TUNEL-assay stellt somit nach der Optimierung eine relativ spezifische Methode zur Färbung apoptotischer Zellen in Geweben mit einer niedrigen Nekroserate dar.

7.2 Laborexperimente

In Laborexperimenten sollte die Wirkung der ausgewählten Modellkontaminanten Cadmium, PCB 118 und PCB 77 auf die Apoptose in Klieschen untersucht werden. Die Schadstoffe wurden in geeigneten Lösungsmitteln gelöst (physiol. NaCl, bzw. Öl) und intraperitoneal injiziert. Die Bestimmung der Apoptose erfolgte in Zeitintervallen von einigen Tagen nach der Injektion (s. 4.1).

Es konnte dabei gezeigt werden, daß Cadmium Apoptose induziert. Im LE 1 betrug die Inkubations-Konzentration 1 mg/kg und das Apoptosemaximum wurde am 5. Tag erreicht. Im LE Cd wurde das Maximum am 5. Tag mit einer Inkubationskonzentration von 100 µg/kg erreicht. Niedrigere Konzentrationen (10 µg/kg) führten nicht zu einer Apoptose-Induktion, wohingegen die Konzentration von 5 mg/kg so hoch war, daß ab dem 5. Tag Fische an der Intoxikation gestorben sind. Die Apoptoseraten waren gegenüber den Kontrollgruppen erhöht. Dies gilt auch für die Inkubationskonzentration von 1 mg/kg, die in einer leichten Erhöhung der Apoptoserate resultierte.

Die Durchführung des TUNEL-assay im LE Cd zeigte, daß ab einer Konzentration von 100 µg/kg vermehrt Strangbrüche induziert worden sind.

Die Ergebnisse der beiden Methoden Elektrophorese und TUNEL-assay korrelierten im LE Cd nicht. Die wesentlichen Unterschiede bestanden in den 1 mg/kg und 5 mg/kg Inkubationskonzentrationen. Mittels Elektrophorese konnte hier nur ein geringer Anstieg apoptotischer DNA-Fragmentierung nachgewiesen werden, wohingegen es im TUNEL-assay zu einer starken Zunahme an DNA-Strangbrüchen kam, die demnach nicht durch Apoptose verursacht worden sein konnten.

Im LE 1 und LE Cd korrelierte die apoptotische DNA-Fragmentierung signifikant mit den akkumulierten Cadmium-Gehalten der Leber ($p = 0,006$, bzw. $p = 0,019$). Der TUNEL-assay korrelierte im LE Cd hoch signifikant zum akkumulierten Cadmium ($p < 0,001$). Die Cadmium-Akkumulation in den Klieschenlebern erreichte, je nach der Inkubationskonzentration, unterschiedliche Größenordnungen (s. Anhang 9.7; Tab. 16).

Die unbehandelten Kontrollfische hatten Cadmium-Gehalte von ca. 50 µg/kg Leber-Frischgewicht. Bei den 10 µg/kg-Gruppen erhöhte sich der Gehalt über den Versuchszeitraum auf 260 µg Cadmium/kg Leber, einem Gehalt, der auch in Freiland-Fischen erreicht wird (s. Anhang 9.7; Tab. 21, Stationen N06, G08). Diese Konzentration führte nicht zu einer verstärkten DNA-Fragmentierung. Bei den 100 µg/kg Inkubations-Gruppen erreichte der Cadmium-Gehalt der Leber am 5. Tag, wo das Apoptose-Maximum erreicht wurde, einen Gehalt von ca. 2700 µg/kg. Die 1 mg/kg-Gruppen akkumulierten Cadmium in der Größenordnung von 10100 bis zu 23300 µg/kg Leber, und die 5 mg/kg-Gruppen schon am 1. Tag 42000 µg/kg.

Gleichzeitig sank in diesen Gruppen der Gehalt des essentiellen Spurenelements Zink von ca. 30 mg/kg Leber auf 13 mg/kg. Es ist zu vermuten, daß die letalen Effekte auf die Klieschen nicht nur von den Cadmium-Gehalten in der Leber von über 40000 µg/kg ausgingen, sondern daß die Verdrängung des Zinks durch das Cadmium zu einem Zusammenbruch der physiologischen Homöostase der Zellen führte.

In diesem Experiment wird deutlich, daß die Effekte in der Leber stark von den akkumulierten Schadstoff-Konzentrationen abhängen. Die Konzentration von 2700 µg/kg Cadmium in den Lebern resultierte in einer deutlichen Induktion von Apoptose. Höhere Konzentrationen zeigten nur geringe Apoptose in der Elektrophorese und in starkem Maße TUNEL-positive Zellen, die durch Nekrose entstanden sein müssen.

Im LE 1 sind neben Cadmium auch die PCB-Kongenerne 118 und 77 in einer Konzentration von 1 mg/kg injiziert worden. PCB 118 bewirkte eine Induktion von Apoptose, wohingegen das toxische PCB 77 keine Erhöhung der Apoptoserate herbeiführte. Im TUNEL-assay waren jedoch zahlreiche Zellkerne markiert, woraus geschlossen werden kann, daß auch durch die hohe Inkubation mit PCB 77, das in der Leber bis zu 13500 µg/kg Lipid akkumulierte, Nekrose induziert wurde.

Die erhaltenen Ergebnisse aus dem LE 1 und dem LE Cd stimmen mit in der Literatur beschriebenen Studien an Zellkulturen, Säugetieren und Fischen überein.

Besonders das Schwermetall Cadmium stand im Zentrum zahlreicher Experimente. So induzierten EL AZZOUZI et al. (1994) in einer humanen T-Zell-Linie mit unterschiedlichen Cadmium-Konzentrationen Apoptose. In Übereinstimmung zu den in dieser Arbeit ermittelten Ergebnissen zeigten die sterbenden T-Zellen ab einer bestimmten Konzentration keine apoptotischen Charakteristika, sondern sie starben durch Nekrose.

LYONS-ALCANTARA et al. (1998) inkubierten primäre Kulturen von Regenbogenforellen-Epithelzellen mit unterschiedlichen subletalen Cadmium-Konzentrationen und beobachteten daraufhin Apoptose-Induktion in diesen Zellen. In *in vivo* Untersuchungen konnte durch Cadmium Apoptose in testiculärem Gewebe (XU et al., 1996) und in urogenitalen Organen (YAN et al., 1997) von Ratten induziert werden.

Untersuchungen zu anderen Schwermetallen, insbesondere Kupfer und Quecksilber, sind in der Regenbogenforelle durchgeführt worden. DAOUST et al. (1984) zeigten, daß sowohl Kupfer, als auch Quecksilber in Dosen, die innerhalb von 96 h letal wirken, Apoptose in den Kiemen der Regenbogenforelle induzierte. In Studien von JULLIARD et al. (1996) induzierte Kupfer in geringen Mengen (20 µg/l) in olfaktorischen Epithelzellen von Regenbogenforellen apoptotischen Zelltod.

Neben Schwermetallen sind auch weitere umweltrelevante organische Schadstoffe und ihre Wirkung auf Apoptose in Zellkulturen oder Geweben Gegenstand von Untersuchungen. Mittels Organo-Zinn-Verbindungen, und hier im besonderen durch TBT, konnte Apoptose in einer humanen Zelllinie (ZAUCKE et al., 1998), in dem marinen Schwamm *Geodia cydonium* (BATEL et al., 1993) und in PC12-Zellen (VIVIANI et al., 1995) induziert werden. Auch konnten von dem Pestizid DDT (Dichlor-Diphenyl-Trichlorethan) *in vitro* (TEBOURBI et al., 1998) und von TCDD *in vivo* (CANTRELL et al., 1998) gezeigt werden, daß sie eine Apoptose-induzierende Wirkung haben.

Veröffentlichungen, die einen Zusammenhang zwischen PCB und einer möglichen Apoptose-induzierenden Wirkung aufzeigen, liegen zum jetzigen Zeitpunkt, außer der Arbeit von PIECHOTTA et al. (1999), nicht vor.

Sowohl im LE 1 als auch im LE Cd resultierte eine, abhängig von dem jeweiligen Schadstoff, hohe Inkubationskonzentration in einer Induktion von Nekrose in den Leberzellen, wobei Apoptose dann nur eine sekundäre Rolle spielte. Mehrere Autoren beobachteten diesen Effekt ebenfalls in Experimenten, wo Schadstoffe in unterschiedlich hohen Konzentrationen auf Zellen wirkten. U.a. beschrieben JULLIARD et al. (1996) diesen Effekt für Kupfer, ZAUCKE et al. (1998) für TBT, EL AZZOUZI et al. (1994) und YAN et al. (1997) für Cadmium und PIECHOTTA et al. (1999) für Cadmium und PCB 77. Es wird hieraus deutlich, daß cytotoxische Substanzen bei niedrigen Konzentrationen eine aktive Form des Zelltods induzieren, wohingegen höhere Konzentrationen zum passiven Zelltod führen, da die Zellen durch die Intoxikation nicht mehr zu aktiven metabolischen Prozessen fähig sind.

Die Mechanismen, die in den Zellen aufgrund von cytotoxischen Substanzen zur Apoptose oder zur Nekrose führen können, sind nicht vollständig aufgeklärt. Es wird davon ausgegangen, daß die biochemischen Signalwege bei der Induktion von Apoptose und Nekrose gleich sind und Unterschiede sich nur durch intrazelluläre und extrazelluläre Kontrollpunkte ergeben (KEDDERIS, 1996).

Mögliche Wirkungsweisen der cytotoxischen Substanzen in den Zellen können aufgrund der Bildung oxidativ wirksamer Substanzen, einer Störung der Mitochondrienfunktion und/oder einer Störung der Calcium-Homöostase erklärt werden.

So können z.B. cytotoxische Substanzen oxidativen Streß durch Bildung reaktiver Sauerstoff-Radikale in den Zellen auslösen. Zu diesen Radikalen gehören u.a. Lipidperoxid, Superoxid, Stickstoffmonoxid- und Hydroxylradikale.

In den Zellen bewirken diese nicht nur einen oxidativen Verbrauch von Glutathion, einem Tripeptid, das elektrophile reaktive Substanzen detoxifiziert, sondern es werden auch Thiol-Gruppen von Proteinen oxidiert, die an zellulären und enzymatischen Regulationen beteiligt sind.

Außerdem kann es zur Lipidperoxidation kommen, die das Membranpotential von z.B. Mitochondrien beeinflussen kann. Ein Zusammenbruch des Membranpotentials kann wiederum zu einer Störung der Calcium-Homöostase in den Zellen führen.

Calcium ist in den Zellen in den Mitochondrien, im ER, im Nucleus und an Calcium-bindenden Proteinen enthalten. Der Calcium-Gradient zwischen dem Zellinneren (ca. 10^{-7} M) und dem Zelläußeren (ca. 10^{-3} M) wird durch die Ca-ATPase reguliert. Durch Oxidation an der Plasmamembran, an den Mitochondrien oder dem ER kann die zelluläre Calcium-Homöostase gestört werden.

In diesem Zusammenhang ist auch die Bedeutung der bei der Apoptose wichtigen Inhibitor-Proteine Bcl-2 und Bcl-x (s. 2.1) zu sehen, die sich auf den Mitochondrien-, ER- und Nucleus-Membranen befinden und denen eine antioxidative Wirkung nachgewiesen werden konnte (RICHTER et al., 1995; KEDDERIS, 1996; LOSSER und PAYEN, 1996; McCONKEY und ORRENIUS, 1996).

In bezug auf Effekte einzelner Substanzen ist beobachtet worden, daß Cadmium in umweltrelevanten Konzentrationen (2 ppb) zu einer zeitabhängigen Produktion freier Radikale in Zellen der Regenbogenforelle führte (ZELIKOFF et al., 1995) und daß es einen Calcium-Ausstrom aus den Mitochondrien induzierte (KEDDERIS, 1996).

XU et al. (1996) diskutieren den Apoptose-induzierenden Effekt von Cadmium damit, daß es durch Calcium-Kanäle in das Zellinnere gelangt und dort eine Calcium- oder Cadmium-abhängige Endonuklease aktiviert. Das Element Zink spielt dabei eine Rolle, da es die Calcium-abhängige Endonuklease inhibieren kann, bzw. die Cadmium-induzierte DNA-Fragmentierung inhibiert (LOHMANN und BEYERSMANN, 1994; XU et al., 1996).

Ferner kann Cadmium-induzierte Apoptose durch Gabe von Selen inhibiert werden. Dieser Effekt steht mit einer Selen-induzierten Erhöhung von Glutathion-Peroxidase und Glutathion in Verbindung, wodurch einer oxidativen Schädigung entgegengewirkt wird (JONES et al., 1997).

Das Pestizid DDT induziert Apoptose, die ebenfalls durch Zink inhibiert wird (TEBOURBI et al., 1998). Hierdurch kann auf einen dem Cadmium ähnlichen Mechanismus geschlossen werden.

Studien zum TBT belegen, daß diese Substanz in den Zellen die Calcium-Homöostase stört. So wird durch TBT die Calcium-Konzentration im Cytosol sowohl durch eine Mobilisierung intrazellulären Calciums, eine Aktivierung des Calcium-Einstroms und eine Inhibierung des Calcium-Ausstroms erhöht (CHOW et al., 1992; VIVIANI et al., 1995).

Inwiefern bei Intoxikationen andere wichtige Mechanismen der Signaltransduktion zur Apoptose, wie z.B. Rezeptor/Ligand-Koppelung oder geänderte Genexpression eine Rolle spielen, ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht geklärt. Auch über die Wirkung von PCB auf die Apoptose gibt es in der Literatur keine Hinweise.

Die Experimente LE 1 und LE Cd sind jeweils im Februar durchgeführt worden. Im Unterschied dazu fanden die Experimente LE PCB 118 und LE PCB 77 aus organisatorischen Gründen im Juli statt. Wie sich herausgestellt hat, lagen zu diesem Zeitpunkt nicht die gleichen Bedingungen vor, da die Apoptoserate der unbehandelten Kontrollfische im Juli sehr viel höher lag als im Februar.

Im LE 118 konnte durch Inkubation mit PCB 118 eine konzentrationsabhängige Abnahme der Apoptose in den Klieschenlebern beobachtet werden. Die Ergebnisse bestätigten sich im TUNEL-assay, wobei hier jedoch zusätzlich am 2. Tag eine konzentrationsabhängige Zunahme TUNEL-positiver Zellen auftrat, die auf Nekrose schließen läßt. Daraus läßt sich ableiten, daß die akkumulierten Konzentrationen am 2. Tag Nekrose induzierten und Apoptose inhibierten, und daß am Ende des Experiments, in Korrelation zur Elektrophorese, die konzentrationsabhängige Abnahme der Apoptose bestätigt wurde und keine Nekrose mehr auftrat.

Auch im LE PCB 77 resultierte die Injektion von PCB 77 in drei verschiedenen Konzentrationen in einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Apoptoserate, obwohl es hier zu stärkeren Schwankungen dieses Trends im Gegensatz zum LE PCB 118 kam. Für die mittels TUNEL-assay analysierten Gruppen wurde das Ergebnis der elektrophoretischen Bestimmung bestätigt.

Die Versuche LE PCB 118 und LE PCB 77 zeigten im Gegensatz zum LE 1 und LE Cd, daß die Apoptose zu unterschiedlichen Jahreszeiten einen unterschiedlichen Level an apoptotischen Zellen aufweist, der physiologischen, bzw. jahreszeitbedingten Ursprungs sein muß.

Es hat sich gezeigt, daß, je nach apoptotischem Grundlevel, Expositionsversuche mit anthropogenen Stressoren zu einem gegenteiligen Effekt führen können. Ist die Apoptoserate im Februar sehr gering, erhöht sie sich durch die Schadstoffe, und ist sie im Juli höher, erniedrigt sie sich nach der Inkubation.

Es läßt sich daraus schließen, daß das Lebergewebe zu der jeweiligen Jahreszeit bestimmten physiologischen Faktoren unterliegt und die Schadstoffe die natürliche Balance des Systems derart stören, daß die zu der jeweiligen Zeit physiologischen Vorgänge aus dem Gleichgewicht geraten.

Ähnliche Resultate, die auch einen Einfluß von unterschiedlichen abiotischen und biotischen Bedingungen zu den jeweiligen Jahreszeiten auf die EROD-Aktivität bestätigen, wurden von SABOROWSKI (1996) in Laborexperimenten mit Klieschen erzielt.

EROD (Ethoxyresorufin-O-deethylase) ist ein Phase 1-Enzym des Cytochrom P450-Monooxygenase-Systems, das u.a. an der Metabolisierung von polyaromatischen Kohlenwasserstoffen, koplanaren PCB und Dioxinen beteiligt ist.

Im Februar resultierte bei SABOROWSKI (1996) die Inkubation mit PCB in einer Erhöhung der EROD-Aktivität um 400 %, wohingegen eine vergleichbare Induktion im Oktober nicht festgestellt werden konnte.

Studien, die von einer Erniedrigung der Apoptoserate aufgrund von Stressoren berichten, sind selten. ALFORD et al. (1994) zeigten jedoch auf, daß nach Streß aufgrund von Gefangenschaft im Netz beim *Ictalurus punctatus* die Apoptoserate in Leukocyten sank, und daß der Grad der Reduzierung von der Streßdauer abhängig war.

Die Experimente zu den natürlichen Stressoren LE NS 1 und LE NS 2 zeigten wieder einen sehr starken Unterschied in den Apoptoseraten der unbehandelten Kontrollfische.

Im LE NS 1 konnte kein Effekt durch die Temperaturerhöhung oder die Salinitätserniedrigung festgestellt werden. Auch im LE NS 2 war mittels Elektrophorese keine Veränderung der Apoptoserate zu beobachten. Mittels TUNEL-assay wurden jedoch am 5. Tag vermehrt Strangbrüche detektiert, wobei im Gefrierschnitt keine morphologischen Betrachtungen zur Unterscheidung von Apoptose oder Nekrose vorgenommen werden können.

Da der TUNEL-assay eine sehr viel empfindlichere Methode als die Elektrophorese ist, kann davon ausgegangen werden, daß die Temperaturerhöhung um 5 °C einen leichten Effekt in den Leberzellen verursachte.

Die Resultate zur Apoptose aus den Laborexperimenten stehen im Zusammenhang mit Experimenten zu anderen, „klassischen“ Biomarkern. So wird eine Erhöhung von Cytochrom P450 1A durch TCDD-Exposition erreicht und daher oft als Biomarker für Dioxin-ähnliche Substanzen verwendet. CANTRELL et al. (1998) wiesen bei TCDD-exponierten Medaka (*Oryzias latipes*) Embryonen sowohl eine Induktion von Cytochrom P450 1A nach, als auch eine gleichzeitige Erhöhung der Apoptoserate.

LYONS-ALCANTARA et al. (1998) zeigten nach Exposition von Cadmium an primären Zellkulturen von Hautzellen der Regenbogenforelle einen Anstieg der Apoptose und eine gleichzeitige Expression von Hitzeschock-Proteinen.

Hitzeschock-Proteine wurden auch in Experimenten von GRØSVIK und GOKSØYR (1996) in primären Zellkulturen von Lachs-Hepatozyten nach Exposition zahlreicher Schadstoffe induziert. Diese Schadstoffe waren u.a. Benzo(a)pyrene, PCB 105, Arsen und Cadmium. Die organischen Substanzen induzierten ferner Cytochrom P450 1A und die anorganischen Substanzen Metallothionein.

Auch im LE Cd wurde Metallothionein in den exponierten Fischen induziert (LACORN, 1999a).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß Apoptose genauso wie die anderen Biomarker an zentrale zelluläre Schutzmechanismen gekoppelt sein könnte.

7.3 Freilanduntersuchungen

Die Freilanduntersuchungen wurden an Proben von zwei Ausfahrten der „Walther Herwig III“ durchgeführt, wobei jeweils 6 Stationen beprobt wurden (s. 4.2). Die Ausfahrten fanden im Dezember 1997 und im Mai 1998 statt. Ferner wurde ein Jahresgang gemessen, d.h. die monatliche Messung der Apoptose an der Station N01.

Die Ergebnisse der 191. Ausfahrt zeigten, daß es Unterschiede zwischen den Stationen gibt. Vor allem die beiden Ostsee-Stationen B01 und B12 wiesen signifikant höhere Apoptoseraten auf als die Nordsee-Stationen, wobei die weiter östlich liegende Station B12 die höchsten Werte hatte.

Es ist hier zu beobachten, daß die Stationen in der Reihenfolge N06, N04, N01, B01 und B12, die auf einer horizontalen Achse von West nach Ost verlaufen, eine steigende Apoptoserate aufwiesen.

Die Ergebnisse des TUNEL-assay zeigten den gleichen Trend, mit Ausnahme der Station G08, die hier im Gegensatz zur elektrophoretischen Bestimmung die höchsten Werte der Nordsee erreichte. Ob es sich bei den TUNEL-markierten Zellkernen um apoptotische handelt, die aufgrund der geringen Nachweisempfindlichkeit mittels Elektrophorese nicht erfaßt werden konnten, oder ob in diesen Zellen vermehrt ungerichtete Strangbrüche auftraten, kann ohne morphologische Betrachtung im Elektronenmikroskop nicht eindeutig gesagt werden.

