

Wissenschaftszentrum Weihenstephan  
für Ernährung, Landnutzung und Umwelt  
Lehrstuhl für Ökologische Chemie und Umweltanalytik  
der Technischen Universität München

**Untersuchung der Effekte der Modells substanz Methimazol  
als Endokriner Disruptor der Schilddrüsenfunktion  
am Zebrafisch (*Danio rerio*)**

Antje Giffing

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Naturwissenschaften**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr.rer.nat.habil. Wilfried Huber

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr.rer.nat., Dr.h.c. (RO) Antonius Kettrup, em.  
2. apl. Prof. Dr.rer.nat., Dr.agr.habil. Karl-Werner Schramm  
3. Univ.-Prof. Dr.rer.nat. Werner Kloas (Humboldt-Universität zu Berlin)

Die Dissertation wurde am 09.08.2006 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 06.12.2006 angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Hintergrund</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Hormonsystem</b>	<b>3</b>
<b>2.2</b>	<b>Die Schilddrüse bei Fischen</b>	<b>4</b>
2.2.1	Bedeutung der Schilddrüse während der Entwicklung von Danio rerio und anderen Knochenfischen	4
2.2.2	Schilddrüsenhormone	6
2.2.3	Schilddrüsenhormonrezeptoren	7
2.2.4	Schilddrüsen-Hypothalamus-Hypophysen-Achse	8
<b>2.3</b>	<b>Stresshormonsystem</b>	<b>9</b>
<b>2.4</b>	<b>Cytochrom P450 System</b>	<b>11</b>
<b>2.5</b>	<b>Endokrine Disruptoren</b>	<b>12</b>
<b>2.6</b>	<b>Methimazol als Schilddrüsen-ED und Testsubstanz</b>	<b>14</b>
<b>2.7</b>	<b>Danio rerio als Modellorganismus zur Untersuchung von ED</b>	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>Aufgabenstellung</b>	<b>16</b>
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>18</b>
<b>4.1</b>	<b>Versuchstiere</b>	<b>18</b>
<b>4.2</b>	<b>Nachzucht, Aufzucht und Haltung von Danio rerio</b>	<b>18</b>
4.2.1	Allgemeine Medien und Ansätze zur Aufzucht und Haltung	18
4.2.1.1	„Hanks-Embryomedium“	18
4.2.1.2	Herstellung von Lebendfutter (Artemia)	19
4.2.2	Paarung und Aufzucht der Eier bis zum Schlupf	20
4.2.3	Aufzucht von Juvenilen	20
4.2.4	Aufzucht von adulten Fischen	21
<b>4.3</b>	<b>In vivo Untersuchungen mit schilddrüsenendokrinen Disruptoren</b>	<b>22</b>
4.3.1	Untersuchungen zur Genexpression während der Entwicklung (Entwicklungsstudie)	22
4.3.2	Untersuchungen an adulten Zebrafischen nach Expositionen mit Methimazol	23
4.3.2.1	Versuchsansatz zum Nachweis der Genexpression der Schilddrüsenhormonrezeptoren im Ganzkörperhomogenat	23
4.3.2.2	Histologische Untersuchungen der Schilddrüse	24
4.3.3	Untersuchungen mit juvenilen Zebrafischen	27
4.3.3.1	Ökotoxikologische Untersuchungen des konzentrationsabhängigen Effekts von Methimazol, T3 und Bisphenol A (BPA) auf die Entwicklung des Zebrafisches	27
4.3.3.2	Untersuchungen zur Genexpression nach Expositionen mit Methimazol	29
4.3.3.3	Untersuchungen zur Genexpression nach Expositionen mit Triiodothyronin (T3)	31
4.3.3.4	Messung der Methimazolkonzentration im Versuchsmedium	32
4.3.3.5	Messung des pH-Wertes im Versuchsverlauf	32
<b>4.4</b>	<b>Nachweis von Genexpressionen potentieller Biomarker mittels Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)</b>	<b>33</b>
4.4.1	Prinzip der RT-PCR	33
4.4.2	Durchführung der RT-PCR	34
4.4.2.1	Phenolische Extraktion der RNA	34
4.4.2.2	Reinheits- und Konzentrationsbestimmung der RNA	36
4.4.2.2.1	Gelelektrophorese der total RNA	36

4.4.2.2.2	Photometrische Reinheitsmessung der RNA	38
4.4.2.3	Real-time RT-PCR	38
4.4.2.3.1	Prinzip der real-time PCR	38
4.4.2.3.2	Erststrang-cDNA-Synthese durch Reverse Transkription (RT)	40
4.4.2.3.3	Amplifikation der cDNA verschiedener Biomarker mittels real-time PCR	42
4.4.2.3.4	Real-time PCR	44
4.4.2.4	RT-PCR	46
4.4.2.4.1	Erststrang-cDNA-Synthese durch reverse Transkription (RT)	46
4.4.2.4.2	Amplifikation von cDNA verschiedener Biomarker mittels PCR	47
4.4.2.4.3	Agarose-Gelelektrophorese	50
<b>4.5</b>	<b>Amplifikation zufälliger Produkte</b>	<b>51</b>
4.5.1	RAP-PCR	52
4.5.1.1	DNase-Verdau mit anschließender RNA-Isolierung	52
4.5.1.2	Erststrang-cDNA-Synthese durch Reverse Transkription (RT)	53
4.5.1.3	RAP-PCR	55
4.5.1.4	Agarose-Gelelektrophorese	56
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>58</b>
<b>5.1</b>	<b>Untersuchungen zur Genexpression während der Entwicklung</b>	<b>58</b>
5.1.1	Untersuchung der Expression der mRNA's von TSH, TR $\beta$ und TR $\alpha$ während der Entwicklung mittels real-time RT-PCR	59
5.1.1.1	Expression der mRNA des Schilddrüsenstimulierenden Hormons (TSH) während der Entwicklung	61
5.1.1.2	Expression der mRNA des Schilddrüsenrezeptors $\beta$ (TR $\beta$ ) während der Entwicklung	62
5.1.1.3	Expression der mRNA des Schilddrüsenrezeptors $\alpha$ (TR $\alpha$ ) während der Entwicklung	64
5.1.2	Untersuchung der Expression der mRNA's von cyp, ddc, th und d $\beta$ h während der Entwicklung mittels real-time RT-PCR	65
5.1.2.1	Expression der mRNA des Cytochrom P450 1A1(cyp) während der Entwicklung	66
5.1.2.2	Expression der mRNA der Dopa decarboxylase (ddc) während der Entwicklung	67
5.1.2.3	Expression der mRNA der Tyrosin-Hydroxylase (th) während der Entwicklung	68
5.1.2.4	Expression der mRNA der Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase (d $\beta$ h) während der Entwicklung	69
<b>5.2</b>	<b>Untersuchungen mit adulten Zebrafischen</b>	<b>69</b>
5.2.1	Nachweis der Genexpression von TR $\alpha$ und TR $\beta$ nach einer Exposition mit Methimazol mittels RT-PCR	70
5.2.2	Bestimmung der Methimazolkonzentrationen im Ganzkörperhomogenat mittels HPLC	72
5.2.3	Bestimmung der Methimazolkonzentrationen im Expositionsmedium mittels HPLC	74
5.2.4	Histologische Untersuchung des Einflusses von Methimazol auf die Schilddrüsenfollikel in adulten Zebrafischen	75
<b>5.3</b>	<b>Untersuchungen mit juvenilen Zebrafischen</b>	<b>78</b>
5.3.1	Ökotoxikologische Untersuchungen des konzentrationsabhängigen Einflusses von Methimazol T3 und Bisphenol A auf die Entwicklung	78
5.3.1.1	Methimazol	79
5.3.1.2	Triiodthyronin (T3)	80
5.3.1.3	Bisphenol A	81
5.3.2	Untersuchungen zur Genexpression nach Expositionen mit Methimazol und Triiodthyronin mittels real-time RT-PCR	83
5.3.2.1	Analyse der Expression der mRNAs nach Expositionen mit Methimazol	84
5.3.2.1.1	Ergebnisse zur Expression der TSH-mRNA	84
5.3.2.1.2	Ergebnisse zur Expression der TR $\alpha$ -mRNA	88
5.3.2.1.3	Ergebnisse zur Expression der TR $\beta$ -mRNA	92
5.3.2.1.4	Ergebnisse zur Expression der cyp-mRNA	95
5.3.2.1.5	Ergebnisse zur Expression der ddc-mRNA	95
5.3.2.1.6	Ergebnisse zur Expression der th-mRNA	96

5.3.2.1.7	Ergebnisse zur Expression der dβh-mRNA	97
5.3.2.2	Analyse der Expression der mRNAs nach Expositionen mit T3	98
5.3.2.2.1	Ergebnisse zur Expression der TSH-mRNA	99
5.3.2.2.2	Ergebnisse zur Expression der TRβ-mRNA	100
5.3.2.2.3	Ergebnisse zur Expression der TRα-mRNA	101
5.3.2.2.4	Ergebnisse zur Expression der cyp-mRNA	102
5.3.2.2.5	Ergebnisse zur Expression der ddc-mRNA	103
5.3.2.2.6	Ergebnisse zur Expression der th-mRNA	105
5.3.2.2.7	Ergebnisse zur Expression der dβh-mRNA	106
5.3.3	Untersuchung der Genexpression mittels RAP-PCR	107
5.3.3.1	RAP-PCR	108
<b>5.4</b>	<b>Methodenetablierung</b>	<b>109</b>
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>114</b>
<b>6.1</b>	<b>Untersuchungen zur Genexpression während der Entwicklung</b>	<b>115</b>
6.1.1	Expression der Gene der Schilddrüsenachse	115
6.1.2	Expression der Gene der Stresshomonbiosynthese und Cytochrom P450 1A1	118
<b>6.2</b>	<b>Untersuchungen mit adulten Zebrafischen</b>	<b>119</b>
6.2.1	Einflüsse von Methimazol auf die Expression der TRα- und TRβ-mRNA	120
6.2.2	Einfluss von Methimazol auf die Schilddrüsenfollikel	123
6.2.3	Bestimmung der Methimazolkonzentration im Ganzkörperhomogenat mittels HPLC	128
<b>6.3</b>	<b>Untersuchungen mit juvenilen Zebrafischen</b>	<b>129</b>
6.3.1	Einflüsse von Methimazol, T3 und BPA auf die Entwicklung vom Zebrafisch	130
6.3.2	Einflüsse von Methimazol und T3 auf die Genexpression	132
6.3.3	Amplifikation zufälliger Produkte	138
<b>6.4</b>	<b>Qualität und Reproduzierbarkeit der Daten und Methoden</b>	<b>139</b>
<b>6.5</b>	<b>Gesamtdiskussion</b>	<b>142</b>
<b>7</b>	<b>Ausblick</b>	<b>150</b>
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>152</b>
<b>9</b>	<b>Abstract</b>	<b>155</b>
<b>10</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>158</b>
<b>11</b>	<b>Anhang</b>	<b>176</b>
11.1	Genverzeichnis	176
11.2	Auflistung der Primersequenzen für die RAP-PCR	186
11.3	Abkürzungsverzeichnis	187
11.4	Abbildungsverzeichnis	190
11.5	Tabellenverzeichnis	196
	<b>Danksagung</b>	<b>i</b>
	<b>Publikationsliste</b>	<b>iii</b>

# 1 Einleitung

In zahlreichen Studien zeigte sich, dass eine zunehmende Anzahl von Umweltchemikalien sowohl die Regulierung des endokrinen Systems als auch die Funktionsweise körpereigener Hormone beeinflussen können, indem sie Hormone nachahmen oder ihre Funktion blockieren (28, 135). Diese Substanzen werden unter dem Begriff Endokrine Disruptoren (ED) zusammengefasst.

ED sind überwiegend anthropogenen Ursprungs und gelangen über kommunale und industrielle Abwässer oder ihre Anwendung in der Agrarkultur in die Gewässer. Aus diesem Grund ist insbesondere in Oberflächengewässern ein Gefährdungspotential für ED vorhanden. In den bisherigen Fokus der ED-Forschungen sind vor allem Industriechemikalien und Pestizide gerückt. Jedoch zeigte sich in neueren Studien die wachsende Bedeutung von Arzneimitteln für aquatische Ökosysteme (74). In der Studie von Harnisch et al. konnte gezeigt werden, dass eine zunehmende Anzahl von Humanarzneimitteln in immer höheren Konzentrationen in den Oberflächengewässern nachzuweisen ist (74).

Die Abschätzung der Folgen für das aquatische Ökosystem insbesondere für die Tierwelt ist jedoch bisher kaum untersucht. Im Hinblick auf die Effekte solcher Arzneimittel auf das endokrine System seien Kontrazeptiva erwähnt. Das synthetische Ethinylestradiol wirkt ähnlich wie das natürliche Estradiol östrogen und führt in zahlreichen Organismen zu Veränderungen in der Reproduktionsbiologie (108). Viele Substanzklassen aus dem Bereich Industriechemikalien, Pestizide und Arzneimittel haben wie das synthetische Ethinylestradiol große strukturelle Ähnlichkeiten mit den natürlichen Hormonen. Eine Bewertung des ökotoxikologischen und endokrinologischen Risikos kann nur durch Untersuchungen der Effekte dieser Substanzen auf das aquatische Ökosystem erfolgen. Fokus dieser vorliegenden Studie ist die Untersuchung der Effekte des Arzneimittels Methimazol als Modellchemikalie zur Etablierung eines ED-Testsystems. In Verbindung mit ihrer aquatischen oder teilweise aquatischen Lebensweise stellen vor allem Fische und Amphibien relevante Zielgruppen für die Beeinflussung durch ED dar.

In den Mittelpunkt der Forschungen waren in den letzten Jahren vor allem die (anti)östrogenen und (anti)androgenen Hormoneffekte von ED auf die

Reproduktionsbiologie gerückt (68, 91, 146, 164). Bei den Amphibien konnte in zahlreichen Untersuchungen zur Entwicklung und Metamorphose ebenso die Bedeutung von ED im Schilddrüsenhormonsystem aufgezeigt werden (99).

Im Vergleich dazu gibt es über das Schilddrüsenhormonsystem, seine Hormone und Funktionsweise und vor allem über die Wirkung von ED auf die Homöostase der Schilddrüsenhormone bei Fischen nur wenige Studien. In diesen konnte die essentielle Bedeutung von Schilddrüsenhormonen für Entwicklung, Wachstum und den Metabolismus auch für die Fische, ähnlich wie für die Amphibien, prinzipiell gezeigt werden (13, 86). Die dabei vorrangig verwendeten Modellorganismen waren die Plattfische und der Zebrafisch. Weiterführende Studien in diesem Themenfeld gibt es bis zu diesem Zeitpunkt jedoch nur wenige. Vor allem Studien zu den Schilddrüsenrezeptoren und deren Beeinflussbarkeit durch ED in Fischen wurden bisher weitgehend außer Acht gelassen. Obwohl es ebenfalls Hinweise zum Zusammenwirken von verschiedenen endokrinen Systemen gibt, fehlen auch hier genauere Untersuchungen.

Modellorganismus der vorliegenden Studie war der Zebrafisch. Als erstes wurde im Rahmen dieser Arbeit für den Zebrafisch die Expressionslevel verschiedener Gene der Schilddrüsenhormonachse, der Stresshormonbiosynthese und des Cytochrom P450 1A1 im Entwicklungsverlauf mittels real-time RT-PCR bestimmt. Des Weiteren sollten die Effekte der Modellschubstanz Methimazol als schilddrüsenendokriner Disruptor auf den Zebrafisch untersucht werden. Dabei sollten nach Expositionen mit Methimazol die Effekte auf die Expressionslevel von Genen der Schilddrüsenhormonachse, der Stresshormonbiosynthese und auf den gesamten Genpool analysiert und mit denen nach Expositionen mit T3 verglichen werden.

## 2 Hintergrund

### 2.1 Hormonsystem

Unter dem Begriff Hormone, abgeleitet von dem griechischen Wort „horman“, d. h. anregen, fasst man Substanzen zusammen, die von speziellen endokrinen Drüsengeweben gebildet und direkt in die Blutbahn oder die Gewebeflüssigkeit abgegeben werden. Von dort aus gelangen sie, überwiegend gebunden an verschiedene Transportproteine, zu ihren entfernt liegenden Zielgeweben, wo sie spezifische Zellantworten hervorrufen. Hormone fungieren somit als primäre Botenstoffe. Nach ihrem Transport zu den Zielgeweben treffen die Hormonmoleküle auf hormonspezifische Rezeptormoleküle, die auf der Oberfläche der Zielzellen sitzen oder sich in der Zelle befinden. Durch die Wechselwirkung der Hormonmoleküle mit den Rezeptormolekülen werden in den Zielzellen mehrere Schritte ausgelöst, die den einen oder anderen Aspekt der Physiologie oder des Stoffwechsels jener Zellen beeinflussen.

Wichtige endokrine Drüsen der Säugetiere sind die Hypophyse, die Schilddrüse, die Nebenschilddrüse, der Thymus, die Bauchspeicheldrüse, die Nebennieren und die Ovarien bzw. Hoden. Es wird angenommen, dass noch nicht alle Hormone entdeckt worden sind. Die meisten der bekannten Hormone lassen sich in 4 molekulare Gruppen einteilen: 1. Amine, 2. Prostaglandine, 3. Steroide sowie 4. Polypeptide und Proteine. Die Wirkungen, die Hormone vermitteln können, sind sehr vielfältig. Grundsätzlich lassen sich jedoch vier Hauptgruppen von Hormonfunktionen ableiten. Diese sind in der Tabelle 2.1 dargestellt.

**Tabelle 2.1:** Die Hauptwirkungen der Vertebratenhormone (aus Eckert (47))

Wirkungsart	Wirkung auf das Zielgewebe	Hormone
<b>kinetisch</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kontraktion der Muskulatur</li> <li>• Konzentrierung und Verteilung von Pigmenten</li> <li>• Sekretion aus exokrinen Drüsen</li> <li>• Sekretion aus endokrinen Drüsen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Adrenalin</b>, Oxytocin</li> <li>• Melatonin</li> <li>• Secretin, Gastrin</li> <li>• ACTH, <b>TSH</b>, LH, Releasing-Hormone wie das TRH</li> </ul>
<b>metabolisch</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kontrolle der Atmungsrate</li> <li>• Kohlenhydrat- und Proteinhaushalt</li> <li>• Elektrolyt- und Wasserhaushalt</li> <li>• Calcium- und Phosphorhaushalt</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Thyroxin</b></li> <li>• Insulin, Glucagon, Glucocorticoide</li> <li>• Wachstumshormone,</li> <li>• ADH, Aldosteron</li> <li>• Parathormon, Calcitonin, Vitamin D3</li> </ul>
<b>morphogenetisch</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Allgemeinwachstum</li> <li>• Mauser, Häutung, Haar- und Fellwechsel</li> <li>• Metamorphose</li> <li>• Regeneration</li> <li>• Gonadenreifung</li> <li>• Gametenfreisetzung</li> <li>• Differenzierung des Genitaltrakts</li> <li>• Entwicklung sekundärer Geschlechtsmerkmale</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Wachstumshormon</li> <li>• <b>Thyroxin</b>, Corticosteroide</li> <li>• <b>Thyroxin</b></li> <li>• GH</li> <li>• FSH</li> <li>• LH</li> <li>• Androgene</li> <li>• Östrogene und Androgene</li> </ul>
<b>Verhalten</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• trophische Wirkungen auf die Entwicklung neuraler Systeme</li> <li>• Empfindlichkeit für spezifische Reize</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Östrogene, Progesteron, Androgene</li> <li>• Prolactin</li> </ul>

## 2.2 Die Schilddrüse bei Fischen

### 2.2.1 Bedeutung der Schilddrüse während der Entwicklung von *Danio rerio* und anderen Knochenfischen

Die Embryonen der meisten Fischarten (*Osteichthyes*) haben eine sehr rasche Embryonalentwicklung. Innerhalb von 24 bis 72 h ist diese meist vollständig abgeschlossen. Beim Zebrafisch (*Danio rerio*) dauert die Embryogenese bis hin zum Schlupf ungefähr 3 Tage (98). Die postembryonale Entwicklung der frisch geschlüpften Embryonen mit Eidottersack, bis hin zur frei schwimmenden Larve, markiert eine wichtige Entwicklungsphase. In dieser erfolgt die Umwandlung von der endogenen zur exogenen Nahrungsbeschaffung (6) und viele Organe beginnen sich zu entwickeln und zu differenzieren. Diese Phase dauert ungefähr 3 bis 5 Tage nach der Befruchtung (dpf). Die wichtigsten morphologischen Änderungen beinhalten die Aufblähung der Schwimmblase, strukturelle und funktionelle Änderungen des

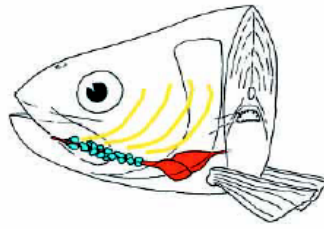


Mundes und des Verdauungstraktes, sowie die Resorption des Eidottersackes (98, 152). Insgesamt ist jedoch bei Knochenfischen besonders über die Entwicklungsphase sehr wenig bekannt.

Schilddrüsenhormone (TH) sind bei Amphibien essentiell für die Umwandlung der Larven (Kaulquappen) zu den Juvenilen, für die Degradation des larvalen Gewebes und die adulte Organese (177). Solche drastischen Umwandlungsvorgänge während der Entwicklung werden als Metamorphose bezeichnet (10). Auch in den so verschiedenartigen Fischen können solche Phasen der Entwicklung von Larve, Juvenilen und Adulten aufgezeigt werden. Das bekannteste Beispiel ist die Umwandlung vom Plattfisch von der bilateralsymmetrischen pelagischen Larve zum asymmetrischen benthischen Juvenilen mit beiden Augen an derselben pigmentierten Seite vom Körper (86). Daher werden sie oft als Modellorganismus zur Untersuchung der Metamorphose bei Teleosten verwendet. Defekte bei der Metamorphose beim Plattfisch stellen ein bedeutendes Problem in der Aquakultur solcher Fischarten dar (48, 158). Die Umwandlung von Flunderlarven in Juvenile hat gezeigt, dass auch Fische eine ähnliche Abhängigkeit von TH's haben wie die Amphibien (87).

Bisher ist jedoch relativ wenig zur Rolle der TH im Wechsel von der Larve zum juvenilen Rundfisch (z.B. Zebrafisch) bekannt, welche keine so extreme Umwandlung wie die Plattfische haben. Bei diesen Rundfischen wird von einer direkten Entwicklung gesprochen, die nicht den dramatischen morphologischen Veränderungen unterworfen ist, wie bei der indirekten Entwicklung der Plattfische (6, 211). Studien am Goldfisch (*Carassius auratus*) (166), dem Zackenbarsch (*Epinephelus coioides*) (34) und dem Aal (*Conger myriaster*) (208) zeigen, dass ihre Metamorphosen TH-abhängig sind. Brown (13) zeigte, dass TH's für die vollständige Entwicklung auch beim Zebrafisch eine wichtige Rolle spielen. Damit kann angenommen werden, dass wohl bei allen Knochenfischen TH's für die Entwicklung erforderlich sind.

Wie in Abbildung 2.1 dargestellt, besitzen Fische wie der Zebrafisch kein kompaktes Schilddrüsenorgan, sondern einzelne um die Aorta liegende Schilddrüsen-Follikel. Die Schilddrüsenhormon-Achse scheint, obwohl noch nicht komplett aufgeklärt, ähnlichen Regelmechanismen unterworfen zu sein, wie bei den Amphibien und Säugern. Siehe dazu auch Kapitel 2.2.4.



**Abbildung 2.1:** Schematische Verteilung der Schilddrüsen-Follikel im adulten Zebrafischkopf. blau: Schilddrüsenfollikel; rot: Herz und ventrale Aorta, gelb: Kiemenbögen (196)

### 2.2.2 Schilddrüsenhormone

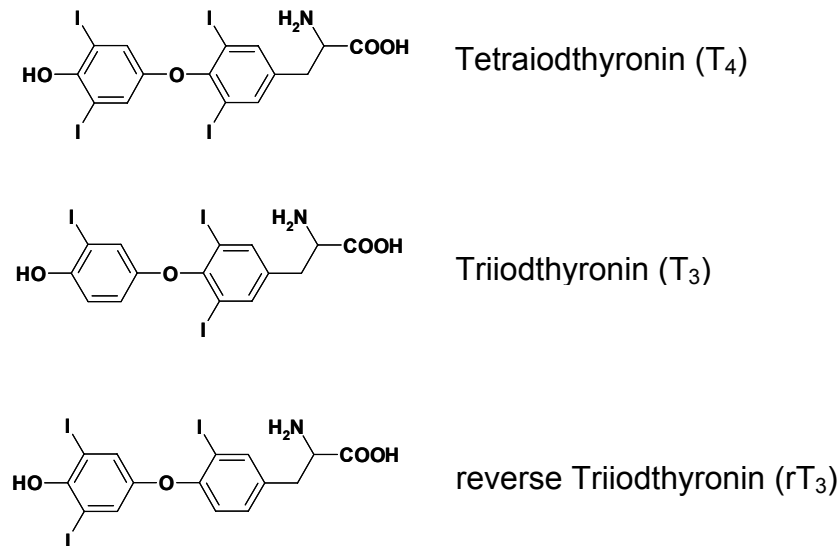
Die Synthese der Schilddrüsenhormone (TH) findet in den Schilddrüsenfollikeln statt, eine einzelne Schicht von Epithelzellen, welche einen Raum, das Kolloid, umgeben. Das vorrangige Sekret dieser Zellen ist das Thyroxin (T<sub>4</sub>; Tetraiodthyronin), welches in den Kolloidraum abgegeben wird. Dieses hat wenige direkte Wirkungen und ist vielmehr Vorläufer für Triiodthyronin (T<sub>3</sub>), das biologisch aktivere Schilddrüsenhormon. Abbildung 2.2 zeigt die Strukturformeln von T<sub>4</sub>, T<sub>3</sub> und dem biologisch inaktiven reverse T<sub>3</sub> (rT<sub>3</sub>).

Die Bildung von T<sub>3</sub> aus T<sub>4</sub> erfolgt im peripheren Gewebe durch die enzymatische Entfernung (5'-Monodeiodinierung) eines Iodions an der äußeren Ringeinheit des T<sub>4</sub> (45). Nach Abgabe der TH's zirkulieren diese frei im Plasma und binden sich an schilddrüsenhormonbindende Proteine (TTR: Transthyretin, Albumin und Thyroxinbindendes Globulin). Im Fischplasma spielen zusätzlich Lipoproteine eine wichtige Rolle im TH-Transport (4).

Die Inaktivierung von TH erfolgt überwiegend in der Leber, den Nieren, im Gehirn und den Muskeln, ebenfalls über eine Deiodinierung. Zusätzlich spielen auch oxidative Deaminierungs- und Decarboxylierungseffekte eine Rolle, sowie in geringerem Umfang Konjugationen (39, 45, 57, 154). Die Enzyme der Deiodinierung sind die Deiodinasen, wobei bis zu drei verschiedene Typen in Mammaliern und Teleostiern identifiziert wurden (45, 57, 61, 117, 140-142, 151, 191).

Die Wirkung der TH's wird durch ihre Bindung an spezifische Nuklearrezeptoren, die Schilddrüsenhormonrezeptoren (TR), vermittelt. Diese wirken direkt am Zielorgan durch die Bindung an spezifische DNA-Sequenzen, welche Veränderungen in der

Genexpression hervorrufen, die dann in Folge zu zellulären Reaktionen auf die TH's führen (210). Schilddrüsenhormonrezeptoren sind Mitglieder der Steroidrezeptor Superfamilie, welche auch Rezeptoren für Liganden wie die Steroidhormone, Retinoid, Melatonin und Vitamin D3 beinhalten.



**Abbildung 2.2:** Strukturformeln der Schilddrüsenhormone

### 2.2.3 Schilddrüsenhormonrezeptoren

Die biologischen Wirkungen von Schilddrüsenhormonen (TH) erfolgen über die Bindung an TH-Rezeptoren (TR), welche wie hormonabhängige Transkriptionsfaktoren wirken (168). Dieser Hormon-Rezeptor-Komplex bindet dann an DNA-Sequenzen, bekannt als schilddrüsenhormonresponsive Elemente (*thyroid hormone response element*; TRE). Diese befinden sich in den regulatorischen Regionen der Zielzellen und entsprechend der Natur des TRE's wird die Genexpression gesteigert oder gehemmt. (Abbildung 2.3; (203))

In Fischen existieren zwei Typen von TR's, TR $\alpha$  und TR $\beta$ . Gezeigt wurde diese Tatsache bereits Anfang der 90iger Jahre in der japanischen Flunder (205, 206). In den darauf folgenden Jahren wurden die Ergebnisse abgesichert durch weitere Klonversuche von TR in anderen Spezies: Zebrafisch (*Danio rerio*) TR $\alpha$  (51) und TR $\beta$  (121), Lachs (*Salmo salar*) TR $\alpha$  (93) und Heilbutt (*Hippoglossus hippoglossus*)

TR $\alpha$  (122). Ein Vergleich der molekularen Strukturen von verschiedenen Fisch-TR's mit denen von Tetrapoden zeigt große Übereinstimmungen (162).

Das Vorhandensein von freien Hormonen (T4 und T3) und spezifisch hoch sensitive Radioimmunoassays (RIA) für T4 und T3 führte in den 60iger Jahren zu wichtigen Erkenntnissen in der TH-Sekretion, dem Metabolismus und den Effekten von externen Faktoren auf die Schilddrüsenachse in Fischen (44, 45, 113-115). Bis zum jetzigen Zeitpunkt zeigen immer mehr Arbeiten die große Bedeutung der TH's auf. Jedoch kam es erst in den letzten Jahren zu einer immer besseren Identifizierung und Charakterisierung der TH-Rezeptoren und Deiodinase Enzymen in zahlreichen Fischarten resultierend aus verschiedensten Methodenentwicklungen speziell in der molekularen Biologie.