Die Proben vom Mai der 195. Reise zeigten keine signifikant erhöhte Apoptose in Klieschen der Ostsee im Vergleich zum Dezember davor. Die Werte waren insgesamt niedriger. Dies gilt besonders für die Ergebnisse des TUNEL-assay.

Während bei der elektrophoretischen Bestimmung im Box-Whisker-Plot keine Unterschiede mehr zwischen den Stationen B01, N01, N04 und G08 zu erkennen waren und nur die Station B12 nach oben und die Station N06 nach unten „herausragte“, waren mittels des empfindlicheren TUNEL-assay noch leichte Unterschiede zu erkennen.

Die höchste Rate wies hier, im Gegensatz zur Elektrophorese, die Station B01 auf und die niedrigste wiederum die Station N06.

Im Jahresgang an der Station N01 traten deutliche Schwankungen der Apoptoserate im Jahresrhythmus auf. Die höchsten Apoptoseraten traten im Spätsommer und Herbst auf mit Maxima im Juli und im Oktober, dann sank die Rate zum Januar, hielt sich auf einem niedrigen Niveau bis zum April/Mai und stieg dann wieder an. Es hat sich somit der Trend aus den Laborexperimenten und den Freilanduntersuchungen bestätigt, daß zu unterschiedlichen Jahreszeiten unterschiedliche Apoptoseraten in den Klieschenlebern auftreten.

Diese Unterschiede lassen sich mit Unterschieden in jahreszeitbedingten externen und physiologischen Faktoren korrelieren. Ein wichtiger externer, saisonaler Faktor ist die Temperatur, die im Laufe eines Jahres periodisch zu- und abnimmt (s. Abb. 25).

Die Apoptoseraten der Klieschen vom Dezember 1997 (WH 191) korrelieren invers hoch signifikant ($p < 0,001$) mit den gemessenen Wassertemperaturen der einzelnen Stationen, d.h., je niedriger die Temperatur, desto höher die Apoptoserate in den Lebern.

Auch im Jahresgang hängt die Apoptoserate hoch signifikant von der Temperatur² ab ($p < 0,001$), wodurch sich der Zusammenhang zwischen der Apoptoserate in Klieschen und dem saisonalen externen Faktor Temperatur bestätigt. Im Mai 1998 (WH 195) besteht keine Korrelation zwischen den beiden Parametern, was auf die geringen Unterschiede in der Apoptoserate der einzelnen Stationen zurückzuführen ist.

Einen weiteren Faktor stellt der Zinkgehalt der Leber dar. Zink ist ein essentielles Spurenelement und wirkt als Co-Faktor zahlreicher Enzyme in Stoffwechselfvorgängen. Der Zinkgehalt der Lebern korreliert invers signifikant mit der Apoptose.

Dies gilt für die unterschiedlichen Stationen der 191. und der 195. Reise. Die Meßwerte der elektrophoretischen Bestimmung der 195. Reise liegen leicht über dem Signifikanzniveau ($p = 0,065$), was sich durch die wenigen Meßwerte über der Nachweisgrenze an der Ostsee-Station B01 erklären läßt.

Im Jahresgang besteht keine signifikante Korrelation zum Zink, da ab Frühsommer bis Herbst relativ gleichbleibende Zink-Raten in den Lebern vorliegen.

Ebenfalls mit dem Fettgehalt der Lebern, als weiteren physiologischen Faktor, gibt es einen Zusammenhang zur Apoptoserate (s. Abb. 25). Dieser Zusammenhang besteht nicht in Proben der WH 191, jedoch gibt es eine signifikante Korrelation sowohl in den Klieschenlebern der WH 195, als auch im Jahresgang.

² Gemessen vom Bundesamt für Seeschifffahrt und Hydrographie (BSH); Feuerschiff Deutsche Bucht

Der GSI stellt sich als eine weitere Einflußgröße heraus und zeigt damit den Einfluß des saisonalen Laichzyklus auf die Apoptose. Im Dezember 1997 korreliert die Apoptose invers signifikant, bzw. für die Ergebnisse des TUNEL-assay hoch signifikant mit dem GSI der Klieschen. Im Mai 1998, nach dem Ablaichen und zu einem Zeitpunkt niedriger Apoptoseraten in den Lebern, besteht diese Signifikanz nicht.

Hingegen zeigt sich im Jahresgang dafür deutlich der inverse Zusammenhang der Apoptoserate mit dem saisonalen Laichfaktor GSI, der wiederum unmittelbar von der Temperatur abhängt.

Die einzelnen, sowohl mit der Apoptoserate als auch untereinander korrelierenden Faktoren, hängen im saisonalen Zyklus der Kliesche eng miteinander zusammen.

Das Wachstum der Ovarien setzt bei Klieschen an der Station N01 im Herbst (Oktober/November) ein (SABOROWSKI, 1996), zu einem Zeitpunkt starker Temperaturabnahme (s. Abb. 25). Es resultiert u.a. aus einem Anstieg der Hormone 17β -Estradiol und Testosteron, wie SABOROWSKI (1996) durch Messung eines Jahresgangs an der Station N01 festgestellt hat.

Die Erhöhung des Hormonspiegels geht einher mit der exogenen Vitellogenese (Synthese des Eiproteins Vitellogenin), einer Hypertrophie der Leber und der Gonaden und einer erhöhten metabolischen Aktivität, die sich in erhöhten mRNA-Mengen widerspiegelt. Nachdem das Vitellogenin in der Leber synthetisiert wurde, wird es über den Blutkreislauf in die Ovarien transportiert und in den Eizellen eingelagert.

Mit fortschreitender Reifung der Eier steigt der GSI, als Faktor aus dem Ovariengewicht und dem Körpergewicht des Fisches. Durch die Erhöhung der metabolischen Aktivität wird vermehrt das Spurenelement Zink in der Leber benötigt, da es als Co-Faktor an der Aktivität zahlreicher Enzyme beteiligt ist.

Die Erhöhung von Zink in den Leberzellen geht einher mit einer Induktion von metallbindenden Proteinen, den Metallothioneinen, die u.a. zur Regulierung der zellulären Zink-Homöostase fungieren (OLSSON et al., 1987; LACORN, 1999a).

Es konnte gezeigt werden, daß die mit dem Eintritt in die Vitellogenese verbundene Erhöhung des 17β -Estradiol-Spiegels zu einer Reduzierung der Apoptoserate in Regenbogenforellen führte (JANZ und VAN DER KRAAK, 1997). Zu diesem Zeitpunkt beginnt auch das Absinken der Apoptoserate im Jahresgang (s. Abb. 24).

FRAKER und TELFORD (1997) diskutieren den Einfluß von erhöhten Zink-Gehalten auf die Reduzierung Glucocorticoid-induzierter Apoptose mit der Fähigkeit von Zink, an vicinales Cystein im Glucocorticoid-Rezeptor zu binden und damit das Glucocorticoid-induzierte Apoptose-Signal zu unterbinden.

Ein weiteres Charakteristikum der Ovarienreifung ist die Reduzierung der Energiereserven der Klieschen, die in Form von Glykogen und Fett in der Leber gespeichert sind.

Die höchsten Glykogen- und Lipidgehalte liegen im Oktober vor, und zum April sinken sie auf ein Minimum (SABOROWSKI and BUCHHOLZ, 1996) (s. Abb. 25). Die gespeicherte Energie wird während der Reifung der Gonaden mobilisiert und für deren Aufbau verwendet. Der Fettgehalt in Klieschenlebern kann bis zu 40 % betragen und sinkt auf Gehalte um 4 % ab. Mit dem Fett werden lipophile Schadstoffe, z.B PCB, mobilisiert und aus der Leber in die Gonaden verlagert (KAMMANN, 1995).

Zwischen Februar und April/Mai kommt es zum Ablachen der reifen Eier. Ab Februar beginnt zudem die Temperatur kontinuierlich zu steigen. Nach dem Ablachen sind die weiblichen Klieschen deutlich geschwächt, was sich an einem Minimum des Konditionsfaktors (CF³) zeigt (KNUST, 1996).

Das Minimum der Speicherstoffe Glykogen und Lipid ist ebenfalls im April/Mai erreicht. Parallel dazu liegt das Apoptose-Minimum ebenfalls im April. Zum Sommer hin wird dann vermehrt Nahrung von den Klieschen aufgenommen und ab Juni/Juli als Glykogen und Lipid in das Speicherorgan Leber eingelagert, bis im Oktober wieder das Maximum erreicht ist (SABOROWSKI, 1996).

Für die o.g. saisonalen Abhängigkeiten und Charakteristika konnte in Fischen gezeigt werden, daß sie auch auf andere, bereits etablierte Biomarker einen Einfluß haben. Es existieren diesbezüglich umfangreiche Studien über die Induktion von Metallothioneinen (MT) und die Erhöhung der EROD-Aktivität im Jahreszyklus.

OLSSON et al. (1987) haben in der Regenbogenforelle eine Abhängigkeit der MT-Induktion mit dem Zinkgehalt der Leber festgestellt, der wiederum eng mit dem 17β-Estradiol zusammenhängt. Das Maximum von Zink und 17β-Estradiol befand sich im Dezember und sank im Januar, als der MT-Gehalt das Maximum erreichte. Die gleiche saisonale Abhängigkeit von Zink und MT konnte LACORN (1999a) in der Kliesche bestätigen.

In Bezug auf den Jahresgang der Apoptose hat sich gezeigt, daß mit Eintritt der Gonadenreifung die Apoptoserate abnimmt, MT und Apoptose also invers korrelieren. Zusätzlich gibt es einen saisonalen MT-Peak in der Kliesche im Juli (LACORN, 1999a), der mit einem Apoptose-Peak korreliert.

Zu diesem Zeitpunkt beginnt in der Leber verstärkt die Einlagerung von Energiereserven in Form von Fett und Glykogen (SABOROWSKI und BUCHHOLZ, 1996) (s. Abb. 25), gleichzeitig tritt zu dieser Zeit eine starke Erwärmung der Wassertemperatur auf, so daß diese beiden Faktoren für einen Anstieg der Apoptose und des MT in der Leber in Zusammenhang zu bringen sind.

³ CF (Konditionsfaktor) : $\frac{\text{Fischgewicht (ohne Gonaden und Verdauungsorgane)} \times 100}{\text{Fischlänge}}$

Das zweite Apoptose-Maximum im Oktober wird wiederum von einem MT-Maximum begleitet. Auch in der Flunder konnte im Herbst ein MT-Maximum nachgewiesen werden (GOKSØYR et al., 1996).

Mögliche ursächliche Faktoren sind wie bereits oben beschrieben, eine Erhöhung der Steroide Testosteron und 17β -Estradiol, der Beginn der Gonadenreifung und damit eine erhöhte Stoffwechsel-Aktivität, eine Abkühlung der Wassertemperatur und das Erreichen des Maximums in der Speicherung von Fett in der Leber (SABOROWSKI, 1996) (s. Abb. 25).

Die oben beschriebenen saisonalen Zusammenhänge zwischen der Wassertemperatur, dem Fettgehalt der Lebern und der Apoptoserate sind in Abb. 25 dargestellt.

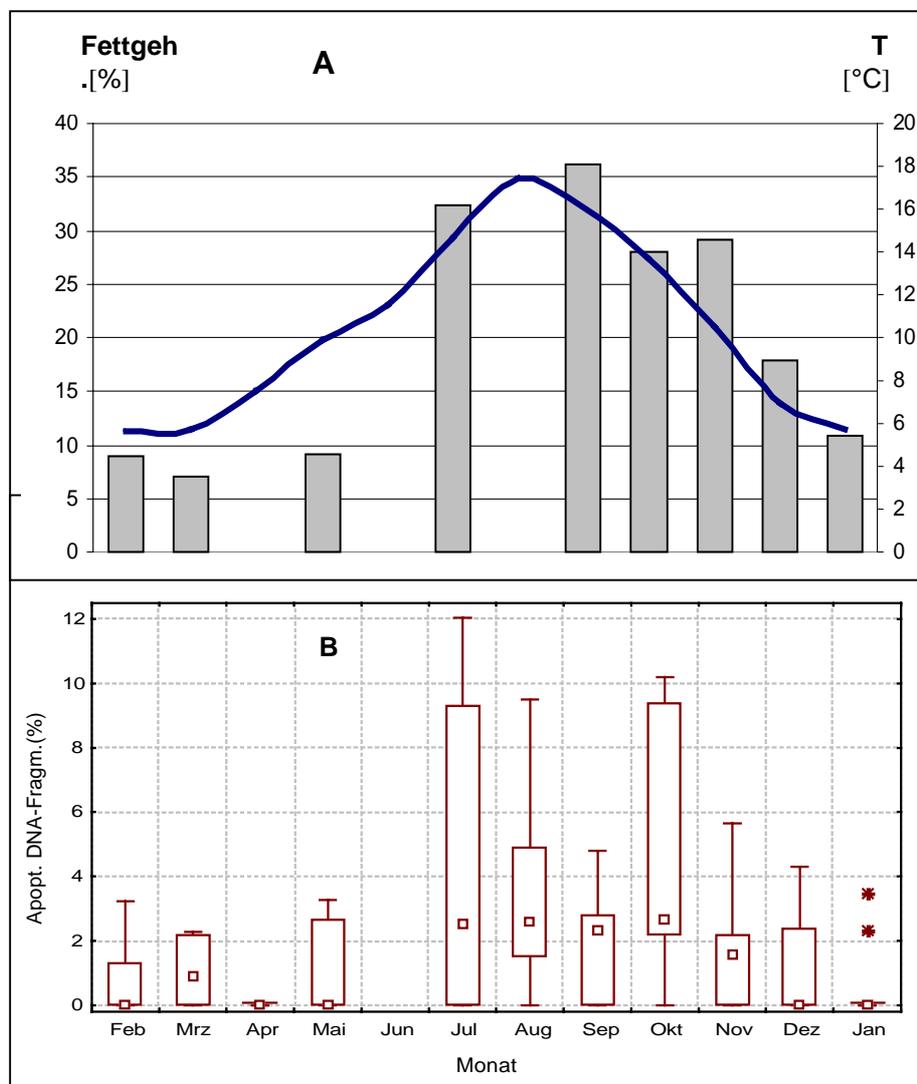


Abb. 25: Saisonale Verläufe der Wassertemperatur (Daten vom BSH; Feuerschiff Deutsche Bucht) (A, durchgezogene Linie), des Fettgehalts (A, Balken) und der Apoptoseraten (B) in den Klieschenlebern; Feb 1998 – Jan 1999

Das Maximum der EROD-Aktivität liegt im Frühsommer, nach dem Ablachen. In den Messungen von SABOROWSKI (1996) in der Kliesche befand sich der Peak im Juni, bei GOKSØYR et al. (1996) in Fludern im April und bei den Klieschen des o.g. Jahresgangs ebenfalls im Juni (VOBACH und KELLERMANN, 1999), jeweils nach dem Ablachen.

Zu diesem Zeitpunkt ist die Apoptoserate noch geringer und erreicht erst einen Monat später, im Juli, das Maximum, wobei der Grad des Anstiegs aufgrund der fehlenden Juni-Daten nicht nachvollzogen werden kann.

Die EROD-Aktivität und die Apoptoserate hängen im Jahresverlauf eng miteinander zusammen, und beide korrelieren wiederum invers mit der Wassertemperatur und dem GSI.

Auch an den 6 Freiland-Stationen im Dezember ist die Korrelation der Apoptose mit den MT und der EROD⁴-Aktivität gegeben, wobei zu den MT auch hier eine inverse Korrelation besteht. Die Daten zu den MT der WH 191 sind bei LACORN (1999a) veröffentlicht.

Der Korrelationskoeffizient (r) zwischen der Apoptose und den beiden MT-Isoformen beträgt bei $p < 0,001$ für MT1 $r = -0,491$ und für MT2 $r = -0,459$. Auch die Korrelation zwischen der EROD-Aktivität und der Apoptoserate ist hoch signifikant ($p = 0,001$; $R = 0,338$).

Da an den 6 untersuchten Freiland-Stationen sowohl die Apoptose mit den o.g. physiologischen und saisonalen Faktoren korreliert, als auch eine Korrelation zu den Biomarkern MT und EROD-Aktivität besteht, die ihrerseits auch maßgeblich durch diese saisonalen Faktoren beeinflusst werden, ist davon auszugehen, daß die Unterschiede in der Apoptoserate dieser 6 Stationen hauptsächlich durch eine Verschiebung der saisonalen Stadien aufgrund unterschiedlicher geographischer Lage, und damit unterschiedlicher geothermaler Einflüsse, verursacht wurde.

Neben den physiologischen Faktoren besteht bei den beiden Freilandfahrten auch eine Korrelation zu dem Schwermetall Cadmium, die jedoch im Jahresgang nicht besteht. Die Korrelationen sind invers signifikant. Darüberhinaus besteht jedoch auch eine hochsignifikante Korrelation zwischen den Cadmium-Gehalten und den Zink-Gehalten ($p < 0,001$) und der Temperatur ($p < 0,001$).

Aufgrund dieser Abhängigkeiten ist ein möglicher Einfluß des Cadmium-Gehalts auf die Apoptoserate unwahrscheinlich. Hinzu kommt die Tatsache, daß zwischen den Cadmium-Gehalten und der Apoptoserate sowohl im Dezember, als auch im Mai eine inverse Korrelation auftrat, wohingegen in den Laborexperimenten eine positive Abhängigkeit bestand.

⁴ EROD-Daten aus einem nicht veröffentlichten Datensatz der BFA für Fischerei, Institut für Fischerei-ökologie

In den Laborexperimenten wurden Apoptose und Nekrose erst ab einer Injektion von 100 µg/kg ab dem 5. Tag induziert. Dies entsprach einer Cadmium-Akkumulation von mehr als 2683 µg/kg Leber.

Im Freiland betragen die Cadmium-Gehalte im Dezember zwischen 70 und 483 µg/kg und im Mai zwischen 29 und 44 µg/kg Leber, lagen damit also weit unter der Konzentration, die im Laborexperiment eine Induktion von Apoptose hervorriefen. Über den eventuellen Einfluß einer chronischen Exposition kann anhand der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen jedoch keine Aussage gemacht werden.

Zu den organischen Schadstoffen PCB und DDE gibt es in den Kliesen der WH 191 keine Korrelation zur Apoptose.

Die Untersuchungen zur Apoptose in Freilandproben zeigen einen deutlichen Zusammenhang zu saisonalen und physiologischen Schwankungen. Ein direkter Einfluß der begleitend gemessenen Schadstoffe auf die Apoptose kann nicht festgestellt werden, bzw. ist im Fall von Cadmium aus o.g. Gründen unwahrscheinlich.

Ebenfalls kann nicht gesagt werden, ob ein einziger Faktor ursächlich die Apoptoserate beeinflusst, oder ob es ein Zusammenwirken mehrerer Faktoren ist.

7.4 Apoptose als Biomarker?

Grundlegende Untersuchungen zur Eignung von Apoptose als Biomarker für das biologische Effektmonitoring sind zum ersten Mal im Rahmen dieser Arbeit anhand von Laborexperimenten und Freilanduntersuchungen vorgenommen worden.

In Laborexperimenten konnte gezeigt werden, daß Apoptose durch die gewählten, umweltrelevanten Kontaminanten PCB und Cadmium induzierbar ist. Dies ist eine wichtige Grundvoraussetzung für einen Biomarker. Ferner hat sich gezeigt, daß Apoptose ein sehr empfindlicher Parameter ist, der nur bis zu einem, je nach Schadstoff, bestimmten toxischen Potential induzierbar ist. Oberhalb dieses Potentials wird Nekrose induziert.

Parallel dazu hat sich gezeigt, daß die Apoptose in Kliesenlebern jahreszeitlichen Schwankungen unterliegt, und daß der Zeitpunkt, an dem Laborexperimente durchgeführt werden, maßgeblich die Reaktion beeinflusst, so daß es bei hohem Apoptose-Grundlevel auch zu einer Inhibition durch Schadstoffe kommen kann.

Die jahreszeitlichen Schwankungen können im wesentlichen auf saisonale und physiologische Faktoren zurückgeführt werden. Diese Tatsache ist den anderen o.g. Biomarkern (EROD, MT) gemein.

Im Kapitel 2.2 sind die von MAYER et al. (1992) genannten Anforderungen an einen Biomarker aufgeführt. Die ersten 3 Punkte können für die Apoptose deutlich bejaht werden:

- Die Messung der Apoptose ist relativ leicht und schnell durchzuführen.
- Im Laborexperiment hat die Apoptose dosis- und zeitabhängig auf die jeweiligen Kontaminanten reagiert.
- Die Apoptose reagierte sensitiv.