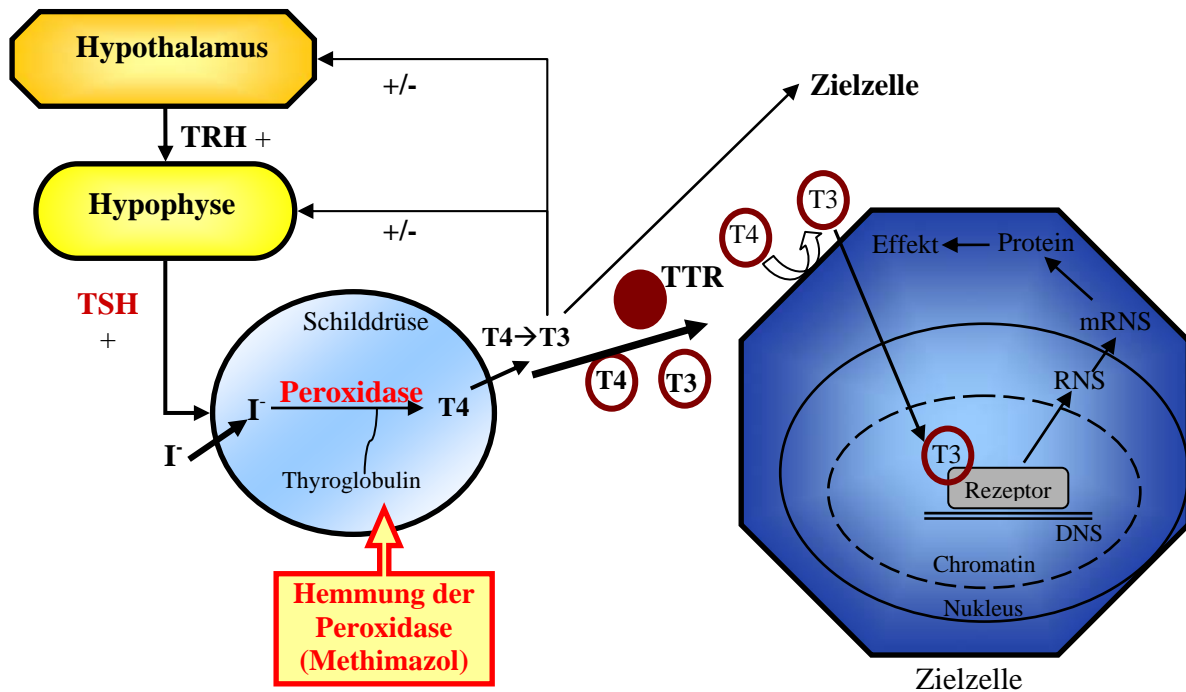
#### 2.2.4 Schilddrüsen-Hypothalamus-Hypophysen-Achse

Die grundlegenden Komponenten der Schilddrüsenachse wurden bereits in zahlreichen Vertebraten untersucht und sind in Abbildung 2.3 dargestellt. Am Beginn des Schilddrüsen-Regelkreislaufes steht das Thyreotrope Hormon (Schilddrüsenstimulierendes Hormon, TSH), das von der Adenohypophyse freigesetzt wird und Volumen, Gewicht und sekretorische Aktivität der Schilddrüse reguliert. Es stimuliert die Freisetzung von Schilddrüsenhormonen.

Die Freisetzung des TSH's wird durch die Sekretion des TSH-releasing-Faktors (Thyreotropin-Releasing Hormon, TRH) aus der *Eminentia mediana* reguliert. Sowohl die hypothalamären neurosekretorischen Zellen, die TRH produzieren als auch die TSH-sezernierenden Zellen der Adenohypophyse werden durch einen Anstieg des zirkulierenden Schilddrüsenhormonspiegels gehemmt (negative Rückkopplung). Dieser chemischen Regulation ist die neurale Stimulation des Hypothalamus übergeordnet, beispielsweise stimuliert bei Säugern eine niedrige Hauttemperatur reflektorisch die Freisetzung von TRH.

Zusammengefasst erscheinen die Grundlagen der Schilddrüsenachse in allen Vertebraten ähnlich, bestehend aus einem stimulierenden Faktor in der Hypophyse, dem schilddrüsenstimulierenden Hormon (TSH), T4 und T3, den TH-bindenden Hormonen, den Deiodinasen und TH-Rezeptoren (siehe Kapitel 2.2.3). Tatsache ist

jedoch, dass für die Fische detaillierte Informationen zu den verschiedenen Komponenten der Schilddrüsen-Achse und der Art und Weise ihrer Funktion und Wirkung bisher fehlen.

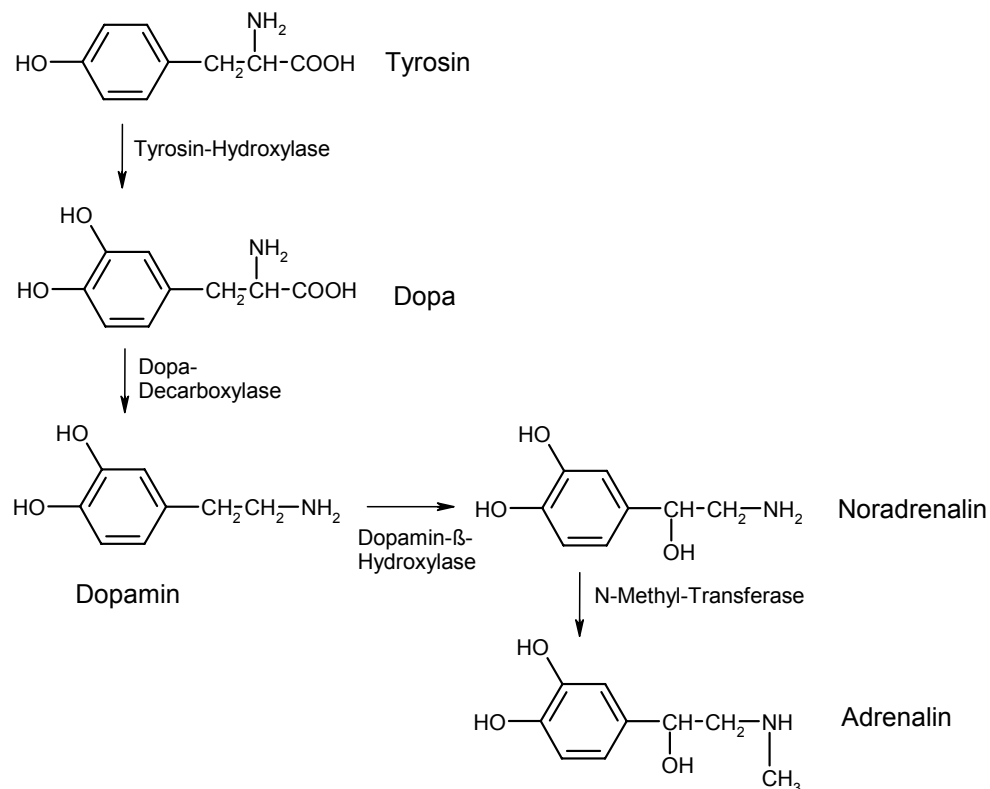


**Abbildung 2.3:** Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse. I: Iod; TH: Schilddrüsenhormon; TRH: Thyreotropin-Releasing Hormon; TSH: Schilddrüsenstimulierende Hormon; TTR: Transthyretin; T4: 3,3',5,5'-Tetraiodthyronin (L-Thyroxin); T3: 3,5,3'-Triiodthyronin

## 2.3 Stresshormonsystem

Die übergeordnete Funktion der Stresshormone ist es, den Organismus gegen akuten und chronischen Stress zu schützen. Die Hormone, die dabei eine Rolle spielen, sind die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin, die im Nebennierenmark des adrenergen Nervensystems (Chromaffinzellen) und Gehirn von Vertebraten aus Tyrosinmolekülen gebildet werden. Abbildung 2.4 zeigt die Biosynthese von Dopamin (Dihydroxyphenylalanin), Noradrenalin und Adrenalin. Wichtige Enzyme, die bei der Bildung der Katecholamine eine Rolle spielen, sind die Tyrosin-Hydroxylase (th), Dopa-Decarboxylase (ddc) und die

Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase (d $\beta$ h). Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Synthesekette wird durch die Aktivität der Tyrosin-Hydroxylase bestimmt, welche die Aminosäure Tyrosin durch Hydroxylierung des aromatischen Kerns in Dopa umwandelt. Bei vermehrter Freisetzung von Noradrenalin nimmt die Aktivität des Enzyms deutlich zu.



**Abbildung 2.4:** Darstellung der Biosynthese von Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin.

Bei akutem Stress mobilisieren die Katecholamine Glucose und Fettsäuren. Zusätzlich stimulieren diese Hormone die Stärke und Frequenz des Herzschlages und die Kontraktion der vaskulären glatten Muskulatur, was zu einer Blutdrucksteigerung führt. Adrenalin und Noradrenalin sind in ihrer Wirkung nicht gleich, obwohl sie in manchen Geweben ähnliche Effekte hervorrufen. Die Unterschiede in ihren Wirkungen beruhen auf unterschiedlichen Membranrezeptormolekülen, mit denen sie in Interaktion treten. Adrenalin bindet am effektivsten am  $\beta$ -adrenergen Rezeptor und Noradrenalin am  $\alpha$ -adrenergen Rezeptor. Bei chronischem Stress kommen dagegen überwiegend die Glucocorticoide zum Tragen, welche in der Nebennierenrinde gebildet werden.

Erhöhte Plasmawerte an Katecholaminen und Glucocorticoide als Folge akuter oder chronischer Stresssituationen hemmen die Schilddrüsenfunktion in sich entwickelnden und adulten Vertebraten.

## 2.4 Cytochrom P450 System

Das Cytochrom P450 System ist ein gut untersuchtes Enzymsystem von verwandten Monooxygenasen und wurde in Bakterien, Pflanzen und Tieren nachgewiesen. Es ist im Metabolismus von Komponenten wie Steroide, Prostaglandine, Eicosanoide, Arzneimittel und Xenobiotika involviert (110, 147). Cytochrom P450 Gene sind sehr verschieden; so wurden etwa 120 unterschiedliche Unterfamilien vom Cytochrom P450 Genen identifiziert (110, 147) und hinsichtlich einer Reihe von xenobiotika-metabolisierenden Funktionen charakterisiert (126).

Das am meisten untersuchte Cytochrom P450 Protein ist Cytochrom P450 1A. Das Gen ist leicht induzierbar durch PAH's, PCB's, Furane und Dioxine (72, 73, 182). Die Mechanismen dieser Art von Induktionen wurden bereits umfangreich studiert, so z.B. in der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*); (17, 22, 159) und anderen Teleostiern. Aufgrund der Induzierbarkeit dieses Genes durch verschiedenste Substanzklassen wurde es als Biomarker für die Detektion von Kontaminationen der Umwelt in Fischpopulationen verwendet (16, 21, 30). Die Expression des Cytochrom P450 1A1 stellt einen frühen biochemischen Marker für die Ah-Rezeptor Wirkung in Fischen und anderen Tieren, einschließlich dem Menschen dar (67, 181, 200). Der Ah-Rezeptor (*Aryl hydrocarbon* Rezeptor, AhR) ist ein durch Liganden aktivierter Transkriptionsfaktor, wie der Steroid- oder Retinoidrezeptor, jedoch mit Unterschieden in der Struktur und der Tatsache, dass bisher keine natürlichen Liganden identifiziert werden konnten (67). Vielmehr binden sich Substanzen wie 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD) an den Ah-Rezeptor und vermitteln so ihre biologisch toxischen Wirkungen.

## 2.5 Endokrine Disruptoren

In den letzten Jahren konnte in einer steigenden Zahl von Studien die zunehmende Bedeutung von endokrin wirksamen Umweltchemikalien gezeigt werden. Diese Chemikalien, welche die Regulierung des endokrinen Systems aber auch die Funktionsweise körpereigener Hormone beeinflussen können, wurden seit 1996 (Weybridge Workshop der Europäischen Kommission) allgemein unter dem Begriff Endokrine Disruptoren (ED) geführt (52). Die Definition des Begriffes ED beinhaltet, dass es sich um „exogene Substanzen handelt, die als Folge der Veränderung der endokrinen Funktionen adverse Gesundheitseffekte in einem intakten Organismus oder seiner Nachkommenschaft verursachen“.

In zahlreichen Arbeiten zeigte sich, dass die endokrin wirksamen, exogenen Substanzen sehr verschiedenen und nicht immer nur anthropogenen Ursprungs sind (Tabelle 2.2); (111, 136, 155, 174).

**Tabelle 2.2:** Endokrine Disruptoren anthropogenen und natürlichen Ursprungs.

Industriechemikalien	Polychlorierte Biphenyle (PCB's) HAH's Polyaromatische Hydrocarbone (PAH's) Halogenierte dibenzo-p-dioxine (Bsp. TCDD) Bisphenol A Alkylphenole
Arzneimittel	Thionamide, wie PTU und Methimazol
Pestizide	DDT und seine Metabolite Zineb, Ethylthiourea
Synthetische Steroide	Ethinylestradiol
Naturstoffe	Phyto- und Mykoöstrogene

Die Veränderungen der endokrinen Funktionen durch ED werden über sehr unterschiedliche Wirkmechanismen hervorgerufen. Einen Schwerpunkt der bisherigen Forschung stellen jene ED dar, die in die rezeptorvermittelten Funktionen



der Sexualsteroiden eingreifen und als Konsequenz nachteilige Effekte für die Reproduktionsbiologie verursachen. Arbeiten dazu gibt es für die verschiedensten Tiergruppen wie Amphibien (124), Reptilien (176), Vögel (62) und Säugern wie dem Florida-Panther (53). In diesem Zusammenhang lassen sich für die Beeinflussung der Sexualsteroiden vier grundsätzliche Wirkmechanismen ableiten, nämlich östrogene, anti-östrogene, androgene und anti-androgene Wirkungen. Bei den Fischen gibt es ebenfalls zahlreiche Arbeiten hinsichtlich der Reproduktionsbiologie und der Wirkung von ED (91, 92, 164).

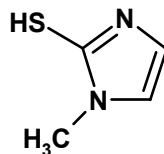
Ein weiterer, neuerer Schwerpunkt der ED-Forschung ist die Untersuchung der Wirkungen von ED auf die Schilddrüse. Nach bisherigen Kenntnissen gibt es drei Hauptangriffspunkte für endokrinwirksame Substanzen auf die Schilddrüse: erstens durch Störung der Hormonsynthese, zweitens durch Modulationen der Transportkapazitäten oder drittens durch Veränderungen im Metabolismus bzw. Katabolismus der Schilddrüsenhormone (15, 38). Im Folgenden sind einige Möglichkeiten für die Wirkung von Schilddrüsen-ED aufgelistet:

- Hemmung der Iod-Aufnahme
- Hemmung der TH-TTR Bindung
- Modulation der 5'-Monodeiodinase
- Störung des TH-Metabolismus
- Hemmung der Schilddrüsen-Peroxidase

Diese Wirkungsweisen von Schilddrüsen-ED stehen im Kontrast zu den ED-Wirkungen auf Steroidhormonfunktionen, wo die (anti-)östrogenen und (anti-)androgenen Substanzen ihre Wirkung vorwiegend über die Östrogen- und Androgenrezeptoren ausüben und ihre transkriptionale Aktivität nachahmen (96, 180, 199). Im Kontext von Endokrinen Disruptoren wird die Schilddrüsen-Achse oft als Zielsystem erwähnt, aber Studien zur Toxikologie von endokrinen Substanzen, fokussierend auf die Schilddrüse, sind nur begrenzt verfügbar.

## 2.6 Methimazol als Schilddrüsen-ED und Testsubstanz

Der Wirkstoff Methimazol (2-mercapto-1-methylimidazol; Abbildung 2.5) wird aktiv von der Schilddrüse aufgenommen (156, 157, 187, 188) und blockiert an verschiedenen Stellen die Schilddrüsenhormonsynthese (157). Als aktiver Metabolit des synthetischen Thyreostatikums Carbimazol (Mercaptoimidazol) hemmt Methimazol vor allem die Schilddrüsenperoxidase (TPO) und blockiert damit als Antioxidant die Iodoxidation, Iodinierung des Thyroglobulin und die Kondensation von zwei Diiodtyrosin-Molekülen bzw. einem Diiodtyrosin-Molekül mit einem Monoiodtyrosin-Molekül (156, 188). Dabei verhindert Methimazol weder die Aufnahme von Jod in die Schilddrüse, noch behindert es die Freisetzung von bereits gebildetem T3 und T4 (156, 157, 187, 188).



**Abbildung 2.5:** Chemische Strukturformel von Methimazol.

Im Zebrafisch konnten die hemmenden Effekte von Methimazol auf die Schilddrüse durch die inhibierte Entwicklung der unpaaren Flossen und der larvalen Entwicklung bereits gezeigt werden (13).

In einer Veröffentlichung der kalifornischen Umweltschutzagentur (*The California Environmental Protection Agency's Office of Environmental Health Hazard Assessment*, OEHHA) im März 2004 wurde Methimazol als krebserzeugende Substanz eingestuft. Damit wird die Bedeutung von Methimazol für die vorliegende Arbeit nicht nur als Modellsubstanz, sondern auch als ökotoxikologisch relevante Testsubstanz deutlich.

## 2.7 *Danio rerio* als Modellorganismus zur Untersuchung von ED

Fische sind ein wichtiges Modell in vielen Gebieten der Wissenschaft, einschließlich der Entwicklungsbiologie, Genetik, Neurobiologie, aquatische Toxikologie und Kanzerogenese geworden (163). Oft wird dabei die Forelle als Alternative zum Säuger-Modell gewählt und ist daher bereits gut charakterisiert (5). Die Verwendung von kleineren Fischen, wie dem Zebrafisch (*Danio rerio*), als experimentelles Modell bietet ebenfalls verschiedene Vorteile, auch im Vergleich zu größeren Fischen. Wichtig ist natürlich ihre geringere Größe und dadurch ihre leichtere Haltung und Pflege, was wiederum geringeren Kosten führt. Ebenso ist die leichte Nachzucht und regelmäßige Eiablagebereitschaft sowie die insgesamt deutlich widerstandsfähigere Konstitution von großem Vorteil (75).

Speziell für den Zebrafisch ist das weit reichend aufgeklärte Genom als großer Vorteil besonders im Zuge der zunehmenden molekularbiologischen Methodenerweiterungen in den letzten Jahren anzufügen. Daten zu den Nukleotid- und Proteinsequenzen lassen sich unter anderem beim *National Center for Biotechnology Information* ([www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)) und dem *Zebrafish Information Network* ([www.zfin.org](http://www.zfin.org)) finden. Als weiterer Vorteil ist für den Zebrafisch neben der Genetik die bereits gut untersuchte Entwicklungsbiologie zu nennen. In den letzten Jahren hat sich der Zebrafisch bereits mehrfach als geeignetes Modellsystem für viele Bereiche der Wissenschaft etabliert (65, 172).

Für Untersuchungen zu Endokrinen Disruptoren zeigten Fische unabhängig von der Größe aufgrund ihrer aquatischen Lebensweise deutliche Vorteile z.B. gegenüber Amphibien, Vögeln oder Säugern, da die Tiere über das Umgebungswasser einfach mit den Substanzen exponiert werden können. Wie bereits angeführt, stellen Oberflächengewässer Hauptsinken für ED dar.

### 3 Aufgabenstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das System der Schilddrüsenhormonachse bei Fischen weiter erforscht und als potentielles Modellsystem zur Untersuchung von ED des Schilddrüsen systems etabliert werden.

Bisher ist zum Schilddrüsen system und der Wirkung von ED bei Fischen sehr wenig bekannt. Arbeiten von Brown (13) und Essner et al. (51) zeigten die Bedeutung der Schilddrüsen hormone für die Entwicklung von Fischen. Untersuchungen zu den Expressionslevels der Schilddrüsenrezeptoren während der Entwicklung deuten darauf hin, dass es sehr verschiedene Steuerungsprozesse bei den einzelnen Organismen gibt, die TH regulieren (127, 207). Grundlegendes Ziel der Arbeit war es die Expression der TR $\alpha$ -, TR $\beta$ - und TSH-mRNA während der Entwicklung mittels real-time RT-PCR zu untersuchen und diese als potentielle Biomarker zu etablieren. Eine Beeinflussung durch ED im System der Schilddrüsen hormone konnte bereits mehrfach gezeigt werden (15, 83, 109). Jedoch konnten Einflüsse, die über die TR auf die Schilddrüsenfunktion wirken, bisher nicht eindeutig belegt werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollten Veränderungen durch die Modellsubstanz Methimazol als ED und dem im Organismus aktiven Schilddrüsenhormon T3 auf die Genexpressionslevel untersucht werden. Im Mittelpunkt der Studie stand die Methodenentwicklung zur Bestimmung der Expressionen von TR $\alpha$ -, TR $\beta$ - und TSH-mRNA.

In einigen Arbeiten wurde die Vermutung aufgestellt, dass Zusammenhänge zwischen den verschiedenen endokrinen Systemen bestehen. Daher sollten in der vorliegenden Arbeit zusätzlich die Expressionen weiterer mRNAs von den Enzymen der Stresshormonbiosynthese (th, ddc, d $\beta$ h) und die des Cytochrom P450 1A1 (cyp) als Vertreter des Systems der Cytochrom Enzymfamilie, während der Entwicklung und nach Expositionen mit Methimazol und T3 untersucht werden.

Als Untersuchungsobjekt wurde der Zebrafisch (*Danio rerio*) verwendet, da er günstige Voraussetzungen als ein möglicher Modellorganismus für die ED-Forschung besitzt. Die Vorteile dieses Fischmodells sind in der aquatischen Lebensweise, der leichten Haltung, der großen Nachkommenschaft und vor allem im

gut untersuchten Genom sowie in den weit reichenden Kenntnissen in der Entwicklung zu sehen.

Die Arbeit soll Grundlage für weitere genetische Arbeiten zur Untersuchung des Einflusses von z.B. Dioxinen und PAHs, wie Bisphenol A, Tetrabrombisphenol A (TBBPA) und 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD) auf aquatische Lebewesen sein. Diese Substanzen besitzen Strukturähnlichkeiten mit den natürlichen Hormonen und könnten damit potentielle ED für das Schilddrüsensystem darstellen.

Als zusammenfassende Zielsetzungen ergeben sich folgende Fragestellungen:

1. Wie stellt sich die Transkription der TSH-, TR $\alpha$ -, TR $\beta$ -, cyp-, ddc-, th- und d $\beta$ h-mRNA während der Entwicklung dar?
2. Welchen Einfluss hat die Testsubstanz Methimazol auf den Zebrafisch?
3. Sind TR $\alpha$ , TR $\beta$  und TSH geeignete Biomarker zur Untersuchung von Effekten durch Schilddrüsen ED?
4. Wirken Methimazol bzw. T3 als chemische Stressoren auf die Gene der Enzyme der Stresshormonbiosynthese (ddc, th und d $\beta$ h)?
5. Gibt es Zusammenhänge zwischen dem Schilddrüsensystem und anderen endokrinen Systemen wie dem Stresshormonsystem?
6. Ist Methimazol eine geeignete Modellsubstanz zur Etablierung eines Schilddrüsen-ED-Testsystems?
7. Lässt sich *Danio rerio* als Modellorganismus zur Bestimmung von Störungen des endokrinen Systems durch chemische Stressoren etablieren?

## **4 Material und Methoden**

### **4.1 Versuchstiere**

Die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen wurden mit Eiern und Embryonen von Zebrafischen (*Danio rerio*), sowie juvenilen und adulten Zebrafischen durchgeführt. Die adulten Tiere, unter anderem für die Nachzucht von Versuchstieren (Eier, Embryonen, Larven) und für die histologischen Vorversuche, stammten aus der Tierhaltung des Instituts für Entwicklungsgenetik (IDG), Arbeitsgruppe *zebrafish neurogenetic* des GSF-Forschungszentrums, Neuherberg. Die Tiere wurden in zwei Tanks, getrennt nach Männchen und Weibchen in einer Durchflussanlage der Quarantänestation des IDG gehalten. Die Bedingungen für die Haltung erfolgten wie von Westerfield (198) beschrieben. Die adulten Fische für den histologischen Hauptversuch stammten von der Firma Ruinemans Aquarium (Montfoort, NL).

### **4.2 Nachzucht, Aufzucht und Haltung von *Danio rerio***

#### **4.2.1 Allgemeine Medien und Ansätze zur Aufzucht und Haltung**

##### **4.2.1.1 „Hanks-Embryomedium“**

Für die Aufzucht und die Untersuchungen mit juvenilen Fischen wurden die Tiere in Becken mit „Hanks-Embryomedium“ (198) gehalten. Zur Herstellung des Embryomediums wurden Stammlösungen mit Millipore-Wasser angesetzt (Tabelle 4.1). Anschließend wurde eine Stammlösung mit 100 ml von Lösung 1, 3 und 4, 10 ml von Lösung 2 und 20 ml von Lösung 5 zusammen pipettiert. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung des Konzentrats (Stammlösung) im Kühlschrank. Für die Herstellung des Embryomediums wurde das Konzentrat mit Millipore-Wasser auf 10 l aufgefüllt und auf 26 °C bis zur Verwendung erwärmt.

**Tabelle 4.1:** Aufstellung der Konzentrationen der Stammlösungen für die Herstellung des Hank-Embryomediums.

Lösung 1	NaCl	80 g/l
	KCl	4,0 g/l
Lösung 2	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,58 g/l
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,0 g/l
Lösung 3	CaCl <sub>2</sub>	14,4 g/l
Lösung 4	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	24,6 g/l
Lösung 5	Hepes	238,0 g/l

#### 4.2.1.2 Herstellung von Lebendfutter (Artemia)

Für eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen wurde neben Trockenfutter mit Artemien zugefüttert. Bei Artemien (Salinenkrebse) handelt es sich um Ruderfußkrebse. Das Besondere an ihnen ist, dass sie Dauereier legen können, d.h. diese Eier sind im trockenen und kühlen Zustand sehr lange haltbar. Die daraus schlüpfenden Larven, auch Nauplien genannt, sind ein hervorragendes Futter für junge und kleine Fische.

Für die Aufzucht der Artemien wurden Dauereier der Firma Inve Aquaculture NV (Dendermonde, Belgien) verwendet. Um die Artemien zum Schlupf zu bringen, wurden die Eier in Salzwasser eingebracht, das aus Meersalz (Tropic Marin, Dr. Biener GmbH, Aquarientechnik, Wartenberg) in einer Konzentration von 20 g/l hergestellt wurde. Damit die Eier ausreichend mit O<sub>2</sub> versorgt waren, wurde das Salzwasser belüftet. Nach ca. 24 h erfolgt der Schlupf der Nauplien.

Zur Fütterung wurden nur frisch geschlüpfte Nauplien verwendet. Vor der Verfütterung wurde dazu die Belüftung abgestellt, so dass die Nauplien absanken. Danach wurden diese möglichst ohne Eier und Eischalen abgenommen und mit einem speziellen Artemiasieb kurz mit Wasser gespült, um restliches Salz zu entfernen. Anschließend konnten die Artemianauplien verfüttert werden.

#### **4.2.2 Paarung und Aufzucht der Eier bis zum Schlupf**

Die Paarung erfolgte, je nach Versuchstierbedarf, in 10 bis 15 mit aufgesalztem Osmosewasser gefüllten Paarungsboxen, in denen je zwei Männchen mit einem Weibchen zusammengebracht wurden. Die Paarungsboxen bestanden aus zwei Behältern, die ineinander steckbar waren, wobei der Einsatz einen Gitterboden hatte. Dadurch waren die Eier nach dem Ablachen und der Befruchtung vor Fraß geschützt. Das Zusammensetzen der Tiere fand stets nachmittags statt. Die Laichablage erfolgte am nächsten Morgen nach automatischem Einschalten der Beleuchtung als natürlichen Signalgeber.

Nach Abnahme der Eier mittels Sieb wurden die Männchen und Weibchen wieder getrennt. Somit konnte eine wöchentliche Paarung der Tiere erfolgen. Die Trennung nach Männchen und Weibchen war wichtig, damit die Weibchen neue Eier ansetzen konnten.

Die aus den Paarungen erhaltenen Eier wurden vor der Verwendung im Versuch gemischt und zu je 110 Stück in mit Embryomedium gefüllten Glas-Petrischalen verteilt. Dabei wurden unbefruchtete Eier sowie in der Entwicklung zurückgebliebene Embryonen aussortiert. Die Aufzucht bis zum Schlupf (ca. 2 Tage nach Befruchtung, 2 dpf) erfolgte bei 28 °C im Inkubatorschrank. Dabei wurden täglich tote oder nicht entwickelte Embryonen entfernt.

#### **4.2.3 Aufzucht von Juvenilen**

Wenn die Embryonen für die Aufzucht von adulten Tieren verwendet werden sollten, blieben die frisch geschlüpften Larven bis zum Zeitpunkt 5 dpf in den Petrischalen. Nach dem Schlupf wurden die Eihüllen entfernt, das Embryomedium erneuert sowie tote Tiere entfernt. Die weiteren Aufzuchtbedingungen der frisch geschlüpften Larven waren gleich denen der Embryonen mit 28 °C Umgebungstemperatur.

Fünf Tage nach der Befruchtung konnten die Larven in 1 l-Bechergläser mit 500 ml Embryomedium überführt werden (Abbildung 4.1). Dabei musste darauf geachtet werden, dass nicht mehr als 100 Fische in ein Becherglas kamen. Die weitere Aufzucht der Fische erfolgte bei 26 °C mit einem Hell-/ Dunkel-Rhythmus von 12:12



Stunden. Außerdem begann ab diesem Zeitpunkt eine zweimal tägliche Fütterung mit konventionell erhältlichem Staubfutter für Jungfische (Aquarien-Bau Schwarz, Göttingen).