Die beiden letzten Punkte sind nicht so eindeutig zu beantworten:

- Die Variabilität aufgrund anderer Faktoren ist komplex und kann anhand dieser Arbeit nicht abschließend beurteilt werden. Die Apoptose stellt in Klieschen einen jahreszeitbedingten, physiologischen Faktor dar, der weiterer Untersuchungen bedarf. Vor allem der Einfluß von Steroid-Hormonen muß in diesem Zusammenhang eingehend untersucht werden.
- Die Messungen haben biologische Bedeutung, da Apoptose ein wichtiger biologischer Prozeß in der Homöostase von Zellen und Geweben ist. Eine Interpretation der auftretenden Schwankungen ist jedoch, s.o., zu diesem Zeitpunkt nicht abschließend möglich.

Ein wesentliches Defizit des neuen, potentiellen Biomarkers Apoptose besteht zur Zeit darin, daß, im Gegensatz z.B. zur EROD-Induktion (BAYNE et al., 1985; ACHAZI, 1989) oder MT-Induktion (WINGE und MIKLOSSEY, 1982; ROESIJADI, 1996), die externen und internen zellulären Mechanismen bei der Signaltransduktion weder im einzelnen, noch in der Gesamtheit ausreichend bekannt sind.

Wie in Kapitel 2.1 ersichtlich, ist die Apoptose ein sehr komplexer Vorgang. Das Hauptinteresse der Apoptose-Forschung liegt zum jetzigen Zeitpunkt noch darin, Ursachen zahlreicher Krankheiten zu erforschen und Therapien zu entwickeln.

Komplexe Studien zum Mechanismus, zur Biologie und zu den wichtigsten saisonalen Einflußgrößen der Apoptose in Fischen existieren kaum, so daß zu diesem Zeitpunkt eine Anwendung der Apoptose als Biomarker nicht gegeben erscheint.

Es wird ferner deutlich, daß eine Übertragung von Ergebnissen aus Laborexperimenten auf die reale Situation im Freiland nicht direkt möglich ist. Im Freiland spielen neben den Schadstoffen unzählige andere o.g. Einflußfaktoren eine Rolle, die mögliche Effekte durch Schadstoffe überlagern können.

Im Rahmen einer eventuellen späteren Anwendung als Biomarker muß für die Apoptose ebenso wie für die anderen, saisonal beeinflussten Biomarker, eine gezielte Probenahmestrategie unter Kenntnis dieser Einflußfaktoren und der genauen saisonalen Abhängigkeiten erfolgen, um falsche Rückschlüsse aufgrund von physiologischen Schwankungen auf Schadstoffeffekte zu vermeiden.

Die Interpretation der Daten unter Berücksichtigung der Gesamtsituation stellt daher auch weiterhin das Problem bei der Anwendung des Biomarker-Konzepts dar.

8 Zusammenfassung/Summary

8.1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte die Eignung von Apoptose als Biomarker für das biologische Effektmontoring überprüft werden. Die Untersuchungen zur Apoptose erfolgten in Lebern der marinen Fisch-Spezies Kliesche (*Limanda limanda* L.).

Hierfür wurden Laborexperimente mit den ausgewählten Modellkontaminanten Cadmium, PCB 118 und PCB 77 durchgeführt, um mögliche Effekte durch anthropogene Stressoren auf die Apoptose nachzuweisen. Ferner sind in Laborexperimenten mögliche Einflüsse natürlicher Stressoren wie Salzgehalt- und Temperaturänderungen auf die Apoptose untersucht worden.

Parallel dazu wurde die Apoptose im Freiland an unterschiedlich kontaminierten Stationen zu zwei verschiedenen Jahreszeiten in Nord- und Ostsee bestimmt. Zur Überprüfung möglicher saisonaler Schwankungen in der Apoptoserate wurde an der Nordsee-Station N01 ein sog. Jahresgang aufgenommen, d.h. die monatliche Messung der Apoptoserate.

Die Bestimmung der Apoptose erfolgte mittels DNA-Elektrophorese und anschließender Quantifizierung der DNA-Fragmente zwischen ca. 180 und 1500 bp sowie mittels des TUNEL-assay an Gefrierschnitten und anschließender Image-Analyse. Den Untersuchungen zur Apoptose vorangestellt erfolgte die Optimierung der Methoden.

In den Laborexperimenten konnte gezeigt werden, daß im Februar bei einem niedrigen Apoptose-Grundlevel Apoptose durch Cadmium und PCB 118 induzierbar ist. Hohe Konzentrationen der stark toxischen Substanzen PCB 77 und Cadmium haben hauptsächlich Nekrose im Lebergewebe induziert.

Im Sommer dagegen, bei einem hohen Apoptose-Grundlevel, führte die Inkubation mit PCB 118 und PCB 77 zu einer konzentrationsabhängigen Reduzierung der Apoptoserate.

In den Laborexperimenten mit den natürlichen Stressoren wurde durch eine Reduzierung des Salzgehalts kein Effekt erzielt, eine Erhöhung der Temperatur führte jedoch im Mai zu einer leichten Erhöhung TUNEL-positiver Zellen.

Die Untersuchung der Freilandstationen zeigte im Dezember höhere Apoptoseraten in der Ostsee als in der Nordsee auf, im Mai dagegen waren kaum Unterschiede zwischen den einzelnen Stationen zu messen. Die Bestimmung der Apoptose im Jahresgang ergab eine Erhöhung der Apoptoserate zwischen Juli und Oktober und ein Minimum im Frühjahr.

Die Apoptoserate an den Freilandstationen korrelierte im Dezember invers zum Zink- und Cadmiumgehalt der Lebern, zum GSI und zur Wassertemperatur, nicht jedoch zu den

organischen Schadstoffen PCB und DDE. Ferner bestand eine Korrelation zu den Biomarkern MT (invers) und zur EROD-Aktivität.

Im Mai korrelierte neben dem Zink- und Cadmiumgehalt der Fettgehalt der Lebern mit der Apoptoserate und im Jahresgang wiederum die Wassertemperatur und der Fettgehalt.

Es hat sich gezeigt, daß die Apoptose in Klieschenlebern einen deutlichen Zusammenhang zu saisonalen und physiologischen Schwankungen aufweist.

Die Apoptoserate sinkt im Herbst, wenn der Hormonspiegel steigt, der Fettgehalt der Lebern abnimmt und der Gonadenaufbau beginnt, und sie erhöht sich im Sommer nach dem Ablaichen, wenn wieder vermehrt Energie in Form von Fett in den Lebern gespeichert wird.

Die Eignung von Apoptose als Biomarker ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht gegeben. Zwar ist durch die potentielle Induzierbarkeit von Apoptose durch Schadstoffe eine der Grundvoraussetzungen für die Eignung von Biomarkern erfüllt, es müssen jedoch noch die genauen Zusammenhänge zwischen dem Mechanismus und den Einflußfaktoren der Apoptose bekannt werden, um mit der Apoptose genaue Aussagen zur Schadstoffbelastung des Meeres treffen zu können.

8.2 Summary

The aim of the present study was to evaluate the suitability of apoptosis as a biomarker for biological effect monitoring. The investigations were carried out with the marine fish species dab (*Limanda limanda* L.).

For this purpose, aquarium experiments with the selected model contaminants cadmium, PCB 118 and PCB 77 were carried out, to examine possible effects of anthropogenic stressors on apoptosis. In further laboratory experiments the effects of the natural stressors salinity and temperature alterations on apoptosis were investigated.

In parallel, apoptosis was analyzed in field studies on different contaminated areas in the North Sea and the Baltic Sea at two different seasons. For an investigation of possible seasonal alterations in the apoptotic level, apoptosis was analyzed monthly for the period of one year at the station N01.

Determination of apoptosis was carried out by DNA gel electrophoresis and quantification of DNA fragments from about 180 to 1500 basepairs as well as by TUNEL-assay in frozen sections, followed by image analysis. The first step of the study was the optimization of the two methods.

In the laboratory experiments could be shown, that in February with a low apoptotic ground level apoptosis is inducible by cadmium and PCB 118. High concentrations of the toxic substances PCB 77 and cadmium resulted mainly in hepatic necrosis.

In summer, when the apoptotic ground level was higher, the exposure of PCB 118 and PCB 77 resulted in a concentration dependent reduction of the apoptotic rate.

The laboratory experiments concerning the natural stressors showed no effects after a reduction of salinity, but an increase in temperature led to a slight increase in TUNEL positive cells.

The investigations of the field stations turned out higher apoptosis levels in December in the Baltic Sea compared to the North Sea, whereas in May scarcely any differences between the stations could be measured. The determination of apoptosis in the annual cycle resulted in an increase in the apoptotic level from July to October and in a minimum in spring.

The apoptotic levels of the field stations correlated in December reversed to the hepatic zinc and cadmium contents, to the GSI and to the water temperature but not to the organic pollutants PCB and DDE. In addition, a correlation could be found to the biomarkers MT (reversed) and to the EROD activity.

In May the apoptosis rate correlated in addition to the hepatic zinc and cadmium level to the lipid content and in the annual cycle to the water temperature and to the hepatic lipid content.

It has shown that there is an apparent connection of apoptosis to seasonal and physiological variations. The apoptotic level decreases in autumn when the hormon level increases, the hepatic lipid content decreases and the formation of the gonads starts, and it increases in summer after spawning at a time of energy uptake and storage of hepatic lipid.

The suitability of apoptosis as a biomarker is not given at the present time. The potential inducability of apoptosis by anthropogenic contaminants is one of the basic requirements for the suitability of biomarkers, but at the moment there is a further need to investigate the mechanism and the influencing factors of apoptosis to be enabled for giving a statement about the condition of marine pollution.

9 Anhang

9.1 DNA-Extraktion (QIAamp Tissue Kit der Fa. QIAGEN)

9.1.1 Lösungen

- Ethanol absolut p.a.
- Puffer für RNase: 10 mM Tris/HCl (pH 7,5)
15 mM NaCl
- RNase A 20 mg/ml (15 min auf 95 °C erhitzen)

9.1.2 Fertiglösungen und -material

- Proteinase K (Lyophilisat + 7 ml dest. Wasser)
- Puffer ATL (Gewebelysispuffer)
- Puffer AL (Probenpuffer)
- Puffer AW (Waschpuffer)
- Puffer AE (Elutionspuffer)

- QIAgen Säulen (Silica)

9.1.3 Durchführung

- Ca. 25 mg Lebergewebe in 1,5 ml Eppendorfgefäß einwiegen
- Zugabe von 180 µl Puffer ATL und 20 µl Proteinase K-Lösung
- Lysis für 3 h bei 55 °C im Heizrührer
- Zugabe von 20 µl RNase A Lösung
- 2 min Inkubation bei RT
- Zugabe von 200 µl Puffer AL
- Inkubation für 10 min bei 70 °C
- Zugabe von 210 µl Ethanol
- Überführen des gelösten Homogenats auf eine QIAgen Säule
- Zentrifugation bei 6000 g für 1 min, Verwerfen des Filtrats
- 2 mal Waschen mit 500 µl Puffer AW und anschließender Zentrifugation (1 min. bei 6000 g)
- 2malige Elution (Zentrifugation) mit jeweils 150 µl auf 70 °C vorgewärmten und für 1 min auf der Säule inkubierten Puffer AE
- Eventuell Wiederholung der Reinigung über die Säule

9.2 DNA-Quantifizierung (MANIATIS et al., 1982)

- Verdünnung des DNA-Extrakts um F=10
- Photometrische Messung der Extinktion bei 260 und 280 nm in Halbmicro-Küvetten
- Referenzlösung: dest. Wasser
- Berechnung des DNA-Gehalts (260 nm) über den molaren Extinktionskoeffizienten:
E=1 entspricht 50 µg DNA/ml
- Berechnung der Reinheit des Extrakts mittels des 260/280-Faktors (F=1,7-1,9
entspricht einem reinen DNA-Extrakt)

9.3 DNA-Elektrophorese

9.3.1 Lösungen

- | | |
|-------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| - TBE-Puffer (5 x konz.)
(MANIATIS et al., 1982) | 54 g Tris
27,5 g Borsäure
20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
ad 1 l mit dest. Wasser |
| - TE-Puffer
(MANIATIS et al., 1982) | 10 mM Tris/HCl (pH 7,4)
1 mM EDTA (pH 8,0) |
| - Probenpuffer (6 x konz.)
(MANIATIS et al., 1982) | 50 % Saccharose
0,15 % Bromphenolblau
0,1 % SDS
in dest. Wasser |
| - Ethidiumbromid-Lösung | Vorratslösung (0,1 %):
0,1 g Ethidiumbromid
ad 100 ml mit dest. Wasser

Färbelösung (2 µg/ml):
0,5 ml Vorratslösung
ad 250 ml mit dest. Wasser |

9.3.2 Gelherstellung:

- 1,5 % Agarosegel:
- 3 g Agarose in ein 250 ml Becherglas einwiegen
 - Zugabe von 200 ml TBE-Puffer
 - Suspension in einem Mikrowellengerät aufkochen (Siedeverzug mittels Glasstab verhindern) und so lange weiter erhitzen und rühren, bis sich die Agarose vollständig gelöst hat
 - Agaroselösung auf ca. 55-60 °C abkühlen lassen
 - Geltablett mit Gummidichtungen (bzw. Tesa Multi-Kraftband) an den Seiten abdichten, horizontal austarieren und mit Probenauftragskämmen versehen
 - Agaroselösung blasenfrei auf das Geltablett gießen und 1 h bei RT aushärten lassen

9.3.3 Durchführung

- Käbme und Dichtungen entfernen und das Geltablett in die Elektrophoresekammer setzen
- Elektrodenpuffer (TBE-Puffer) einfüllen bis das Gel ca. 1 mm mit Puffer bedeckt ist
- Proben in die Slots pipettieren (60 µl DNA-Extrakt + 12 µl Probenpuffer)
- DNA-bp-Marker (PCR, Sigma) (5 µl + 45 µl TE Puffer + 12 µl Probenpuffer) in einen Slot pipettieren
- Proben bei 200 V (entspricht 6 V/cm) 1 h trennen (ca. 200 mA)
- Gel 30 min in Ethidiumbromid-Lösung färben

9.3.4 Densitometrie

9.3.4.1 Gerätebedingungen

- Video Digitalkamera: 256 Graustufen, 440000 Pixel, Belichtungszeit 1,16 sec, Blende rasterlos einstellbar
- UV Transilluminator: 302 nm
- Steuerungseinheit
- Software Gelpro 2.0 (Fa. Intas)

9.3.4.2 Kalibrierung

a) DNA-Quantifizierung des PCR-Markers (externer Standard und Belichtungsstandard):

- Erstellen einer Kalibriergeraden eines DNA-Markers mit bekanntem DNA-Gehalt (100 bp-Marker der Fa. FMC).
- Herstellerangabe: Der Marker enthält 8 Banden, davon 1 Doppelbande. Jede Bande enthält bei 5 µl Auftragsvolumen ca. 50 ng DNA. Dies entspricht einer DNA-Menge von ca. 90 ng/µl.

Tab. 12: IOD für unterschiedliche Konzentrationen des 100 bp-Marker

DNA [ng]	IOD
0	0
450	8756
900	20742
1800	37265
2700	57530
3600	72751

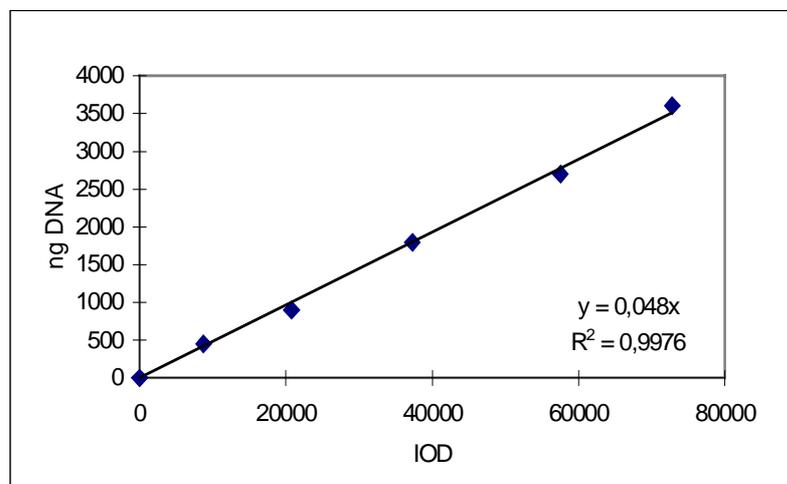


Abb. 26: Kalibriergerade des 100 bp-Markers

Tab. 13: Quantifizierung des DNA-Gehalts des PCR-Markers aus o.g. Kalibriergeraden

PCR Marker [μ l]	IOD	DNA Gehalt [μ g/ml]
3	15984	257
4	21184	256
5	26980	261

Ø 258 μ g/ml

Der ermittelte DNA Gehalt des PCR Markers beträgt 258 μ g/ml.

b) Erstellen einer Kalibriergeraden des PCR Markers:

Tab. 14: IOD für unterschiedliche Konzentrationen des PCR-Markers

DNA [ng]	IOD
0	0
258	3360
516	10119
774	13875
1032	17314
1290	24791
1548	28103
1806	34774
2064	37880

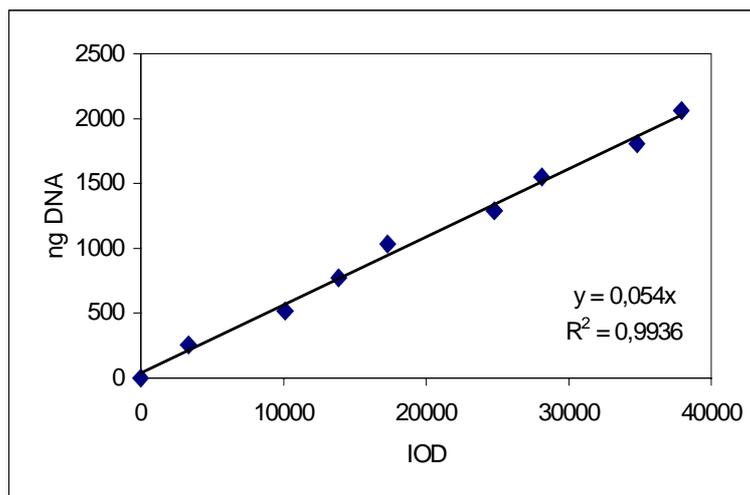


Abb. 27: Kalibriergerade des PCR-Markers

9.3.4.3 Durchführung/Berechnung der apoptotischen DNA-Fragmentierung

- Laden des digital abgespeicherten Gels in Gelpro
- Setzen der Integrationsgrenzen der zu quantifizierenden Banden zwischen 180 und 1500 bp
- Gelpro-Bedingungen: Lane width (pixel): 28
 Sensitivity (1-9): 9
- Speichern der ermittelten IOD der Banden
- Berechnung des Korrekturfaktors für die Belichtung (PCR-Marker auf dem Gel, 5 µl Auftrag) anhand der PCR-Kalibriergeraden (5 µl, 1290 ng DNA, IOD: 23889):
F (Belichtung) = 23889 (IOD Kalibriergerade) / IOD (PCR-Marker Gel)
- Berechnung der auf die Belichtungssituation des PCR-Markers (Kalibriergerade) korrigierten IOD der jeweiligen Probe:
IOD (korrigiert) = F (Belichtung) x IOD (DNA-Fragmente der Probe)
- Berechnung des DNA-Gehalts der apoptotischen Banden über die IOD des externen Standards (Kalibriergerade):
DNA [ng] = IOD (korrigiert) x 0,054 (s. Abb. 27)
- Berechnung des prozentualen DNA-Gehalts der Fragmente auf die Gesamtmenge der auf dem Gel aufgetragenen DNA

9.4 TUNEL-assay (modifiziert nach GAVRIELI et al., 1992)

9.4.1 Lösungen

- | | | |
|---|------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| - | Kryo-embedding-Lösung | Fertiglösung, Fa. Microm |
| - | Paraformaldehyd-Lösung (4 %) | 12 g Paraformaldehyd
125 ml dest. Wasser (erhitzen, leicht abkühlen lassen)
NaOH (1 mol/l) bis Lösung klar ist (1-2 Tropfen)
125 ml 2 x PBS |
| - | Ethanol absolut p.a. | |
| - | PBS-Puffer | Sigma, P-3813
10 mmol, pH 7,4
ad 1 l mit dest. Wasser |
| - | Blockierlösung (1 %) | 500 µl Wasserstoffperoxid (30 %ig)
50 ml Methanol |
| - | Lysis-Puffer (0,1 %) | 1 g Natriumcitrat
1 ml Triton X-100
ad 1 l mit dest. Wasser |
| - | DNase I | 1 mg/ml in DNase-Puffer |
| - | DNase-Puffer | 50 mmol Tris/HCl (pH 7,6)
10 mmol MgCl ₂
1 mg/ml BSA |