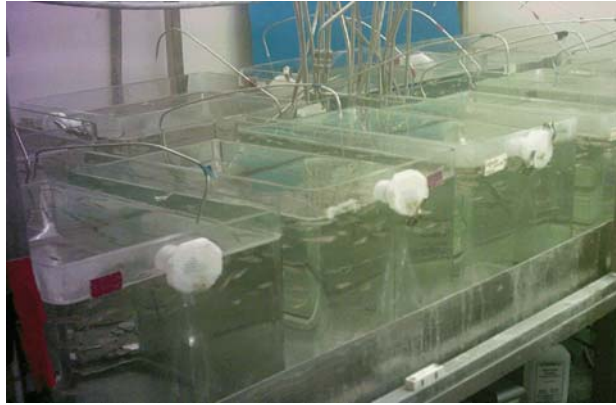
**Abbildung 4.1:** Aufzucht von Larven des Zebrafisches (*Danio rerio*).

Bei direkter Verwendung der frisch geschlüpften Larven in Untersuchungen wurden die Tiere gleich nach dem Schlupf in 1 l-Bechergläser mit je 500 ml Embryomedium überführt.

#### **4.2.4 Aufzucht von adulten Fischen**

Die Larven wurden vom 5. bis zum 10. Tag nach der Befruchtung in den 1 l-Bechergläsern mit 500 ml Embryomedium gehalten. Dabei erfolgte ein semistatischer Wasserwechsel dreimal wöchentlich und eine zweimal tägliche Fütterung mit Staubfutter für Jungfische.

Ab dem Tag 10 nach der Befruchtung (10 dpf) kamen die Fische in eine Durchflussanlage, welche mit Trinkwasser betrieben wurde (Siehe Abbildung 4.2). Dabei wurden in ein Becken mit 15 l Wasser ca. 300-400 Fische überführt. Mit zunehmendem Alter, d.h. ab 10 dpf bis zu einem Alter von ca. 3 Wochen (3 wpf), wurde die Fütterung von zweimal täglich Staubfutter auf täglich einmal Trockenfutter mit Sera San (Sera, Heinsberg) und einmal Artemia umgestellt. Um das Wachstum durch zu engen Besatz nicht zu behindern, erfolgte mit Heranwachsen der Fische eine immer weitere Separation.



**Abbildung 4.2:** Becken für die Aufzucht und Pflege vom Zebrafisch (*Danio rerio*).

### **4.3 *In vivo* Untersuchungen mit schilddrüsenendokrinen Disruptoren**

#### **4.3.1 Untersuchungen zur Genexpression während der Entwicklung (Entwicklungsstudie)**

##### **Probennahme für die Entwicklungsstudie**

Während der Aufzucht, also direkt nach der Paarung bis hin zum adulten Tier, wurden Proben entnommen. Die Aufzucht der Larven und adulten Fische erfolgte wie oben beschrieben.

In der folgenden Tabelle 4.2 sind die Probennahmezeitpunkte sowie die Anzahl der für die jeweilige Probe genommenen Eier, Larven bzw. Fische ablesbar. Für jeden Probennahmezeitpunkt wurden drei Proben entnommen. Die Einteilung der Stadien für den 1. Abschnitt der Probennahme erfolgte nach Kimmel et al. (98).

Für die Probennahme wurden die Tiere bei größeren Stadien mit Eis betäubt und anschließend in flüssigen Stickstoff eingefroren. Die Proben wurden bis zur Analyse bei -70 °C gelagert. In den Embryostadien und frühen larvalen Stadien wurden die Tiere nach Absaugen des Mediums mit Hilfe von Eiswasser in Petrischalen betäubt und danach mittels Pasteurpipette in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und das überschüssige Wasser abgesaugt. Anschließend konnten die Proben in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert werden.

**Tabelle 4.2:** Probennahmezeitpunkte zur Untersuchung der Veränderung der Genlevel während der Entwicklung vom Zebrafisch (*Danio rerio*).

1. Abschnitt		2. Abschnitt (tägliche Probennahme)		3. Abschnitt (wöchentliche Probennahme)	
Zeitpunkt (Entwicklungs- stadium)	Anzahl	Zeitpunkt	Anzahl	Zeitpunkt	Anzahl
2 h (64-cell)	200	2. bis 7. Tag	100	3. Woche	20
6 h (shield)	200	8. bis 14. Tag	50	4. und 5. Woche	10
10 h (bud)	200			6. bis 15. Woche	5
18 h (18-somite)	200				
24 h (prim-5 stage)	200				

#### 4.3.2 Untersuchungen an adulten Zebrafischen nach Expositionen mit Methimazol

##### 4.3.2.1 Versuchsansatz zum Nachweis der Genexpression der Schilddrüsenhormonrezeptoren im Ganzkörperhomogenat

In diesem Versuch sollte der Einfluss von Methimazol (Sigma-Aldrich, Steinheim) auf die Genexpressionslevel der beiden Schilddrüsenhormonrezeptoren TR $\alpha$  und TR $\beta$  in adulten Zebrafischen untersucht werden. Die Proben dazu stammten aus einem Versuch von Dr. L. Hollosi und Dr. R. Simon vom IÖC der GSF, wobei die Fische mit folgenden Konzentrationen exponiert waren:

0 (Kontrolle); 0,05; 0,3; 0,5; 2,0; 10 und 30 ppm.

Der gesamte Versuchsablauf wurde mittels Durchflussanlage unter regelmäßiger Messung der Methimazolkonzentrationen durchgeführt.

Die Probennahme erfolgte nach 6 Wochen Exposition, wobei die Proben nach Männchen und Weibchen getrennt, die Massen bestimmt und die Tiere bei -70 °C bis zur Analyse gelagert wurden. Die Extraktion der RNA für anschließende RT-PCR Analysen ist im Kapitel 4.4 beschrieben.

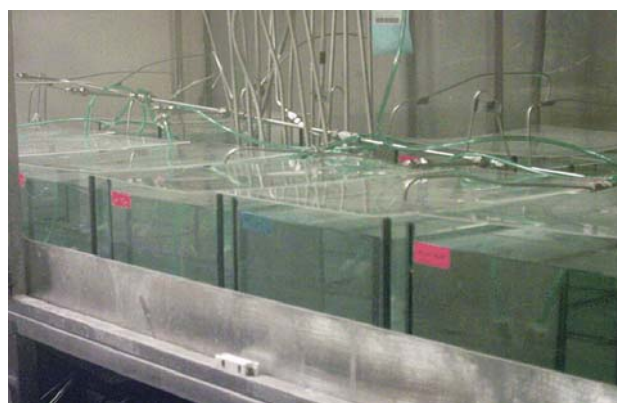
#### 4.3.2.2 Histologische Untersuchungen der Schilddrüse

In dieser Studie sollte der Einfluss von Methimazol auf die Schilddrüse und die Schilddrüsenfollikel im adulten Zebrafisch untersucht werden. Dazu wurden drei Versuche durchgeführt. Die verwendeten Konzentrationen und Expositionszeiten der jeweiligen Versuche sind in Tabelle 4.4 aufgeführt.

In einem ersten Versuch mit adulten Fischen wurden folgende Konzentrationen an Methimazol eingesetzt:

0 (Kontrolle), 10, 50, 100, 300 und 900  $\mu\text{M}$  (Siehe Tabelle 4.4).

Für die Exposition wurden ähnliche Konzentrationen wie für die Exposition mit den Zebrafischlarven (siehe Kapitel 4.3.3.2) verwendet. Die Fische für die diesen Versuch stammten aus eigener Aufzucht in der Fischhälterungsanlage des IÖCs und waren 7 Monate alt. Je Konzentration kamen 21 Männchen und 21 Weibchen getrennt in je ein mit 10 l Trinkwasser gefülltes Glasbecken (Außenmaße: 20 x 30 x 25). Die Temperaturen der Becken wurden über die kontrollierte Umgebungstemperatur einer Klimakammer (Hereaus, Vötsch Industrietechnik GmbH) eingestellt. Damit konnte die Temperatur in den Versuchsbecken auf  $26 \pm 1$  °C konstant gehalten werden. Zusätzlich erfolgte über Sprudelsteine eine Belüftung der Becken. Abbildung 4.3 zeigt den Versuchsaufbau.



**Abbildung 4.3:** Übersicht zum Versuchsaufbau für die *in vivo* Behandlungen mit Methimazol von adulten Zebrafischen (*Danio rerio*).

Für die Untersuchungen wurde ein semistatisches Expositionsregime gewählt. Die Zugabe der Substanz Methimazol erfolgte unmittelbar nach Wasserwechsel, d.h. dreimal wöchentlich (Montag, Mittwoch und Freitag). Eine zweimalige Fütterung mit einmal Trockenfutter (Sera San, Heinsberg) und einmal Artemien erfolgte täglich bzw. einmal täglich mit Trockenfutter an den Wochenendtagen.

Die Probennahmen erfolgten an den Tagen 5, 10 und 15 nach Beginn der Exposition. Dabei wurden bei jedem Probennahmezeitpunkt randomisiert 6 Männchen und 6 Weibchen aus jedem Becken entnommen, diese betäubt, abgetötet und anschließend in Bouin'scher Lösung für 24 h fixiert. Die Zusammensetzung der Bouin'schen Lösung ist in Tabelle 4.3 nachzulesen. Das Betäuben und Abtöten erfolgte durch Einsetzen der Tiere in eine Tricainlösung (Tricain-Methansulfonat; Wirkstoff MS 222; Sigma-Aldrich, Steinheim) mit einer Konzentration von 1 g/l. Die Betäubung der Tiere trat bereits nach wenigen Sekunden ein und nach einige Minuten waren die Tiere dann tot und konnten aus der Lösung entfernt und in die Bouin'sche Lösung überführt werden.

**Tabelle 4.3:** Zusammensetzung der Bouin'sche Fixierungslösung für die Histologie.

Eisessig (Merck, Darmstadt)	10 ml
Formalin (37,5 %;neolab Migge Laborbedarf, Heidelberg)	50 ml
Pikrinsäure (gesättigt, wässrig; Sigma-Aldrich, Steinheim)	150 ml

Nach der Fixierung folgte ein zweimaliger Waschschrift mit Ethanol (70 %; Merck, Darmstadt). Bis zur Aufarbeitung der Proben für die histologischen Untersuchungen wurden die Proben in Ethanol (70 %) gelagert.

Die weitere Aufarbeitung der Proben für die histologischen Untersuchungen der Schilddrüse erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Leo van der Ven (National Institute for Public Health and the Environment, rivm; Niederlande) nach Wester et al. (197). Dort wurden Koronalsektionen von 4 µm Dicke in den Regionen von Interesse durchgeführt. Die erhaltenen Sektionen wurden mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbt.

In einem zweiten anschließenden Versuch wurden verschiedene höhere Konzentrationen an Methimazol und längere Expositionszeiten als im ersten Versuch für histologische Untersuchungen getestet. Dazu wurden ein Jahr alte, adulte Zebrafische aus der Quarantäneanlage von Frau Dr. Bally-Cuif vom Institut für Entwicklungsgenetik an der GSF, Neuherberg, verwendet. Die getesteten Konzentrationen sind in Tabelle 4.4 gezeigt.

Der Versuchsablauf entsprach identisch dem des ersten Versuchs, nur wurden diesmal je Konzentration je 7 Tiere in ein Becken gesetzt. Die Dauer der Behandlung mit Methimazol betrug 21 Tage. Danach wurden je Becken 6 Tiere entnommen, betäubt, mit Tricainlösung abgetötet und in Bouin'scher Lösung für 24 h fixiert, anschließend in Ethanol (70 %) gespült und bis zur histologischen Untersuchung gelagert.

**Tabelle 4.4:** Übersicht über die Expositionssansätze zu den histologischen Untersuchungen (Erklärung siehe Text).

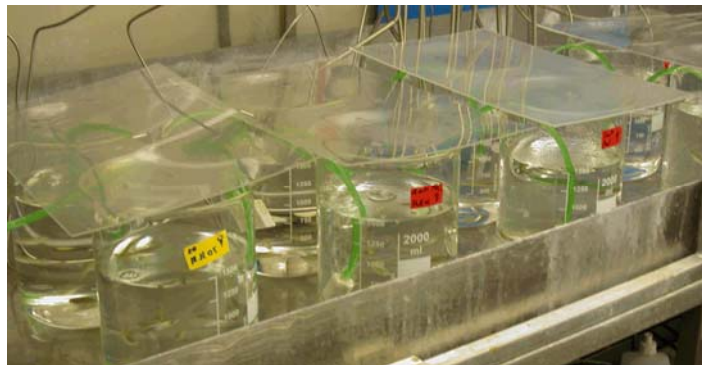
Versuch für die Histologie	Probenahmen (in Tagen)	eingesetzte Methimazolkonzentrationen	
1.	5, 10, 15	10; 50; 100; 300; 900	µM
2.	21	1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 5; 6; 8; 10	mM
3.	21	1; 5; 10	mM

In einem dritten Versuch sollten die Ergebnisse des zweiten Versuches in statistisch signifikantem Probenumfang wiederholt werden. Die Tiere für den Versuch stammen aus einem Import von der Firma Ruinemans Aquarium (Montfoort, Niederlande) und hatten ein Alter von ca. 6-8 Monaten. Nach Lieferung der Tiere wurden diese für zwei Wochen in großen Becken mit ca. 30 l Wasservolumen unter Quarantäne gehalten, wobei in der ersten Woche keine Trennung zwischen Männchen und Weibchen erfolgte. In der zweiten Woche wurden die Tiere nach Geschlechtern getrennt gehalten, um am Ende dieser Woche eine Paarung mit ihnen durchzuführen. Gepaart wurden zwei Männchen mit einem Weibchen.

Für die Exposition wurden folgende Konzentrationen eingesetzt:

0 (Kontrolle); 1; 5; 10 mM (Siehe auch Tabelle 4.4).

Dabei wurde in 2 l Bechergläsern (Glas) 1,5 l aufgesalzenes Osmosewasser eingefüllt und die Männchen und Weibchen getrennt voneinander exponiert. In jeder Konzentration wurden 12 Tiere exponiert, so dass in jedes Becherglas 6 Männchen bzw. Weibchen kamen. Die allgemeinen Bedingungen während des Versuches waren  $26 \pm 1$  °C Wassertemperatur, 12:12 h Hell-Dunkel-Rhythmus und zweimal tägliche Fütterung mit Trockenfutter. Am Wochenende wurde nur einmal täglich gefüttert. In Abbildung 4.4 ist der Versuchsaufbau zu sehen. Die Probennahme erfolgte wie im 2. Versuch nach einer Expositionsdauer von 21 Tagen und wiederum durch das Abtöten mit einer Tricainlösung und anschließender Fixierung in Bouin'scher Lösung.



**Abbildung 4.4:** Versuchsaufbau für die *in vivo* Expositionen zur histologischen Untersuchung des Einflusses von Methimazol auf die Schilddrüse bei *Danio rerio*.

### 4.3.3 Untersuchungen mit juvenilen Zebrafischen

#### 4.3.3.1 Ökotoxikologische Untersuchungen des konzentrationsabhängigen Effekts von Methimazol, T3 und Bisphenol A (BPA) auf die Entwicklung des Zebrafisches

In diesem Versuch sollte der Einfluss von Methimazol, T3 und BPA auf die frühen Entwicklungsstadien beim Zebrafisch untersucht werden. Dazu wurde die Paarung

wie zuvor beschrieben (Kapitel 4.2.2) durchgeführt und die erhaltenen Eier sortiert, indem unbefruchtete und in der Entwicklung zurückgebliebene Eier entfernt wurden. In einem Vorversuch sollten die Konzentrationen für Methimazol und T3 aus den *in vivo* Behandlungen zur Genexpression (Kapitel 4.3.3.2 und 4.3.3.3) getestet werden, um zu zeigen, dass in diesen Konzentrationsbereichen keine Effekte auf die Entwicklung zu erkennen sind und somit die Bedingungen für einen ökotoxikologischen Versuch gegeben waren. Die getesteten Konzentrationen für Methimazol betragen 10, 100 und 1000  $\mu\text{M}$  und für T3 1, 5, 10 und 30 nM und je eine Kontrolle. Die Herstellung der jeweiligen Stammlösungen für diesen Versuch ist in den entsprechenden Kapiteln 4.3.3.2 bzw. 4.3.3.3 beschrieben.

**Tabelle 4.5:** Aufstellung der eingesetzten Konzentrationen zur Untersuchung des Einflusses von Methimazol, Triiodothyronin (T3) und Bisphenol A auf die Entwicklung von *Danio rerio*. Ko: Kontrolle

Expositionssubstanzen	Testkonzentrationen	
Methimazol (Sigma-Aldrich, Steinheim)	0 (Ko), 1, 5,	mM
T3 (Sigma-Aldrich, Steinheim)	0 (Ko), 10, 100, 1000	nM
Bisphenol A (Sigma-Aldrich, Steinheim)	0 (Ko), 1, 10, 100	$\mu\text{M}$

Im darauf folgenden Versuch sollten höhere Testkonzentrationen, wie in Tabelle 4.5 aufgeführt, eingesetzt werden. Dafür wurden wiederum für alle drei Testsubstanzen Stammlösungen hergestellt. Methimazol konnte in Wasser gelöst werden, in einer Konzentration der Stammlösung von 1 M. T3 dagegen wurde mit Hilfe von 1 M NaOH Lösung gelöst und dann auf die Stammlösungskonzentration von  $10^{-4}$  M mit Wasser verdünnt. Bisphenol A wurde in Ethanol (50 %) gelöst. Die Konzentration der Stammlösung betrug 0,1 M.

Damit eventuelle Effekte der Lösungsmittel die Ergebnisse nicht beeinflussen, wurden in den Versuchen mit T3 und Bisphenol A jeweils  $10^{-4}$  M NaOH Lösung bzw. 50 %-iger Ethanol in entsprechender Menge in die Ansätze (Expositionsmedien) zugegeben. Damit entsprach die Lösungsmittelkonzentration in der Behandlung mit der höchsten Konzentration derer in den anderen Versuchsansätzen.



Vor Versuchsbeginn wurden die Expositionsmedien aus den Stammlösungen wie oben angegeben und die entsprechenden Lösungsmittelmengen für jede zu testende Konzentration in 500 ml Schott-Flaschen hergestellt. Beginn der Versuche war das 64-Zell-Stadium (2 hpf). Zu diesem Entwicklungszeitpunkt wurden 20 Eier randomisiert aus der Gesamtmenge entnommen und in Petrischalen überführt. Anschließend wurde das überschüssige Medium entfernt und frisch angesetztes Expositionsmedium dazugegeben. Während der Exposition wurden die Tiere zu folgenden Zeitpunkten beobachtet und Veränderungen in der Entwicklung tabellarisch und per Fotoaufnahmen festgehalten:

6 hpf, 10 hpf, 24 hpf und dann täglich von 2 dpf bis 5 dpf

Zusätzlich wurden mit denselben Konzentrationen, wie in Tabelle 4.5 aufgeführt, frisch geschlüpfte Larven behandelt, um zu untersuchen, ob die Tiere in dieser Phase unterschiedlich sensitiv im Vergleich zur embryonalen Entwicklungsphase reagieren.

#### **4.3.3.2 Untersuchungen zur Genexpression nach Expositionen mit Methimazol**

Ziel dieses Versuches war es, die Einflüsse von Methimazol auf die Expressionen von Genen der Schilddrüsenhormon- und Stresshormonachse in Abhängigkeit von verschiedenen Expositionszeiten und -konzentrationen zu untersuchen. Dazu wurden jeweils 105 frisch geschlüpfte Zebrafischlarven (48 hpf) und 500 ml Embryomedium in ein 1 l-Becherglas aus Glas überführt. Die Gewinnung und Aufzucht der Eier bis zum Schlupf der Larven sind in Kapitel 4.2 nachlesbar. Die Abbildung 4.5 zeigt den Versuchsaufbau für die *in vivo* Behandlungen der frisch geschlüpften Larven.



**Abbildung 4.5:** Versuchsaufbau für die *in vivo* Behandlung von frisch geschlüpften *Danio rerio* Larven (48 hpf; Stunden nach der Befruchtung) mit Methimazol und Triiodothyronin (T3)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedenste Expositionen durchgeführt und diese getrennt voneinander analysiert. In Tabelle 4.6 sind die getesteten Konzentrationen, Expositionszeiten und die untersuchten Gene für die verschiedenen Expositionsversuche mit den Larven dargestellt. Für alle Expositionen wurde zu jedem Wasserwechsel eine frische Stammlösung mit einer Konzentration von 0,1 M hergestellt. Von dieser Stammlösung wurde dann nach dem Wasserwechsel die entsprechende Menge, in Abhängigkeit von der gewünschten Zielkonzentration, in das 500 ml Embryomedium zugegeben.

**Tabelle 4.6:** Aufstellung der Teilversuche für die *in vivo* Behandlungen mit Methimazol zur Untersuchung der Genexpressionen bei juvenilen Zebrafischen. TR $\alpha$ : Schilddrüsenrezeptor  $\alpha$ , TR $\beta$ : Schilddrüsenrezeptor  $\beta$ , TSH: Schilddrüsenstimulierendes Hormon, cyp: Cytochrom P450 1A1, ddc: Dopa-Decarboxylase, th: Tyrosin-Hydroxylase, d $\beta$ H: Dopamine- $\beta$ -Hydroxylase, Ko:Kontrolle

Teil-Versuch	Dauer der Expositionen in Tagen	Expositionskonzentrationen in $\mu$ M	untersuchte Gene
1.	1, 3, 5, 7	0 (Ko), 50, 100, 300	TR $\alpha$ , TSH
2.	3, 5, 7, 8, 9	0 (Ko), 10, 50, 100, 300	TR $\alpha$ , TR $\beta$ , TSH
3.	3, 7	0 (Ko), 10, 100, 1000	TR $\alpha$ , TR $\beta$ , TSH, cyp, ddc, th, d $\beta$ H

Die Versuche wurden semistatisch mit einem 3x wöchentlichen Wasserwechsel durchgeführt. Bei jedem Wasserwechsel wurde bis auf ca. 20 ml das komplette Expressionsmedium abgesaugt und durch 500 ml frisches Embryomedium ersetzt.

Anschließend erfolgte die Zugabe der Expositionssubstanz. Damit es nicht zu Schimmelbildung kommen konnte, diente das Absaugen auch zur Entfernung von Futterresten sowie von eventuell gestorbenen Tieren. Die Fütterung der Larven erfolgte ab einem Alter von 5 dpf und dann 2x täglich mit Staubfutter. Vor jeder Fütterung wurden mittels Papiertuch alte Futterreste von der Oberfläche abgenommen, welche nach Absinken auf den Boden und möglichen Fäulnisprozessen ansonsten das Wasser zusätzlich verunreinigen würden.

Die Probennahmen erfolgten nach dem jeweiligen Ende der Expositionszeiten durch Absaugen des Expositionsmediums bis auf ca. 15 bis 20 ml und anschließendem Überführen aller mit gleicher Konzentration exponierten Tiere eines Becherglases in eisgekühlte Petrischalen. Beim Absaugen wurde wie beim normalen Wasserwechsel darauf geachtet, dass tote Tiere und Futterreste mit entfernt wurden. In die Petrischalen wurde nochmals Eis zugegeben, so dass die Tiere schnell durch den Kälteschock starben. Danach wurden sie rasch mit Hilfe einer Pasteurpipette (3 ml) in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und das restliche Medium abgesaugt.

Es ergab sich je Probe eine durchschnittliche Tieranzahl von 100. Bei der Auswertung der Versuche wurde je Probe als Durchschnittswert ein Pool von 100 Tieren (n=100) angenommen.

#### **4.3.3.3 Untersuchungen zur Genexpression nach Expositionen mit Triiodothyronin (T3)**

Dieser Versuch war identisch konzipiert wie der vorangegangene Versuch mit Methimazol. Versuchsaufbau und Versuchsdurchführung sind von daher im vorhergehenden Abschnitt beschrieben (siehe auch Abbildung 4.5).

Unterschiede zum Versuch mit Methimazol waren die eingesetzten Konzentrationen an T3, die in Tabelle 4.7 zusammen mit den Expositionszeiten und den untersuchten Genen aufgeführt sind. Bei den Expositionen wurde für jede neue Substanzzugabe nach den Wasserwechseln, wie bei Methimazol, eine frische Stammlösung hergestellt. Die Konzentration der T3-Stammlösung betrug  $10^{-4}$  M. Aufgrund der schlechten Lösungseigenschaften von T3 in Wasser wurde es in NaOH-Lösung

gelöst. Um im Versuch mögliche Effekte unterschiedlicher Lösungsmittelgehalte zu vermeiden, wurde bei der Substanzzugabe die entsprechende Menge an Lösungsmittel in den jeweiligen Konzentrationen abgeglichen. Die Endkonzentration des Lösungsmittels NaOH in der Stammlösung betrug 0,05 M.

**Tabelle 4.7:** Aufstellung der *in vivo* Behandlungen mit T3 zur Untersuchung von Genexpressionen bei juvenilen Zebrafischen. TR $\alpha$ : Schilddrüsenrezeptor  $\alpha$ , TR $\beta$ : Schilddrüsenrezeptor  $\beta$ , TSH: Schilddrüsenstimulierendes Hormon, cyp: Cytochrom P450 1A1, ddc: Dopa-Decarboxylase, th: Tyrosin-Hydroxylase, d $\beta$ H: Dopamine- $\beta$ -Hydroxylase

Versuch	Dauer der Expositionen (in Tagen)	Expositionskonzentrationen (in nM)	untersuchte Gene
1.	1, 3, 5, 7	0, 1, 5, 10, 30	TR $\alpha$ , TR $\beta$ , TSH, cyp, ddc, th, d $\beta$ H

#### 4.3.3.4 Messung der Methimazolkonzentration im Versuchsmedium

Um festzustellen, in wie weit die nominal dosierte Soll-Konzentration von der tatsächlich im Versuchsmedium aktiven Konzentration abweicht, wurden in verschiedenen Versuchen Messungen der Methimazolkonzentrationen im Versuchsmedium vorgenommen.

Dazu wurden 10 ml Medium aus mittleren Wasserschichten mit Hilfe einer Glaspipette entnommen und in Zusammenarbeit mit Dr. L. Hollosi mittels HPLC gemessen, wie anderweitig beschreiben (80, 81).

#### 4.3.3.5 Messung des pH-Wertes im Versuchsverlauf

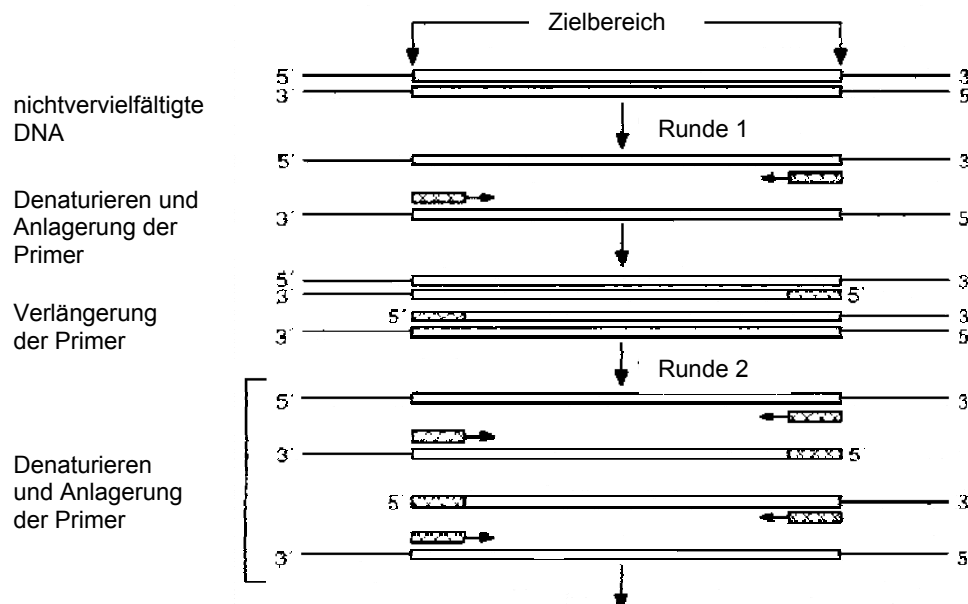
Eine weitere Kontrolle der Versuchsbedingungen war neben der regelmäßigen Temperaturkontrolle auch die Messung des pH-Wertes während der Versuche. In regelmäßigen Abständen, auch vor und nach den Wasserwechseln, wurden dazu Wasserproben entnommen und der pH-Wert mit Hilfe eines Digital-pH-Meters (Knick, Berlin) bestimmt.

## 4.4 Nachweis von Genexpressionen potentieller Biomarker mittels Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

### 4.4.1 Prinzip der RT-PCR

Das Prinzip der Reversen Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) ist, die reverse Transkription der mRNA mit der Amplifizierung der daraus erhaltenen komplementären DNA (cDNA) durch die Polymerasekettenreaktion zu verbinden (19, 193).

Mittels RT-PCR können kleinste Mengen einer mRNA-Sequenz spezifisch detektiert werden (18). Dazu wird die mRNA aus dem Gewebe bzw. den Zellen phenolisch extrahiert und in den ersten Schritt der RT-PCR, der cDNA Erststrangsynthese, eingesetzt. Dabei synthetisiert eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die Reverse Transkriptase, in Gegenwart eines Primers einen komplementären DNA-Strang zur einzelsträngigen mRNA in 5' → 3' Richtung. Für die Transkriptase dient die mRNA als Matrize. Der eingesetzte Oligo-(dT)-Primer bindet sich an die mRNA im Bereich des Poly-A-Schwanzes.



**Abbildung 4.6:** Schema des Prinzips der PCR. Nach Newton und Graham (148), verändert.

Die nach dieser Transkriptions-Reaktion erhaltene cDNA wird in die PCR eingesetzt. Die PCR ermöglicht es, gezielt DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen begrenzt werden, zu vervielfältigen. Dazu wird als erstes die Matrizen-DNA (template) bei hohen Temperaturen (90-95 °C) aufgeschmolzen. Beim anschließenden Abkühlen auf Temperaturen zwischen 50 °C und 60 °C (Annealing-Temperatur) erfolgt die Anlagerung der Oligonukleotidprimer (Amplimere) an die komplementären Sequenzen der DNA-Matrize. Bei den Amplimere handelt es sich um kurze, einzelsträngige DNA-Moleküle, die komplementär zu den Enden einer definierten Sequenz der DNA-Matrize sind. Eine DNA-Polymerase (*Taq*-Polymerase) verlängert unter geeigneten Reaktionsbedingungen (Temperaturoptimum) und in Gegenwart von Desoxynucleosidtriphosphaten (dNTP's) die Primer entlang der einzelsträngigen denaturierten DNA-Matrize vom 3'-Ende ausgehend und synthetisiert so neue DNA-Stränge, deren Sequenz komplementär zur Matrize ist. Am Ende der Reaktion liegt die DNA doppelsträngig vor, so dass diese erneut aufgeschmolzen werden kann.

Das entscheidende Prinzip der PCR ist die zyklische Wiederholung dieser einzelnen Reaktionsschritte (Abbildung 4.6). Dadurch kann die Ausgangsmenge der spezifischen DNA-Zielsequenz vermehrt werden.

#### 4.4.2 Durchführung der RT-PCR

##### 4.4.2.1 Phenolische Extraktion der RNA

Für die Extraktion der RNA wurden folgende Chemikalien verwendet:

Chloroform	(Merck, Darmstadt);
DEPC (Diethylpyrocarbonat)-behandeltes	
Wasser (0,1 %), autoklaviert	(AppliChem, Darmstadt);
Ethanol 70 %	(Merck, Darmstadt);
Isopropanol	(AppliChem, Darmstadt);
Trizol®-Reagenz	(Invitrogen, Karlsruhe).

Die gesamtzelluläre RNA (totalRNA) wurde nach einer Modifikation der Methode von Chomczynski und Sacchi (26) mittels Phenol-Cholorform-Extraktion unter Verwendung von Trizol®-Reagenz isoliert. Die zur Isolierung verwendeten Proben aus den Versuchsansätzen hatten stark unterschiedliche Gewebemengen. Durch verschiedene Optimierungen ergab sich die im Folgenden beschriebene Methode der phenolischen RNA-Extraktion. Soweit nicht anders angegeben, erfolgten die einzelnen Isolierungsschritte bei Raumtemperatur und unter Verwendung RNase-freier Lösungen und Materialien.

Als erster Schritt wurde den tief gefrorenen Proben nach kurzem Antauen 2 ml Trizol®-Reagenz zugegeben. Nachdem dann das Gewebe aufgetaut war konnte es mit dem Ultra-Turrax (IKA Labortechnik, Janke & Kunkel GmbH, Staufen) homogenisiert werden. Durch einen ersten Zentrifugationsschritt bei 4 °C mit 12000 g für 10 Min. wurde unlösliches Material (Fett, Proteine usw.) entfernt. Dazu wurde der Überstand nach dem Zentrifugieren in ein frisches Falcongefäß überführt. Um die Membranen und sonstige Zellkompartimente aufzulösen, wurde das Homogenisat für 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 400 µl Chloroform, ein Vortexen von 15 Sekunden und eine weitere Inkubation für 3 Min. bei Raumtemperatur. Durch diese Schritte kam es zur Trennung der wässrigen (hydrophilen) und organischen (lipophilen) Phase. Um die Trennung der Phasen zu vervollständigen, wurden die Proben bei 4 °C mit 12000 g für 15 Min. zentrifugiert (Beckmann Zentrifuge).

Vom wässrigen Überstand, in dem sich die gesamte RNA befand, wurden 1000 bis 1200 µl abgenommen und in sterile 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Die Ausfällung der RNA erfolgte durch Zugabe von 700 µl Isopropanol. Anschließend musste das Gemisch kurz geschüttelt und für 10 Min. bei Raumtemperatur inkubiert werden. Danach folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt, bei 4 °C und 12000 g für 10 Min. Das nach der Zentrifugation erhaltende RNA-Pellet wurde nach vorsichtiger Entfernung des Überstand mit 1000 µl Ethanol (70 %) gewaschen (kurzes Vortexen zwischendurch) und bei 4 °C und 12000 g für 5 Min. erneut abzentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet für 10-15 Min. luftgetrocknet.

Als abschließenden Schritt der RNA-Extraktion erfolgte die Resuspendierung der RNA-Pellets mit DEPC-behandeltem Wasser in Abhängigkeit von der Größe. In den meisten Fällen wurde das RNA-Pellet in 50 µl DEPC-Wasser gelöst. Durch eine Inkubation von 10 Min. bei 55 °C löste sich das Pellet dann endgültig. Die Lagerung

erfolgte bei sofortiger weiterer Analyse auf Eis oder bei späterer Verwendung bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.4.2.2 Reinheits- und Konzentrationsbestimmung der RNA

Zur Bestimmung der Reinheit der RNA wurden zwei verschiedene Verfahren angewendet. Zuerst mit einem visuellen Nachweis über ein denaturierendes Agarose-Gel. Die Ursache für die Auftrennung der einzelsträngigen RNA im Agarose-Gel unter denaturierenden Bedingungen liegt in intra- bzw. intermolekularen Basenpaarungen, welche unter nicht denaturierenden Bedingungen leicht zu Sekundärstrukturen führen könnten (128). DNA wird dagegen unter nativen, nicht denaturierenden Bedingungen getrennt.

Das zweite Verfahren ist die Messung der Optischen Dichte bei verschiedenen Wellenlängen. Beide Verfahren mussten positive Ergebnisse liefern, damit die isolierte RNA in die RT-PCR bzw. in die Differential Display Methode eingesetzt wurde.

##### 4.4.2.2.1 Gelelektrophorese der total RNA

Für die Herstellung des Agarose-Gels wurden folgende Chemikalien verwendet:

Agarose	(Biozym, Oldendorf);
DEPC (Diethylpyrocarbonat)-behandeltes Wasser (0,1 %), autoklaviert	(AppliChem, Darmstadt);
Formaldehyd (37 %)	(AppliChem, Darmstadt);
Formamid	(AppliChem, Darmstadt);
10xMOPS-Puffer	(AppliChem, Darmstadt);
Ethidiumbromid	(0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , Roth, Karlsruhe);
0,5 M EDTA pH 7,5	(AppliChem, Darmstadt);
6xLoading Dye	(MBI Fermentas, St. Leon Roth).



Die Quantität und Qualität der isolierten RNA konnte mittels eines denaturierenden Agarose-Gels gezeigt werden. Des Weiteren konnten mittels des Gels mögliche DNA-Verunreinigungen erkannt werden.

Dafür wurde ein 1 % Agarose-Gel hergestellt. Zur Herstellung wurde 1 g Agarose in 82,5 ml Wasser in der Mikrowelle gelöst. Dem gelösten Gel wurden anschließend unter leichtem Rühren 10 ml 10x MOPS-Puffer und 7,5 ml Formaldehyd zugegeben. Anschließend konnte das Gel in eine zuvor von RNA gereinigte Gelkammer mit eingesetztem Gelkamm gegossen werden. Die Aushärtung des Gels dauerte 1 h.

Formaldehyd dient dabei als Denaturierungsmittel für die RNA. Seine denaturierende Wirkung beruht auf der Bildung Schiff'scher Basen mit den Aminogruppen von Guanin, Cytosin und Adenin. Dadurch wird die Ausbildung von Wasserstoffbrücken effektiv unterbunden, so dass sich keine Sekundärstruktur ausbilden kann.

Für die Probenauftragung wurden 5 µl der unverdünnten Probe mit 10 µl Auftragspuffer gemischt. Der Auftragspuffer wurde stets frisch angesetzt und setzte sich wie folgt zusammen:

Formaldehyd	45 µl
Formamid	45 µl
10xMOPS-Puffer	10 µl
Ethidiumbromid	10 µl
0,1 M EDTA	1,5 µl
6xLoading Dye	8,0 µl

Zur Denaturierung der RNA wurde vor der Gelbeladung die Mischung aus Probe und Auftragspuffer 10 Min. bei 70 °C inkubiert und dann auf Eis 1 Min. abgekühlt und abzentrifugiert. Anschließend konnte das zuvor in die Gelapparatur (Mini Sub-Cell GT System, BioRad) eingebrachte und mit 1xMOPS-Puffer überschichtete Gel mit den Proben beladen werden. Für die Horizontal-Elektrophorese wurde eine Spannung von 60 V für ca. 30 Min. angelegt.

Die Einlagerung des Ethidiumbromids an die RNA und in die vorhandene DNA verursacht im UV-Licht eine Fluoreszenz, die mit der Menge an RNA bzw. DNA korreliert werden kann. Ethidiumbromid absorbiert dabei Licht zwischen 254 und 366 nm und emittiert im rot-orangen Wellenbereich (590 nm); (123).

#### 4.4.2.2 Photometrische Reinheitsmessung der RNA

Die Konzentrationsbestimmung der extrahierten RNA-Menge erfolgte mit dem Spectrophotometer der Firma Beckmann (DU@530 LifeScience UV/Vis). Dazu wurden 2 µl der gelösten RNA in 198 µl DEPC-behandeltem Wasser (Applichem, Darmstadt) verdünnt und die Extinktionen bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm gemessen. Der Quotient aus den Messwerten bei 260 nm und 280 nm stellt ein Maß für die Reinheit der isolierten RNA dar und lag zwischen 1,8 und 2,0. Die Konzentration der RNA ergab sich aus der optischen Dichte bei 260 nm ( $1 \text{ OD}_{260} = 40 \text{ µg/ml}$ ). Danach ergibt sich folgende Formel zur Konzentrationsberechnung:

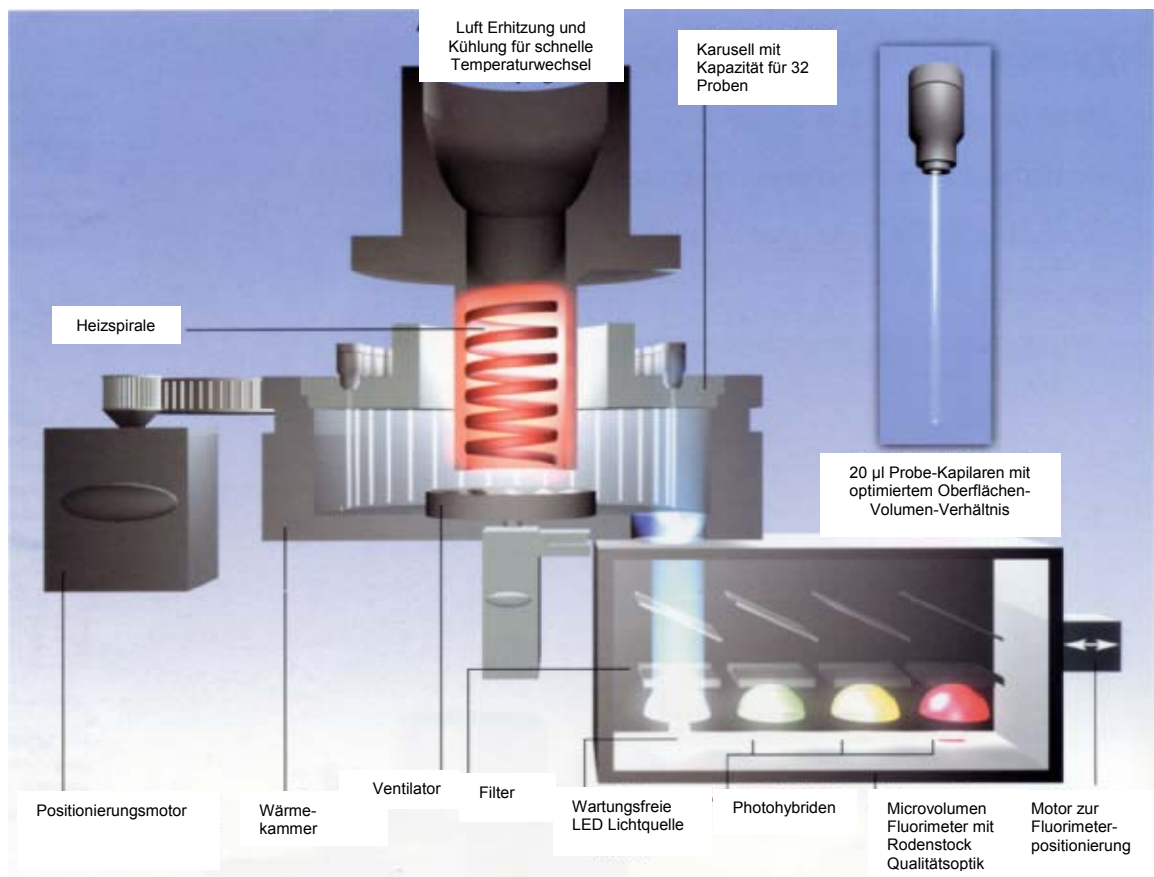
$$C_{\text{RNA}} = E_{260} \times \text{VF} \times 40 / 1000$$

Die Einheit der Konzentration ist µg/µl. VF ist der Verdünnungsfaktor der gemessenen Probe,  $E_{260}$  die Extinktion bei 260 nm. Für die weitere Verarbeitung in der RT-PCR wurde die RNA-Lösung auf 1 µg RNA pro µl DEPC-Wasser verdünnt. Anschließend konnte sie sofort für die RT-PCR weiter verwendet oder bei -70 °C gelagert werden.

#### 4.4.2.3 Real-time RT-PCR

##### 4.4.2.3.1 Prinzip der real-time PCR

Zur Analyse der Genexpressionslevel mittels real-time PCR wurde das LightCycler System von Roche (Penzberg) verwendet. Dieses System kann durch sehr schnelles Heizen und Kühlen (*Cycling*) die Zeit für eine PCR gegenüber der herkömmlichen PCR stark verringern (Abbildung 4.7). Gleichzeitig ist es möglich, die Ergebnisse nach jedem Amplifikations-Zyklus am Bildschirm in Echtzeit (real-time) zu verfolgen. Dazu wurde für das Fluoreszenzsignal SYBR Green I als Fluoreszenzfarbstoff verwendet. Dieser ist gegenüber Ethidiumbromid spezifischer, da es nur an doppelsträngiger DNA (dsDNA) bindet.

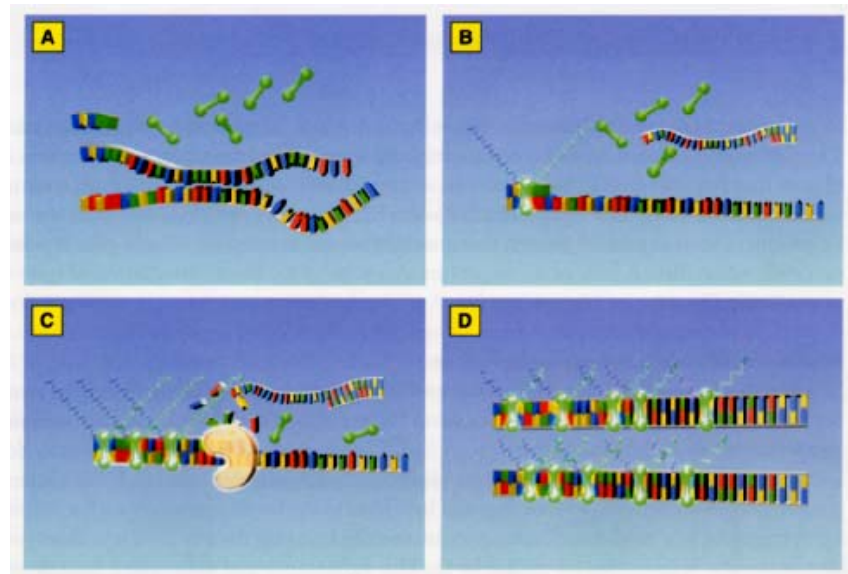


**Abbildung 4.7:** Schema LightCycler System (Abbildung von Roche, verändert).

Das Grundprinzip der PCR ist jedoch bei der real-time PCR identisch zur herkömmlichen PCR (Abbildung 4.8) Nach der Denaturierungsphase der PCR (Abbildung 4.8 A) liegt einzelsträngige DNA vor und SYBR Green I ist nicht gebunden, so dass die Intensität des Fluoreszenzsignal gering ist. Während der Annealingphase der PCR (Abbildung 4.8 B) binden sich die Primer an die Zielsequenz, so dass sich zwischen den kleinen Stücken an dsDNA SYBR Green I binden kann und das Signal ansteigt.

In der Elongationsphase der PCR (Abbildung 4.8 C) werden die Primer verlängert und weiteres SYBR Green I kann sich binden. Am Ende der Elongation (Abbildung 4.8 D) liegt der überwiegende Teil an DNA als dsDNA vor; der Farbstoff ist maximal gebunden und bewirkt sein maximales Signal.

Das Fluoreszenzsignal wird am Ende dieser Elongationsphase bei 530 nm gemessen. Die ansteigende Menge an PCR-Produkt kann von Zyklus zu Zyklus aufgezeichnet werden.



**Abbildung 4.8:** Überblick über die Phasen der PCR der real-time PCR unter Verwendung von SYBR Green I als Fluoreszenzsignal. **A:** Denaturierungsphase, **B:** Annealingphase, **C:** Anfang der Elongationsphase, **D:** Ende der Elongationsphase (Abbildung von Roche).

#### 4.4.2.3.2 Erststrang-cDNA-Synthese durch Reverse Transkription (RT)

Für die Synthese des cDNA-Erststranges wurde der Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) bzw. folgende Reagenzien daraus verwendet:

Transcriptor-Reverse Transcriptase

(Transcriptor-RT) (20 U/ $\mu$ l);

Transcriptor RT Reaktionspuffer (5x)

Zusammensetzung: 250 mM Tris-HCL (pH 8,5 bei 25 °C),

150 mM KCL,

40 mM MgCl<sub>2</sub>;

RNAse Hemmer (40 U/ $\mu$ l);

Desoxynucleotide Mix 10 mM von dATP, dGTP, dCTP, dTTP;

Anchored-oligo-(dT<sub>18</sub>)-Primer (50  $\mu$ M),

Sequenz: 5'-NV(T)<sub>18</sub>-3', V = A, C oder G;

N = A, C, G oder T;

Wasser (aufgereinigt, nukleasenfrei).

Alle Arbeitsschritte der RT wurden auf Eis durchgeführt. Als erster Schritt wurde 1,5 µl der 8-fach verdünnten RNA-Lösung in ein 200 µl-Mikrogefäß vorgelegt. Danach wurde je vorgelegte Probe folgender Premix zugegeben:

Wasser	10,5 µl
Oligo-(dT)-Primer	<u>1,0 µl</u>
Gesamtvolumen:	11,5 µl

Im Thermocycler (Thermal Cycler PxE 0.2, Thermo Electron Corporation, Dreieich, VWR) wurden die Proben bei 65 °C für 10 Min. inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Im zweiten Schritt der RT wurde den Proben der bereits vorbereitete 2. Premix zugegeben:

RT-Puffer	4,0 µl
dNTP-Lösung	2,0 µl
RNase Hemmer	0,5 µl
Transcriptor-RT	<u>0,5 µl</u>
Gesamtvolumen:	7,0 µl

Danach wurden die Proben bei 50 °C für 60 Min. erneut im Thermocycler inkubiert. Bei diesen Schritten lagerte sich der Poly-(dT)-Primer spezifisch an den Poly-(A)-,Schwanz' der mRNA an und die mRNA wurde in komplementäre, doppelsträngige DNA (cDNA, dsDNA) transkribiert. Durch die mRNA-spezifische Primerhybridisierung wurde nur die mRNA in cDNA umgeschrieben. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Erhitzen auf 85 °C 5 Min. und anschließendem Abkühlen auf 6 °C für 5 Min.. Damit wurden gleichzeitig die Transcriptor-RT und die restliche RNA zerstört.

#### 4.4.2.3.3 Amplifikation der cDNA verschiedener Biomarker mittels real-time PCR

##### Primer

Die Gensequenzen, aus welchen die Primer entwickelt wurden, sind im Genverzeichnis (Kapitel 11.1) aufgeführt. Alle verwendeten Primer wurden von Tib Molbiol (Berlin) synthetisiert und mittels HPLC aufgereinigt. Die Primersequenzen von TR $\alpha$ , TR $\beta$  und gapdh, als „housekeeping gene“ (HG), für die 1. Untersuchung zur Genexpression nach einer Methimazolexposition wurden mit Hilfe des Programms Primer3Software entwickelt. Für die 2. und 3. Untersuchung zur Genexpression nach den Expositionen mit Methimazol, für die Untersuchungen nach den Expositionen mit T3 und für die Entwicklungsstudien stammten die Primersequenzen für TR $\alpha$  und TR $\beta$  aus Liu et al. (121). An Stelle von gapdh wurde für diese Untersuchungen EF 1 $\alpha$  als HG verwendet, dessen Primersequenz ebenfalls aus Liu et al. (121) entnommen wurde. Alle Primer lagen lyophilisiert vor und wurden mittels DEPC-behandeltem Wasser (AppliChem, Darmstadt) zu einer Konzentration von 10  $\mu$ M gelöst.

##### Schilddrüsenhormonrezeptor $\alpha$ (*thyroid hormone receptor, TR $\alpha$* )

###### 1. Untersuchung:

Primer forward: 5'-tca gtc gag agc agc tga aa-3'

Primer reverse: 5'-tag tgc tcg aat gcc aac ag-3'

Die Länge des aus der Amplifikation der spezifischen TR $\alpha$ -cDNA von Zebrafisch entstehenden PCR-Produkts beträgt 411 Basenpaare (bp).

###### 2. Untersuchung:

Primer *forward*: 5'-cga caa gag cat ctc tgt tcc-3'

Primer *reverse*: 5'-gct cag gtc gat tgt gta acg-3'

Die Länge des aus der spezifischen Amplifikation entstehenden PCR-Produkts beträgt 380 bp.

### **Schilddrüsenhormonrezeptor $\beta$ (*thyroid hormone receptor, TR $\beta$* )**

#### **1. Untersuchung**

Primer *forward*: 5'-tat gac ccc gag agc gat ac-3'

Primer *reverse*: 5'-gga cga tca gag gaa agc ag-3'

Die Länge des aus der Amplifikation der spezifischen TR $\beta$ -cDNA von Zebrafisch entstehenden PCR-Produkts beträgt 291 bp.

#### **2. Untersuchung**

Primer *forward*: 5'-tcc tgc cag aag aca ttg g-3'

Primer *reverse*: 5'-tcc tga caa cgc tct atc cg-3'

Die Länge des aus der spezifischen Amplifikation entstehenden PCR-Produkts beträgt 457 bp.

### **Glycerinaldehyd-3-phosphate Dehydrogenase (*gapdh*)**

Primer *forward*: 5'-gaa ggt ggc aaa ctg gtc at-3'

Primer *reverse*: 5'-ttg cac cac cct taa tgt ga-3'

Die Länge des aus der Amplifikation der spezifischen gapdh-cDNA von Zebrafisch entstehenden PCR-Produkts beträgt 163 bp.

### **Elongationsfaktor 1 $\alpha$ (EF 1 $\alpha$ )**

Primer *forward*: 5'-gaa tcg aca aga gaa cca tcg-3'

Primer *reverse*: 5'-ccg ttc ttg gag ata cca gc-3'

Die Länge des aus der Amplifikation der spezifischen EF 1 $\alpha$ -cDNA von Zebrafisch entstehenden PCR-Produkts beträgt 295 bp.

Die folgenden Primer wurden mit Hilfe des Programms Primer3Software entwickelt. Die Längen der aus den Amplifikationen der spezifischen cDNAs von Zebrafisch entstehenden PCR-Produkte betragen für TSH 221 bp, cyp 217 bp, ddc 173 bp, th 223 bp und d $\beta$ h 180 bp. Die lyophilisierte Primer wurde in DEPC-behandeltem Wasser (AppliChem, Darmstadt) gelöst und auf eine Konzentration von 10  $\mu$ M eingestellt.

Schilddrüsenstimulierendes Hormone (*thyroid stimulating hormone*, **TSH**)

Primer *forward*: 5'-att gtt cag agg gga tgc ac-3'

Primer *reverse*: 5'-ttc tcc tcg ggg tac aga tg-3'

Tyrosin-Hydroxylase (**th**)

Primer *forward*: 5'-agt gtg aag tgc acc tgt cg-3'

Primer *reverse*: 5'-cga tca tct tcc gtc gtt tt-3'

Dopa-Decarboxylase (**ddc**)

Primer *forward*: 5'-ggc gat gtg ggt aaa gaa aa-3'

Primer *reverse*: 5'-cgt aca tgc gga aca caa ac-3'

Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase (**d $\beta$ H**)

Primer *forward*: 5'-tcc aag tag ggg gca tac ac-3'

Primer *reverse*: 5'-ggc aga cca agt cac cat ctt-3'

Cytochrom P450 1A1 (**cyp**)

Primer *forward*: 5'-tcc tgg aaa tcg gaa aca ac-3'

Primer *reverse*: 5'-ctg aac gcc aga ctc ttt cc-3'

#### 4.4.2.3.4 Real-time PCR

Für die Durchführung der real-time PCR wurde neben den aufgeführten Primern der LightCycler® FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> SYBR Green I Kit (Roche, Mannheim) verwendet.

Alle Arbeitsschritte beim Erstellen der Reaktionslösungen für die Amplifikation der cDNA wurden auf Eis durchgeführt. Für die Amplifikation wurden 5  $\mu$ l der aus der RT erhaltenen cDNA in für den Roche LightCycler® spezifischen Glaskapillaren (Roche, Mannheim) vorgelegt. Der PCR-Premix wurde in einem sterilen Eppendorf-Reaktionsgefäß zusammengemischt. Pro Probe wurde folgender Premix hergestellt und zu der vorgelegten cDNA in die Kapillaren gegeben:



Master Mix 5x (bestehend aus Enzym, Reaktionsmix mit SYBR Green I Farbstoff)	4 µl
Primermix aus forward und reverse Primer(5 µM)	4 µl
Wasser, PCR-grade	<u>7 µl</u>
Gesamtvolumen: 15 µl	

Zusätzlich wurde in einer Kapillare anstatt der Probe Wasser vorgelegt. Dies diente zur Überprüfung, ob die Substanzen frei von Verunreinigungen durch Fremd-DNA waren und ob es nicht zu unerwünschten Primerdimeren während der Amplifikation gekommen ist, d.h. ob die Primer nicht zu stark mit sich selber binden.

Nach Zugabe aller Komponenten wurden die Kapillaren verschlossen und bei 700 *g* für 5 sec mit der LightCycler® Carousel Centrifuge (Roche, Mannheim) abzentrifugiert. Anschließend konnten die Kapillaren in das Proben Karussell vom zuvor bereits programmierten LightCycler® Gerät überführt und die Amplifikation gestartet werden.

In der Pre-Inkubationsphase von 10 Min. wird die FastStart DNA Polymerase aktiviert und die DNA denaturiert. Genauere Instruktionen für den Roche LightCycler® und seine Programmierung sind in den im Kit mitgelieferten Anweisungen und im Roche LightCycler® Handbuch beschrieben.

Das Programm für den LightCycler® sah folgendermaßen aus:

Pre-Inkubation	95 °C	10 Min.	1 Zyklus
Denaturierung	95 °C	10 sec	
Annealing	65 °C	5 sec	45 Zyklen
Extension (DNA-Synthese)	72 °C	10 sec	
Schmelzkurve			1 Zyklus
Kühlen	40 °C	30 sec	1 Zyklus

## Schmelzkurvenanalyse

Jedes PCR-Produkt hat eine spezifische Schmelztemperatur, welche definiert ist als die Temperatur, bei der 50 % der dsDNA als einzelsträngige DNA vorliegt. Die Ursachen für das unterschiedliche Schmelzverhalten (Denaturierungsverhalten) liegen in der Länge des PCR-Produkts und dem GC-Gehalt.

Durch die Schmelzkurvenanalyse kann zum einen die Bildung des gesuchten PCR-Produkts bekräftigt und zum anderen die Bildung von möglichen unspezifischen Produkten aufgezeigt werden, so dass die Schmelzkurve zur PCR-Produktidentifizierung dient.

Daher wurde zur Überprüfung der Qualität der amplifizierten Produkte am Ende jeder real-time PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Diese erfolgte durch eine kontinuierliche Erhöhung der Temperatur ab 65 °C in 0,1 °C Schritten unter gleichzeitiger Messung des Fluoreszenzsignals bis hoch zu 95 °C. Sobald die dsDNA zu denaturieren beginnt, sinkt das Fluoreszenzsignal ab.

### 4.4.2.4 RT-PCR

#### 4.4.2.4.1 Erststrang-cDNA-Synthese durch reverse Transkription (RT)

Für die Synthese des cDNA-Erststranges wurden folgende Reagenzien benutzt:

DEPC-behandeltes Wasser	(aqua bidest., autoklaviert);
Oligo-(dT) <sub>15</sub> -Primer	(0,5 µg/µl; Promega, Mannheim);
M-MuLV-RT	(20 units/µl, MBI Fermentas, St. Leon Roth);
Puffer 5x für M-MuLV-RT	(20 u/µl, MBI Fermentas, St. Leon Roth), Zusammensetzung: 250 mM Tris-HCL (pH 8,3 bei 25 °C), 250 mM KCL, 20 mM MgCl <sub>2</sub> , 50 mM DTT;
dNTP-Lösung	10 mM von dATP, dGTP, dCTP, dTTP (MBI Fermentas, St. Leon Roth);
RNase Inhibitor	(MBI Fermentas, St. Leon Roth).

Alle Arbeitsschritte der RT wurden auf Eis durchgeführt. Als erster Schritt wurden 2 µl der verdünnten mRNA-Lösung in ein 200 µl-Mikrogefäß vorgelegt. In dieses Gefäß wurden 19 µl Wasser und 2 µl Oligo-(dT)<sub>15</sub>-Primer zugegeben. Im Thermocycler (Thermal Cycler PxE 0.2, Thermo Electron Corporation, Dreieich, VWR) wurde die mRNA bei 70 °C für 5 Min. erhitzt und dann auf Eis abgekühlt. Bei diesem Schritt lagert sich der Poly-(dT)-Primer spezifisch an den Poly-(A)-,Schwanz' der mRNA an. Anschließend wurde dem Reaktionsgefäß 8 µl 5x M-MuLV-RT-Puffer, 4 µl dNTP-Lösung, 1 µl RNase Inhibitor und 4 µl AMV-RT zugegeben. Danach erfolgte im Thermocycler bei 37 °C eine Inkubation von einer Stunde, während derer die RNA in komplementäre, doppelsträngige DNA (cDNA) transkribiert wird. Durch die mRNA-spezifische Primerhybridisierung wurde nur die mRNA in cDNA umgeschrieben. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Erhitzen auf 70 °C für 10 Min. und anschließendem Abkühlen auf 6 °C. Dadurch wurden die M-MuLV-RT und die restliche RNA zerstört.