-	TUNEL-Puffer	125 mmol Tris/HCl (pH 6,6) 1,26 mg/ml BSA
-	Verdünnungspuffer	100 mmol Tris/HCl (pH 7,5) 150 mmol NaCl 5 % Milchpulver
-	Mounting medium	DAKO Ultramount, S-1964
-	TUNEL-Reaktionsgemisch (Roche Diagnostics)	10 µl 5 x konz. TUNEL-Puffer 0,5 µl (12,5 U) Terminale Transferase 5 µl (25 mmol) Cobaltchlorid 0,25 µl (0,25 nmol) Digoxigenin-11-dUTP ad 50 µl mit bidest. Wasser
-	Anti-DIG-POD (Roche Diagnostics)	Anti-DIG-POD (Roche) 1:200 in Verdünnungspuffer
-	DAB-Substrat (Roche Diagnostics)	Fertiglösung 1:10 in DAB-Puffer

9.4.2 Anfertigung der Kryoschnitte

- Gefrorenes (-20 °C) Leberstück auf dem Schneidblock mittels Kryo-embedding-Lösung anfrieren und Schneidblock einspannen
- Vorschneiden einer geraden Schnittfläche
- Schneiden von 10 µm dicken Schnitten
- Aufnehmen des Schnitts mit einem Kryo-Objektträger
- Durch leichtes Reiben an der Unterseite des Objektträgers wird der Schnitt auf dem Objektträger „aufgeschmolzen“
- Ca. 3 min an der Luft trocknen lassen
- 30 min Fixierung des Gewebes in frisch hergestellter 4 %iger Paraformaldehyd-Lösung
- 30 min waschen in PBS
- Zur längeren Lagerung in der Gefriertruhe: 2 min Dehydratisierung in Ethanol (96 %)

9.4.3 Durchführung der TUNEL-Färbung

- Schnitte mit dem DAKO-pen umkreisen
- Schnitte 15 min in PBS waschen
- 30 min in Blockierlösung bei RT inkubieren
- 3 x in PBS waschen (5, 3 und 1 min)
- 5 min in Lysis-Puffer bei RT inkubieren
- 3 x in PBS waschen (5, 3 und 1 min)
- (Positivkontrolle:
Objektträger um den Schnitt herum trocknen
50 µl DNase I auf den Schnitt pipettieren
20 min bei 37 °C in einer Feuchtkammer inkubieren

- 3 x 5 min in PBS waschen)
- Objektträger um den Schnitt herum trocknen
- 50 µl TUNEL-Reaktionsgemisch auf jeden Schnitt pipettieren, 1 h bei 37 °C in der Feuchtkammer inkubieren
(Negativkontrolle: TUNEL Reaktionsgemisch ohne Terminale Transferase)
- 3 x 5 min in PBS waschen
- Objektträger um den Schnitt herum trocknen
- 50 µl Anti-DIG-POD auf die Schnitte pipettieren, 30 min bei 37 °C in der Feuchtkammer inkubieren
- 3 x 5 min in PBS waschen
- Objektträger um den Schnitt herum trocken
- 50 µl DAB-Substrat auf die Schnitte pipettieren, 10 min bei RT inkubieren
- 3 x 5 min in PBS waschen
- Schnitte trocknen
- Mounting medium auf die Schnitte geben, 20 min bei 70 °C aushärten lassen

9.4.4 Image Analyse

9.4.4.1 Gerätebedingungen

- Durchlicht-Mikroskop: 400fache Vergrößerung
- Video Digitalkamera: 256 Graustufen, 440000 pixel, Belichtungszeit 0,04 sec
- Steuerungseinheit
- Software ImagePro 3.0 (Fa. Intas)

9.4.4.2 Durchführung

- Laden der digital abgespeicherten Bilder in ImagePro 3.0
- Zählen aller Zellkerne
- ImagePro 3.0 Bedingungen:
 - fill holes
 - Area: 20-50000
 - Graustufe: 0-150

9.5 Geräte und Zubehör

Brutschrank	B6200	Heraeus
DAKO-pen	S-2002	DAKO
Densitometriesoftware Gelpro	Version 2.0	Intas
Densitometriesoftware ImagePro	Version 3.0	Intas
Dunkelkammer	Dark Box	Intas
Elektrophoresekammer	Agagel Maxi	Biometra
Feuchtkammer		
Gel-Videodokumentation	S/W, 440000 pixel	Intas
Kryogefäße		Nalgene
Kryomikrotom	HM 500	Microm
Leuchttisch UV/VIS	UV-Systeme	Intas
Magnetrührer	RCT	Ikamag
Mikroskop	Axioskop	Zeiss
Mikrowellengerät		Panasonic
Objektträgerkästen		NeoLab
pH-Elektrode	SenTix 50	WTW
pH-Meter		Knick
Photometer	Lambda 2 UV/VIS Spectrophotometer	Perkin Elmer
Potter		B.Braun Melsungen
Power Supply	Minicell Power Pack P20	Biometra
Quarz Halbmikro-Küvetten		
Stickstoffkanne	35 VHC	Taylor-Wharton
Thermodrucker		Intas
Thermomixer	5436	Eppendorf
Tiefkühlschrank		
Trockenschrank	T 6120	Heraeus
Waage	MC1 Research RC 210 P	Sartorius
Zentrifuge	Biofuge pico	Heraeus

9.6 Chemikalienliste

Substanz	Firma	Toxizität; R- und S-Sätze
Agarose (SeaKem Le)	FMC	
Anti-DIG-POD	Roche Diagnostics	
Borsäure	Merck	
BSA (Fraktion V)	Merck	
Bromphenolblau Na-Salz	Merck	
DAB-Substrat	Roche Diagnostics	T, F R11-23/25-40; S7-16-24-45
DAB-Substrat-Puffer	Roche Diagnostics	
DIG-11-dUTP	Roche Diagnostics	
DNA Marker (100 bp)	FMC	
DNA Marker (PCR)	Sigma	
DNase I	Roche Diagnostics	
Dodecylsulfat-Na-Salz	Merck	Xn R22-36/38
EDTA (Titriplex II)	Merck	Xn R22
Ethanol absolut p.a.	Merck	F R11, S7-16
Ethidiumbromid	Merck	T+ R22-26-36/37/38-40; S26-28.1-36/37-45
Isopentan	Merck	F R11; S9-16-29-33
Kryo-embedding	Microm	
Magnesiumchlorid	Merck	
Methanol	Merck	T, F R11-23/25; S7-16-24-45
Mounting Medium	DAKO	
MSS 22 (3-Aminobenzoe- säureethylester		
Natriumchlorid	Merck	
Natriumcitrat	Merck	
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck	Xn R20/22-36/38; S26-28
Natriumhydroxid	Merck	C R35; S26-37/39-45
Paraformaldehyd	Sigma	Xi R22-36/37/38-40-43; S22-26-36/37
PBS	Sigma	X R36/37/38; S26-36
Proteinase K	Roche Diagnostics	
RNAse A	Merck	
Saccharose	Merck	
Salzsäure (25 %)	Merck	C R34-37; S26-36/37/39-45
Terminale Transferase	Roche Diagnostics	T R23/25; S20/21-28-45
Tris(hydroxymethyl)- aminomethan	Merck	Xi R36/38
Triton X-100	Sigma	Xn R22-36, S24
Wasserstoffperoxid 30%	Merck	C R34, S28.1-39

9.7 Ergebnistabellen

Tab. 15: Daten zum LE 1

Behandlung	Tage	Probe	DNA-Fragm. [%]	Cd-Gehalt [$\mu\text{g}/\text{kg}$ Leber]*	PCB 118 [$\mu\text{g}/\text{kg}$ Lipid]*	PCB 77 [$\mu\text{g}/\text{kg}$ Lipid]*	Länge [cm]	Alter [a]
Unbeh.	2	1	0,0	62,8	87,4	63,3	21	3
Kontrolle	2	2	6,6	114,5	67,5	51,4	25	4
	2	3	0,0	67,6	266,0	179,4	24	3
	2	4	0,0	164,8	138,2	204,2	21	4
	2	5	0,0	65,6	72,0	56,7	21	3
Median			0,0	67,6	87,4	63,3		
Phys. NaCl	2	1	0,0	105,4			25	4
	2	2	0,0	83,8			21	3
	2	3	4,5	67,0			23	3
	2	4	0,0	48,1			21	2
	2	5	0,0	235,4			23	4
Median			0,0	83,8				
Phys. NaCl	5	1	0,0	127,7			20	3
	5	2	0,0	57,4			23	3
	5	3	0,0	45,1			21	3
	5	4	0,0	93,1			20	3
	5	5	0,0	147,2			21	4
Median			0,0	93,1				
Phys. NaCl	10	1	0,0	57,9			21	3
	10	2	0,0	107,2			19	3
	10	3	0,0	91,4			23	3
	10	4	0,0	130,9			22	4
	10	5	0,0	79,7			21	3
Median			0,0	91,4				
Cd, 1 mg/kg	2	1	0,0	11608,4			22	3
	2	2	0,0	5516,9			24	4
	2	3	5,4	17001,7			22	3
	2	4	5,6	23756,3			20	3
	2	5	0,0	14452,6			23	3
Median			0,0	14452,6				
Cd, 1 mg/kg	5	1	7,4	11673,1			23	4
	5	2	7,3	198,6			23	4
	5	3	5,1	19902,8			20	3
	5	4	7,4	11976,7			21	3
	5	5	0,0	13049,8			20	2
Median			7,3	11976,7				
Cd, 1 mg/kg	10	1	5,3	10608,2			24	3
	10	2	2,2	206,8			24	4
	10	3	3,9	5295,3			22	3
	10	4	0,0	17268,1			18	2
	10	5	0,0	750,8			22	3
Median			2,2	5295,3				

Behandlung	Tage	Probe	DNA-Fragm. [%]	Cd-Gehalt [µg/kg Leber]*	PCB 118 [µg/kg Lipid]*	PCB 77 [µg/kg Lipid]*	Länge [cm]	Alter [a]
ÖI	2	1	0,0		63,9	56,8	24	5
	2	2	0,0		103,5	139,6	25	4
	2	3	8,8		52,3	44,7	22	3
	2	4	0,0		83,3	88,7	21	3
	2	5	0,0		118,6	125,0	22	3
Median			0,0		83,3	88,7		
ÖI	5	1	0,0		66,5	57,3	25	4
	5	2	0,0		57,1	53,1	23	3
	5	3	3,5		67,9	61,7	22	3
	5	4	0,0		70,1	83,1	22	2
	5	5	0,0		76,8	65,5	24	3
Median			0,0		67,9	61,7		
ÖI	10	1	0,0		66,6	49,3	21	3
	10	2	0,0		60,4	50,9	22	3
	10	3	0,0		73,3	68,6	18	2
	10	4	4,3		106,9	153,4	22	3
	10	5	0,0		50,3	56,2	19	2
Median			0,0		66,6	56,2		
ÖI	20	1	5,2		78,6	62,2	21	3
	20	2	0,0		109,1	167,6	21	3
	20	3	0,0		99,6	128,2	20	2
	20	4	0,0		109,2	108,1	20	2
	20	5	0,0		97,5	89,3	24	3
Median			0,0		99,6	108,1		
PCB 118 1 mg/kg	2	1	5,9		3750,0		22	4
	2	2	0,0		11275,0		22	3
	2	3	0,0		10505,0		25	3
	2	4	0,0		10445,0		20	3
	2	5	0,0		19165,0		21	3
Median			0,0		10505,0			
PCB 118 1 mg/kg	5	1	0,0		16528,0		21	3
	5	2	5,4		19433,0		20	2
	5	3	8,2		27070,0		21	3
	5	4	4,4		37502,0		23	5
	5	5	0,0		25045,0		20	3
Median			4,4		25045,0			
PCB 118 1 mg/kg	10	1	17,7		755,0		22	3
	10	2	6,2		55251,0		20	3
	10	3	0,0		2709,0		25	5
	10	4	13,6		10459,0		20	3
	10	5	4,8		36337,0		20	2
Median			6,2		10459,0			

Behandlung	Tage	Probe	DNA-Fragm. [%]	Cd-Gehalt [$\mu\text{g}/\text{kg}$ Leber]*	PCB 118 [$\mu\text{g}/\text{kg}$ Lipid]*	PCB 77 [$\mu\text{g}/\text{kg}$ Lipid]*	Länge [cm]	Alter [a]
PCB 77	2	1	0,0			11016,0	19	2
1 mg/kg	2	2	0,0			22064,0	22	3
	2	3	0,0			10231,0	24	3
	2	4	0,0			2562,0	25	3
	2	5	0,0			7244,0	21	3
Median			0,0			10231,0		
PCB 77	5	1	4,7			26773,0	24	4
1 mg/kg	5	2	2,4			22536,0	21	3
	5	3	0,0			13537,0	22	5
	5	4	0,0			9380,0	22	3
	5	5	0,0			6503,0	22	3
Median			0,0			13537,0		
PCB 77	10	1	0,0			4313,0	24	4
1 mg/kg	10	2	0,0			19074,0	25	3
	10	3	0,0			6198,0	24	3
	10	4	0,0			4147,0	23	3
	10	5	0,0			22211,0	21	3
Median			0,0			6198,0		
PCB 77	20	1	0,0			7223,0	21	4
1 mg/kg	20	2	4,0			6029,0	23	3
	20	3	4,3			9090,0	22	2
	20	4	0,0			6024,0	23	4
	20	5	0,0			9031,0	21	3
Median			0,0			7223,0		

* (LACORN, 1999b)

Tab. 16: Daten zum LE Cd

Behandlung	Tage	Probe	TUNEL [n]	DNA- Fragm. [%]	Cd-Gehalt [µg/kg Leber]*	Zink [µg/kg Leber]*	Alter [a]	Länge [cm]
Unbeh.	1	1	3	3,2	50,7	46,5	3	23
Kontrolle	1	2	6	0,0	93,1	40,9	4	21
	1	3	2	3,7	252,3	43,8	4	23
	1	4	2	0,0	65,6	33,1	2	19
	1	5	143	0,0	53,5	35,3	2	19
	1	6		4,9	124,1	27,0	5	23
	1	7		0,0	66,3	24,9	4	25
Median			3	0,0	66,3	35,3		
Unbeh.	5	1	23	2,2	36,1	41,8	3	22
Kontrolle	5	2	2	1,9	16,2	23,5	5	26
	5	3	1	0,0	53,5	34,8	4	23
	5	4	1	0,0	18,3	27,6	2	22
	5	5	148	0,0	24,8	24,6	3	23
Median			2	0,0	24,8	27,6		
Unbeh.	10	1	30	1,0	54,3	39,0	2	20
Kontrolle	10	2	6	0,0	120,9	44,7	3	20
	10	3	19	3,8	47,3	26,6	4	23
	10	4	1	0,0	56,0	30,9	3	20
	10	5	1	0,0	177,9	35,2	4	25
	10	6		0,0	55,5	30,4	3	22
	10	7		0,0	25,8	28,3	2	21
Median			6	0,0	55,5	30,9		
Phys. NaCl	1	1	3	4,3	41,9	48,1	4	23
	1	2	9	1,4	20,5	25,1	3	22
	1	3	0	2,2	124,8	39,6	3	23
	1	4	0	1,0	63,5	39,0	3	20
	1	5	1	0,0	92,8	26,8	4	21
	1	6		0,0	72,7	32,7	4	23
	1	7		0,0	96,5	32,3	3	23
Median			1	1,0	72,7	32,7		
Phys. NaCl	2	1	1	1,6	43,9	28,2	5	22
	2	2	9	0,0	114,0	32,1	5	23
	2	3	3	0,0	46,8	39,4	3	23
	2	4	2	0,0	61,1	40,1	3	19
	2	5	19	0,0	77,1	46,5	3	23
	2	6		0,0	94,3	28,7	5	23
	2	7		0,0	31,1	35,2	3	21
Median			3	0,0	61,1	35,2		

Behandlung	Tage	Probe	TUNEL [n]	DNA- Fragm. [%]	Cd-Gehalt [µg/kg Leber]*	Zink [µg/kg Leber]*	Alter [a]	Länge [cm]
Phys. NaCl	5	1	2	0,0	32,8	32,6	2	20
	5	2	6	0,0	50,5	41,3	3	23
	5	3	4	0,0	49,2	36,4	3	24
	5	4	6	2,2	40,6	27,2	3	20
	5	5	20	0,0	21,5	22,1	3	21
	5	6		0,0	106,4	29,7	3	22
	5	7		2,9	88,2	19,5	6	26
Median			6	0,0	49,2	29,7		
Phys. NaCl	10	1	6	0,0	116,1	39,6	4	21
	10	2	18	0,0	34,1	32,1	3	21
	10	3	1	0,0	98,7	28,1	5	26
	10	4	7	0,0	160,2	32,5	4	26
	10	5	24	0,0	97,6	18,4	3	24
	10	6		3,8	62,2	26,1	4	24
Median			7	0,0	98,2	30,1		
Cd 10 µg/kg	1	1	49	0,0	101	24,4	5	23
	1	2	2	1,0	83,1	34,2	3	20
	1	3	7	0,0	108,5	30,5	2	20
	1	4	56	0,0	47,5	44,6	3	22
	1	5	79	0,0	148,6	38,3	5	26
	1	6		1,5	49,5	27,8	3	23
Median			49	0,0	92,05	32,35		
Cd 10 µg/kg	2	1	0	2,5	49,8	22,9	4	23
	2	2	2	0,0	105,3	27,0	2	18
	2	3	3	3,2	43,4	32,9	4	26
	2	4	10	0,0	56,4	26,1	2	21
	2	5	20	0,0	59,4	30,0	2	22
	2	6		0,0	83,5	60,9	3	21
Median			3	0,0	57,9	28,5		
Cd 10 µg/kg	5	1	13	0,0	179,5	27,8	5	25
	5	2	3	0,0	91,8	36,3	4	22
	5	3	9	0,0	386,3	40,2	3	20
	5	4	17	2,2	385,2	33,6	4	25
	5	5	5	0,0	294,3	23,1	3	21
	5	6		0,0	44,7	25,6	3	23
Median			9	0,0	236,9	30,7		
Cd 10 µg/kg	10	1	4	0,0	443,4	30,1	3	20
	10	2	15	0,0	201,5	36,9	4	23
	10	3	24	0,0	271,4	34,3	5	26
	10	4	3	0,0	403,8	31,3	3	21
	10	5	28	1,7	50,9	28,9	3	20
	10	6		4,7	248,5	24,8	4	22
Median			15	0,0	260,0	30,7		

Behandlung	Tage	Probe	TUNEL [n]	DNA- Fragm. [%]	Cd-Gehalt [µg/kg Leber]*	Zink [µg/kg Leber]*	Alter [a]	Länge [cm]
Cd	1	1	6	0,0	933,7	39,8	4	22
100 µg/kg	1	2	8	2,9	139,7	28,3	3	23
	1	3	8	0,0	70,7	26,4	4	24
	1	4	4	0,0	498,5	40,3	4	24
	1	5	9	0,0	426	31,3	4	24
	1	6		1,4	513,9	32,5	4	26
Median			8	0,0	462,3	31,9		
Cd	2	1	4	0,0	893	11,7	4	21
100 µg/kg	2	2	7	4,9	1432,8	37,2	3	23
	2	3	2	0,0	1419,2	31,4	4	23
	2	4	5	1,5	65,9	28,4	2	22
	2	5	2	0,0	939,7	31,3	4	25
	2	6		0,0	111	52,2	3	22
Median			4	0,0	916,4	31,4		
Cd	5	1	116	0,0	59,5	26,6	3	21
100 µg/kg	5	2	16	6,2	2369,9	27,8	5	25
	5	3	101	2,9	3586,1	24,4	4	23
	5	4	176	3,2	3424,4	20,7	3	21
	5	5	92	3,3	2995,6	40,4	3	22
	5	6		1,7	2142,5	18,5	5	24
Median			101	3,1	2682,8	25,5		
Cd	10	1	119	0,0	4225,4	31,0	4	23
100 µg/kg	10	2	156	2,9	3056,3	30,4	3	21
	10	3	163	0,0	4155,5	70,8	2	20
	10	4	135	3,2	5114,4	23,8	4	20
	10	5	137	0,0	3744,3	38,4	3	21
	10	6		4,5	2247,3	46,6	3	22
Median			137	1,5	3949,9	34,7		
Cd 1 mg/kg	1	1	2	0,0	4109,1	64,5	4	23
	1	2	1	1,6	12932,4	29,5	3	21
	1	3	6	0,0	10690	88,6	2	18
	1	4	6	1,3	5821,3	8,2	3	24
	1	5	14	1,6	19319,9	22,8		23
	1	6		0,0	9512,6	63	3	20
Median			6	0,7	10101,3	46,3		
Cd 1 mg/kg	2	1	23	0,0	14628,9	23,6	5	25
	2	2	209	2,5	6590,4	15,5	4	21
	2	3	20	3,3	33206,5	23	4	22
	2	4	18	0,0	1583,4	29,5	2	22
	2	5	10	1,1	1819,4	9,2	3	23
	2	6		0,0	14198,9	26,3	4	23
Median			20	0,6	10394,7	23,3		

Behandlung	Tage	Probe	TUNEL [n]	DNA- Fragm. [%]	Cd-Gehalt [µg/kg Leber]*	Zink [µg/kg Leber]*	Alter [a]	Länge [cm]
Cd 1 mg/kg	5	1	176	0,0	23270	35,6	3	23
	5	2	12	2,4	18804,2	22,5	3	23
	5	3	2	1,2	32817,6	22,9	4	23
	5	4	143	0,0	32839,1	20,6	4	23
	5	5	108	1,9	10351,8	27	4	22
	5	6						
Median			108	1,2	23270,0	22,9		
Cd 1 mg/kg	10	1	102	1,7	7168,6	31,8	3	22
	10	2	149	3,2	11631,5	34,6	4	24
	10	3	223	1,1	57795,9	44,4	2	20
	10	4	154	2,5	19829,7	30,5	4	25
	10	5	136	2,0	23063,5	26,6	3	23
	10	6		0,0	39436,5	31,3	3	21
Median			149	1,9	21446,6	31,6		
Cd 5 mg/kg	1	1	25	1,8	23296,3	22,4	3	22
	1	2	19	0,0	45952,5	14,9	4	25
	1	3	4	0,0	44354,8	11,7	3	24
	1	4		3,0	70302,7	13,5	3	23
	1	5	4	3,0	39500,9	21,1	3	23
	1	6		3,3	17516,1	31,1	4	23
Median			12	2,4	41927,9	18,0		
Cd 5 mg/kg	2	1	112	0,0	44378	10,8	2	21
	2	2	155	2,9	11573,5	31,3	3	20
	2	3	62	3,2	55985	12,5	4	25
	2	4	144	4,2	63733,8	10,5	3	22
	2	5	50	1,2	27804,5	19,2	4	22
	2	6		0,0	51266,1	20,4	3	21
Median			112	2,1	47822,1	15,9		
Cd 5 mg/kg	5	1	60	0,0	54011	9,3	4	25
	5	2	137	1,2	26062,9	14,7	4	21
	5	3	121	0,0	43413,9	21	4	23
	5	4	17	5,1	48433,9	11,9	4	24
Median			91	0,6	45923,9	13,3		

* (LACORN, 1999b)

Tab. 17: Daten zum LE PCB 118

Behandlung	Tage	Probe	DNA-Fragm. [%]	TUNEL [n]	Alter [a]	Länge [cm]
Unbeh. Kontrolle	2	1	3,1	23	3	22
	2	2	4,9	206	5	26
	2	3	0,0	63	2	19
	2	4	3,9	337	5	24
	2	5	0,0	194	2	19
Median			3,1	194		
Unbeh. Kontrolle	10	1	3,7	256	4	24
	10	2	2,6	97	5	24
	10	3	3,3	48	3	23
	10	4	2,3	167	3	20
	10	5	5,5	158	4	23
Median			3,3	158		
ÖI	2	1	3,3	28	4	25
	2	2	0,0	37	4	25
	2	3	0,0	89	4	24
	2	4	5,9	116	4	24
	2	5	0,0	50	4	23
Median			0,0	50		
ÖI	5	1	0,0	87	4	23
	5	2	3,2	105	3	21
	5	3	0,0	5	4	20
	5	4	2,9	87	3	22
	5	5	0,0	114	4	23
Median			0,0	87		
ÖI	10	1	2,7	52	4	23
	10	2	0,0	88	3	22
	10	3	1,8	91	2	19
	10	4	0,0	113	4	25
	10	5	3,7	125	2	19
Median			1,8	91		
ÖI	15	1	0,0	24	3	21
	15	2	0,0	162	4	24
	15	3	6,5	74	3	20
	15	4	5,6	62	3	22
	15	5	0,0	43	2	19
Median			0,0	62		
PCB 118	2	1	2,4	67	4	24
10 µg/kg	2	2	6,2	87	4	23
	2	3	0,0	133	4	24
	2	4	0,0	179	4	21
	2	5	0,0	152	3	22
Median			0,0	133		

Behandlung	Tage	Probe	DNA-Fragm. [%]	TUNEL [n]	Alter [a]	Länge [cm]
PCB 118	5	1	1,4	159	2	20
10 µg/kg	5	2	0,0	312	4	24
	5	3	1,6	133	3	22
	5	4	2,1	372	3	21
	5	5	2,8	4	2	19
Median			1,6	159		
PCB 118	10	1	2,2	98	3	20
10 µg/kg	10	2	0,0	211	3	20
	10	3	3,1	167	5	24
	10	4	0,0	290	4	27
	10	5	0,0	137	2	19
Median			0,0	167		
PCB 118	15	1	0,0	9	4	24
10 µg/kg	15	2	0,0	130	4	23
	15	3	0,0	3	4	24
	15	4	4,2	274	3	23
	15	5	2,1	56	3	23
Median			0,0	56		
PCB 118	2	1	0,0	53	4	22
100 µg/kg	2	2	0,0	224	5	24
	2	3	0,0	180		28
	2	4	0,0	293	4	22
	2	5	0,0	210	3	20
Median			0,0	210		
PCB 118	5	1	4,2	312	4	23
100 µg/kg	5	2	0,0	187	3	21
	5	3	0,0	165	2	23
	5	4	4,6	81	3	23
	5	5	0,0	122	3	22
Median			0,0	165		
PCB 118	10	1	0,0	20	4	21
100 µg/kg	10	2	1,7	24	4	25
	10	3	1,4	11	4	24
	10	4	0,0	35	3	22
	10	5	0,0	26	3	21
Median			0,0	24		
PCB 118	15	1	0,0	9	3	20
100 µg/kg	15	2	0,0	68	3	22
	15	3	0,0	74	4	23
	15	4	2,6	4	4	23
	15	5	0,0	0	3	22
Median			0,0	9		

Tab. 18: Daten zum LE PCB 77

Behandlung	Tage	Probe	DNA-Fragm. [%]	TUNEL [n]	PCB 77 [$\mu\text{g}/\text{kg}$ Lipid]*	Fett [%]*	Länge [cm]	Alter [a]
Unbeh.	1	1	5,2		31,0	19,0	21	3
Kontrolle	1	2	3,7		26,9	9,0	24	5
	1	3	7,1		40,5	11,3	20	2
	1	4	6,7		24,5	7,6	22	3
Median			6,0		29,0	10,2		
ÖI	1	1	5,2		10,0	8,9	23	4
	1	2	4,0		27,6	7,9	22	3
	1	3	6,5		12,5	10,2	22	3
	1	4	3,9		114,2	2,6	26	5
	1	5	2,4		36,9	14,3	22	3
Median			4,0		27,6	8,9		
ÖI	2	1	2,1		41,2	11,8	20	3
	2	2	2,8		23,9	17,6	23	3
	2	3	3,4		18,8	4,7	22	4
	2	4	2,5		84,3	5,9	24	5
	2	5	6,3		21,2	22,9	24	3
Median			2,8		23,9	11,8		
ÖI	5	1	0,0		59,3	8,6	20	2
	5	2	1,3		25,1	12,2	21	3
	5	3	3,2		57,2	7,0	20	2
	5	4	3,9			3,8	22	4
	5	5	2,2		47,2	18,0	21	3
Median			2,2		52,2	8,6		
ÖI	10	1	3,2		52,8	12,4	21	3
	10	2	0,0		9,7	28,5	20	2
	10	3	4,6		58,6	8,8	24	4
	10	4	9,8		12,9	19,3	22	4
	10	5	4,0		46,0	4,5	22	3
Median			4,0		46,0	12,4		
PCB 77	1	1	4,4		166,9	25,0	24	3
100 $\mu\text{g}/\text{kg}$	1	2	0,0		899,9	3,6	20	3
	1	3	2,9		296,8	13,1	24	5
	1	4	1,8		272,9	4,1	21	3
	1	5	0,0		1177,8	18,5	24	4
Median			1,8		296,8	13,1		
PCB 77	2	1	0,0		1668,3	20,9	22	3
100 $\mu\text{g}/\text{kg}$	2	2	3,8		458,2	11,0	20	3
	2	3	3,7		1941,1	9,5	21	3
	2	4	2,2		603,2	8,4	21	3
	2	5	0,0		6902,8	6,5	22	5
Median			2,2		1668,3	9,5		

Behandlung	Tage	Probe	DNA-Fragm. [%]	TUNEL [n]	PCB 77 [$\mu\text{g}/\text{kg}$ Lipid]*	Fett [%]*	Länge [cm]	Alter [a]
PCB 77	5	1	0,0		902,3	7,2	21	3
100 $\mu\text{g}/\text{kg}$	5	2	0,0		16917,2	3,0	23	4
	5	3	2,5		678,8	15,6	22	4
	5	4	2,9		3180,7	10,0	22	3
	5	5	4,6		2873,5	13,3	21	2
Median			2,5		2873,5	10,0		
PCB 77	10	1	0,0		619,2	16,7	23	4
100 $\mu\text{g}/\text{kg}$	10	2	0,0		2987,4	4,1	25	4
	10	3	2,8		631,7	13,0	25	3
	10	4	0,0		305,0	3,6	21	4
	10	5	0,0		1480,4	24,6	21	2
Median			0,0		631,7	13,0		
PCB 77	1	1	2,7		126,5	3,2	24	4
10 $\mu\text{g}/\text{kg}$	1	2	0,0			4,2	21	3
	1	3	7,1		26,6	8,8	23	3
	1	4	2,3		109,8	6,3	21	3
	1	5	2,5		270,6	7,0	21	4
Median			2,5		118,2	6,3		
PCB 77	2	1	3,1	249	99,8	11,8	22	4
10 $\mu\text{g}/\text{kg}$	2	2	3,7	35	68,9	4,4	21	4
	2	3	0,0	247		3,7	24	4
	2	4	4,6	52	380,1	9,6	22	3
	2	5	2,6	242	146,7	14,3	23	4
Median			3,1	242	123,3	9,6		
PCB 77	5	1	5,1	100		10,6	20	3
10 $\mu\text{g}/\text{kg}$	5	2	0,0	72	931,4	9,9	23	3
	5	3	7,4	123	30,7	18,2	25	4
	5	4	6,5	240	76,5	9,0	22	3
	5	5	0,0	233	61,7	6,4	23	4
Median			5,1	123	69,1	9,9		
PCB 77	10	1	7,8	75	357,2	5,9	22	4
10 $\mu\text{g}/\text{kg}$	10	2	2,5	34	411,6	6,9	21	3
	10	3	4,2	113	20,0	14,4	20	3
	10	4	4,5	70	348,0	2,9	23	4
	10	5	5,6	107	145,3	14,6	20	3
Median			4,5	75	348,0	6,9		
PCB 77	1	1	3,6		86,0	6,6	25	3
1 $\mu\text{g}/\text{kg}$	1	2	4,4		48,0	8,1	25	4
	1	3	0,0		19,3	4,5	23	3
	1	4	3,2		48,7	9,7	21	3
	1	5	3,8			10,6	20	2
Median			3,6		48,4	8,1		

Behandlung	Tage	Probe	DNA-Fragm. [%]	TUNEL [n]	PCB 77 [$\mu\text{g}/\text{kg}$ Lipid]*	Fett [%]*	Länge [cm]	Alter [a]
PCB 77	2	1	5,4	263	69,3	3,6	25	5
1 $\mu\text{g}/\text{kg}$	2	2	9,7	267	50,5	6,7	21	3
	2	3	5,8	291	75,9	10,7	23	4
	2	4	5,2	272	108,2	8,1	20	2
	2	5	2,4	332	41,1	8,4	20	3
Median			5,4	272	69,3	8,1		
PCB 77	5	1	4,7	271	32,8	24,4	25	4
1 $\mu\text{g}/\text{kg}$	5	2	0,0	121	87,9	15,6	23	3
	5	3	4,2	175	35,8	24,6	24	4
	5	4	8,2	205	31,3	31,0	26	4
	5	5	4,0	246		10,0	22	3
Median			4,2	205	34,3	24,4		
PCB 77	10	1	0,0	298	48,5	13,1	21	3
1 $\mu\text{g}/\text{kg}$	10	2	2,1	137	29,8	16,6	24	5
	10	3	9,3	220		11,1	21	3
	10	4	4,5	305	14,6	16,6	22	3
	10	5	2,3	36		6,1	21	
Median			2,3	220	29,8	13,1		

* (LACORN, 1999b)

Tab. 19: Daten zum LE NS 1

Behandlung	Tage	Probe	DNA-Fragm. [%]	Länge [cm]	Alter [a]
Unbeh. Kontrolle	7	1	30,8	21	3
	7	2	19,0	18	2
	7	3	4,8	22	5
	7	4	10,0	24	5
	7	5	15,4	20	2
	7	6	18,6	27	4
	7	7	6,1	23	3
	7	8	6,6	25	6
	7	9	1,3	20	3
Median			10,0		
Salzgehalt (-8 ‰)	7	1	6,9	23	4
	7	2	6,6	26	4
	7	3	15,6	21	4
	7	4	15,7	21	2
	7	5	10,4	23	3
	7	6	17,9	20	2
	7	7	11,9	24	2
	7	8	2,3	22	4
	7	9	19,6	20	2
	7	10	18,4	24	5
Median			13,8		
Temperatur (+5 °C)	7	1	12,7	19	2
	7	2	0,0	23	3
	7	3	22,3	22	3
	7	4	21,4	24	4
	7	5	3,6	19	3
	7	6	14,1	21	4
	7	7	29,6	21	2
	7	8	2,4	23	2
	7	9	5,1	19	2
	7	10	3,1	26	4
Median			8,9		

Tab. 20: Daten zum LE NS 2

Behandlung	Tage	Probe	DNA-Fragm. [%]	TUNEL [n]	Alter [a]	Länge [cm]
Unbeh. Kontrolle	1	1	1,0		3	22
	1	2	0,0		3	21
	1	3	0,0		2	21
	1	4	0,0		3	21
	1	5	0,0		2	20
	1	6	0,0	12	3	20
	1	7	0,0	46	4	25
	1	8	0,0	2	4	26
	1	9	0,0	5	4	23
	1	10	0,0	3	3	21
Median			0,0	5		
Unbeh. Kontrolle	5	1	0,0	6	3	20
	5	2	0,0	0	4	26
	5	3	0,0	2	4	24
	5	4	0,0	8	4	23
	5	5	0,0	1	3	20
	5	6	5,1		4	25
	5	7	0,0		4	24
	5	8	0,0		4	21
	5	9	0,0		3	22
	5	10	0,0		4	24
Median			0,0	2		
Unbeh. Kontrolle	10	1	0,0		4	22
	10	2	0,0		3	21
	10	3	0,0		2	21
	10	4	0,0		3	22
	10	5	0,0		4	25
	10	6	0,0	0	4	26
	10	7	0,0	5	3	23
	10	8	0,0	2	3	22
	10	9	0,0	1	4	22
	10	10	0,0	16	3	21
Median			0,0	2		
Salzgehalt (-8 ‰)	1	1	0,0	4	4	25
	1	2	0,0	1	3	22
	1	3	0,0	6	4	22
	1	4	0,0	1	4	24
	1	5	0,0	1	2	20
	1	6	0,0		3	21
	1	7	0,0		4	22
	1	8	0,0		2	21
	1	9	0,0		2	20
	1	10	0,0		3	22
Median			0,0	1		

Behandlung	Tage	Probe	DNA-Fragm. [%]	TUNEL [n]	Alter [a]	Länge [cm]
Salzgehalt (-8 ‰)	5	1	0,0	0	4	24
	5	2	0,0	3	4	23
	5	3	0,0	2	3	20
	5	4	0,0	4	3	20
	5	5	0,0	5	3	21
	5	6	0,0		4	24
	5	7	0,0		3	21
	5	8	0,0		3	20
	5	9	1,0		4	23
	5	10	1,4		3	20
Median			0,0	3		
Salzgehalt (-8 ‰)	10	1	0,0		4	23
	10	2	0,0			22
	10	3	1,2		2	21
	10	4	5,8		3	19
	10	5	0,0		2	21
	10	6	0,0	5	3	23
	10	7	0,0	6	3	22
	10	8	0,0	28	3	23
	10	9	0,0	0	2	19
	10	10	0,0	18	3	21
Median			0,0	6		
Temperatur (+5°C)	1	1	0,0	2	4	21
	1	2	0,0	1	4	22
	1	3	0,0	4	4	25
	1	4	0,0	0	4	22
	1	5	0,0	1	3	23
	1	6	0,0		4	25
	1	7	0,0		3	24
	1	8	0,0		3	22
	1	9	0,0		2	21
	1	10	0,0		3	22
Median			0,0	1		
Temperatur (+5°C)	5	1	0,0		3	21
	5	2	0,0		4	24
	5	3	2,2		3	21
	5	4	0,0		2	19
	5	5	0,0		4	23
	5	6		2	4	24
	5	7	0,0	0	2	22
	5	8	0,0	64	3	22
	5	9		16		21
	5	10	0,0	130	2	19
Median			0,0	16		

Behandlung	Tage	Probe	DNA-Fragm. [%]	TUNEL [n]	Alter [a]	Länge [cm]
Temperatur (+5°C)	10	1	0,0		3	22
	10	2	0,0		4	24
	10	3	2,7		4	26
	10	4	2,9		4	24
	10	5	0,0		3	23
	10	6	0,0	7	3	24
	10	7	0,0	2	3	21
	10	8	4,2	3	3	22
	10	9	0,0	2	3	22
	10	10	0,0	0	3	20
Median			0,0	2		

Tab. 21: Daten zur WH 191

Station	Hol, Probe	DNA-Fragm. [%]	TUNEL [n]	Cd* [µg/kg]	Zn* [mg/kg]	GSI	Fettgeh.* [%]	PCB 28* [µg/kg Lipid]	DDE* [µg/kg Lipid]	PCB 153* [µg/kg Lipid]	Alter [a]	T [°C]
B01	1,4	6,4	146	143,3	43,1						4	6,4
B01	1,5	4,0	42	91,3	63,9		24,2	27,8	231,2	365,9	6	6,4
B01	1,6	9,3	163	94,0	35,7		19,8	5,3	34,4	54,1	5	6,4
B01	1,7	2,3	63	263,0	35,4		29,8	0,1	64,9	99,5	5	6,4
B01	2,14	4,3	19	155,1	59,4		24,3	10,5	120,4	133,2	5	6,4
B01	2,15	1,4	116	54,4	33,4		25,9	12,2	121,4	134,4	4	6,4
B01	2,16	0,0	184	43,0	32,6		30,1	11,6	32,5	26,2	5	6,4
B01	2,17	0,0	198	64,2	34,5		21,3	9,9	32,2	28,3	5	6,4
B01	2,18	4,0	81	388,1	31,1		21,5	10,6	45,1	36,1	4	6,4
B01	2,19	3,8	71	38,3	39,7		35,8	11,3	32,1	31,3		6,4
B01	2,20	2,1		62,2	22,1	2,01	32,8	9,0	95,7	76,5	5	6,4
B01	2,21	4,7		60,6	28,1	2,69	28,9	14,1	68,6	43,7	4	6,4
B01	2,22	0,0		178,3	37,9	2,85	16,0	10,5	39,5	32,2	3	6,4
B01	2,23	0,0		107,8	32,2	3,92	24,0	19,6	60,9	58,1	2	6,4
B01	2,24	0,0		179,6	35,0	0,92	18,8	56,7	101,5	107,3	2	6,4
B01	2,25	9,0		217,6	36,8	1,8	24,4				2	6,4
B01	3,5	2,5		385,4	56,8	5,59	22,9	12,4	193,9	139,0	7	6,4
B01	3,6	7,3		73,9	55,9	1,11	29,0	0,1	23,6	24,9	4	6,4
B01	3,7	0,0		35,7	20,9	4,58	17,1	13,2	69,8	54,7	3	6,4
B01	3,8	4,1		74,4	38,5	1,67	19,5	12,8	106,9	99,5	3	6,4
B01	3,9	0,0		30,0	27,5	3,47	36,3	7,4	38,2	29,0	4	6,4
B01	3,10	0,0		28,4	13,0	2,84	30,1	19,7	34,3	53,3	5	6,4
B01	3,11	0,0		80,1	27,2	3,77	30,6	9,4	23,9	19,4	5	6,4
B01	3,12	2,8		236,1	43,4	7,45	25,3	10,4	79,5	55,1	6	6,4
B01	3,13	0,0		22,6	23,9	3,57	16,7	17,7	95,8	93,6	5	6,4
Median		2,3	99	80,1	35,0	2,9	24,3	11,3	64,9	54,7		6,4
B12	34,1	0,0	247	60,9	44,8		40,9	35,4	75,5	32,5	3	6,6
B12	34,2	2,6	209	45,9	60,4						3	6,6
B12	34,3	3,5	321	84,0	37,1						3	6,6
B12	34,4	2,9	188	40,6	31,3		41,9	12,6	3,3	52,7	3	6,6
B12	34,5	0,0	191	92,1	22,0						3	6,6
B12	34,6	0,0	188	84,6	69,7						3	6,6
B12	34,7	2,4	274	42,5	33,3						2	6,6
B12	35,1	2,2	142	124,2	83,2		29,3	13,5	90,5	53,8	4	6,6
B12	35,2	3,8	158	62,3	38,2		34,7	12,5	183,5	99,4	4	6,6
B12	35,3	0,0	104	76,7	50,1		21,9	16,7	207,8	157,7	4	6,6
B12	35,4	0,0		53,5	21,9	1,15	24,3	36,3	337,9	281,1	4	6,6
B12	35,5	10,2		76,7	30,5	0,78	22,6	33,4	203,3	150,8	4	6,6
B12	35,6	3,0		81,0	50,4	2,92	35,6	31,4	386,3	213,7	4	6,6
B12	35,7	2,7		40,1	30,9	1,86	42,0	25,0	256,6	136,0		6,6
B12	36,1	7,1		79,4	27,8	1,93	28,7	20,8	235,9	148,2	2	6,6
B12	36,2	1,9		37,3	27,1	3,28	19,9	44,2	293,5	237,2	3	6,6
B12	36,3	2,6		61,4	34,8	0,88	24,9	21,9	148,5	99,6	2	6,6
B12	36,4	1,9		72,2	39,5	4,58	17,1				2	6,6