#### 4.4.2.4.2 Amplifikation von cDNA verschiedener Biomarker mittels PCR

##### Primer:

Schilddrüsenhormonrezeptor  $\alpha$  (*thyroid hormone receptor  $\alpha$* , TR $\alpha$ )

Primer forward: 5'-tca gtc gag agc agc tga aa-3'

Primer reverse: 5'-tag tgc tcg aat gcc aac ag-3'

Die Länge des aus der Amplifikation der spezifischen TR $\alpha$ -cDNA vom Zebrafisch entstehenden PCR-Produkts beträgt 411 Basenpaare (bp). Der lyophilisierte Primer wurde in DEPC-behandeltes Wasser (AppliChem, Darmstadt) gelöst und auf eine Konzentration von 10 µM eingestellt.

Schilddrüsenhormonrezeptor  $\beta$  (*thyroid hormone receptor  $\beta$* , TR $\beta$ )

Primer forward: 5'-tcc tgc cag aag aca ttg g-3'

Primer reverse: 5'-tcc tga caa cgc tct atc cg-3'

Die Länge des aus der Amplifikation der spezifischen TR $\beta$ -cDNA vom Zebrafisch entstehenden PCR-Produkts beträgt 457 bp. Der lyophilisierte Primer wurde in

DEPC-behandeltes Wasser (AppliChem, Darmstadt) gelöst und auf eine Konzentration von 10  $\mu$ M eingestellt.

Elongationsfaktor 1 $\alpha$ , EF 1 $\alpha$ )

Primer *forward*: 5'-gaa tcg aca aga gaa cca tcg-3'

Primer *reverse*: 5'-ccg ttc ttg gag ata cca gc-3'

Die Länge des aus der Amplifikation der spezifischen EF 1 $\alpha$ -cDNA vom Zebrafisch entstehenden PCR-Produkts beträgt 295 bp. Der lyophilisierte Primer wurde in DEPC-behandeltes Wasser (AppliChem, Darmstadt) gelöst und auf eine Konzentration von 10  $\mu$ M eingestellt. Der EF 1 $\alpha$  vom Zebrafisch wurde als HG als interner Standard für die semiquantitative RT-PCR benutzt.

Die Primersequenzen für die Amplifikation von TR $\beta$  und EF 1 $\alpha$  stammen aus Liu et al. (121). Alle Primer wurden von MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert und aufgereinigt.

Für die Durchführung der PCR wurden neben den aufgeführten Primern folgende Substanzen verwendet:

DEPC-behandeltes Wasser	(aqua bidest., autoklaviert);
Taq-Puffer 10x	(Amersham Biosciences, Freiburg),
Zusammensetzung:	100 mM Tris-HCL (pH 9,0 bei 25 °C), 500 mM KCL, 15 mM MgCl <sub>2</sub> ;
dNTP-Lösung	10 mM von dATP, dGTP, dCTP, dTTP (MBI Fermentas, St. Leon Roth);
MgCl <sub>2</sub>	(Amersham Biosciences, Freiburg);
Taq-DNA-Polymerase	(5 u/ $\mu$ l, Invitrogen, Karlsruhe).

Alle Arbeitsschritte beim Erstellen der Reaktionslösungen für die Amplifikation der cDNA wurden auf Eis durchgeführt. Für die Amplifikation wurden 5  $\mu$ l der aus der RT erhaltenen cDNA in 200  $\mu$ l-Mikrogefäße vorgelegt. Der PCR-Premix wurde in einem sterilen Eppendorf-Reaktionsgefäß wie folgt zusammengemischt:

	Premix-Ansatz
Wasser	33,1 $\mu$ l
<i>Taq</i> -Puffer	5,0 $\mu$ l
dNTP-Lösung	1,0 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	1,5 $\mu$ l
Primer forward	2,0 $\mu$ l
Primer reverse	2,0 $\mu$ l
<u>Taq-Polymerase</u>	<u>0,4 <math>\mu</math>l</u>
Gesamtvolumen:	45,0 $\mu$ l

Für die PCR wurden je 45  $\mu$ l dieses Premixes zu der Probenvorlage gegeben, anschließend alles gevortext und abzentrifugiert. Anschließend wurde die cDNA im Thermocycler amplifiziert. Das PCR-Programm für den Thermocycler entstand durch zahlreiche Optimierungsversuche, in denen Inkubationstemperaturen und -zeiten verändert wurden. Dabei ergaben sich die folgenden optimierten Einstellungen:

Programmierung des Thermocyclers:

1. Schritt: 94 °C 3 Min. (Beginn; Denaturierung);
  2. Schritt: 94 °C 1 Min. (Denaturierung);
  3. Schritt: 58 °C 45 sec (Annealing);
  4. Schritt: 72 °C 45 sec (DNA-Synthese);
- Rücksprung zum 2. Schritt, 35 Zyklen für TR $\alpha$  und TR $\beta$ ;  
24 Zyklen für EF 1 $\alpha$
5. Schritt: 72 °C 10 Min. (Abschluß);
  6. Schritt: 6 °C 1 Min.

#### 4.4.2.4.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Darstellung der amplifizierten cDNA erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese, für die nachfolgende Chemikalien verwendet wurden:

50x TAE-Puffer, pH 8,5	(Ultra Qualität, Carl Roth GmbH), Zusammensetzung: 242 g Tris, 57,1 ml Eisessig, 18,6 g NaEDTA; auf 1 L aufgefüllt;
Agarose	(Biozym, Oldendorf);
6xLoading Dye	(MBI Fermentas, St. Leon Roth)
Ethidiumbromid	(0,5 mg/ ml, Roth, Karlsruhe);
GeneRuler, 100bp DNA Ladder (von 80 bis 1031 bp)	(1 mgDNA/ ml, MBI Fermentas, St. Leon Roth).

Für die Auftrennung der amplifizierten cDNA wurden ethidiumbromidhaltige 1,5 % Agarosegele in 1x TAE-Puffer verwendet. Für die Horizontal-Elektrophorese (Biorad, Sub-Cell 182) wurde eine Spannung von 80 V für 50 Min. angelegt. Es wurden 5 µl der Probe mit 2 µl Loading Dye (Probenpuffer) gemischt und 6 µl auf das Gel gegeben. Die Einlagerung des Ethidiumbromids (1 µl Ethidiumbromid-Lösung in 10 ml flüssigem Agarosegel) in die cDNA verursachte im UV-Licht Fluoreszenz, die mit der Menge an cDNA korreliert werden konnte. Die Gele wurden mit Hilfe eines Video Dokumentationssystems (BioVision 3000 CN-3000 WL/CL) aufgenommen und mit dem Computersoftwareprogramm Quantity One densitometrisch ausgewertet.

Die Bestimmung der Werte des „housekeeping gene“ EF 1 $\alpha$  dienten als Maß für die eingesetzte mRNA-Menge. Durch den Vergleich der amplifizierten Ziel-cDNA der spezifisch regulierten Biomarker mit der des „housekeeping gene“ konnte ungleiche mRNA-Fracht und/ oder mRNA-Abbau bei der Quantifizierung ausgeglichen werden. Alle densitometrischen Meßwerte wurden mit den Werten des EF 1 $\alpha$  abgeglichen.

## 4.5 Amplifikation zufälliger Produkte

Ziel aller Methoden zur Amplifikation zufälliger Produkte ist es, große Mengen an cDNA, deren Sequenz nicht bekannt ist, zu analysieren. Dabei lassen sich verschiedene Herangehensweisen unterscheiden. Eine der ersten Methoden war die Methode der *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD; (201)), die ursprünglich für DNA-Fingerprints entwickelt wurde. Dieses Verfahren wurde jedoch kurze Zeit später unter dem Namen *RNA arbitrarily primed PCR* (RAP-PCR; (195)) und *Differential Display* (DD; (118)) an die Fingerprint-Analyse von RNA angepasst. Mit Hilfe des DD, der RNA-Variante der zufälligen Amplifikation, lassen sich Unterschiede in der Genexpression zwischen Behandlung und Kontrolle aufzeigen. Dazu wird eine Reverse Transkription mit einem Ankerprimer durchgeführt, welcher zusätzlich zum üblichen Oligo-dT-Abschnitt und einer spezifischen Adaptorsequenz am 5'-Ende zwei definierte Basen (z.B. 5'-NNNNN(T)16AG-3') am 3'-Ende enthält. Dadurch wird ein Teil der mRNAs in cDNA umgeschrieben und so die Komplexität der cDNA reduziert. Anschließend wird mit einem ankerspezifischen und einem kurzen, zufälligen Primer amplifiziert und die erhaltenen Bandenmuster verglichen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Methode der RAP-PCR durchgeführt. In einem ersten Schritt wurde dazu die isolierte und aufgereinigte total RNA in cDNA mit einem Random Hexamer Primer transkribiert. Im Gegensatz zu Amplifikationen in einer normalen PCR, wurden für die anschließende RAP-PCR zufällige Primer mit deutlich kürzerer Basenpaar-Länge von 10 bp verwendet. Damit die Primer zusätzlich auch nur teilweise komplementäre Sequenzen hybridisieren konnten, musste die Annealingtemperatur auf unter 40 °C gesenkt werden.

Als Ergebnis erhält man mehrere Banden von verschiedener Größe. Durch einen Vergleich der nach mehreren Amplifikationen erhaltenen Bandenmuster von Behandlung und Kontrolle lassen sich potentielle Unterschiede aufzeigen, die dann in weiteren Schritten (Untersuchungen der Banden) als wirkliche Genexpressionsunterschiede bewiesen bzw. widerlegt werden müssen. In einer dieser folgenden Schritte würde das Gen mit der veränderten Expression ermittelt werden.

Da das Genom vom Zebrafisch bis zu diesem Zeitpunkt weitgehend sequenziert ist, diene die im Rahmen dieser Studie angewandte Methode dazu, mRNA-Sequenzen,

die durch *in vivo* Behandlungen mit den Substanzen Methimazol und T3 in ihrer Expression verändert sind, aufzuzeigen.

#### 4.5.1 RAP-PCR

Mit Hilfe dieser Methode sollte untersucht werden, ob es Unterschiede in den Genexpressionen in Larven vom Zebrafisch durch die Behandlung mit Methimazol und T3 im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen gibt.

Für die Untersuchungen wurden Proben aus den Versuchen zur Genexpression mittels real-time PCR mit juvenilen Zebrafischen verwendet. Die Proben waren mittels Phenolischer Extraktion der RNA bereits aufgearbeitet und lagen als 1 µg/ µl konzentrierte RNA-Lösung vor. Welche Proben aus welchen Behandlungen verwendet wurden, ist in der Tabelle 4.8 aufgeführt.

**Tabelle 4.8:** Aufstellung der verwendeten Proben für die RAP-PCR aus den Larvenversuchen. T3: Triiodothyronin; BPA: Bisphenol A

Behandlung	Expositionszeit	Konzentration
Methimazol	7 Tage	0, 1000 µM
T3	5 Tage	0, 30 nM
BPA	5 Tage	0, 1000 nM

Für die weitere Verwendung der totalRNA der Proben in der RAP-PCR ist Voraussetzung, dass die Proben absolut frei von DNA-Kontaminationen sind (119). Daher wurde anschließend mit den Proben ein DNase-Verdau durchgeführt

##### 4.5.1.1 DNase-Verdau mit anschließender RNA-Isolierung

Für den Abbau der in den Proben befindlichen restlichen DNA wurde mittels des MessageClean® Kits (GenHunter® Corporation, USA) ein DNase-Verdau durchgeführt. Dazu wurde die gesamte RNA-Lösung der einzelnen Proben aus der



RNA Extraktion eingesetzt und diese auf 50 µl mit DEPC-behandeltem Wasser (Kit Bestandteil) aufgefüllt. Anschließend wurden von den Kit-Komponenten 10x Reaktionspuffer 5,7 µl und von der DNase I (10 units/ µl) 1 µl zu den Proben gegeben und gevortext. Dann folgte eine Inkubation bei 37 °C für 30 Min..

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden in die Proben 50 µl Trizo®-Reagenz-Chloroform-Mix (Verhältnis 3:1) pipettiert, diese dann kurz gevortext und 10 Min. auf Eis inkubiert. Durch einen anschließenden Zentrifugationsschritt wurden die lipophile und hydrophile Phase mit der RNA getrennt. Der wässrige RNA-haltige Überstand wurde abgenommen und mit 5 µl NaOAc (3 M, Kitbestandteil) und 200 µl Ethanol (99 % p.a.) gemischt.

Bei einer Temperatur von -80 °C wurde dann innerhalb von 1 h die RNA ausgefällt. Danach erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt für 10 Min. und bei 12000 g, um das RNA-Pellet zu erhalten. Das erhaltene Pellet wurde wie bei der herkömmlichen im Kapitel 4.4.2.1 beschriebene RNA-Isolierung mit 70 % Ethanol gespült und anschließend luftgetrocknet, um am Ende je nach Pelletgröße in ca. 20 µl DEPC-behandeltes Wasser gelöst zu werden.

Zur Überprüfung, ob die RNA intakt ist, der DNase-Verdau alle Spuren von DNA beseitigt hat und zur RNA-Konzentrationsbestimmung wurde, wie im Kapitel 4.4.2.2.1 und 4.4.2.2.2 beschrieben, eine RNA-Elektrophorese sowie eine spektrometrische Messung der RNA-Lösung durchgeführt. Bis zur weiteren Verwendung der RNA wurde diese bei -70 °C eingefroren.

Nach erfolgreichem DNase-Verdau wurden direkt vor der Reversen Transkription (RT) die Proben zu 0,5 µg/ µl verdünnt.

#### **4.5.1.2 Erstrang-cDNA-Synthese durch Reverse Transkription (RT)**

Für die Synthese des cDNA-Erstranges wurde der First Strand cDNA Synthesis Kit (Novagen-Merck, Darmstadt) bzw. folgende Reagenzien daraus verwendet:

MMLV Reverse Transkriptase (200 U/µl);

First Strand Puffer (5x)

---

	Zusammensetzung: 250 mM Tris-HCL (pH 8,3 bei 25 °C),
	375 mM KCL,
	15 mM MgCl <sub>2</sub> ,
DDT	(100 mM),
Desoxynucleotide Mix (dNTP's)	10 mM von dATP, dGTP, dCTP, dTTP,
Random Hexamer-Primer	(10 µg),
Wasser	(Nukleasenfrei).

Alle Arbeitsschritte der RT wurden auf Eis durchgeführt. Zunächst wurden 3 µl der zuvor auf 0,5 µg/µl verdünnten RNA-Lösung in 200 µl-Mikroreaktionsgefäße vorgelegt und 9,5 µl des vorbereiteten 1. Premixes zugegeben.

1. Premix:

Wasser	8,5 µl
Random-Primer	<u>1,0 µl</u>
Gesamtvolumen:	9,5 µl

Nach Zugabe wurden die Proben kurz gevortext, abzentrifugiert und dann für 10 Min. im Thermocycler bei 70 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis gekühlt. Während der Inkubation konnte der 2. Premix hergestellt und danach den Proben zugegeben werden.

2. Premix:

First Strand Puffer	4,0 µl
DTT	2,0 µl
dNTP's	1,0 µl
Reverse Transkriptase	<u>0,5 µl</u>
Gesamtvolumen:	7,5 µl

Die Proben wurden erneut gevortext und abzentrifugiert, um danach die eigentliche cDNA-Synthese im Thermocycler ablaufen zu lassen: Eine Inkubation für 10 Min. bei 25 °C und 60 Min. bei 37 °C. Nach Beendigung der Transkription wurden die Proben bei -20 °C gelagert oder direkt in die RAP-PCR eingesetzt.

### 4.5.1.3 RAP-PCR

Die Komponenten für die RAP-PCR sind im Folgenden aufgeführt:

5x Green GoTaq® Reaktionspuffer	(Promega, USA),
GoTaq® DNA Polymerase	(5u/ µl)
Desoxynucleotide Mix (dNTP's)	(MBI Fermentas, St. Leon Roth)
Wasser	(Nuklasenfrei)
20 Primerpaare	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe)

Die Primer stammen als Kit von Carl Roth GmbH (Karlsruhe). Die Sequenzen sind im Anhang (Kapitel 11.2) aufgeführt. Für die Verwendung im Versuch wurden die lyophilisierten Primer mit nukleasefreiem Wasser auf eine Konzentration von 10 pmol/ µl verdünnt. Je PCR wurde ein Primerpaar getestet.

Alle Arbeitsschritte der RAPD-PCR wurden auf Eis durchgeführt. Dazu wurde als Erstes ein Premix in einem sterilen 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß für die passende Probenzahl zusammengemischt.

Der Premix setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

Puffer	10,0 µl
dNTP's	1,0 µl
Primer <i>forward</i>	3,0 µl
Primer <i>reverse</i>	3,0 µl
Wasser	17,7 µl
<u>GoTaq®</u>	<u>0,3 µl</u>
Gesamtvolumen:	35,0 µl

Anschließend wurden in 200 µl-Mikroreaktionsgefäße 5 µl der aus der RT erhaltenen cDNA vorgelegt und der Premix zugegeben. Die Proben wurden dann gevortext, abzentrifugiert, sofort in den vorprogrammierten Thermocycler gestellt und das Programm gestartet.

Die Programmierung des Thermocyclers für die RAP-PCR sah wie folgt aus:

1. Schritt: 95 °C 2 Min. (Beginn; Denaturierung);
2. Schritt: 95 °C 45 sec (Denaturierung);
3. Schritt: 37 °C 1 Min. (Annealing);
4. Schritt: 72 °C 45 sec (DNA-Synthese);  
Rücksprung zum 2. Schritt, 50 Zyklen;
5. Schritt 72 °C 5 Min. (Abschluss);
6. Schritt 4 °C halten

#### 4.5.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Darstellung der amplifizierten cDNA erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese. Dazu wurden folgende Komponenten verwendet:

10x TBE-Puffer	(Applichem, Darmstadt);
Agarose	(Biozym, Oldendorf);
Ethidiumbromid	(0,5 mg/ ml, Roth, Karlsruhe);
GeneRuler, 100 bp DNA Ladder (von 80 bis 1031 bp)	(1 mg DNA/ ml, MBI Fermentas, St. Leon Roth).

Für die Auftrennung der amplifizierten cDNA wurden 1,5%-ige Agarosegele verwendet. Das Ansetzen und Überschichten des Gels erfolgte mit 1x TBE-Puffer. Als Fluoreszenzfarbstoff diente Ethidiumbromid. Dieses wurde der flüssigen Agarose in einer Konzentration von 1 µl je 10 ml Agarose-Gel zugegeben.

Nach der Trocknung des Gels konnten die Proben ohne weitere Zugabe von Loading Dye aufgetragen werden, da im Reaktionspuffer bereits blauer und gelber Farbstoff zum Markieren der Banden und Lauffront enthalten war. Für die Elektrophorese wurde die Sub-Cell Model 182 Gelkammer (BioRad, München) verwendet, die eine Spannung von 120 V angelegt wurde. Die Laufzeit des Gels betrug 1 h 30 Min.

Danach wurde das Gel mit dem Geldokumentationssystem BioVision 3000 unter UV-Licht aufgenommen.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Untersuchungen zur Genexpression während der Entwicklung

Dass die Schilddrüsenhormone eine tragende Rolle in der Entwicklung auch bei den Fischen spielen, wurde bereits gezeigt (14). Die Rolle der Schilddrüsenrezeptoren ist bisher nur unzulänglich untersucht und scheint bei den verschiedenen Organismen sehr unterschiedlich zu sein. Zielsetzung dieser Studie war die Untersuchung der Expressionslevel der Schilddrüsenrezeptoren  $TR\alpha$  und  $TR\beta$  und des Schilddrüsenstimulierenden Hormons TSH als schilddrüsenrelevante Gene im Verlauf der Entwicklung vom Zebrafisch (*Danio rerio*).

Des Weiteren gibt es Vermutungen, dass andere endokrine Systeme, wie das Stresshormonsystem, nicht nur mit an der Entwicklung beteiligt sind, sondern auch mit dem Schilddrüsen system zusammenwirken. Daher wurden in dieser Arbeit ebenfalls einige Gene der Dopaminachse (Dopa-Decarboxylase (ddc), Tyrosin-Hydroxylase (th), Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase ( $d\beta h$ ) und das Cytochrom P450 1A1 (cyp) und ihre Expression im Verlauf der Entwicklung untersucht. Ziel war es, die Verläufe der Expressionen in den ersten drei Monaten der Entwicklung darzustellen, um Kenntnisse zur Entwicklung bzw. zur natürlichen Regulierung dieser Gene zu erhalten. Zusätzlich sollten die Daten ebenfalls Informationen und Interpretationsmöglichkeiten auf die Ergebnisse aus den Expositionsversuchen mit den Larven vom Zebrafisch liefern.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei unabhängige Entwicklungsreihen durchgeführt. In jedem untersuchten Entwicklungsabschnitt wurden Proben von 2 Stunden alten Embryonen im 64-Zellstadium (2 hpf) bis zu den 3 Monate alten Zebrafischen genommen. Die Aufstellung der Probennahmen sind in Kapitel 4.3.1 und der Tabelle 4.2 nachzulesen. Grafisch dargestellt sind in den folgenden Abbildungen zwei Entwicklungsreihen, eine bis zum Zeitpunkt 4 wpf (Abbildung A, 1. Probennahme) und eine bis zum Entwicklungszeitpunkt 14 wpf (Abbildung B, 2. Probennahme).

Jeder Punkt in den Grafiken entspricht einem Pool von Eiern, Larven oder Juvenilen in unterschiedlicher Anzahl, 200 bzw. 100 Embryonen zu Beginn, dann 100 Larven und absteigend bis zu 10 Juvenilen beim Messwert für 4 wpf. Genauere Angaben

dazu sind bei Material und Methoden im Kapitel 4.3.1 nachzulesen. Für die Messungen der Expressionslevel der mRNAs mittels semi-quantitativer real-time RT-PCR wurden spezifische Primer für die zu quantifizierenden Gene entwickelt.

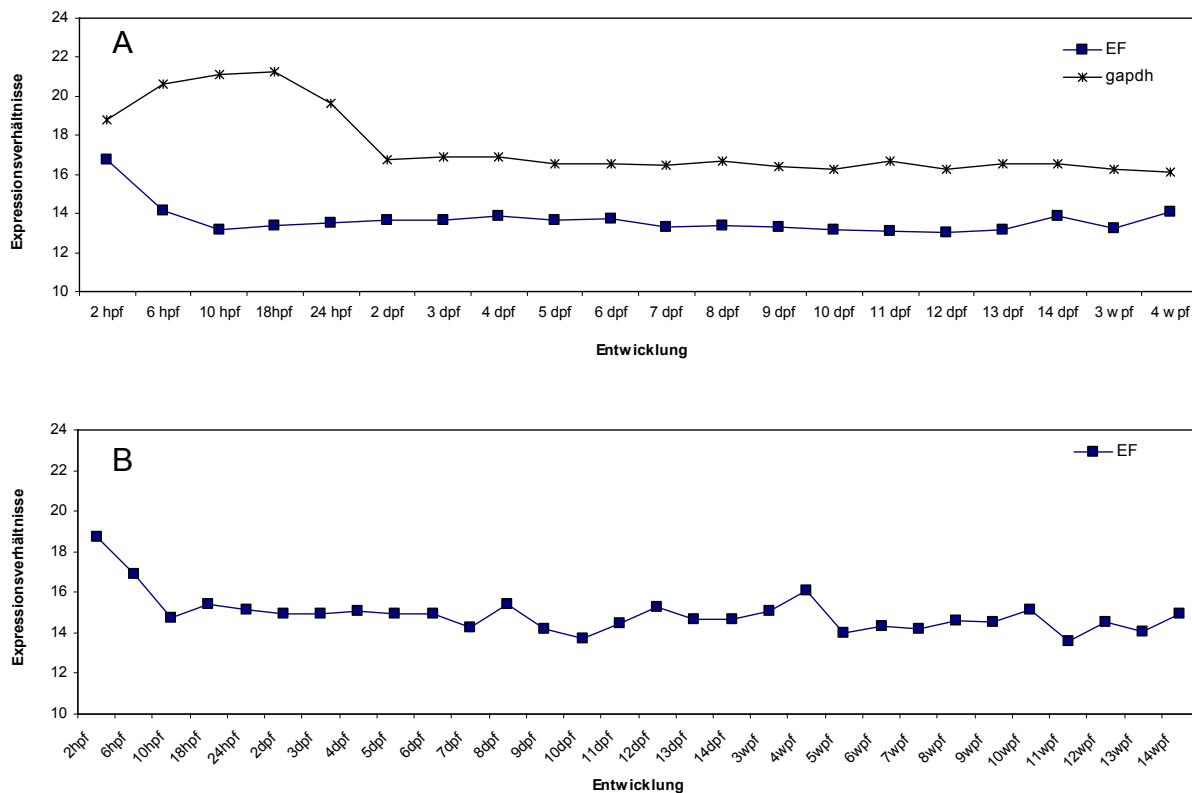
### **5.1.1 Untersuchung der Expression der mRNA's von TSH, TR $\beta$ und TR $\alpha$ während der Entwicklung mittels real-time RT-PCR**

Ziel dieser Untersuchungen war es, die Expressionslevel an TSH-, TR $\beta$ - und TR $\alpha$ -mRNA in den verschiedenen Entwicklungsabschnitten zu analysieren. Die Methode der real-time RT-PCR ist eine sehr sensitive Methode. Bevor jedoch diese Methode angewandt werden konnte, mussten in einem ersten Schritt geeignete Primer für die zu untersuchenden Gene entwickelt und die PCR-Bedingungen für die Amplifikationen optimiert werden.

Des Weiteren musste ein geeignetes *Houskeeping Gene* (HG) als interner Standard gefunden werden, welches als Maß für die eingesetzte mRNA-Menge diente und über den Vergleich mit der amplifizierten Ziel-DNA ungleiche mRNA-Fracht und/ oder mRNA-Abbau bei der Quantifizierung ausgleicht. Daher war es wichtig, dass das HG über den gesamten Entwicklungszeitraum stabil in seiner Exposition war. In der Studie von Liu et al. (121) wurde der Elongationsfaktor 1 $\alpha$  (EF 1 $\alpha$ ) als HG eingesetzt. Neben diesem Gen wurden im Rahmen dieser Untersuchungen noch *gapdh* (Glycerinaldehyde-3-phosphate Dehydrogenase) und  $\beta$ -Actin als potentielle HG untersucht. Von den drei Genen ist aus verschiedenen Arbeiten bekannt, dass sie geeignete HG sein können. Die Sequenzen dieser Gene sind im Anhang aufgelistet.

Für  $\beta$ -Actin-mRNA zeigten sich sehr unterschiedliche Expressionslevel (nicht grafisch dargestellt), so dass dieses Gen nicht als HG für die Untersuchungen zur Entwicklung in Betracht kam. Dagegen war die Expression für *gapdh* ab dem Zeitpunkt des Schlupfes (48 hpf) sehr stabil (Abbildung 5.1 A). Im Vergleich dazu zeigt sich in der embryonalen Phase jedoch ein deutlicher Anstieg der *gapdh*-mRNA Expression mit einem Maximum 10 / 18 hpf. Danach sinkt die Expression wieder und

bleibt ab 48 hpf stabil. Damit war *gapdh*-mRNA als HG zur Untersuchung über gesamten Entwicklungszeitraum ungeeignet.



**Abbildung 5.1:** Darstellung der Expressionen der *gapdh*- und *EF 1 $\alpha$* -mRNA während der Entwicklung vom Zebrafisch (*Danio rerio*) in 2 unabhängigen Probenahmen. **A:** 1. Probenahme, **B:** 2. Probenahme. *gapdh*: Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, *EF*: Elongationsfaktor 1 $\alpha$ , hpf: Stunden nach der Befruchtung, dpf: Tage nach der Befruchtung, wpf: Wochen nach der Befruchtung. Die Anzahl der Tiere je Probe sind im Kapitel 4.3.1 nachzulesen.