Station	Hol, Probe	DNA-Fragm. [%]	TUNEL [n]	Cd* [µg/kg]	Zn* [mg/kg]	GSI	Fettgeh.* [%]	PCB 28* [µg/kg Lipid]	DDE* [µg/kg Lipid]	PCB 153* [µg/kg Lipid]	Alter [a]	T [°C]
B12	36,5	4,2		85,5	38,1	1,32	31,2	13,8	20,1	120,3	3	6,6
B12	36,6	3,6		91,1	19,0	1,14	31,5	20,2	17,4	92,9	2	6,6
B12	36,7	2,6		86,3	21,7	1,01	15,6	46,2	443,8	487,1	2	6,6
B12	36,8	3,4		71,0	28,9	1,32	26,5	15,2	224,9	108,9	2	6,6
B12	37,1	5,0		45,1	46,8	5,81	26,2	16,5	173,8	97,6	4	6,6
B12	37,2	7,2		51,1	37,3	4,46	14,1	15,6	210,5	171,4	4	6,6
B12	37,3	5,1		44,5	36,9	1,67	39	12,8	237,2	151,8	4	6,6
Median		2,7	190	71,0	36,9	1,7	27,6	20,2	207,8	136,0		6,6
N01	59,1	0,0	2	292,6	60,3						6	6,8
N01	59,2	0,0	12	115,0	41,9						6	6,8
N01	59,3	0,0	6	114,6	58,4						6	6,8
N01	59,4	4,6	4	87,9	37,3		27,1	45,0	19,2	28,0	4	6,8
N01	59,5	2,8	127	56,3	42,8		13,1	26,3	63,4	114,6	4	6,8
N01	59,6	3,5	52	181,2	44,1		27,3				6	6,8
N01	59,7	0,0	12	97,6	43,7							6,8
N01	59,8	0,0	14	98,9	82,8						6	6,8
N01	59,9	0,0	5	204,4	54,0						6	6,8
N01	59,10	0,0	91	108,4	43,2						5	6,8
N01	59,11	0,0		51,2	56,0	10,8		17,9	24,3	35,9	5	6,8
N01	59,12	1,6		130,1	45,3	5,22	18,3	8,9	9,5	36,2	4	6,8
N01	59,13	3,1		68,5	40,9	13,4	14,3	19,0	42,9	136,1	6	6,8
N01	59,14	0,0		189,9	55,4	3,2	25,6	28,3	67,7	137,1	5	6,8
N01	59,15	0,0		94,1	54,7	8,66	22,5	10,8	35,0	78,6	4	6,8
N01	59,16	0,0		186,7	68,3	7,58	22,5	14,6	24,7	36,8	5	6,8
N01	59,17	0,0		60,1	54,9	6,94	22,2	12,5	24,1	31,6	4	6,8
N01	59,18	0,0		78,8	55,7	5,31	38,8	15,3	121,8	203,5	6	6,8
N01	59,19	3,1		137,3	34,5	5,57	25,5	18,6	116,4	359,8	5	6,8
N01	59,20	2,8		144,0	49,0	4,55	27,2	8,7	60,1	171,9	4	6,8
N01	59,21	1,8		172,9	38,4	7,81	25,6	21,9	30,7	35,6	5	6,8
N01	59,22	0,0		294,5	47,3	4,34	22,8	16,5	67,5	110,6	6	6,8
N01	59,23	0,0		55,5	55,2	7,82	35,2	0,1	52,4	82,2	4	6,8
N01	59,24	0,0		90,1	49,3	7,35	20,8	19,3	69,6	153,5	5	6,8
N01	59,25	0,0		163,2	36,1	2,6	24,4	19,6	70,6	155,7	5	6,8
Median		0,0	12	114,6	49,0	6,9	24,4	17,9	52,4	110,6		6,8
N04	50,1	2,4	20	23,1	54,8		24,8	6,9	68,8	31,7	6	8,6
N04	50,2	2,2	2	80,5	45,8		34,4	10,3	100,3	67,4	4	8,6
N04	50,3	0,0	7	69,9	58,0		18,8	13,7	62,8	41,5	7	8,6
N04	50,4	1,8	20	72,3			27,5	12,5	103,9	80,6	5	8,6
N04	50,5	0,0	1	174,8			30,8	12,2	103,0	79,5	5	8,6
N04	50,6	0,0	26	161,7			21,0	6,8	198,4	174,5	5	8,6
N04	50,7	0,0	41	83,0			28,3	3,4	25,6	15,2	6	8,6
N04	50,8	0,0	112	63,0			19,8	13,8	58,7	25,2	5	8,6
N04	50,9	0,0	1	21,9			27,6	10,0	52,3	25,0	5	8,6
N04	50,10	1,8	4	114,9			28,5	7,5	72,3	63,2	6	8,6
N04	50,11	0,0		100,8		13,78	10,7	5,9	120,0	113,7	5	8,6
N04	50,12	0,0		113,2		7,45	22,3	5,4	160,9	135,9	5	8,6

Station	Hol, Probe	DNA-Fragm. [%]	TUNEL [n]	Cd* [µg/kg]	Zn* [mg/kg]	GSI	Fettgeh.* [%]	PCB 28* [µg/kg Lipid]	DDE* [µg/kg Lipid]	PCB 153* [µg/kg Lipid]	Alter [a]	T [°C]
N04	50,13	0,0		58,8		11,49	13,9	5,4	159,2	134,4	5	8,6
N04	50,14	0,0		135,0		5,76	24,8	8,3	18,0	5,2	4	8,6
N04	50,15	0,0		72,7		7,76	24,5	4,7	29,3	15,3	7	8,6
N04	50,16	3,1		145,3	48,4	4,19	28,7	2,6	19,3	7,5	6	8,6
N04	50,17	0,0		171,9	57,0	6,08	22,2	15,5	32,6	28,6	5	8,6
N04	50,18	3,6		135,4	60,4	6,25	22,3	18,5	98,4	54,7	8	8,6
N04	50,19	0,0		157,9	67,7	5,65	19,3	4,5	103,6	93,7	6	8,6
N04	50,20	1,6		61,2	41,5	3,6	44,4	7,8	53,2	25,9	5	8,6
N04	50,21	1,9		494,0	45,0	2,71	29,2	12,8	71,0	44,1	8	8,6
N04	50,22	0,0		89,7	56,6	4,0	22,7	10,6	107,8	71,1	4	8,6
N04	50,23	3,3		125,8	28,0	3,72	30,6	11,6	68,1	34,3	5	8,6
N04	50,24	0,0		404,5	87,6	5,03	22,2	28,5	130,8	84,7	5	8,6
N04	50,25	1,0		111,0	52,9	8,71	18,9	21,6	68,7	39,7	5	8,6
Median		0,0	14	111,0	54,8	5,8	24,5	10,0	71,0	44,1		8,6
N06	55,1	0,0	78	71,6	53,0						6	9,0
N06	55,2	0,0	8	139,8	61,0						5	9,0
N06	55,3		0	287,2	40,6						5	9,0
N06	55,4		10	588,7	43,0						6	9,0
N06	55,5	0,0	17	90,2	28,6		39,3	21,1	7,5	26,5	6	9,0
N06	55,6	0,0	1	105,5	53,3						5	9,0
N06	55,7	0,0	0	107,3	37,6						5	9,0
N06	55,8	0,0	12	323,1	47,7						6	9,0
N06	55,9	0,0	2	38,1	36,5		48,4	32,8	64,4	37,4	5	9,0
N06	55,10	0,0	3	453,6	75,7		18,2	13,7	126,2	78,1	7	9,0
N06	55,11	1,4		249,9	40,4	6,05	26,9	9,3	90,8	75,9	6	9,0
N06	55,12	0,0		312,1	44,4	3,95	21,2	13,2	96,8	74,0	5	9,0
N06	55,13	0,0		71,5	37,9	3,11	40,7	6,5	12,5	38,8	6	9,0
N06	55,14	0,0		161,2	64,2	4,87	36,6	6,9	76,9	42,6	5	9,0
N06	55,15	0,0		277,5	46,9	2,88	32,7	14,2	151,7	104,3	7	9,0
N06	55,16	0,0		67,8	45,2	3,31	46,3	14,4	110,6	67,2	6	9,0
N06	55,17	3,5		701,6	43,0	5,84	29,3	10,7	73,8	45,9	6	9,0
N06	55,18	5,5		162,4	42,4	4,9	32,1	7,4	94,2	63,4	5	9,0
N06	55,19	0,0		1050,0	56,5	5,88	27,8	22,4	77,2	53,8	5	9,0
N06	55,20	0,0		77,0	42,2	5,22	48,9	6,6	51,8	32,4	6	9,0
N06	55,21	0,0		230,2	45,6	3,72	31,2	12,5	82,7	62,9		9,0
N06	55,22	0,0		75,0	35,6	4,04	43,4	8,8	11,4	35,5	6	9,0
N06	55,23	0,0		114,2	55,1	5,88	32,3	14,7	62,9	42,9	4	9,0
N06	55,24	1,9		166,3	41,7	6,77	36,8	10,6	81,7	56,5	6	9,0
N06	55,25	2,2		90,1	52,9	5,23	34,3	20,1	68,3	52,2	5	9,0
Median		0,0	6	161,2	44,4	4,9	33,5	12,8	77,0	53,0		9,0
G08	46,1	0,0	5	734,4	56,3						6	11,6
G08	46,2	0,0	11	1693,8	43,7						5	11,6
G08	46,3	0,0	118	484,2	58,2						4	11,6
G08	46,4	0,0	11	252,3	68,3		7,6	34,0	133,9	365,3	5	11,6
G08	46,5	0,0	19	869,3	77,7						5	11,6
G08	46,6	1,4	115	482,6	36,7						5	11,6

Station	Hol, Probe	DNA-Fragm. [%]	TUNEL [n]	Cd* [µg/kg]	Zn* [mg/kg]	GSI	Fettgeh.* [%]	PCB 28* [µg/kg Lipid]	DDE* [µg/kg Lipid]	PCB 153* [µg/kg Lipid]	Alter [a]	T [°C]
G08	46,7	0,0	54	174,0	52,8						5	11,6
G08	46,8	1,0	0	542,6	60,3						5	11,6
G08	46,9	0,0	26	170,8	62,2		22,1	20,2	17,5	19,1	6	11,6
G08	46,10	1,5	297	81,1	76,0						3	11,6
G08	47,1	2,5		523,8	63,4	4,61	15,5	17,1	101,2	281,3	7	11,6
G08	47,2	0,0		457,8	72,4	4,96	38,0	21,3	65,4	70,9	6	11,6
G08	47,3	0,0		371,0	54,8	1,45	32,0	11,8	68,1	74,7	6	11,6
G08	47,4	0,0		489,8	77,2	3,74	36,4	25,8	13,7	73,0	5	11,6
G08	47,5	0,0		384,5	35,7	2,6	34,7	16,3	185,7	170,0	6	11,6
G08	47,6	0,0		870,8	79,8	2,15	24,3	24,7	163,2	327,9	5	11,6
G08	47,7	0,0		632,8	76,0	5,79	27,9	17,6	157,3	110,0	4	11,6
G08	47,8			348,2	49,3	3,27	23,9	19,4	95,6	129,0	4	11,6
G08	47,9	0,0		88,9	70,1	3,14	28,2	39,3	143,9	1242,8	4	11,6
G08	47,10	0,0		736,6	33,6		15,7	36,8	29,0	355,5	6	11,6
G08	47,11	0,0		110,9	59,3	3,42	32,1	0,1	81,4	74,4	4	11,6
G08	48,1	0,0		624,6	87,1	5,66	30,6	28,7	22,6	219,2	5	11,6
G08	48,2	0,0		580,1	45,5	2,3	25,5	49,0	100,8	230,9	8	11,6
G08	48,3	1,0		155,1	54,3	6,16	39,3	19,0	72,8	89,3		11,6
G08	48,4	0,0		269,3	42,3	3,25	16,1	19,0	82,0	163,7		11,6
Median		0,0	23	482,6	59,3	3,3	27,9	20,2	82,0	163,7		11,6

* (LACORN, 1999b)

Tab. 22: Daten zur WH 195

Station	Hol, Probe	DNA-Fragm. [%]	TUNEL [n]	Cd* [µg/kg]	Zn* [mg/kg]	Fettgeh.* [%]	GSI	Länge [cm]	T [°C]
B01	6,1	0,0	1	30,9	41,9	3,7			6,4
B01	6,2	0,0	36	23,0	35,1				6,4
B01	7,1	0,0	4	39,6	49,6	2,9			6,4
B01	7,2	6,1	216	21,2	23,3				6,4
B01	8,1	0,0	24	39,4	17,8	3,8			6,4
B01	8,2	0,0	9	20,3	59,1	6,1			6,4
B01	8,3	4,1	216	27,6	44,9				6,4
B01	8,4	0,0	29	33,4	43,2	3,7			6,4
B01	8,5	0,0	10	33,3	19,1	4,2			6,4
B01	8,6	0,0	29	25,1	38,9	4,7			6,4
B01	8,7	2,4		40,1	70,0	4,4	10,6	26	6,4
B01	8,8	0,0		27,9	57,3	1,7	8,3	24	6,4
B01	8,9	5,0		23,0	59,0	17,4	0,6	24	6,4
B01	8,10	1,8		34,6	30,1	3,3	12,6	24	6,4
B01	8,11	5,3		56,8	122,8	6,5	2,2	23	6,4
B01	8,12	0,0		31,6	43,7	3,4	11,7	23	6,4
B01	8,13	0,0		22,1	76,5	9,5	0,7		6,4
B01	9,1	4,0		23,1	42,0	5,8	13,1	36	6,4
B01	9,2	0,0		41,3	46,2	4,9	14,0	30	6,4
B01	9,3	0,0		25,4	61,5	1,9	6,4	23	6,4
B01	10,1	0,0		24,2	43,8	1,8	8,3	27	6,4
B01	10,2	0,0		29,2	21,1	4,1	13,9	34	6,4
B01	10,3	0,0		28,7	41,4	2,5	8,1	29	6,4
B01	10,4	3,5		26,2	49,3	7,5	13,9	25	6,4
B01	10,5	2,7		50,0	35,5	2,1	3,4	25	6,4
Median		0,0	26,5	28,7	43,7	4,0	8,3		6,4
B12	2,1	0,0	3	21,2	15,2	4,6			5,1
B12	2,2	2,5	14	38,3	25,3				5,1
B12	2,3	4,0	26	45,8	60,6				5,1
B12	2,4	1,7	26	21,9	56,2				5,1
B12	2,5	0,0	1	45,9	60,3				5,1
B12	2,6	0,0	2	38,4	29,1	4,4			5,1
B12	2,7	1,4	29	42,0	17,9				5,1
B12	2,8	0,0	3	30,5	21,3				5,1
B12	3,1	4,9	11	31,4	18,2				5,1
B12	3,2	0,0	3	40,0	23,8				5,1
B12	3,3	0,0		33,3	25,0	3,3	11,1	23	5,1
B12	3,4	4,3		24,4	30,5	4,0	8,1	24	5,1
B12	3,5	0,0		26,1	22,4	13,6	0,0	23	5,1
B12	4,1	0,0		34,8	16,8		11,7	24	5,1
B12	4,2	5,9		25,7	20,7	21,8	2,2	25	5,1
B12	4,3	0,0		24,4	14,2	11,5	1,3	24	5,1
B12	4,4	3,3		27,0	25,1	2,6	11,4	30	5,1
B12	4,5	0,0		21,3	19,6	27,5	0,8	23	5,1

Station	Hol, Probe	DNA-Fragm. [%]	TUNEL [n]	Cd* [µg/kg]	Zn* [mg/kg]	Fettgeh.* [%]	GSI	Länge [cm]	T [°C]
B12	4,6	3,2		33,2	24,2	5,1	3,5	24	5,1
B12	4,7	2,5		30,1	35,0	3,8	8,8	24	5,1
B12	4,8	2,8		32,8	24,8	3,7	10,7	23	5,1
B12	5,1	5,8		24,1	15,5	23,5	0,0	24	5,1
B12	5,2	0,0		26,8	46,3	3,6	10,0	23	5,1
B12	5,3	4,7		17,0	19,0	3,0	0,0	25	5,1
B12	5,4	4,0		34,2	46,4	3,0	7,1	24	5,1
Median		1,7	7	30,5	24,2	4,2	7,1		5,1
N01	12,1	2,7	38	31,2	37,9	23,3			9,4
N01	12,2	3,2	33	27,0	83,5	16,0			9,4
N01	12,3	2,5	12	22,6	79,4	6,4			9,4
N01	12,4	0,0	4	34,4	41,7				9,4
N01	12,5	0,0	80	55,5	65,9				9,4
N01	12,6	0,0	23	25,6	193,8				9,4
N01	12,7	0,0	2	42,5	60,2				9,4
N01	12,8	0,0	0	44,6	113,5	8,4			9,4
N01	12,9	0,0	9	33,7	41,2				9,4
N01	12,10	3,1	0	57,9	103,7				9,4
N01	12,11	0,0		54,8	32,3	3,0	4,1	26	9,4
N01	13,1	8,7		59,5	38,1	9,1	4,4	29	9,4
N01	13,2	3,8		35,8	110,6	13,7	1,1	27	9,4
N01	13,3	3,4		43,8	40,9	7,0	1,1	27	9,4
N01	13,4	5,6		35,9	58,3	37,4	1,3	28	9,4
N01	13,5	0,0		38,1	58,9	6,5	6,3	25	9,4
N01	13,6	0,0		32,0	76,2	16,1	0,9	32	9,4
N01	13,7	2,8		27,9	64,0	19,1	1,1	25	9,4
N01	13,8	0,0		43,2	147,0	9,1	2,6	27	9,4
N01	13,9	0,0		51,9	28,1	5,0	11,2	27	9,4
N01	13,10	0,0		34,4	84,6	12,2	0,8	28	9,4
N01	13,11	0,0		36,7	65,8	6,7	1,1	26	9,4
N01	13,12	4,3		27,3	65,0	27,7	0,9	27	9,4
N01	13,13	0,0		54,5	1259,6	4,4	3,6	25	9,4
N01	13,14	0,0		42,8	72,7	13,3	2,4	25	9,4
Median		0,0	10	36,7	65,8	9,1	1,3		9,4
N04	47,1	0,0	10	28,7	52,7	8,9			10,5
N04	47,2	0,0	21	55,1	46,6				10,5
N04	47,3	0,0	103	36,3	188,9				10,5
N04	47,4	3,6	1	56,8	215,3				10,5
N04	47,5	0,0	0	60,9	112,3	2,8			10,5
N04	47,6	3,3	0	40,5	117,0				10,5
N04	47,7	0,0	0	47,0	163,6	4,1			10,5
N04	47,8	5,3	16	54,3	72,8				10,5
N04	47,9	0,0	4	67,2	136,4				10,5
N04	47,10	0,0	1	64,5	183,0				10,5
N04	47,11	0,0		99,0	440,8	2,5	1,2	27	10,5
N04	47,12	0,0		58,6	319,8	4,8	2,7	28	10,5