Die Expressionslevel von *EF 1 $\alpha$* -mRNA sind in zwei unabhängigen Probenahmen in Abbildung 5.1 A und B dargestellt. Es wird deutlich, dass über die gesamten untersuchten Entwicklungszeiträume die Expression der *EF 1 $\alpha$* -mRNA nur leichten Veränderungen unterlag. Bei beiden Grafiken lässt sich für die beiden ersten Probenahmezeitpunkte, 2 und 6 hpf, eine leichte Erhöhung der *EF 1 $\alpha$* -mRNA Expression gegenüber den restlichen Untersuchungszeiträumen erkennen. Im Vergleich ist jedoch das Expressionsniveau für den *EF* viel stabiler als für *gapdh* bzw.  $\beta$ -Actin, so das *EF 1 $\alpha$*  als HG für diese Untersuchungen ausgewählt wurde. Das für die durchgeführte semi-quantitative real-time RT-PCR als HG entwickelte



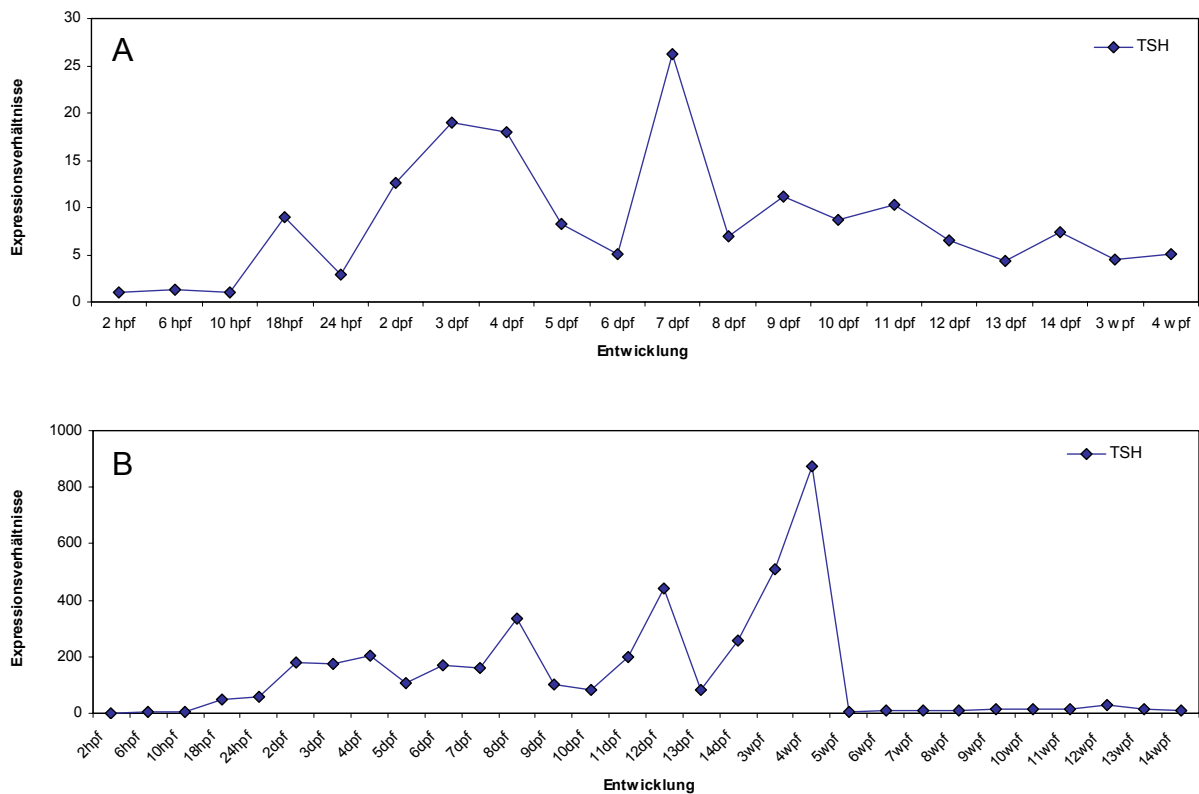
EF 1 $\alpha$  Primerpaar amplifizierte ein einzelnes PCR-Produkt von 295 bp. Die Sequenz der Primer stammten aus Liu et al. (121).

Für die Auswertung der Untersuchungen wurden die Schwankungen des Genexpressionslevels von EF 1 $\alpha$  in der ersten Probennahme für den Zeitpunkt 2 hpf und in der zweiten Probennahme für 2 und 6 hpf mathematisch auf ein Niveau, was einer stabilen Genexpression während der gesamten Entwicklung entsprechen würde, berechnet. Damit konnte EF 1 $\alpha$  als HG verwendet werden, ohne dass die Entwicklungsverläufe der Expression der zu untersuchenden Gene stark verändert wurden. Es zeigte sich vielmehr, dass Veränderungen im Genlevel durch diese Anpassung etwas verringert wurden (grafisch nicht dargestellt). Folglich konnte es nicht zu einer Überbewertung der Expressionslevel und damit zu einer potentiellen Fehlinterpretation der Ergebnisse kommen.

#### **5.1.1.1 Expression der mRNA des Schilddrüsenstimulierenden Hormons (TSH) während der Entwicklung**

Das für die semi-quantitative real-time RT-PCR dieser Studie entwickelte TSH Primerpaar amplifizierte ein einzelnes PCR-Produkt von 221 bp. Die Abbildung 5.2 A zeigt den Verlauf der Expression der TSH-mRNA für die erste Probennahme. Zu Beginn der Entwicklung, bis zum Ende der Gastrulastadien bei 10 hpf, gab es keine Veränderungen im Expressionslevel der TSH-mRNA. Danach kam es zu einem Anstieg mit zwei Maxima bei 18 hpf und 3 dpf. Nach diesem zweiten Anstieg nahm die Expression wieder ab, um sich auf ein Niveau etwa 10-fach höher als zum Anfang der Entwicklung einzupendeln. Eine Ausnahme bildete das Alter von 7 dpf, wo nochmals ein deutliches Maximum in der Expression festzustellen war.

Etwas anders verhielt es sich bei den Ergebnissen zur zweiten Probennahme, die in der Abbildung 5.2 B zu sehen sind. Nach einem ähnlichen Beginn mit Anstieg des Expressionslevels zum Zeitpunkt 18 hpf fehlten jedoch hier die deutlichen Maxima bei 18 hpf und 3 dpf. Dafür zeigten sich Maxima in der Expression zu den Zeitpunkten 8 dpf, 12 dpf und 4 wpf. Nach dem letzten Maxima fiel dann die Expression schlagartig auf das Niveau wie zum Beginn der Entwicklung zurück.

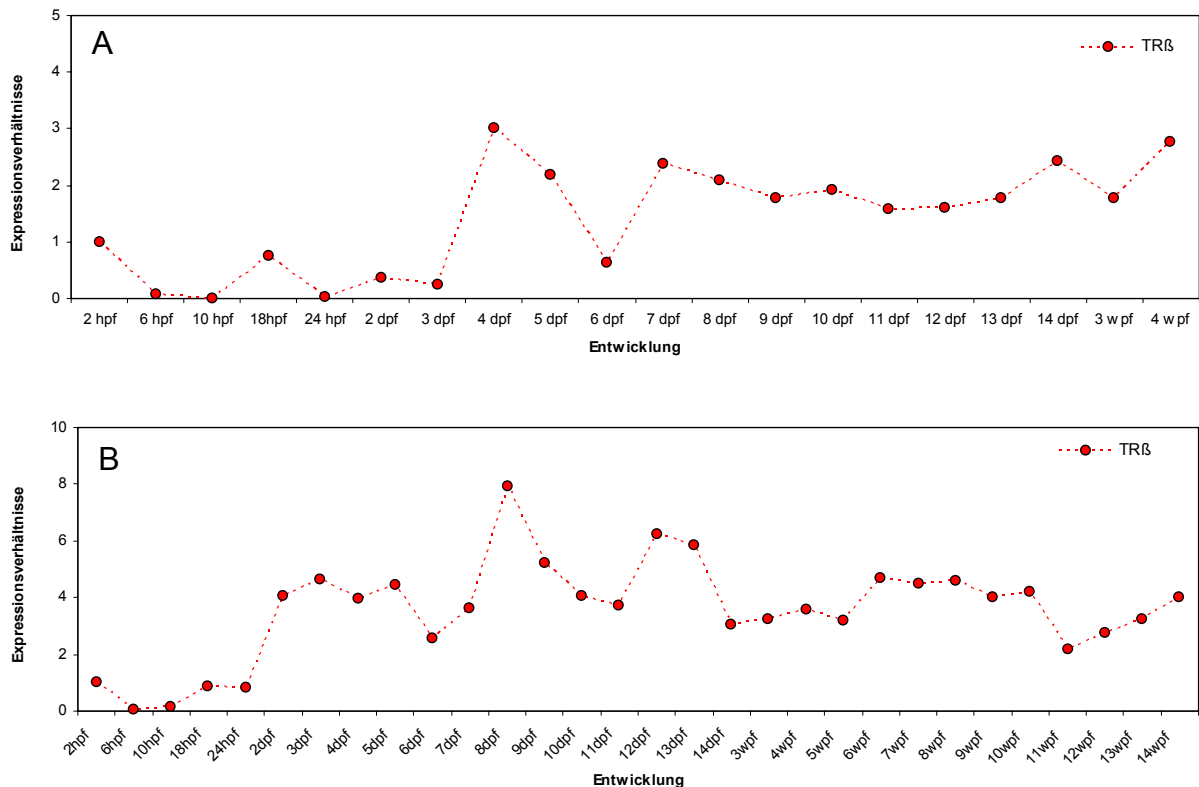


**Abbildung 5.2:** Darstellung der Expression der TSH-mRNA während der Entwicklung vom Zebrafisch (*Danio rerio*) in 2 unabhängigen Probenahmen. **A:** 1. Probenahme, **B:** 2. Probenahme. TSH: Schilddrüsenstimulierendes Hormon, hpf: Stunden nach der Befruchtung, dpf: Tage nach der Befruchtung, wpf: Wochen nach der Befruchtung. Die Anzahl der Tiere je Probe sind im Kapitel 4.3.1 nachzulesen.

### 5.1.1.2 Expression der mRNA des Schilddrüsenrezeptors $\beta$ (TR $\beta$ ) während der Entwicklung

Das TR $\beta$  Primerpaar, welches für die semi-quantitative real-time RT-PCR dieser Studie entwickelt wurde, amplifizierte ein einzelnes PCR-Produkt von 457 bp. Die Expressionen für die TR $\beta$ -mRNA im Rahmen der Zebrafiscentwicklung sind in Abbildung 5.3 A und B zu sehen. Es zeigt sich in beiden Abbildungen zum Beginn der Entwicklung eine deutlich höhere Expression an TR $\beta$ -mRNA in den sich entwickelnden Embryonen im Vergleich zu den ersten direkt nachfolgenden Entwicklungsstufen.

Bei den Ergebnissen zur ersten Probenahme (Abbildung 5.3 A) kam es bis auf eine kleine Spitze bei 18 hpf erst zu einem Zeitpunkt von 3 dpf zu einem deutlichen Anstieg in der Expression der TR $\beta$ -mRNA auf ca. das 3-fache des Wertes bei 2 hpf. Nach diesem Anstieg mit dem Maximum bei 4 dpf sank zunächst die Expression bis zum Alter von 6 dpf, um sich dann auf ein in etwa gleich bleibendes Niveau, ca. das 2,5-fache über dem des Ausgangsniveaus, zu stabilisieren.



**Abbildung 5.3:** Darstellung der Expression der TR $\beta$ -mRNA während der Entwicklung vom Zebrafisch (*Danio rerio*) in 2 unabhängigen Probenahmen. **A:** 1. Probenahme, **B:** 2. Probenahme. TR $\beta$ : Schilddrüsenrezeptor  $\beta$ , hpf: Stunden nach der Befruchtung, dpf: Tage nach der Befruchtung, wpf: Wochen nach der Befruchtung. Die Anzahl der Tiere je Probe sind im Kapitel 4.3.1 nachzulesen.

In der Abbildung 5.3 B, welche die Ergebnisse der zweiten Probenahme zeigt, wird deutlich, dass der Anstieg in der TR $\beta$ -mRNA Expression bereits ab 24 hpf beginnt. Des Weiteren lässt sich das Maximum bei 18 hpf nicht so deutlich ablesen wie in der ersten Probenahme. In Abschnitt zwischen 2 und 5 dpf gab es einen relativ konstanten Level der Genexpression. Die Expression zu dieser Phase der Entwicklung war etwa 4- bis 5-mal höher als zu Beginn der Entwicklung. Ähnlich wie

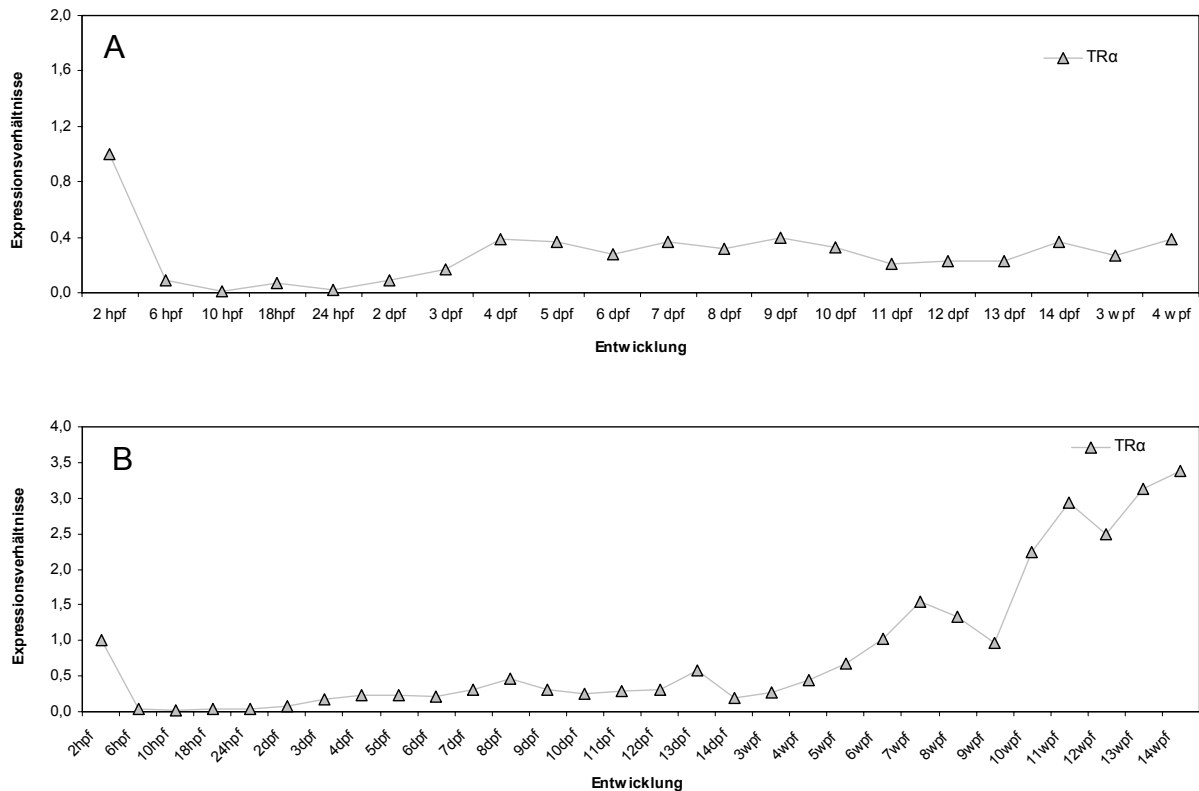
bei der ersten Probennahme kam es auch hier bei 6 dpf zu einem Rückgang im Expressionslevel, nur dass dieser deutlich schwächer als bei der ersten Probennahme ausfiel. Im Vergleich zur ersten Probennahme kam es zu zwei weiteren Maxima in der Expression bei 8 und 12 dpf. Danach pendelte sich der Level der TR $\beta$ -mRNA Expression ungefähr auf einen Wert 4- bis 5-mal höher als zu Beginn der Entwicklung ein, ähnlich wie beim ersten konstanten Plateaubereich.

### 5.1.1.3 Expression der mRNA des Schilddrüsenrezeptors $\alpha$ (TR $\alpha$ ) während der Entwicklung

Für die Amplifizierung der TR $\alpha$ -mRNA wurden Primer von Liu et al. (121) verwendet. Sie erzeugten ein PCR-Produkt von 380 bp. Die Abbildung 5.4 A und B zeigen die Ergebnisse zur Expression der TR $\alpha$ -mRNA für zwei verschiedene Probennahmen im Verlauf der Entwicklung vom Zebrafisch.

Für beide Probennahmen zeigte sich, soweit vergleichbar, ein sehr ähnlicher Kurvenverlauf. In beiden Abbildungen wurde der relativ hohe Level an TR $\alpha$ -mRNA im 64-cell Stadium (2 hpf) deutlich. Nach diesem Stadium sank die Expression auf ein Niveau drastisch unter dem des ersten Entwicklungsabschnittes („*cleavage period*“) und hielt sich dort konstant bis zum Alter von 2 dpf. Danach stieg die Expression an. Dieser entwickelte sich jedoch sehr langsam und zum Entwicklungszeitpunkt von 4 wpf, also im Alter von 4 Wochen, befand sich der Level an TR $\alpha$ -mRNA auf einem Stand von ungefähr der Hälfte wie nach 2 h Entwicklung.

Ab einem Alter von 4 Wochen erhöhte sich die Expression deutlich stärker (Abbildung 5.4 B) und übertraf mit 6 Wochen den Level an TR $\alpha$ -mRNA zu Beginn. Danach erhöhte sich die Expression weiter, um am Ende der hier durchgeführten Studie auf das 3,5-fache des Ausgangsniveaus gestiegen zu sein. Eine Ausnahme bildete ein kleiner Rückgang zum Zeitpunkt 9 wpf.



**Abbildung 5.4:** Darstellung der Expression der TR $\alpha$ -mRNA während der Entwicklung vom Zebrafisch (*Danio rerio*) in 2 unabhängigen Probenahmen. **A:** 1. Probenahme, **B:** 2. Probenahme. TR $\alpha$ : Schilddrüsenrezeptor  $\alpha$ , hpf: Stunden nach der Befruchtung, dpf: Tage nach der Befruchtung, wpf: Wochen nach der Befruchtung. Die Anzahl der Tiere je Probe sind im Kapitel 4.3.1 nachzulesen.

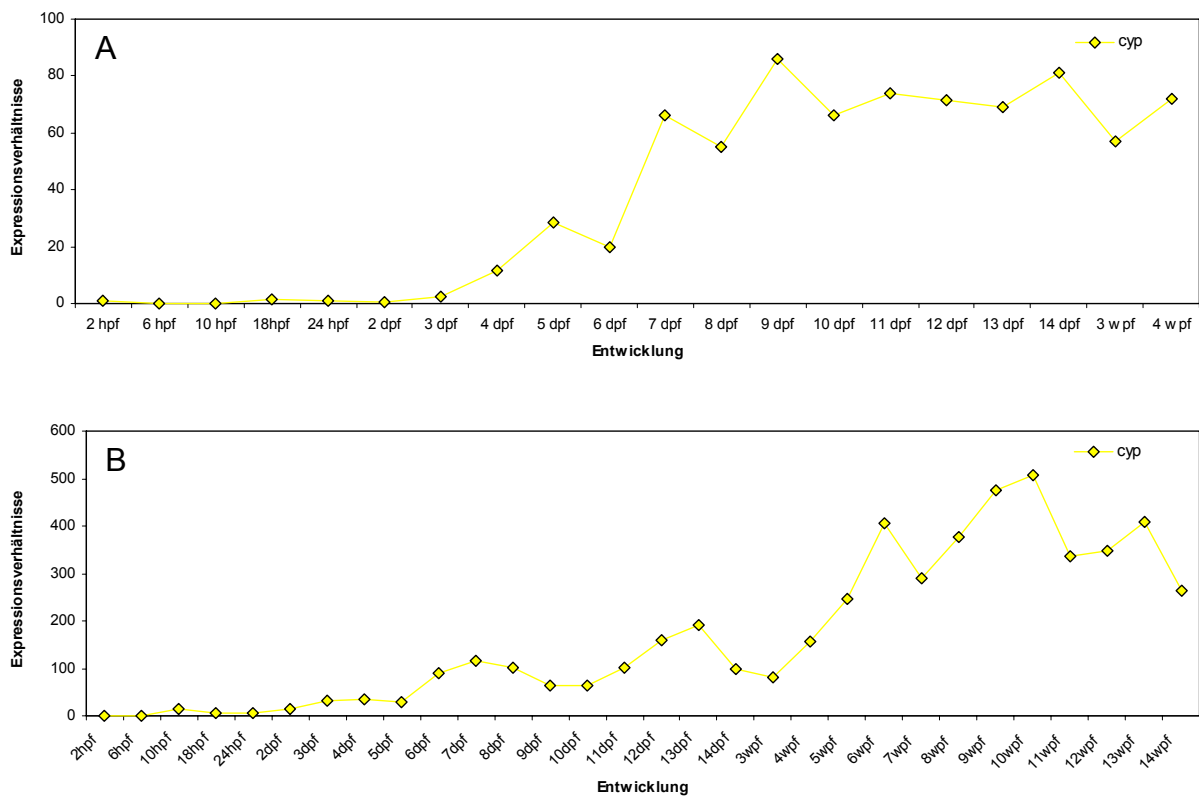
### 5.1.2 Untersuchung der Expression der mRNA's von *cyp*, *ddc*, *th* und *d $\beta$ h* während der Entwicklung mittels real-time RT-PCR

Ziel dieser Untersuchungen war es, die Verläufe der Expressionen der Gene *ddc*, *th* und *d $\beta$ h*, der Stresshormonachse, sowie das *cyp* mittels real-time RT-PCR zu untersuchen. Außer für *cyp* gab es für die Untersuchungen nur eine bearbeitete Probennehmeserie, nämlich die über 4 Wochen. Für den Einsatz in diesen real-time RT-PCR's wurde dasselbe Probenmaterial (total RNA) verwendet, das bei den Genen zur Schilddrüsenachse bei der ersten Probenahme zum Einsatz kam.

Alle Primer für die semi-quantitative RT-PCR's wurden mit Hilfe des Softwareprogramms Primer3 entwickelt.

### 5.1.2.1 Expression der mRNA des Cytochrom P450 1A1(cyp) während der Entwicklung

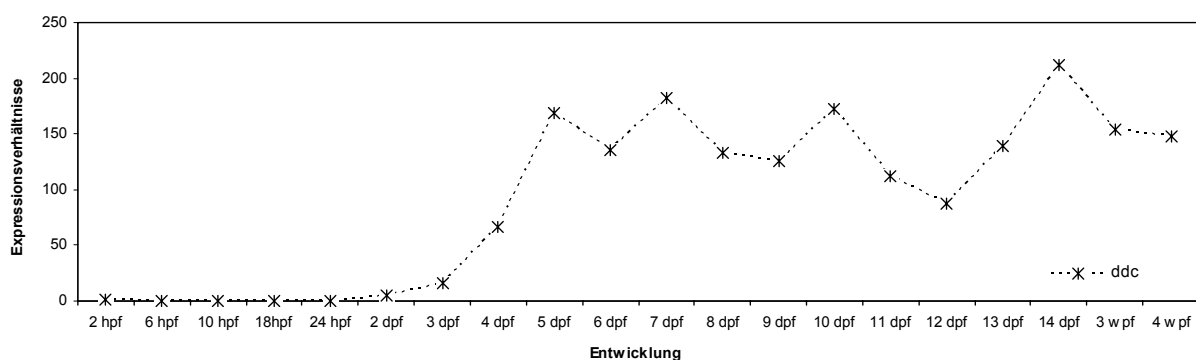
Das cyp Primerpaar amplifizierte ein einzelnes RT-PCR Produkt von 217 bp. Die Ergebnisse für die Expression der cyp-mRNA für die zwei Probenahmen sind in Abbildung 5.5 zu sehen. Für die erste Probenahme in Abbildung 5.5 A lässt sich in der gesamten embryonalen Phase der Entwicklung keine Veränderung im Expressionslevel erkennen. Dann, mit einem Alter von 3 dpf, also kurz nach dem Schlupf, steigt die Expression, abgesehen von kleinen Schwankungen, innerhalb von einer Woche auf ein etwa 80-fach höheres Level als zu Beginn der Entwicklung und verbleibt bis zum Ende der Untersuchungsreihe auf diesem Niveau.



**Abbildung 5.5:** Darstellung der Expression der cyp-mRNA während der Entwicklung vom Zebrafisch (*Danio rerio*) in 2 unabhängigen Probenahmen. **A:** 1. Probenahme, **B:** 2. Probenahme. cyp: Cytochrom P450 1A1, hpf: Stunden nach der Befruchtung, dpf: Tage nach der Befruchtung, w pf: Wochen nach der Befruchtung. Die Anzahl der Tiere je Probe sind im Kapitel 4.3.1 nachzulesen.

Für die zweite Probennahme (Abbildung 5.5 B) zeigte sich zu Beginn der Entwicklung ein recht ähnliches Bild, wobei die Phase der sehr niedrigen Expression im Gegensatz zur ersten Probennahme etwa bis zum Tag 2 der Entwicklung (2 dpf), also genau bis zum beginnenden Schlupf der Larven, andauerte. Danach folgte ebenfalls ein Anstieg in der Expression. Im Vergleich zur ersten Probennahme ließ sich bei den Ergebnissen ein stufigerer Anstieg feststellen, mit Stufen nach 5 dpf, 10 dpf und 3 wpf. Nach 4 Wochen war die Expression an cyp-mRNA im Vergleich zur ersten Probennahme etwa doppelt so hoch und stieg danach noch einmal stark mit einigen Schwankungen auf etwa das Doppelte an.

### 5.1.2.2 Expression der mRNA der Dopa decarboxylase (ddc) während der Entwicklung



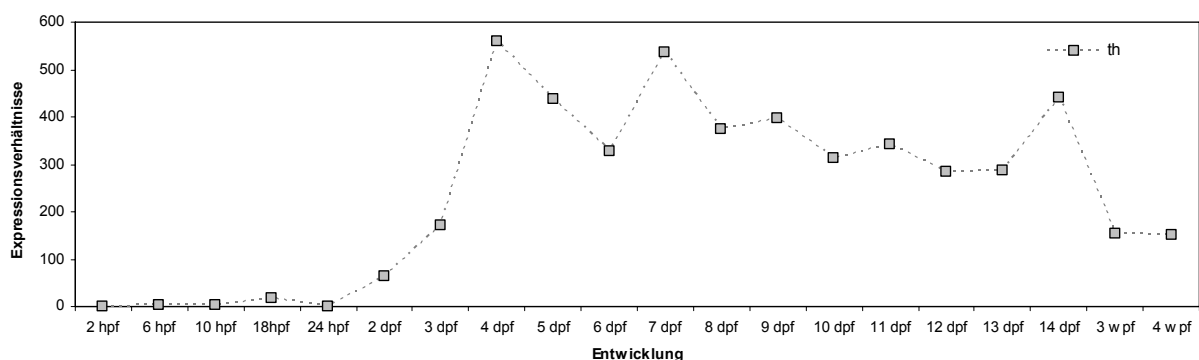
**Abbildung 5.6:** Darstellung der Expression der ddc-mRNA während der Entwicklung vom Zebrafisch (*Danio rerio*). ddc: Dopa decarboxylase, hpf: Stunden nach der Befruchtung, dpf: Tage nach der Befruchtung, wpf: Wochen nach der Befruchtung. Die Anzahl der Tiere je Probe sind im Kapitel 4.3.1 nachzulesen.

Das für die durchgeführte semi-quantitative real-time RT-PCR entwickelte ddc Primerpaar amplifizierte ein einzelnes PCR-Produkt von 173 bp. Der Verlauf des Graphen in der Abbildung 5.6, der die Expressionsergebnisse für die ddc-mRNA zeigt, unterscheidet sich nicht wesentlich von dem für die cyp-mRNA der ersten Probennahme. Zu Beginn der Entwicklung war die Expression der mRNA kaum induziert und auf einem sehr niedrigen Niveau. Ab einem Alter 2 dpf wurde die Expression deutlich hoch reguliert, so dass der Expressionslevel an ddc-mRNA

anstieg. Dieser Anstieg erfolgte bis zu einem Alter von 5 dpf. Danach regelte sich die Expression trotz einiger Schwankungen auf ein Niveau ein, das etwa 150-fach über dem Ausgangsniveau lag. Es sei angemerkt, dass es am Ende des hier untersuchten Zeitraums, zum Entwicklungszeitpunkt 14 dpf, nochmals zu einem Maximum in der Expression gekommen ist.

### 5.1.2.3 Expression der mRNA der Tyrosin-Hydroxylase (th) während der Entwicklung

Das für die durchgeführte semi-quantitative real-time RT-PCR entwickelte th Primerpaar amplifizierte ein einzelnes PCR-Produkt von 223 bp. Die Abbildung 5.7 zeigt die Ergebnisse zur Expression der th-mRNA. Ebenfalls wie bei den Expressionsergebnissen für die cyp- und ddc-mRNA lässt sich zu Beginn der Entwicklung nur ein sehr geringer Expressionslevel ablesen. Im Vergleich zur Expression der ddc-mRNA erfolgt bereits nach einer Entwicklungszeit von 24 hpf ein deutlicher Anstieg in der Expression. Mit 4 dpf war dann bereits das Maximum der Expression erreicht. Im weiteren Entwicklungsverlauf gab es einige Schwankungen des Expressionslevels, jedoch war insgesamt eine wieder abnehmende Tendenz zu erkennen. Im gesamten Entwicklungsverlauf ließen sich drei Spitzen der Expression aufzeigen, zu den Zeitpunkten 4, 7 und 14 dpf.



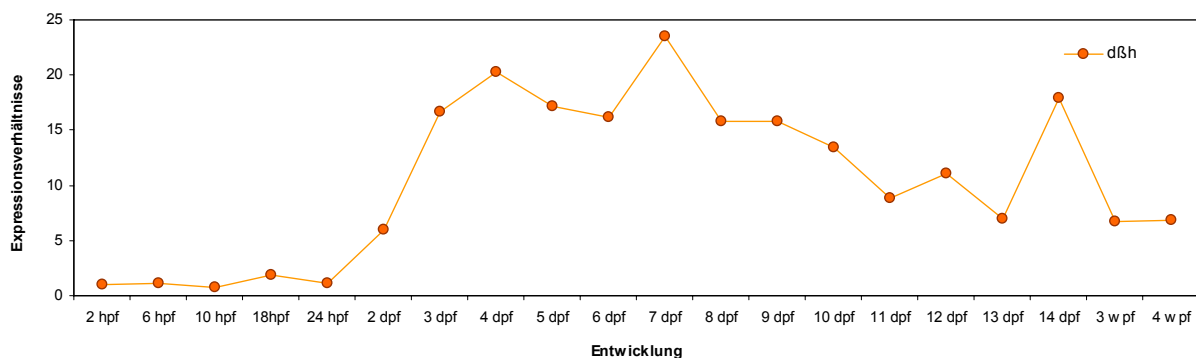
**Abbildung 5.7:** Darstellung der Expression von th-mRNA während der Entwicklung vom Zebrafisch (*Danio rerio*). th: Tyrosin-Hydroxylase, hpf: Stunden nach der Befruchtung, dpf: Tage nach der Befruchtung, wpf: Wochen nach der Befruchtung. Die Anzahl der Tiere je Probe sind im Kapitel 4.3.1 nachzulesen.