Station	Hol, Probe	DNA-Fragm. [%]	TUNEL [n]	Cd* [µg/kg]	Zn* [mg/kg]	Fettgeh.* [%]	GSI	Länge [cm]	T [°C]
N04	47,13	0,0		60,6	55,3	4,4	8,3	27	10,5
N04	47,14	0,0		33,8	116,0	3,6	7,4	26	10,5
N04	47,15	0,0		26,2	306,2	2,4	5,6	29	10,5
N04	47,16	0,0		35,1	147,8	3,1	9,4	31	10,5
N04	47,17	0,0		34,7	314,0	11,9	1,2	28	10,5
N04	47,18	3,7		29,7	266,6	5,4	1,5	31	10,5
N04	47,19	2,7		26,2	114,0	3,8	4,1	27	10,5
N04	47,20	3,0		25,6	191,6	5,7	3,8	26	10,5
N04	47,21	5,0		38,5	283,0	8,6	1,0	30	10,5
N04	47,22	0,0		19,9	89,2	21,0	1,1	27	10,5
N04	47,23	0,0		21,5	90,0	11,0	4,9	27	10,5
N04	47,24	0,0		29,1	126,4	17,1	5,5	26	10,5
N04	57,29	0,0		32,8	155,5	8,9	1,7	29	10,5
Median		0,0	3	36,3	147,8	5,1	3,8		10,5
N06	57,30	0,0	1	29,2	706,6	4,1			8,2
N06	57,31	0,0	0	26,4	925,1	3,1			8,2
N06	57,32	3,5	3	30,2	87,1	11,1			8,2
N06	57,33	0,0	0	31,0	78,7	3,3			8,2
N06	57,34	0,0	1	34,1	38,4	10,7			8,2
N06	57,35	0,0	2	58,0	376,0				8,2
N06	57,36	0,0	0	46,2	440,8	3,7			8,2
N06	57,37	1,0	0	43,8	1072,8				8,2
N06	57,37	0,0	1	57,3	353,3	3,3			8,2
N06	57,38	0,0	0	35,6	216,3	10,8			8,2
N06	57,41	0,0		40,7	65,7	2,3	6,5	25	8,2
N06	58,1	2,9		41,3	2866,2	5,0	4,6	32	8,2
N06	58,2	0,0		34,3	79,1	1,5	7,3	27	8,2
N06	58,3	0,0		52,7	421,4	12,8	2,7		8,2
N06	58,4	0,0		24,2	64,7	6,4	9,1	26	8,2
N06	58,5	0,0		26,9	431,7	4,7	8,8	28	8,2
N06	58,6	0,0		33,5	127,0	5,4	8,0	27	8,2
N06	58,7	0,0		36,0	142,3	2,5	7,1	26	8,2
N06	58,8	0,0		32,4	129,0	5,5	6,3	27	8,2
N06	58,9	0,0		37,6	103,4	11,8	3,8	26	8,2
N06	58,10	2,8		38,2	57,1	2,9	7,0	27	8,2
N06	58,11	0,0		36,3	64,6	3,6	5,9	27	8,2
N06	58,12	5,0		34,9	112,7	4,0	6,7		8,2
N06	58,13	0,0		40,1	208,9	1,7	4,8		8,2
N06	58,14	0,0		45,6	104,0	2,8	5,2	26	8,2
Median		0,0	1	36,0	129,0	4,0	6,5		8,2
G08	21,1	0,0	0	42,7	29,6				11,5
G08	21,2	2,5	4	28,8	950,2				11,5
G08	21,3	0,0	28	41,4	542,7				11,5
G08	21,4	0,0	48	49,8	131,6				11,5
G08	21,5	0,0	16	30,5	103,7				11,5
G08	21,6	0,0	5	56,4	230,6				11,5

Station	Hol, Probe	DNA-Fragm. [%]	TUNEL [n]	Cd* [µg/kg]	Zn* [mg/kg]	Fettgeh.* [%]	GSI	Länge [cm]	T [°C]
G08	21,7	2,1	28	36,8	208,4				11,5
G08	22,1	6,4	5	13,4	39,8	27,3			11,5
G08	22,2	3,4	2	43,5	69,7	5,1			11,5
G08	22,3	3,4	40	27,1	176,2	26,1			11,5
G08	22,4	0,0		118,0	130,0	3,6	2,3	28	11,5
G08	22,5	0,0		45,4	26,4	4,1	1,9	26	11,5
G08	23,1	0,0		47,1	255,3	8,7	1,5	27	11,5
G08	23,2	0,0		42,1	42,9	12,9	1,2	26	11,5
G08	23,3	3,3		44,1	416,5	3,7	1,9		11,5
G08	23,4	3,3		44,1	628,4	2,3	0,6	26	11,5
G08	23,5	0,0		50,7	257,7	2,1	1,5	23	11,5
G08	23,6	3,1		37,3	43,7	3,5	3,6	23	11,5
G08	24,1	0,0		48,7	592,0	3,8	1,3		11,5
G08	24,2	3,6		64,1	48,7	4,5	5,0	27	11,5
G08	24,3	0,0		41,9	368,9	10,7	1,2	30	11,5
G08	24,4	0,0		56,1	79,6	4,2	5,3	27	11,5
G08	24,5	0,0		50,3	42,2	6,2	6,1	33	11,5
G08	24,6	0,0		49,0	132,3	16,4	0,9	29	11,5
G08	24,7	0		66,2	332,9	3,4	2,8		11,5
Median		0,0	11	44,1	132,3	4,4	1,9		11,5

* (LACORN, 1999b)

Abb. 23: Daten zum Jahresgang; Feb. 1998 – Jan. 1999

Monat	Probe	DNA-Fragm. [%]	Cd* [µg/kg]	Zn* [mg/kg]	Fettgeh.* [%]	T [°C]
Feb	1	1,3	40,1	35,5		5,61
Feb	2	0,0				5,61
Feb	3	0,0	83,6	29,3		5,61
Feb	4	0,0				5,61
Feb	5	0,0	349,8	25,8		5,61
Feb	6	0,0	120,9	23,2		5,61
Feb	7	0,0	105,0	29,6		5,61
Feb	8	1,7	86,9	27,6		5,61
Feb	9	3,2				5,61
Feb	10	0,0	90,6	28,3		5,61
Median		0,0	90,6	28,3		5,61
Mrz	1	1,9	68,4	23,3	6,6	5,73
Mrz	2	2,2	70,2	24,3	7,6	5,73
Mrz	3	0,0			4,5	5,73
Mrz	4	2,3	110,7	37,2	6,0	5,73
Mrz	5	1,8	98,2	26,7	6,3	5,73
Mrz	6	0,0	92,4	33,3	6,5	5,73
Mrz	7	0,0			12,7	5,73
Mrz	8	0,0	58,9	19,0	12,4	5,73
Mrz	9	2,3			9,0	5,73
Mrz	10	0,0			8,2	5,73
Median		0,9	81,3	25,5	7,1	5,73
Apr	1	0,0	48,7	12,4		7,45
Apr	2	0,0	157,6	26,9		7,45
Apr	3	0,0				7,45
Apr	4	0,0	166,0	22,9		7,45
Apr	5	0,0		14,2		7,45
Apr	6	0,0	97,7	28,2		7,45
Apr	7	0,0	171,6	19,5		7,45
Apr	8	0,0	76,3	18,0		7,45
Apr	9	0,0				7,45
Apr	10	0,0	98,8	22,0		7,45
Median		0,0	98,8	20,8		7,45
Mai	1	2,7	37,9	15,6	9,1	9,94
Mai	2	3,3	83,5	19,3	9,1	9,94
Mai	3	2,6	79,4	15,0	9,1	9,94
Mai	4	0,0	41,7	17,2	9,1	9,94
Mai	5	0,0	65,9	27,8	9,1	9,94
Mai	6	0,0	193,8	26,4	9,1	9,94
Mai	7	0,0	60,2	27,3	9,1	9,94
Mai	8	0,0	113,5	26,3	9,1	9,94
Mai	9	0,0	41,2	33,7	9,1	9,94
Mai	10	3,1	103,7	28,4	9,1	9,94
Median		0,0	72,7	26,4	9,1	9,94
Jun						11,52

Monat	Probe	DNA-Fragm. [%]	Cd* [µg/kg]	Zn* [mg/kg]	Fettgeh.* [%]	T [°C]
Jul	1	0,0	68,9	23,0	32,4	14,70
Jul	2	0,0	50,9	23,7		14,70
Jul	3	0,0	103,8	36,3		14,70
Jul	4	2,0	82,1	32,0		14,70
Jul	5	12,0	112,3	28,4		14,70
Jul	6	10,5	57,4	27,0	34,6	14,70
Jul	7	6,2	53,3	35,0	35,0	14,70
Jul	8	1,9	37,8	35,2	28,4	14,70
Jul	9	3,0	307,2	24,7	22,7	14,70
Jul	10	9,3	98,1	34,7		14,70
Median		2,5	75,5	30,2	32,4	14,70
Aug	1	0,0	174			17,40
Aug	2	4,9	24,0	37,8	28,9	17,40
Aug	3	8,5	118,3	23,9		17,40
Aug	4	1,5				17,40
Aug	5	9,5	52,7	18,8		17,40
Aug	6	4,5				17,40
Aug	7	2,4	111,7	29,5		17,40
Aug	8	2,8	106,2	28,6		17,40
Aug	9	0,0	22,8	32,0		17,40
Aug	10	2,3	161,3	29,3		17,40
Median		2,6	109,0	29,3	28,9	17,40
Sep	1	3,9	106,3	25,1	27,8	16,11
Sep	2	2,2	124,9	60,4	26,1	16,11
Sep	3	0,0			45,5	16,11
Sep	4	4,8	119,1	18,8	39,0	16,11
Sep	5	2,6	105,2	27,5	39,3	16,11
Sep	6	0,0			36,2	16,11
Sep	7	2,4	35,2	30,6	39,5	16,11
Sep	8	2,8	56,5	24,6	26,8	16,11
Sep	9	2,1			21,3	16,11
Sep	10	0,0				16,11
Median		2,3	105,8	26,3	36,2	16,11
Okt	1	5,3	67,8	42,5	28,6	13,66
Okt	2	2,9	38,8	49,2	26,4	13,66
Okt	3	1,7	24,9	63,4	27,5	13,66
Okt	4	10,2	54,4	57,0	26,0	13,66
Okt	5	2,4	58,9	28,4	28,5	13,66
Okt	6	2,2	73,7	29,2	37,6	13,66
Okt	7	9,5	82,1	45,5	36,6	13,66
Okt	8	9,4	135,6	33,4	25,5	13,66
Okt	9	0,0	136,7	35,8	25,5	13,66
Okt	10	2,3	88,4	35,0	31,4	13,66
Median		2,7	70,7	39,1	28,0	13,66

Monat	Probe	DNA-Fragm. [%]	Cd* [µg/kg]	Zn* [mg/kg]	Fettgeh.* [%]	T [°C]
Nov	1	0,0	97,7	40,6	41,5	10,54
Nov	2	1,4	43,5	44,0	29,1	10,54
Nov	3	1,8	128,4	53,1	27,2	10,54
Nov	4	5,7	41,1	27,9	34,3	10,54
Nov	5	2,2	99,4	49,7	14,6	10,54
Nov	6	2,2	95,0	53,2	30,7	10,54
Nov	7	0,0	24,8	35,9	24,2	10,54
Nov	8	0,0				10,54
Nov	9	2,2	75,3	34,1	37,6	10,54
Nov	10	0,0	165,5	59,7	21,8	10,54
Median		1,6	95,0	44,0	29,1	10,54
Dez	1	0,0	113,3	62,8	17,9	6,97
Dez	2	2,6	132,8	69,0	18,0	6,97
Dez	3	0,0	177,2	53,1	11,9	6,97
Dez	4	0,0			26,9	6,97
Dez	5	4,3	71,3	38,2		6,97
Dez	6	2,4	70,4	28,6		6,97
Dez	7		188,3			6,97
Dez	8	0,0	97,9	38,5	15,2	6,97
Dez	9	1,4	329,8	52,7	23,3	6,97
Dez	10	0,0	135,1	36,3	16,2	6,97
Median		0,0	132,8	45,6	17,9	6,97
Jan	1	0,0	57,9	30,4	5,3	5,67
Jan	2	0,0	94,8	45,9	9,9	5,67
Jan	3	0,0	208,6	35,2	10,9	5,67
Jan	4	0,0	96,1	43,8	11,0	5,67
Jan	5	0,0	255,4	45,8		5,67
Jan	6	0,0	56,3	52,9	13,0	5,67
Jan	7	0,0	168,5	34,8	4,3	5,67
Jan	8	3,5	114,2	52,4	19,9	5,67
Jan	9	2,3	118,8	38,3	4,3	5,67
Jan	10	0,0	43,8	48,2	14,6	5,67
Median		0,0	105,2	44,8	10,9	5,67

* (LACORN, 1999b)

9.8 Korrelationstabellen

Tab. 24: Spearman Rangkorrelationen LE 1

Variablenpaar	Proben [n]	Spearman [r]	p-level
Apopt.* - Cd	35	0,457	0,006
Apopt. – Zn	35	0,104	0,552
Apopt. - MT1	34	0,412	0,016
Apopt. - MT2	34	0,551	< 0,001

Tab. 25: Spearman Rangkorrelationen LE Cd

Variablenpaar	Proben [n]	Spearman [r]	p-level
Apopt. - Cd	133	0,204	0,019
Apopt. – Zn	133	0,207	0,017
Apopt. - MT1	130	0,146	0,098
Apopt. - MT2	133	0,229	0,008
Apopt. - TUNEL	108	0,169	0,080
TUNEL – Cd	108	0,435	< 0,001
TUNEL – Zn	108	-0,212	0,028
TUNEL – MT1	106	0,298	0,002
TUNEL MT2	108	0,330	0,001

Tab. 26: Spearman Rangkorrelationen LE PCB 118

Variablenpaar	Proben [n]	Spearman [r]	p-level
Apopt. – TUNEL	80	0,026	0,819

Tab. 27: Spearman Rangkorrelationen LE PCB 77

Variablenpaar	Proben [n]	Spearman [r]	p-level
Apopt. – PCB 77	76	-0,403	< 0,001
Apopt. - TUNEL	50	0,056	0,695
TUNEL – PCB 77	25	-0,464	0,020

* Mittels Elektrophorese bestimmte DNA-Fragmentierung

Tab. 28: Spearman Rangkorrelationen WH 191

Variablenpaar	Proben [n]	Spearman [r]	p-level
Apopt. – TUNEL	58	0,343	0,008
Apopt. – Cd	147	-0,192	0,020
Apopt. – Zn	135	-0,296	0,001
Apopt. – MT1	55	-0,491	< 0,001
Apopt. – MT2	56	-0,459	< 0,001
Apopt. GSI	88	-0,243	0,022
Apopt. EROD	88	0,338	0,001
Apopt. Fettgeh.	120	0,036	0,693
Apopt. – Temp.	147	-0,438	< 0,001
Apopt. - PCB 28	118	-0,024	0,795
Apopt. - PCB 153	118	0,111	0,230
Apopt. - DDE	118	0,166	0,073
Apopt. - Länge	88	-0,220	0,039
Apopt. - Alter	141	-0,284	0,001
TUNEL – Cd	60	-0,387	0,002
TUNEL – Zn	53	-0,365	0,006
TUNEL – MT1	57	-0,184	0,171
TUNEL – MT2	58	-0,384	0,003
TUNEL – GSI	60	-0,631	< 0,001
TUNEL – EROD	60	0,698	< 0,001
TUNEL – Fettgeh.	32	0,002	0,990
TUNEL – PCB 28	31	-0,038	0,840
TUNEL – PCB 153	31	-0,021	0,911
TUNEL – DDE	31	-0,143	0,441
TUNEL – Temp.	60	-0,507	< 0,001
TUNEL - Alter	58	-0,584	< 0,001
GSI – Zn	84	-0,488	< 0,001
GSI – Fettgeh.	89	-0,182	0,087
GSI – Temp.	90	0,244	0,020
GSI – Alter	85	0,368	< 0,001
GSI – Cd	149	0,106	0,200
GSI – EROD	89	-0,762	< 0,001
GSI – PCB 28	88	-0,300	0,004
GSI – PCB 153	88	-0,289	0,006
GSI – DDE	88	-0,249	0,019

Zn – Cd	138	0,428	< 0,001
Zn – Fettgeh.	109	-0,060	0,534
Zn – Temp.	138	0,499	< 0,001
Zn – Alter	132	0,318	< 0,001
Zn - EROD	84	-0,512	< 0,001
Fettgeh. – Cd	121	-0,124	0,175
Fettgeh. – PCB 28	119	-0,128	0,166
Fettgeh. – PCB 153	119	-0,251	0,006
Fettgeh. - DDE	119	-0,172	0,061
Temp. – Cd	150	0,528	< 0,001
Temp. – EROD	90	-0,484	< 0,001
Temp. – Fettgeh.	122	0,163	0,073
Temp. - Alter	144	0,456	< 0,001

Tab. 29: Spearman Rangkorrelationen WH 195

Variablenpaar	Proben [n]	Spearman [r]	p-level
Apopt. – Cd	150	-0,161	0,049
Apopt. – Zn	150	-0,151	0,065
Apopt. – Fettgeh.	116	0,229	0,013
Apopt. – Temp.	150	-0,107	0,192
Apopt. – GSI	150	-0,112	0,173
Apopt. – EROD	121	0,173	0,058
Apopt. - TUNEL	60	0,257	0,048
TUNEL – Cd	60	-0,349	0,006
TUNEL – Zn	60	-0,303	0,019
TUNEL – Fettgeh.	27	0,463	0,015
TUNEL – Temp.	60	-0,033	0,802
TUNEL – GSI	60	0,057	0,664
TUNEL - EROD	50	-0,067	0,645
Zn – Cd	150	0,338	< 0,001
Zn – Fettgeh.	116	-0,046	0,621
Zn – Temp.	150	0,586	< 0,001
Zn – GSI	90	-0,238	0,024
GSI – Temp.	90	-0,343	0,001
GSI – Fettgeh.	89	-0,511	< 0,001
GSI – Cd	90	-0,066	0,538

Temp. – Cd	150	0,430	< 0,001
Temp. – Fettgeh.	116	0,157	0,092
Fettgeh. - Cd	116	-0,230	0,013

Tab. 30: Spearman Rangkorrelationen Jahresgang

Variablenpaar	Proben [n]	Spearman [r]	p-level
Apopt. – Temp.	109	0,430	< 0,001
Apopt. – Zn	109	0,155	0,107
Apopt. – Cd	109	0,028	0,770
Apopt. – Fettgeh.	70	0,355	0,003
Apopt. – MT1	109	-0,018	0,850
Apopt. – MT2	109	0,213	0,026
Zn – Cd	110	0,408	< 0,001
Zn – Fettgeh.	70	0,160	0,186
Zn – Temp.	110	0,000	0,997
Fettgeh. – Temp.	70	0,798	< 0,001
Fettgeh. – Cd	70	-0,131	0,280

10 Literaturverzeichnis

Achazi, R.K.: Das Biotransformationssystem der Fische als Schadstoffindikator; the use of enzymes of the biotransformationssystem of fishes in biological monitoring, *Zeitschr. Angew. Zool.* 76, 1-25 (1989)

Alford, P.B.; Tomasso, J.R.; Bodine, A.B.; Kendall, C.: Apoptotic death of peripheral leukocytes in channel catfish: effect of confinement-induced stress, *J. Aquat. Anim. Health* 6, 64-69 (1994)

Anonymus: Biological markers in environmental health research. Committee on Biological Markers of the national research council, *Environ. Health Perspect.* 74, 3-9 (1989)

Arends, M.J.; Morris, R.G.; Wyllie, A.H.: Apoptosis, the role of the endonuclease, *Am. J. Pathol.* 136, 593-608 (1990)

Batel, R.; Bihari, N.; Rinkevich, B.; Dapper, J.; Schäcke, H.; Schröder, H.C.; Müller, W.E.G.: Modulation of organotin-induced apoptosis by the water pollutant methyl mercury in a human lymphoblastoid tumor cell line and a marine sponge, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 93, 245-251 (1993)

Bayne, B.L.; Brown, D.A.; Burns, K.; Dixon, D.R.; Ivanivici, A.; Livingstone, D.R.; Lowe, D.M.; Moore, M.N.; Stebbing, A.R.D.; Widdows, J.: Specific indicators of stress, mixed-function oxidase systems, In: *The effects of stress and pollution on marine animals*, Praeger, New York, 1985, 115-125

Berridge, M.J.; Bootmann, M.D.; Lipp, P.: Calcium – a life and death signal, *Nature* 395, 645-648 (1998)

Billig, H.; Furuta, I.; Hsueh, A.J.W.: Gonadotropin-releasing hormone directly induces apoptotic cell death in the rat ovary: biochemical and in situ detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in granulosa cells, *Endocrinology* 134, 245-252 (1994)

Bodammer, J.E.; Murchelano, R.A.: Cytological Study of vacuolated cells and other aberrant hepatocytes in winter flounder from Boston Harbor, *Cancer Res.* 50, 6744-6756 (1990)

Bohl, H.: Die Biologie der Kliesche (*Limanda limanda* L.) in der Nordsee, *Ber. Dtsch. Wiss. Komm. Meeresforsch.* XV, 1-57 (1957)

Burkhardt-Holm, P.; Schmidt, H.; Meier, W.: Heat shock protein (hsp70) in brown trout epidermis after sudden temperature rise, *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 120, 35-41 (1998)

Cantrell, S.M.; Joy-Schlesinger, J.; Stegeman, J.J.; Tilitt, D.E.; Hannink, M.: Correlation of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced apoptotic cell death in the embryonic vasculature with embryotoxicity, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 148, 24-34 (1998)

Charriaut-Marlangue, C.; Ben-Ari, Y.: A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis, *J. Mol. Neurosci.* 7, 61-64 (1995)

- Chow, S.C.; Kass, G.E.N.; McCabe, M.J.; Orrenius, S.: Tributyltin increase cytosolic free Ca^{2+} concentration in thymocytes by mobilizing intracellular Ca^{2+} , activating a Ca^{2+} entry pathway, and inhibiting Ca^{2+} efflux, Arch. Biochem. Biophys. 298, 143-149 (1992)
- Clarke, A.R.; Purdie, C.A.; Harrison, D.J.; Morris, R.G.; Bird, C.C.; Hooper, M.L.; Wyllie, A.H.: Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways, Nature 362, 849-852 (1993)
- Claußen, T: Vergleich der regionalen Verteilungen von Schwermetallen in Klieschen (*Limanda limanda*) aus der südlichen Nordsee unter besonderer Berücksichtigung biologischer Einflußgrößen, Dissertation, Universität Hamburg, Fachbereich Chemie, 1990
- Cohen, G.M.: Caspases: the executioners of apoptosis, Biochem. J. 326, 1-16 (1997)
- Compton, M.M.: A biochemical hallmark of apoptosis: internucleosomal degradation of the genome, Cancer Metast. Rev. 11, 105-119 (1992)
- Cossa, D.; Auger, D.; Averty, B.; Lucon, M.; Masselin, P.; Noël, J: Flounder (*Platichthys flesus*) muscle as an indicator of metal and organochlorine contamination of french atlantic coastal waters, Ambio. 21, 176-182 (1992)
- Daoust, P.Y.; Wobeser, G.; Newstead, J.D.: Acute pathological effects of inorganic mercury and copper in gill of rainbow trout, Vet. Pathol. 21, 93-101 (1984)
- Darmon, A.J.; Nicholson, D.W.; Bleackley, R.C.: Activation of the apoptotic protease CPP32 by the cytotoxic T-cell-derived granzyme B, Nature 377, 446-448 (1995)
- Depledge, M.H.; Fossi, M.C.: The role of biomarkers in environmental assessment (2). Invertebrates, Ecotoxicology 3, 161-172 (1994)
- Depraetere, V.; Golstein, P.: Fas and other cell death signaling pathways, Immunology 9, 93-107 (1997)
- Dethlefsen, V.: Status report on aquatic pollution problems in Europe, Aquat. Toxicol. 11, 259-286 (1988)
- Eastman, A.: Apoptosis: A product of programmed and unprogrammed cell death, Toxicol. Appl. Pharmacol. 121, 160-164 (1993)
- El Azzouzi, B.; Tsangaris, G.Th.; Pellegrini, O.; Manuel, Y.; Benveniste, J.; Thomas, Y.: Cadmium induces apoptosis in a human T cell line, Toxicology 88, 127-139 (1994)
- Enari, M.; Sakahira, H.; Yokoyama, H.; Okawa, K.; Iwamatsu, A.; Nagata, S.: A caspase-activated Dnase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD, Nature 391, 43-50 (1998)
- Fesus, L.; Davies, P.J.A.; Piacentini, M.: Apoptosis: molecular mechanisms in programmed cell death, Eur. J. Cell. Biol. 56, 170-177 (1991)
- Fox, C.H.; Johnson, F.B.; Whiting, J.; Roller, P.P.: Formaldehyde fixation, J. Histochem. Cytochem. 33, 845-853 (1985)

- Fraker, P.J., Telford, W.G.: A reappraisal of the role of zinc in life and death decisions of cells, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 215, 229-236 (1997)
- Gavrieli, Y.; Sherman, Y.; Ben-Sasson, S.A.: Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation, *J. Cell Biol.* 119, 493-501 (1992)
- Goksøyr, A.; Beyer, J.; Egaas, E.; Grøsvik, B.E.; Hylland, K.; Sandvik, M.; Skaare, J.U.: Biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus*) and their use in pollution monitoring, *Mar. Pollut. Bull.* 33, 36-45 (1996)
- Gold, R.; Schmied, M.; Giegerich, G.; Breitschopf, H.; Hartung, H.P.; Toyka, K.V.; Lassmann, H.: Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of *in situ* tailing and nick translation techniques, *Lab. Invest.* 71, 219-225 (1994)
- Gougeon, M.-L.; Montagnier, L.: Apoptosis in aids, *Science* 260, 1269-1270 (1993)
- Grøsvik, B.E.; Goksøyr, A.: Biomarker protein expression in primary cultures of salmon (*Salmo salar* L.) hepatocytes exposed to environmental pollutants, *Biomarkers* 1, 45-53 (1996)
- Heining, P.; Hoffmann, R.W.: Light- and electron microscopical studies on the prolonged toxicity of trichlorethylene on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Exp. Toxicol. Pathol.* 45, 167-176 (1993)
- Hoole, D.: The effects of pollutants on the immune response of fish: implications for helminth parasites, *Parassitologia* 39, 219-225 (1997)
- Huang, P.; Plunkett, W.: A quantitative assay for fragmented DNA in apoptotic cells, *Anal. Biochem.* 207, 163-167 (1992)
- Hylland, K.; Haux, C.; Hogstrand, C.: Hepatic metallothionein and heavy metals in dab *Limanda limanda* from the German Bight, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 91, 89-96 (1992)
- ICES, Methodology of fish disease surveys. Report of an ICES sea going workshop held on RV U/F Argos, 16.-32. April 1988, ICES cooperative research report 166 (1989)
- Janz, D.M.; van der Kraak, G.: Suppression of apoptosis by gonadotropin, 17 β -Estradiol, and epidermal growth factor in rainbow trout preovulatory ovarian follicles, *Gen. Comp. Endocr.* 105, 186-193 (1997)
- Janz, D.M.; McMaster, M.E.; Munkittrick, K.R.; Van der Kraak, G.: Elevated ovarian follicular apoptosis and heat shock protein-70 expression in white sucker exposed to bleached kraft pulp mill effluent, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 147, 391-398 (1997)
- Jones, M.M.; Xu, C.; Ladd, P.A.: Selenite suppression of cadmium-induced testicular apoptosis, *Toxicology* 116, 169-175 (1997)
- Julliard, A.K.; Saucier, D.; Astic, L.: Time-course of apoptosis in the olfactory epithelium of rainbow trout exposed to a low copper level, *Tissue Cell* 28, 367-377 (1996)

- Kaiser, N.; Edelman, I.S.: Further studies on the role of calcium in glucocorticoid-induced lymphocytolysis, *Endocrinology* 103, 936-942 (1978)
- Kammann, U: Metallothioneine und polychlorierte Biphenyle in Fischen aus Elbe und Nordsee, Dissertation, Universität Hamburg, Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Abteilung für Lebensmittelchemie, 1995
- Kedderis, G.L.: Biochemical basis of hepatocellular injury, *Toxicol. Pathol.* 24, 77-83 (1996)
- Kerr, J.F.R.; Wyllie, A.H.; Currie, A.R.: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics, *Brit. J. Cancer* 26, 239-257 (1972)
- Knust, R.: Food ecology of North Sea dab (*Limanda limanda*). Part I: Seasonal changes in food uptake and condition in the German Bight and on Dogger Bank, *Arch. Fish. Mar. Res.* 44, 1-12 (1996)
- Korsmeyer, S.J.; Shutter, J.R.; Veis, D.J.; Merry, D.E.; Oltavi, Z.N.: Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death, *Cancer Biol.* 4, 327-332 (1993)
- Kressel, M.; Groscurth, P.: Distinction of apoptosis and necrotic cell death by in situ labeling of fragmented DNA, *Cell Tissue Res.* 278, 549-556 (1994)
- Lacorn, M.: Einfluß natürlicher und anthropogener Stressoren auf die Metallothionein-Isoformen der Kliesche (*Limanda Limanda L.*), Dissertation, Universität Hamburg, Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Abteilung für Lebensmittelchemie, 1999a
- Lacorn, M.: Persönliche Mitteilung, 1999b
- Landgraff, O.: Nachweis und Analytik von Polychlorierten Biphenylen unter besonderer Berücksichtigung ihrer toxisch relevanten koplanaren Kongenere sowie weiterer Organochlor-Verbindungen in Sedimenten, dem Seestern sowie der Kliesche aus der inneren Deutschen Bucht, Dissertation, Universität Hamburg, Fachbereich Chemie, 1995
- Lang, T.; Dethlefsen, V.: Fish disease monitoring: a valuable tool for pollution assessment? *ICES C.M.* 1996/E: 17 (1996)
- Lauc, G.; Perovic, S.; Dapper, J.; Flögel, M.; Iskrac, S.; Müller, W.E.G.: A non-radioactive, sensitive method for the detection of DNA fragmentation in apoptotic cells (rat pheochromocytoma PC12 and rat cortical cells), *Anal. Cell. Pathol.* 7, 107-114 (1994)
- Li, P.; Nijhawan, D.; Budihardjo, I.; Srinivasula, S.M.; Ahmad, M.; Alnemri, E.S.; Wang, X.: Cytochrome c and dATP-dependent formation of APAF-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade, *Cell* 91, 479-489 (1997)
- Liu, Z.G.; Hsu, H.; Goeddel, D.V.; Karin, M.: Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death, *Cell* 87, 565-576 (1996)
- Lohmann, R.D.; Beyersmann, D.: Effects of zinc and cadmium on apoptotic DNA fragmentation in isolated bovine liver nuclei, *Environ. Health Persp.* 102, 269-271 (1994)

- Losser, M.-R.; Payen, D.: Mechanisms of liver damage, *Semin. Liver Dis.* 16, 357-367 (1996)
- Lozan, J.L.: Verbreitung, Dichte und Struktur der Population der Klieschen (*Limanda limanda* L.) in der Nordsee mit Vergleichen zu den Populationen um Island und in der Ostsee anhand meristischer Merkmale, *Arch. Fisch. Wiss.* 38, 165-189 (1988)
- Lyons-Alcantara, M.; Mooney, R.; Lyng, F.; Cottell, D.; Mothersill, C.: The effects of cadmium exposure on the cytology and function of primary cultures from rainbow trout, *Cell Biochem. Funct.* 16, 1-13 (1998)
- Maniatis, T.; Fritsch, E.F.; Sambrook, J.: *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbour Laboratory (1982)
- Martin, R.: *Elektrophorese von Nucleinsäuren*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, (1996)
- Martin, S.J.; Green, D.R.: Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts?, *Cell* 82, 349-352 (1995)
- Mason, J.T.; O`Leary, T.J.: Effects of formaldehyde fixation on protein secondary structure: a calorimetric and infrared spectroscopic investigation, *J. Histochem. Cytochem.* 39, 225-229 (1991)
- Maugh, T.H.: Chemicals: how many are there?, *Science* 199, 162 (1978)
- Mayer, F.L.; Versteeg, D.J.; McKee, M.J.; Folmar, L.C.; Graney, R.L.; McCume, D.C.; Rattner, B.A.: Physiological and nonspecific biomarkers, In: Huggett, R.J.; Kimerle, R.A.; Mehrle, P.M.; Bergman, H.L. (eds.): *Biomarkers: Biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress*, Lewis Publishers, Boca Raton, 1992
- McCarthy, J.F.; Shugart, L.R.: Biological markers of environmental contamination; In: McCarthy, J.F.; Shugart, L.R. (eds.): *Biomarkers of environmental contamination*, Lewis Publishers, 429-439 (1990)
- McConkey, D.; Orrenius, S.: The role of calcium in the regulation of apoptosis, *J. Leucocyte Biol.* 59, 775-783 (1996)
- Migheli, A.; Cavalla, P.; Marino, S.; Schiffer, D.: A study of apoptosis in normal and pathologic nervous tissue after in situ end-labeling of DNA strand breaks, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 53, 606-616 (1994)
- Moriarty, F.: *Ecotoxicology. The study of pollutants in ecosystems*. Academic Press, London, 289 (1993)
- Nagata, S.; Golstein, P.: The Fas death factor, *Science* 267, 1449-1456 (1995)
- Negoescu, A.; Lorimier, P.; Labat-Moleur, F.; Drouet, C.; Robert, C.; Guillermet, C.; Brambilla, C.; Brambilla, E.: In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations, *J. Histochem. Cytochem.* 44, 959-968 (1996)

- Nicholson, D.W.; Thornberry, N.A.: Caspases: killer proteases, Trends Biochem. Sci. 22, 299-306 (1997)
- Obeid, L.M.; Hannun, Y.A.: Ceramide: a stress signal and mediator of growth suppression and apoptosis, J. Cell Biochem. 58, 191-198 (1995)
- Olsson, P.-E.; Haux, C.; Förlin, L.: Variations in hepatic metallothionein, zinc and copper levels during an annual reproductive cycle in rainbow trout, *Salmo gairdneri*, Fish Physiol. Biochem. 3, 39-47 (1987)
- Peakall, D.B.: The role of biomarkers in environmental assessment (1). Introduction, Ecotoxicology 3, 157-159 (1994)
- Peakall, D.B.; Walker, C.H.: The role of biomarkers in environmental assessment (3). Vertebrates, Ecotoxicology 3, 173-179 (1994)
- Piechotta, G.; Lacorn, M.; Lang, T.; Kammann, U.; Simat, T.; Jenke, H.-St.; Steinhart, H.: Apoptosis in dab (*Limanda limanda*) as possible new biomarker of anthropogenic stress, Ecotox. Environ. Saf. 42, 50-56 (1999)
- Richter, C.; Gogvadse, V.; Laffranchi, R.; Schlapbach, R.; Schweizer, M.; Suter, M.; Walter, P.; Yaffee, M.: Oxidants in mitochondria: from physiology to diseases, Biochim. Biophys. Acta 1271, 67-74 (1995)
- Rijnsdorp, A.D.; Vethaak, A.D.; van Leeuwen, P.I.: Population biology of dab *Limanda limanda* in the southeastern North Sea, Mar. Ecol. Prog. Ser. 91, 19-35 (1992)
- Roesijadi, G.: Metallothionein and its role in toxic metal regulation, Comp. Biochem. Physiol. 113, 117-123 (1996)
- Saborowski, R.: Zur Ökologie der Kliesche, *Limanda limanda* (L.); Einfluss saisonaler Zyklen auf das hepatische Entgiftungssystem, Dissertation, Universität Hamburg, Fachbereich Biologie (1996)
- Saborowski, R.; Buchholz, F.: Annual changes in the nutritive state of North Sea dab, J. Fish Biol. 49, 173-194 (1996)
- Sachs, L.: Angewandte Statistik. 8. Auflage, Springer Verlag, Berlin, 1996
- Safe, S.H.: Polychlorinated biphenyls (PCBs): Environmental impact, biochemical and toxic responses and implications for risk assessment, Crit. Rev. Toxicol. 24, 87-149 (1994)
- Sakahira, H.; Enari, M.; Nagata, S.: Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis, Nature 391, 96-99 (1998)
- Schwartzman, R.A.; Cidlowski, J.A.: Glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells, Int. Arch. Allergy Immunol. 105, 347-354 (1994)
- Shaikh, Z.A.; Blazka, M.E.; Endo, T.: Metal transport in cells: cadmium uptake by rat hepatocytes and renal cortical epithelial cells, Environ. Health. Perspect. 103, 73-75 (1995)

- Sheridan, J.P.; Marsters, S.A.; Pitti, R.M.; Gurney, A.; Skubatch, M.; Baldwin, D.; Ramakrishnan, L.; Gray, C.L.; Baker, K.; Wood, W.I.; Goddard, A.D.; Godowski, P.; Ashkenazi, A.: Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors, *Science* 277, 818-821 (1997)
- Suda, T.; Takahashi, T.; Golstein, P.; Nagata, S.: Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family, *Cell*, 75, 1169-1178 (1993)
- Sündermann, J.: Die Nordsee: Wasseraustausch und Schadstoffbelastung, Institut für Meereskunde, Universität Hamburg, 1989
- Susin, S.A.; Zamzami, N.; Castedo, M.; Hirsch, T.; Marchetti, P.; Macho, A.; Daugas, E.; Geuskens, M.; Kroemer, G.: Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease, *J. Exp. Med.* 184, 1331-1341 (1996)
- Tartaglia, L.A.; Ayres, T.M.; Wong, G.H.; Goeddel, D.V.: A novel domain within the 55 kD TNF receptor signals cell death, *Cell* 74, 845-853 (1993)
- Tebourbi, O.; Rhouma, K.B.; Sakly, M.: DDT induces apoptosis in rat thymocytes, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 61, 216-223 (1998)
- Thompson, C.B.: Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease, *Science* 267, 1456-1462 (1995)
- Umansky, S.R.: Apoptosis: Molecular and cellular mechanisms (a review), *J. Mol. Biol.* 30, 285-295 (1996)
- Van der Land, M.A.: Distribution of flatfish eggs in the 1989 egg surveys in the southeastern North Sea and mortality of plaice and sole eggs, *Neth. J. Sea Res.* 27, 277-286 (1991)
- Viviani, B.; Rossi, A.D.; Chow, S.C.; Nicotera, P.: Organotin compounds induce calcium overload and apoptosis in PC12 cells, *Neurotoxicology* 16, 19-26 (1995)
- Vobach, M.; Kellermann, H.-J.: Entgiftungsstoffwechsel der Kliesche (*Limanda limanda*) In: Jahresbericht 1998, Bundesforschungsanstalt für Fischerei, Hamburg (1999)
- Wahl, E.; Möller, H.; Anders, K.; Köhler-Günther, A.; Pluta, H.-J.; Cameron, P.; Harms, U.; Büther, H.; Söffker, K.: Fish diseases in the Wadden Sea, ICES, C.M.1992/E. 27 (1992)
- Westermeier, R.: Elektrophorese-Praktikum, 2. Auflage, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1990
- Whyte, M.; Evan, G.: The last cut is the deepest, *Nature* 376, 17 (1995)
- Wijsman, J.H.; Jonker, R.R.; Keijzer, R.; van de Velde, C.J.H.; Cornelisse, C.J.; van Dierendonck, J.H.: A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labeling of fragmented DNA, *J. Histochem. Cytochem.* 41, 7-12 (1993)
- Winge, D.H.; Miklossey, K.A.: Structure of metallothioneins, *J. Biol. Chem.* 257, 3471-3473 (1982)
- Wyllie, A.H.; Kerr, J.F.R.; Currie, A.R.: Cell death: the significance of apoptosis, *Int. Rev. Cytol.* 68, 251-306 (1980)

Xu, C.; Johnson, J.E.; Singh, P.K.; Jones, M.M.; Yan, H.; Carter, C.E.: In vivo studies of cadmium-induced apoptosis of the rat and its modulation by a chelating agent, *Toxicology* 107, 1-8 (1996)

Yan, H.; Carter, C.E.; Xu, C.; Singh, P.K.; Jones, M.M.; Johnson, J.E.; Dietrich, M.S.: Cadmium-induced apoptosis in the urogenital organs of the male rat and its suppression by chelation, *J. Toxicol. Env. Health* 149-167 (1997)

Yang, E.; Zha, J.; Jockel, J.; Boise, L.H.; Thompson, C.B.; Korsmeyer, S.J.: Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death, *Cell* 80, 285-291 (1995)

Yasuda, M.; Umemura, S.; Osamura, R.Y.; Kenjo, T.; Tsutsumi, Y.: Apoptotic cells in the human endometrium and placental villi: pitfalls in applying the TUNEL method, *Arch. Histol. Cytol.* 58, 185-190 (1995)

Zaucke, F.; Zöltzer, H.; Krug, H.F.: Dose-dependent induction of apoptosis or necrosis in human cells by organotin compounds, *J. Anal. Chem.* 361, 368-392 (1998)

Zelikoff, J.T.; Bowser, D.; Squibb, K.S.; Frenkel, K.: Immunotoxicity of low level cadmium exposure in fish: an alternative animal model for immunotoxicological studies, *J. Toxicol. Environ. Health* 45, 235-248 (1995)

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Gundula Piechotta
Geburtstag: 07.08.1967
Geburtsort: Hamburg
Familienstand: ledig

Schulbildung

1973 - 1977 Grundschule Hohenlockstedt
1977 - 1985 Kreisgymnasium Itzehoe
1985 - 1987 Auguste-Viktoria-Schule Itzehoe
Juli 1987 Abitur

Berufstätigkeit

1987 - 1990 Ausbildung zur Polizeibeamtin in Hamburg
1990 - 1991 Berufsausübung als Polizeibeamtin in Hamburg

Studium

1991 - 1996 Studium der Lebensmittelchemie, Universität Hamburg
April 1996 Diplom und 1. Staatsexamen in Lebensmittelchemie
Thema der Diplomarbeit: Charakterisierung von Allergenen der Kiwi
mittels elektrophoretischer Verfahren

Promotion

1996 - 1999 Wissenschaftliche Angestellte an der Bundesforschungsanstalt für
Fischerei, Hamburg