### 5.1.2.4 Expression der mRNA der Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase (d $\beta$ h) während der Entwicklung

Das für die semi-quantitative real-time RT-PCR entwickelte d $\beta$ h Primerpaar amplifizierte ein einzelnes PCR-Produkt von 180 bp. Die Ergebnisse für die Expression der d $\beta$ h-mRNA sind in Abbildung 5.8 zu sehen. Wieder zeigt sich ein ähnlicher Verlauf der Expression für die Entwicklung wie bei th.

Nach 24 hpf erfolgte ein Anstieg in der Expression, nachdem zu Beginn der Entwicklung der Level sehr niedrig war. Mit 4 dpf war der erste Höhepunkt in der Expression erreicht. Danach folgte wie bei th ein Rückgang. Zwei Ausnahmen bildeten in ähnlicher Weise wie zuvor bei der th-mRNA die Expressionsmaxima bei 7 und 14 dpf.



**Abbildung 5.8:** Darstellung der Expression von d $\beta$ h-mRNA während der Entwicklung vom Zebrafisch (*Danio rerio*). d $\beta$ h: Dopamine- $\beta$ -Hydroxylase, hpf: Stunden nach der Befruchtung, dpf: Tage nach der Befruchtung, w pf: Wochen nach der Befruchtung. Die Anzahl der Tiere je Probe sind im Kapitel 4.3.1 nachzulesen.

## 5.2 Untersuchungen mit adulten Zebrafischen

Es ist bekannt, dass bei allen Vertebraten die Schilddrüse nicht nur bei der Entwicklung eine Rolle spielt, sondern ebenfalls im adulten Organismus wichtige Funktionen übernimmt. Die Bedeutung der Schilddrüsenhormone im adulten Zebrafisch ist bisher wenig untersucht. Ebenfalls gibt es nur wenige Studien, die sich

mit dem Einfluss von ED auf adulte Fische und Zebrafische im Speziellen beschäftigen.

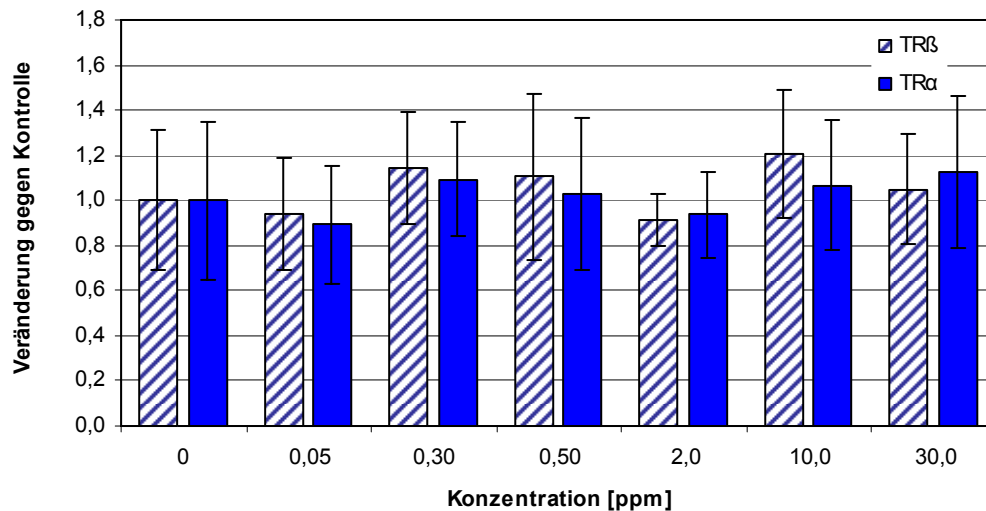
Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der schilddrüsenwirksamen Substanz Methimazol auf den adulten Zebrafisch zu untersuchen. In diesem Zusammenhang sollte dabei auch die Eignung des Zebrafisches als Modellorganismus für die ED-Forschung überprüft werden, um so möglicherweise eine Methode zur Untersuchung des Einflusses von ED zu etablieren.

Dazu wurden verschiedene Untersuchungen durchgeführt. In einem ersten Teilversuch wurden die Expressionen der TR $\alpha$ - und TR $\beta$ -mRNA nach einer 6-wöchigen Exposition mit Methimazol mittels RT-PCR analysiert. Des Weiteren wurde mittels HPLC und in Zusammenarbeit mit Dr. L. Hollosi der Gehalt an Methimazol nach *in vivo* Behandlungen von unterschiedlicher Dauer im Zebrafisch gemessen. Der dritte Teil dieser Studie umfasste histologische Untersuchung der Schilddrüsenfollikel, ebenfalls nach einer Behandlung mit Methimazol.

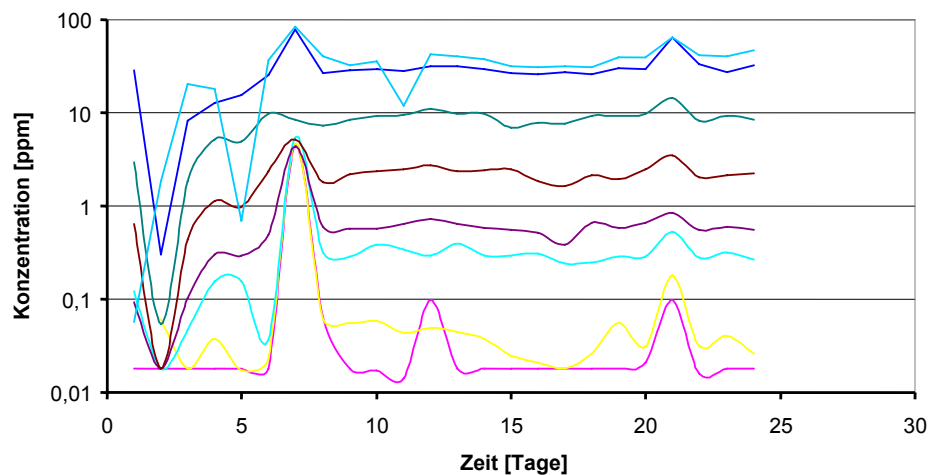
### **5.2.1 Nachweis der Genexpression von TR $\alpha$ und TR $\beta$ nach einer Exposition mit Methimazol mittels RT-PCR**

Im ersten Teilversuch zu den Untersuchungen von adulten Zebrafischen wurden die Level der Expressionen von TR $\alpha$ - und TR $\beta$ -mRNA von Ganzkörperhomogenaten des Zebrafisches mittels RT-PCR analysiert. Der Versuch umfasste eine *in vivo* Exposition mit Methimazol über einen Zeitraum von 6 Wochen, die von Dr. L. Hollosi und Dr. R. Simon durchgeführt wurde. Dabei handelte es sich um eine Exposition mittels Durchflussanlage mit kontinuierlichem Wasser- und Substanztausch.

Die für die durchgeführte semi-quantitative RT-PCR entwickelten TR $\alpha$  und TR $\beta$  Primerpaare amplifizierten je ein einzelnes PCR-Produkt von 382 bp bzw. 454 bp. In Abbildung 5.9 sind die Ergebnisse der Analyse der TR $\alpha$ - und TR $\beta$ -mRNA zu sehen. Bei den Untersuchungen mit den adulten Fischen zeigten sich bei den Behandlungen im Vergleich zu den Kontrollen keine signifikanten Veränderungen in den mRNA-Expressionen für TR $\alpha$  und TR $\beta$ .



**Abbildung 5.9:** Darstellung der Effekte auf die Expression von TR $\alpha$ - und TR $\beta$ -mRNA nach einer *in vivo* Behandlung von adulten Zebrafisch (*Danio rerio*) Weibchen. Die Expositionsdauer betrug 6 Wochen. Jeder Balken repräsentiert die Mittelwerte und Standardabweichungen der RT-PCR Ergebnisse. Die dargestellten Werte zeigen die mittels des internen Standards EF 1 $\alpha$  normalisierten Messwerte, wobei diese im Vergleich zu den Kontrollwerten aufgetragen wurden (n=5; EF 1 $\alpha$ : Elongationsfaktor 1 $\alpha$ , n: Anzahl, TR $\alpha$ : Schilddrüsenrezeptor  $\alpha$ , TR $\beta$ : Schilddrüsenrezeptor  $\beta$ ).



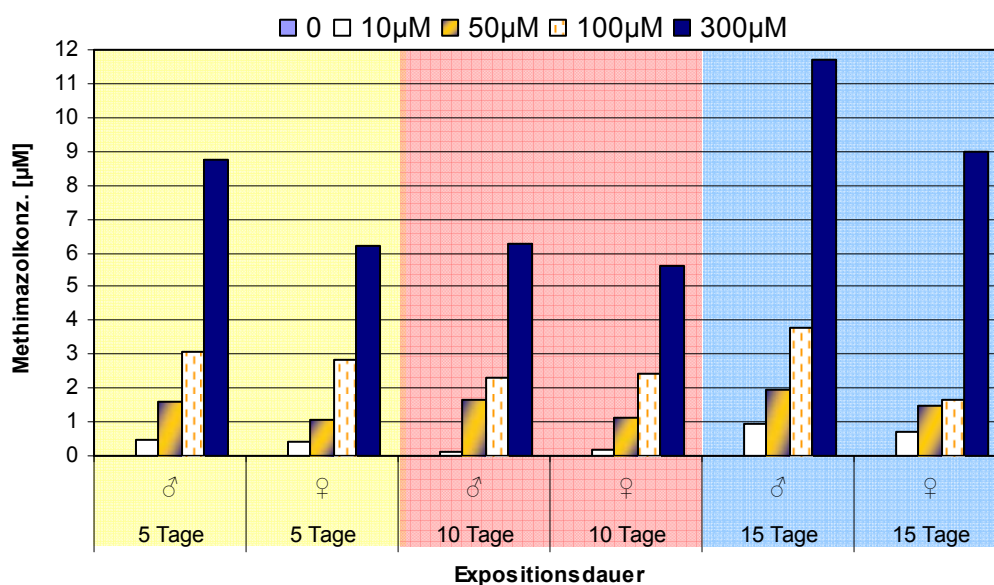
**Abbildung 5.10:** Aufzeichnung des Verlaufes der Methimazolkonzentration in den Versuchsbecken über den Versuchszeitraum; durchgeführt von R. Simon und L. Hollosi.

Zur Kontrolle der Konzentration an Methimazol im Testmedium wurde während des Versuches in regelmäßiger Folge die Konzentration im Versuchsmedium gemessen (Abbildung 5.10). Dabei zeigte sich, dass die Konzentrationen zu Beginn des

Versuches stark schwankten, bevor sie sich auf die geforderte Sollkonzentration einstellen.

### 5.2.2 Bestimmung der Methimazolkonzentrationen im Ganzkörperhomogenat mittels HPLC

Eine weitere wichtige Fragestellung in diesem Zusammenhang war, ob das Methimazol in den Tieren überhaupt aufgenommen bzw. angereichert wurde. Dazu wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Laszlo Hollosi und mittels HPLC die Konzentrationen an Methimazol nach Expositionen von 5, 10 und 15 Tagen in Ganzkörperhomogenaten von männlichen und weiblichen Zebrafischen gemessen.

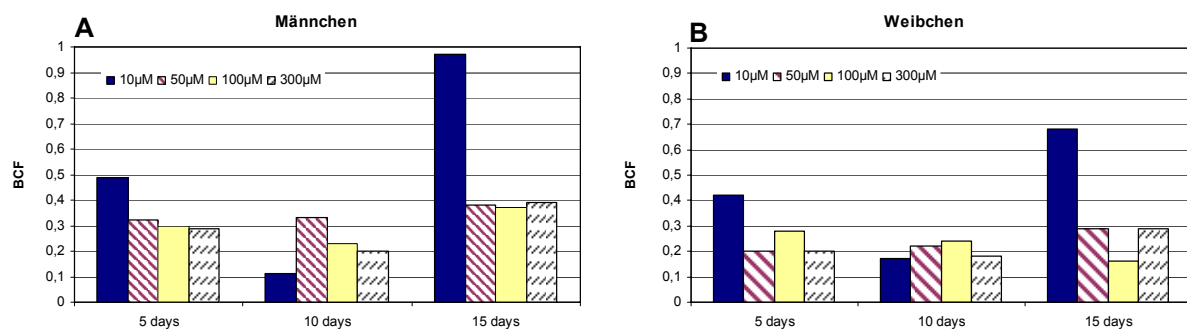


**Abbildung 5.11:** Darstellung der Methimazolkonzentrationen in Ganzkörperhomogenaten von männlichen (♂) und weiblichen (♀) adulten Zebrafischen (*Danio rerio*) nach einer 5, 10 und 15-tägigen *in vivo* Behandlung mit Methimazol in den Konzentrationen 0 (Kontrolle), 10, 50, 100 und 300 µM. Jeder Balken repräsentiert Mittelwerte der HPLC Bestimmungen aus 5 unabhängigen Messwerten. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte in Zusammenarbeit mit L. Hollosi (80).

Die Exposition der Fische erfolgte im Rahmen der ersten histopathologischen Untersuchungen zu den Effekten von Methimazol auf die Schilddrüse (Kapitel 4.3.2.2). Zusätzlich wurden über den gesamten Versuchszeitraum die

Konzentration an Methimazol im Testmedium gemessen. Es zeigte sich, dass alle Werte in den Testmedien über den gesamten Versuchszeitraum ohne wesentliche Schwankungen den Soll-Werten entsprachen (grafisch nicht dargestellt).

Die Ergebnisse der HPLC Analysen für die Methimazolkonzentrationen im Fischhomogenat sind in Abbildung 5.11 dargestellt. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert aus fünf unabhängig voneinander gemessenen Proben. In der Abbildung wird deutlich, dass unterschiedliche Konzentrationen an Methimazol bei allen Expositionenzeiten zu unterschiedlichen Konzentrationen der Substanz im Fisch führten und dass diese proportional zu den gemessenen Konzentrationen im Wasser waren. Signifikante Unterschiede zwischen Weibchen und Männchen konnten jedoch nicht festgestellt werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass längere Expositionenzeiten die Menge an Methimazol im Fisch nicht signifikant erhöhten. Aus der Abbildung wird ebenfalls deutlich, dass sich nur ein relativ geringer Anteil der eingesetzten Expositionskonzentrationen bei den Messungen wiederfinden lässt.



**Abbildung 5.12:** Darstellung der ermittelten Biokonzentrationsfaktoren (BCF) von männlichen (A) und weiblichen (B) adulten Zebrafischen (*Danio rerio*) nach einer 5, 10 und 15-tägigen *in vivo* Behandlung mit Methimazol in den Konzentrationen 0 (Kontrolle), 10, 50, 100, 300 und 900 µM. Jeder Balken repräsentiert einen BCF und somit das Verhältnis von Methimazol im Fisch (Mittelwerte der HPLC-Ergebnisse aus 5 unabhängigen Messwerten) zur gemessenen Konzentration an Methimazol im Wasser (80).

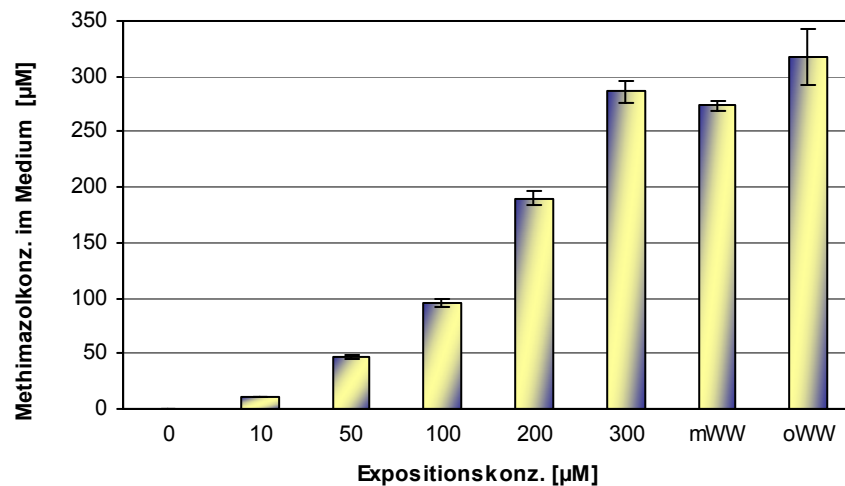
Aus den HPLC Messungen wurde anschließend der BCF (Biokonzentrationsfaktor) kalkuliert. Dieser Faktor gibt das Verhältnis der gemessenen Menge an Testsubstanz im Fisch zur Konzentration im Testmedium an (80). Die Abbildung 5.12 zeigt die Ergebnisse der Analysen des BCF.

### 5.2.3 Bestimmung der Methimazolkonzentrationen im Expositionsmedium mittels HPLC

Damit es nicht zu Fehlinterpretationen kommen konnte, war es wichtig, für die Versuche zur Methimazolbestimmung im Ganzkörperhomogenat, die Versuche zur Expression mit den juvenilen Zebrafischen und für die histologischen Untersuchungen der Schilddrüse (Ergebnisse Siehe Kapitel 5.2.4 und 5.3.2), die Expositionsmedien auf ihre tatsächliche Konzentration an Methimazol hin zu überprüfen. Daher wurde in Zusammenarbeit mit Dr. L. Hollosi in den verschiedenen Versuchen stets die Konzentration an Methimazol im Versuchswasser mittels HPLC gemessen.

Abbildung 5.13 stellt die gemittelten Ergebnisse mit Standardabweichung aus den HPLC Analysen eines Versuches mit juvenilen Zebrafischen dar. Diese hier dargestellten Ergebnisse stehen beispielhaft für die anderen Messungen, die alle zusammen sehr ähnliche Werte zeigten und daher grafisch nicht dargestellt wurden. Für alle Konzentrationen zeigt sich, dass die gemessenen Konzentrationen nur leicht unter den Soll-Konzentrationen lagen. Auch die Schwankungen der einzelnen Messwerte und damit die Standardabweichung waren sehr gering.

In der Abbildung 5.13 sind zusätzlich die Ergebnisse zur Messung der Stabilität an Methimazol unter Versuchsbedingungen dargestellt. Dafür wurden zwei Bechergläser wie im Versuch mit den juvenilen Larven, mit 500 ml Embryomedium und 300  $\mu\text{M}$  Methimazol gefüllt. Im Unterschied zu den anderen Versuchsansätzen wurden in diesem Teilversuch keine Fischlarven eingebracht wurden. In einem der beiden Becken wurde dann wie im richtigen Versuch ein 3-mal wöchentlicher Wasserwechsel durchgeführt. Das andere Becherglas blieb unverändert, also ohne Wasserwechsel. Die Konzentration im Becherglas mit Wasserwechsel war etwas niedriger als die Soll-Konzentration und auch niedriger als die Konzentration, die im Versuch mit Fischbesatz war. Im Vergleich dazu war die Konzentration, bei der kein Wasserwechsel stattgefunden hatte, mit 320  $\mu\text{M}$  geringfügig höher als die eigentliche Soll-Konzentration von 300  $\mu\text{M}$ .



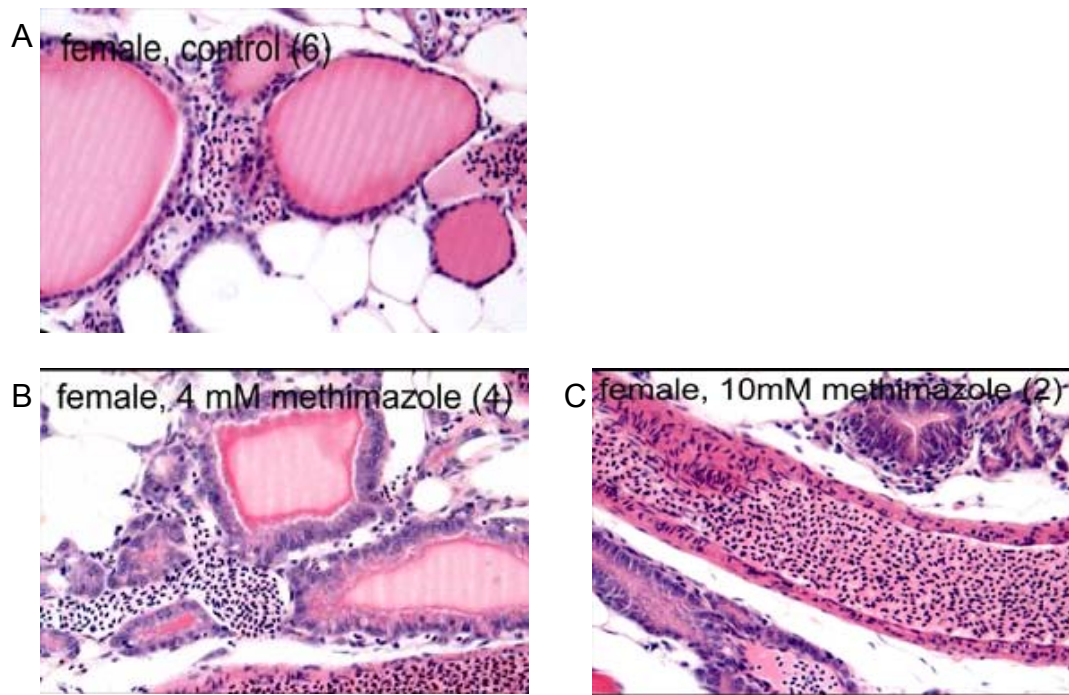
**Abbildung 5.13:** Darstellung der Ergebnisse zur Bestimmung der tatsächlichen Methimazolkonzentration im Expositionsmedium, sowie Test der Stabilität von Methimazol unter Versuchsbedingungen. Die Balken zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen der HPLC-Ergebnisse über einen Versuchszeitraum von 7 Tagen. Aufbereitung und Messung der Wasserproben erfolgte in Zusammenarbeit mit L. Hollosi (n=8; mWW: mit Wasserwechsel und ohne Fische, n: Anzahl, oWW: ohne Wasserwechsel und ohne Fischlarven).

#### 5.2.4 Histologische Untersuchung des Einflusses von Methimazol auf die Schilddrüsenfollikel in adulten Zebrafischen

Bei Untersuchungen von Wester et. al wurden Tests mit der Substanz Propylthiouracil (PTU) durchgeführt, welche ebenfalls wie Methimazol die Synthese von Schilddrüsenhormonen hemmt und zur Aktivierung der Follikel-epithelzellen, sowie zur teilweisen bis völligen Entleerung des Kolloidraumes führte (197). In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluß von Methimazol in Abhängigkeit von der Expositionszeit und der Konzentration untersucht werden. Die histologische Untersuchung der Proben erfolgte in Zusammenarbeit mit Leo van der Ven (rivm, NL).

In einem ersten Versuch mit identischen Methimazolkonzentrationen wie im Versuch mit den juvenilen Fischen (Siehe Tabelle 4.3 in Kapitel 4.3.2.2), zeigten sich keine Veränderungen in den Schilddrüsen innerhalb der Expositionszeiten von 5, 10 und 15 Tagen. Daher wurde der Test mit erhöhten Konzentrationen von 1 bis 10 mM und

verlängerter Expositionszeit von 20 Tagen wiederholt (Siehe Kapitel 4.3.22). Erst Konzentrationen von 8 bis 10 mM wirkten innerhalb des Testzeitraums toxisch. Darunter konnte in Abstufungen eine verstärkte Beeinflussung in der Physiologie und im Verhalten der Fische beobachtet werden.



**Abbildung 5.14:** Darstellung histologischer Schilddrüsenschnitte von *Danio rerio* nach einer *in vivo* Behandlung mit **B:** 4 mM und **C:** 10 mM Methimazol, **A:** Kontrolle. Die Probenaufarbeitung erfolgte in Zusammenarbeit mit L. van der Ven (rivm, NL).

Für die histologischen Schnitte der Schilddrüesfollikel wurden neben den Kontrollen die Konzentrationen 4, 6, 8 und 10 mM bearbeitet. In Abbildung 5.14 sind für drei Behandlungen, Kontrolle, 4 und 10 mM, von Zebrafischweibchen die Ergebnisse der Histologie dargestellt. Als Ergebnisse für den gesamten zweiten Versuch konnte eine Aktivierung der Schilddrüse bei allen Konzentrationsbereichen festgestellt werden. Besonders präsent waren diese Aktivierungen in den Weibchen. Bei den Männchen zeigten sich vorwiegend in den niedrigeren Konzentrationsbereichen (4 und 6 mM) Aktivierung der Follikelepithelzellen. Bei den höheren Konzentrationsbereichen gab es dagegen keinerlei Aktivierungen.

Die Aktivierungen des Follikelepithels waren charakterisiert durch Veränderungen in der Zellmorphologie von flachen zu würfel- oder zylinderförmigen Zellen, einer



ansteigenden Kerngröße und der zunehmenden Entleerung des intrafollikularen Kolloids (Abbildung 5.14 B und C). Im Vergleich dazu hatten die Kontrolltiere alle große bis mittelgroße Follikelzellen, gut gefüllte Kolloidräume und inaktive Epithelzellen (Abbildung 5.14 C).

Für den dritten Versuch in der Histologie wurde zusätzlich zur normalen Exposition geplant, die Tiere während des Versuches mehrfach zu paaren. Dadurch sollte geprüft werden, ob die Behandlungen z.B. zu Veränderungen in der Zahl der befruchteten Eier oder in der Nachkommenschaft führen. Die Tiere wurden dafür nach der Quarantänezeit für zwei Wochen getrennt gehalten und anschließend gepaart (Paarung beschrieben in Kapitel 4.2.2). Die Paarung brachte jedoch keine Eier. Auch eine Wiederholung des Paarungsversuches nach einer Woche führte wiederum nicht zur Eiablage bei den Weibchen. Aufgrund der Kürze der verbleibenden Zeit konnte nicht geklärt werden, warum die Tiere keine Eier gelegt haben. Daher wurde dieser Versuchsteil im Rahmen der histologischen Versuche ausgelassen.

Die histologischen Ergebnisse für den dritten Versuch sind grafisch nicht dargestellt. Es zeigte sich, dass alle Kontrolltiere normale Follikel besaßen, mit gut gefüllten Kolloidräumen und flachem Epithelium. Die meisten Tiere der behandelten Gruppen hatten kollabierte, entleerte Follikel und hoch aktivierte Epithelzellen mit einem säulenartigen Aussehen, einem großem, offen strukturiertem Kern und basophilem Zytoplasma, Indiz für eine gehemmte Schilddrüsenhormonproduktion.

Insgesamt lässt sich aussagen, dass die Histopathologie der Schilddrüsen nicht direkt mit den Behandlungskonzentrationen korrelierte. Bei einigen Tieren zeigten sich keinerlei Beeinflussungen durch die Behandlungen. Unterschiede in der Histologie bei den Behandlungen von Männchen und Weibchen konnten im Gegensatz zum zweiten Versuch nicht festgestellt werden.

## 5.3 Untersuchungen mit juvenilen Zebrafischen

### 5.3.1 Ökotoxikologische Untersuchungen des konzentrationsabhängigen Einflusses von Methimazol T3 und Bisphenol A auf die Entwicklung

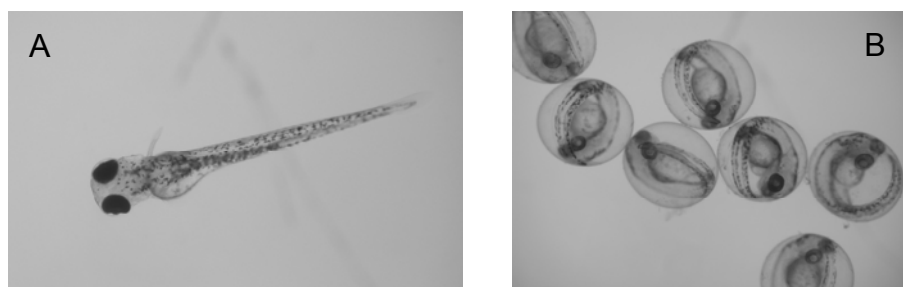
Das die Zugabe von exogenen Schilddrüsenhormonen in Abhängigkeit von den Konzentrationen und den Expositionszeitrahmen die Entwicklung in Fischen beeinflusst, konnte bereits gezeigt werden (13). In ersten Studien zeigte sich auch, welche Einflüsse andere ED auf die Entwicklung haben können (49). Im Rahmen der Untersuchungen zu den juvenilen Stadien sollten die Wirkungen durch die Modellsubstanz Methimazol, T3 und Bisphenol A auf die Entwicklung getestet werden. Dabei sollte auch überprüft werden, ob die eingesetzten Konzentrationen in den *in vivo* Tests zur Genexpression keine direkten toxischen Effekte laut Definition für ED hervorrufen.

Im ersten Teil der ökotoxikologischen Untersuchungen wurden Konzentrationen getestet, welche in den *in vivo* Behandlungen für die Untersuchungen zur Genexpression mit den juvenilen Fischen eingesetzt wurden (Siehe Kapitel 4.3.3.2 und 4.3.3.3; Methimazolkonzentrationen: 10, 100, 1000  $\mu\text{M}$  und T3-konzentrationen: 1, 5, 10, 30 nM). Es zeigten sich keine Entwicklungsstörungen bei Methimazol. Bei T3 gab es zwar bei 30 mM einige tote Fische, jedoch waren die Todesraten durchaus im natürlichen Bereich. Andere offensichtliche Beeinflussungen konnten im Rahmen dieser Beobachtungen nicht aufgezeigt werden, so dass nicht eindeutig festzustellen war, ob wirkliche Beeinflussungen in der Entwicklung aufgetreten waren.

Es zeigte sich, dass die Konzentrationen an Methimazol aus den Untersuchungen zur Genexpression mit juvenilen Zebrafischen nicht zu unerwünschten morphologischen oder toxischen Effekten führten. Im zweiten Teil der Untersuchungen konnten jedoch durch die Behandlung mit höheren Konzentrationen Veränderungen in der Entwicklung aufgezeigt werden. Die Ergebnisse dazu sind in den folgenden Kapiteln dargestellt.

### 5.3.1.1 Methimazol

Für die Untersuchungen der Wirkungen von Methimazol auf die Entwicklung wurden Konzentrationen von 0 (Kontrolle), 1 und 5 mM eingesetzt. Zu Beginn der Entwicklung gab es keinerlei Unterschiede in den einzelnen Behandlungen im Vergleich zur Kontrolle. Nach einer Behandlungsdauer von 48 h zeigte sich, dass die mit 5 mM Embryos behandelt in ihrer Entwicklung leicht verzögert waren. Ansonsten gab es keine weiteren Auffälligkeiten. Nach 72 h waren nur die Kontrolle und die Tiere mit der Behandlung 1 mM geschlüpft. Die mit 5 mM behandelten Tiere waren nicht geschlüpft. Ansonsten schienen sie jedoch normal entwickelt zu sein (Abbildung 5.15). Mit zunehmender Expositionsdauer kam es nicht mehr zum Schlupf der Tiere und ab dem Tag 5 der Behandlung begannen die Tiere abzusterben. Die Behandlung mit 1 mM führte bis zum Ende des Versuches (Gesamtdauer 5 Tage) zu keinen deutlichen Beeinträchtigungen in der Entwicklung.

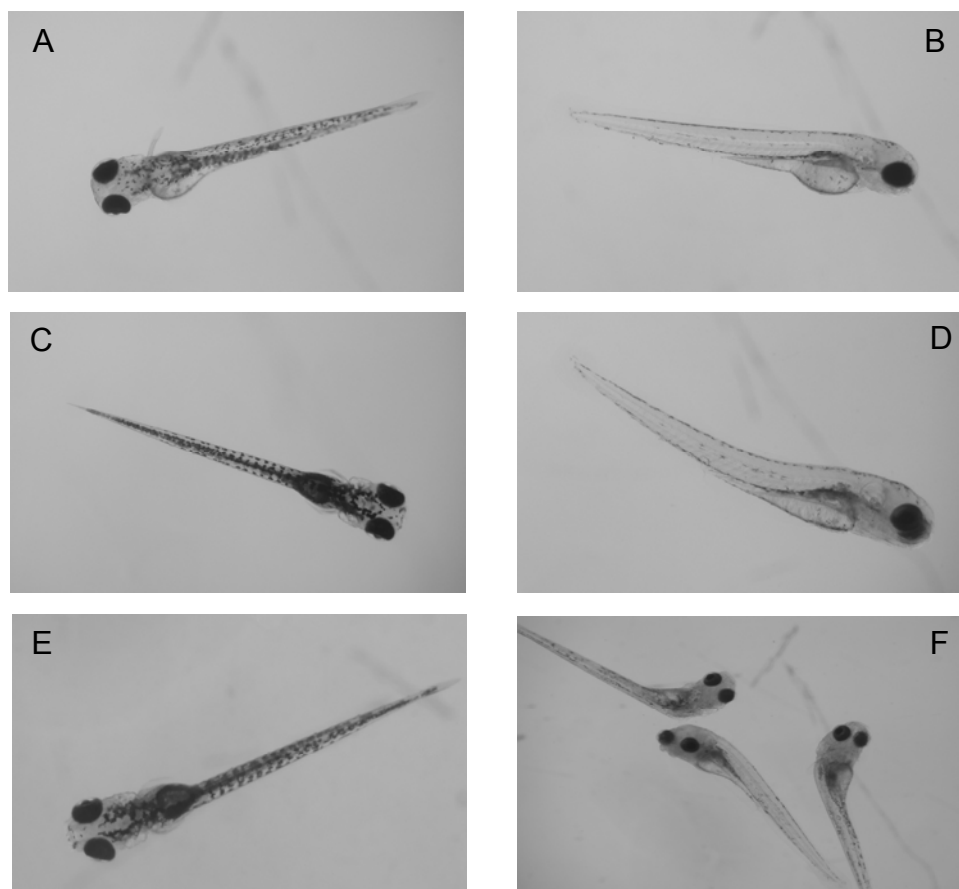


**Abbildung 5.15:** Darstellung der Entwicklungsstadien bei *Danio rerio* nach einer *in vivo* Behandlung mit Methimazol vom 64 cell-Stadium (2 hpf) bis zum Zeitpunkt 3 dpf. **A:** Kontrolle, **B:** 5 mM. Einteilung der Stadien nach Kimmel et al. (98). dpf: Tage nach der Befruchtung, hpf: Stunden nach der Befruchtung

Zusätzlich wurden frisch geschlüpfte Zebrafischlarven mit denselben Konzentrationen an Methimazol behandelt. In diesem Versuch konnte bei den Behandlungen mit 1 mM wiederum kein Einfluss auf die Entwicklung festgestellt werden. Bei der Behandlung mit 5 mM kam es nicht zu direkten toxischen oder deutlichen Entwicklungsstörungen. Lediglich schienen die Tiere etwas weniger beweglich und aktiv zu sein.

### 5.3.1.2 Triiodthyronin (T3)

Für die Untersuchungen mit Triiodthyronin (T3) wurden *in vivo* Behandlungen mit den Konzentrationen 0, 10, 100 und 1000 nM durchgeführt. Zu Beginn der Entwicklung, d.h. nach ca. 7 h Exposition gab es keine Einflüsse von T3 auf die Entwicklung. Nach 24 h und 48 h zeigten sich dagegen bei den Behandlungen mit 100 und 1000 nM bei einzelnen Embryonen Missbildungen in der Entwicklung. Der überwiegende Teil der Embryos entwickelte sich aber normal im Vergleich zu den Kontrolltieren.



**Abbildung 5.16:** Darstellung der Entwicklungsstadien bei *Danio rerio* nach einer *in vivo* Behandlung mit T3 vom 64 cell-Stadium (2 hpf) bis zu den Zeiten 3 dpf: **A:** KO, **B:** 1000 nM; 4 dpf: **C:** KO, **D:** 1000 nM und 5 dpf: **E:** KO, **F:** 100 nM. Einteilung der Stadien nach Kimmel et al. (98). dpf: Tage nach der Befruchtung, hpf: Stunden nach der Befruchtung, KO: Kontrolle

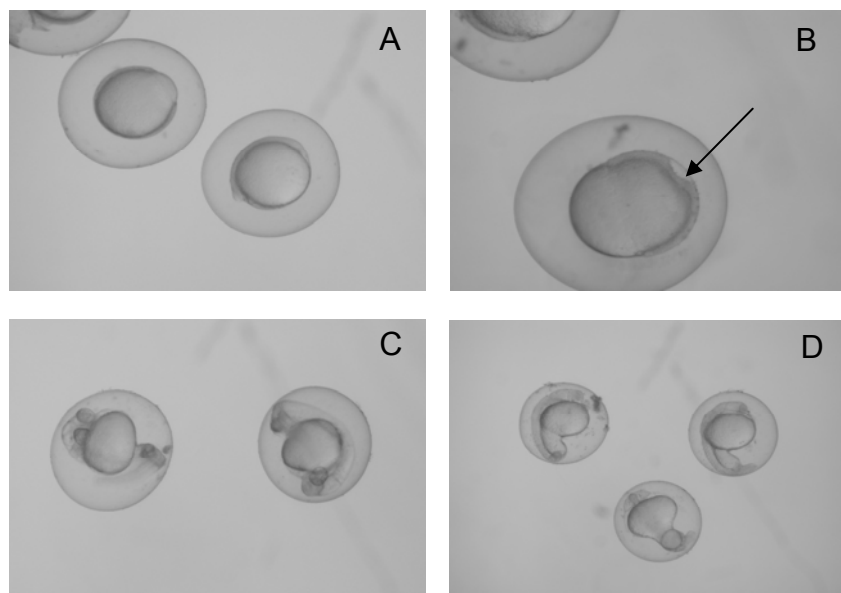
Behandlungen über 48 h hinaus führten zu Veränderungen in der Entwicklung der Embryonen. Die Abbildung 5.16 zeigt einige Auswirkungen der *in vivo* Behandlungen mit T3. Nach 3 Tagen Exposition führte die Behandlung zu keinen direkten Entwicklungsstörungen, jedoch wiesen die Embryonen in den Konzentrationen 100 und 1000 nM eine deutlich geringere Pigmentierung auf als die Kontrolltiere (Abbildung 5.16 A und B). Die Behandlung mit 10 nM blieb unbeeinflusst. Mit zunehmender Expositionsdauer zeigten die Tiere der Expositionen mit 100 und 1000 nM außer der geringeren Pigmentierung zunehmende Effekte in ihre Entwicklung, so waren nach 4 Tagen die motorischen Fähigkeiten stark eingeschränkt und die Tiere schwammen nur noch im Kreis. Es zeigten sich Effekte auf die phänotypische Entwicklung der Tiere (Abbildung 5.16 D). Bei den mit 10 nM behandelten Larven zeigten sich zu diesem Zeitpunkt ebenfalls geringere Pigmentierungen im Vergleich zu den Kontrolltieren. Nach 5 Tagen waren die Auswirkungen noch deutlicher (Abbildung 5.16 F). Bereits bei Konzentrationen von 10 nM zeigten sich Störungen, die mit zunehmender Konzentration zu immer schwerwiegenderen Auswirkungen führten, die bei den Tieren bis zur Bewegungsunfähigkeit reichten.

Bei den Behandlungen von frisch geschlüpften Larven mit denselben Konzentrationen konnten sehr ähnliche Effekte festgestellt werden. Bereits nach 24 h Exposition wiesen die Tiere in den höheren Konzentrationen geringere Pigmentierungen auf. Nach 48 h zeigte auch die Tiere in der Behandlung mit 10 nM eine geringe Pigmentierung und bei 100 und 1000 nM zeigten sich die gleichen Störungen wie im Versuch ab Stadium 2 hpf und 4 Tagen Exposition.

### 5.3.1.3 Bisphenol A

Als weitere endokrin wirksame Substanz sollte Bisphenol A (BPA) getestet werden. Zum Einfluss dieser Substanz auf die Entwicklung vom Zebrafisch war bis zu diesem Zeitpunkt nichts bekannt. Jedoch ist bekannt, dass BPA ein sehr potenter ED ist. Daher wurden für diesen Versuch die *in vivo* Behandlungen ab dem Zeitpunkt 2 hpf und mit den frisch geschlüpften Larven in den Konzentrationen 0, 1, 10 und 100 µM durchgeführt.

Im ersten Versuchsteil der Behandlung von Beginn der Entwicklung an (2 hpf) zeigten sich bereits nach einer Behandlungsdauer von 7 h (Entwicklungszeitpunkt 9 hpf) bei 10  $\mu\text{M}$  Störungen in der embryonalen Gastrula-Entwicklung; drei Tiere starben (Abbildung 5.17 B, Pfeil). Die Embryonen der höheren Konzentration waren zu diesem Zeitpunkt bereits alle abgestorben. Mit Fortschreiten der Entwicklung konnte der zunehmende Einfluss von BPA auf die Entwicklung gezeigt werden. Die Abbildung 5.17 D zeigt den Entwicklungsstand nach 24 h Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 5.17 C). Danach begannen die Embryonen abzusterben und bis zum Zeitpunkt 72 h waren alle Embryonen, ohne dass ein Tier geschlüpft wäre, gestorben. Bei der Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  überlebten bis auf 5 Tiere alle und entwickelten sich normal innerhalb der Versuchsdauer.



**Abbildung 5.17:** Darstellung der Entwicklungsstadien bei *Danio rerio* nach einer *in vivo* Behandlung mit Bisphenol A vom 64 cell-Stadium (2 hpf) bis zu den Zeiten 9 hpf: **A:** KO, **B:** 10  $\mu\text{M}$  und 24 dpf: **C:** KO, **D:** 10  $\mu\text{M}$ . Einteilung der Stadien nach Kimmel et al. (98). dpf: Tage nach der Befruchtung, hpf: Stunden nach der Befruchtung, KO: Kontrolle

Bei der Behandlung der frisch geschlüpften Larven zeigte sich das gleiche Bild. Nach 24 h Exposition waren die Tiere in der Konzentration 100  $\mu\text{M}$  bereits vollständig abgestorben und die Tiere, behandelt mit 10  $\mu\text{M}$ , wiesen starke Schäden auf. Nach 48 h waren auch diese Tiere gestorben. Die Tiere mit 1  $\mu\text{M}$  entwickelten sich normal im Vergleich zu den Kontrolltieren.

### 5.3.2 Untersuchungen zur Genexpression nach Expositionen mit Methimazol und Triiodthyronin mittels real-time RT-PCR

Im Gegensatz zu anderen endokrinen Systemen und ihren typischen ED, welche ihre Hauptwirkungen auf die Rezeptoren haben, zeigt sich für das Schilddrüsensystem, dass fast alle bisher untersuchten schilddrüsenendokrine Substanzen ihre Wirkung durch die Störung der Schilddrüsenhormonsynthese, des Plasmatransports und/ oder des Schilddrüsenhormonmetabolismus hervorrufen.

Durch die Komplexität des Schilddrüsensystems und seiner Regulierungsmechanismen, die bisher besonders bei Fischen wenig untersucht sind, ließ sich bis heute nicht eindeutig zeigen, ob schilddrüsenwirksame ED nicht auch auf die Schilddrüsenrezeptoren direkt wirken können, oder ob sie über verschiedenste Regulationsmechanismen die Transkription der Rezeptoren durch ED indirekt beeinflussen. Im Rahmen der Untersuchungen mit den juvenilen Zebrafischlarven sollte die Expression der mRNAs der Schilddrüsenrezeptoren ( $TR\alpha$  und  $TR\beta$ ), des schilddrüsenstimulierenden Hormons (TSH) nach *in vivo* Behandlungen mit Methimazol und T3 analysiert werden.

Obwohl es Hinweise auf eine Beeinflussung des Stresshormonsystems durch andere endokrine und durch ED gibt, konnte dies bisher nicht eindeutig gezeigt werden. Mit Hilfe dieser Studie sollte untersucht werden, ob Behandlungen durch Methimazol und/ oder durch T3 die Expression der Enzyme der Stresshormonsynthese (th, d $\beta$ h und ddc) beeinflussen. Da es darüber hinaus Hinweise darauf gibt, dass andere endokrine Systeme ebenfalls durch Schilddrüsenhormone beeinflusst sind, wurden in diesem Zusammenhang die Expression der mRNA des Cytochrom P450 1A1 (cyp) als bekannter Angriffspunkt von ED mit untersucht.

Dazu wurden im Rahmen der vorliegenden Studie mehrere unabhängige Tests mit verschiedensten Konzentrationen und Längen der *in vivo* Behandlungen mit Methimazol und T3 durchgeführt. Im ersten Teil der Versuch, bei den Expositionen mit Methimazol, konnten in einer ersten Untersuchung nur für TSH und  $TR\alpha$  geeignete Primer etabliert und damit die Expressionen der mRNAs nach verschiedenen Expositionszeiten und -konzentrationen analysiert werden. Im zweiten Versuch wurden neue Primer für  $TR\alpha$  und  $TR\beta$  etabliert und die Expression für die TSH-,  $TR\alpha$ - und  $TR\beta$ -mRNA untersucht. Im dritten Versuch wurden dann alle oben

aufgeführten Gene in ihrer Expression analysiert, nachdem die Primer für *cyp*, *ddc*, *th* und *dh* erfolgreich etabliert werden konnten. In diesem dritten Versuch war es auf Grund einer geringeren Larvenanzahl nicht möglich den Versuch für beide Expositionszeiträume mit denselben Konzentrationsstufungen durchzuführen. Aus diesem Grund fehlen für alle Gene für die dritte Untersuchung mit Methimazol zum Expositionszeitraum 3 Tage die Werte für 1  $\mu$ M. Die Ergebnisse der drei Versuche sind im Kapitel 5.3.2.1 dargestellt.

Im zweiten Teil des Versuchs wurde eine *in vivo* Behandlung mit fünf verschiedenen Konzentrationen und vier Probennahmzeitpunkte mit T3 durchgeführt und alle oben aufgeführten Gene erfolgreich in ihren Expressionen analysiert. Die Ergebnisse zu diesem Teilversuch sind im Kapitel 5.3.2.2 aufgeführt.

Ab der zweiten Untersuchung wurden für TR $\alpha$  und TR $\beta$ , sowie für das HG EF 1 $\alpha$  neue Primer aus Liu et al. verwendet (121). Durch eine Sequenzierung der PCR-Produkte konnte aufgezeigt werden, dass die Gene von Interesse in der PCR amplifiziert worden sind. Ebenso konnte durch die Sequenzierung der PCR-Produkte für die mRNAs von TSH, *cyp*, *th*, *ddc* und *d $\beta$ h* gezeigt werden, dass diese Gene ebenfalls spezifisch in den PCR's amplifiziert wurden.

Die für die 2. und 3. Untersuchung verwendeten Primer entsprachen denen aus den Untersuchungen zur Expression der mRNAs während der Entwicklung. Sie amplifizierten die identischen einzelnen PCR-Produkte wie im Kapitel 5.1 aufgeführt.

### **5.3.2.1 Analyse der Expression der mRNAs nach Expositionen mit Methimazol**

#### **5.3.2.1.1 Ergebnisse zur Expression der TSH-mRNA**

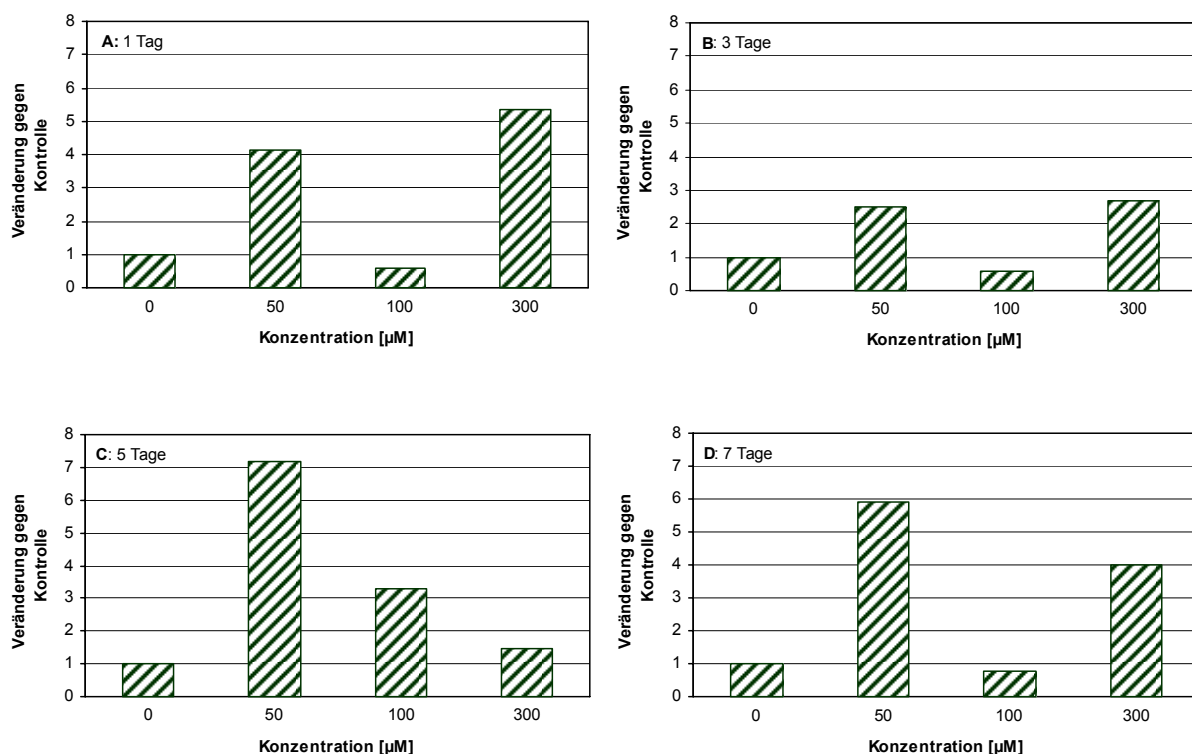
Bei Veränderungen in der Schilddrüsenhormonhomöostase kommt es durch verschiedene Mechanismen zur Gegenregulation in der Hormonsynthese. Die Freisetzung von TSH wird zum einen durch die Sekretion des TSH-releasing Faktors (TRH) gesteuert, aber auch direkt durch den Gehalt an zirkulierenden Schilddrüsenhormonen. Man spricht dabei von einem chemischen



Regulationsmechanismus. Im Rahmen der Untersuchung sollte analysiert werden, welchen Einfluss die Substanz Methimazol als Hemmer der Schilddrüsenhormonsynthese auf die Expression der TSH-mRNA hat.

### 1. Untersuchung:

Die Ergebnisse für die erste Untersuchung zur Expression der TSH-mRNA nach Behandlung mit Methiamzol in den Konzentrationen 0, 50, 100 und 300  $\mu\text{M}$  von 1, 3, 5 und 7 Tagen Dauer sind in der Abbildung 5.18 dargestellt.



**Abbildung 5.18:** Darstellung der Effekte auf die Expression der TSH-mRNA nach einer *in vivo* Behandlung mit Methimazol in den Konzentrationen 0, 50, 100 und 300  $\mu\text{M}$  zu den Expositionszeiten **A:** 1 Tag, **B:** 3 Tage, **C:** 5 Tage und **D:** 7 Tage (1. Untersuchung). Jeder Balken repräsentiert das Ergebnis der real-time RT-PCR einer aus 100 Tieren gepoolten Probe. Die dargestellten Werte zeigen die mittels des internen Standards EF 1 $\alpha$  normalisierten Messwerte, wobei diese im Vergleich zu den Kontrollwerten aufgetragen wurden. EF 1 $\alpha$ : Elongationsfaktor 1 $\alpha$ , TSH: Schilddrüsenstimulierendes Hormon

Bereits nach einem Tag Exposition war die Expression der TSH-mRNA für die Konzentrationen 50 und 300  $\mu\text{M}$  auf das 4- bzw. 5-fache hochreguliert (Abbildung 5.18 A). Diese Effekte zeigten sich ebenfalls für die Expositionsdauer von 3 und 7

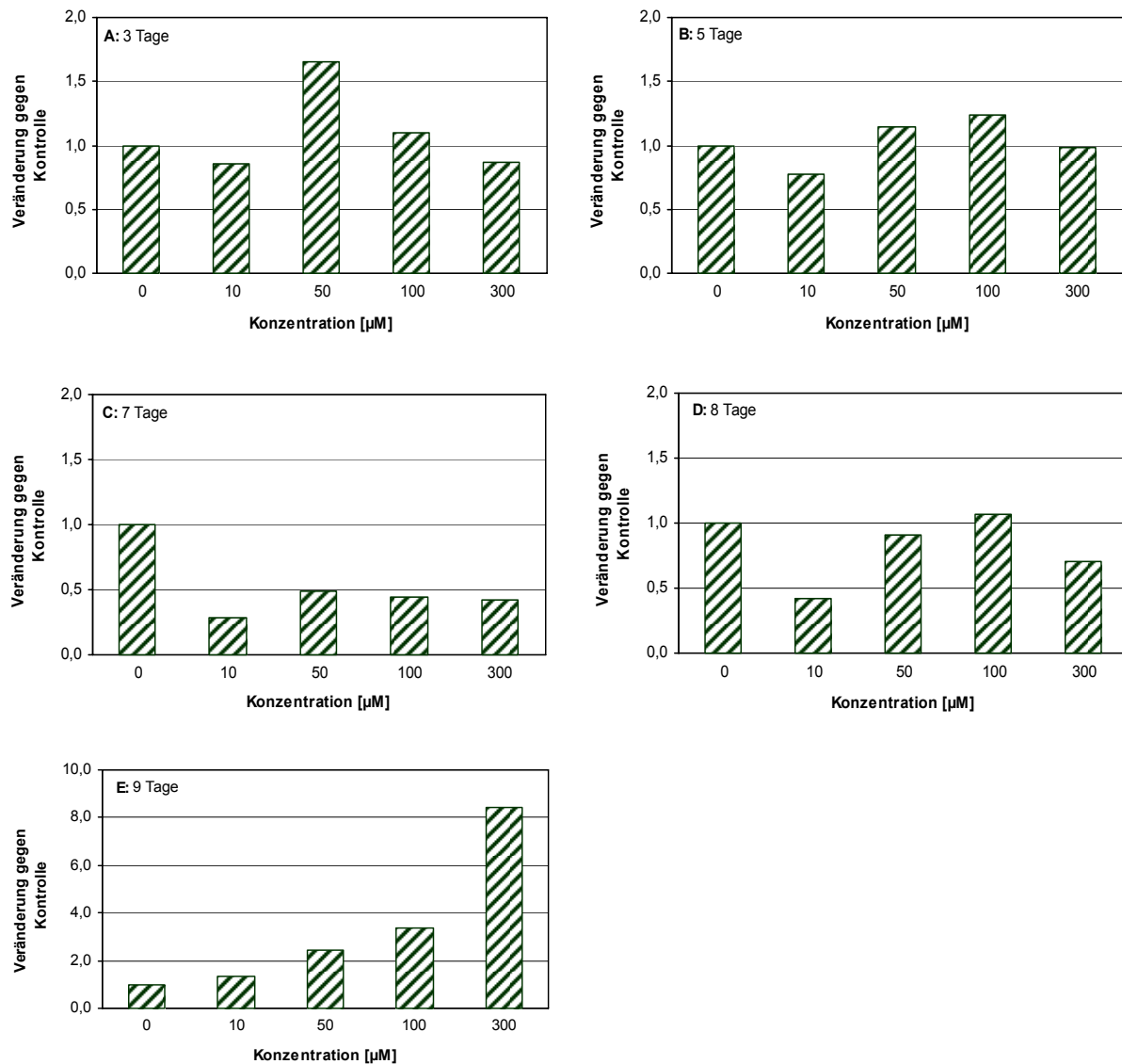
Tagen, jedoch mit etwas unterschiedlicher Stärke (Abbildung 5.18 B und D). Für den 3. Tag konnte im Gegensatz zum ersten Tag nur eine Verdopplung im Expressionslevel gezeigt werden. Nach 7 Tagen war dagegen der Level an TSH-mRNA von 50  $\mu\text{M}$  6-fach und der für 300  $\mu\text{M}$  4-fach höher als der für die Kontrolle. Die Expression für die TSH-mRNA zur Konzentration 100  $\mu\text{M}$  war zu den Expositionszeiten 1, 3 und 7 Tage gegenüber der Kontrolle leicht herunterreguliert. Im Gegensatz zu diesen drei Expositionstagen stand die Expressionsanalyse für den Tag 5 (Abbildung 5.18 C). Hier waren alle drei Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle hochreguliert, wobei die Levels der Expressionen negativ mit den Konzentrationen korrelierten.

## **2. Untersuchung:**

Die Ergebnisse für den 2. Versuch zur Analyse der Expression der TSH-mRNA nach einer in vivo Exposition sind in Abbildung 5.19 dargestellt. Im Rahmen dieser Exposition gab es 5 verschiedene Expositionszeiträume von 3, 5, 7, 8 und 9 Tagen. Die getesteten Konzentrationen waren 0, 10, 50, 100 und 300  $\mu\text{M}$ .

Für die TSH-mRNA zeigten sich innerhalb der ersten beiden Expositionszeiträume (3 und 5 Tage; Abbildung 5.19 A und B) keine signifikanten Veränderungen im Expressionslevel im Vergleich zur Kontrolle. Einzige Ausnahme bildete die Konzentration 50  $\mu\text{M}$  am 3. Expositionstag, wo ein leicht erhöhter Expressionslevel vorlag.

Nach 7 Tagen Exposition (Abbildung 5.19 C) war die Expression aller Behandlungen stark gegenüber der Kontrolle herunterreguliert. Einen Tag später waren dagegen nur noch die Expressionslevel für die Behandlungen mit 10 und 300  $\mu\text{M}$  niedriger als die der Kontrolle. Die anderen Konzentrationen zeigten keine Beeinflussung durch die Behandlung mit Methimazol. Diese Tendenz der Zunahme in der Expression vom Tag 8 setzte sich am Tag 9 fort, wo alle Konzentrationen einen höheren Expressionslevel gegenüber der Kontrolle hatten. Die Höhe der Expressionslevel korrelierte positiv mit der Konzentration. Bei der Behandlung mit 300  $\mu\text{M}$  konnte ein 8-fach höherer Level der Expression im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden.

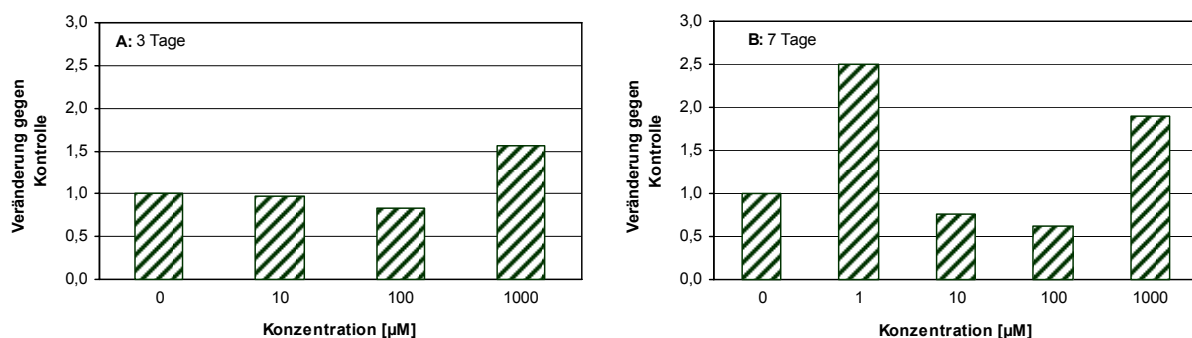


**Abbildung 5.19:** Darstellung der Effekte auf die Expression der TSH-mRNA nach einer *in vivo* Behandlung mit Methimazol in den Konzentrationen 0, 10, 50, 100 und 300 µM zu den Expositionszeiten **A:** 3 Tag, **B:** 5 Tage, **C:** 7 Tage, **D:** 8 Tage und **E:** 9 Tagen (2. Untersuchung). Jeder Balken repräsentiert das Ergebnis der real-time RT-PCR einer aus 100 Tieren gepoolten Probe. Die dargestellten Werte zeigen die mittels des internen Standards EF 1 $\alpha$  normalisierten Messwerte, wobei diese im Vergleich zu den Kontrollwerten aufgetragen wurden. EF 1 $\alpha$ : Elongationsfaktor 1 $\alpha$ , TSH: Schilddrüsenstimulierendes Hormon

### 3. Untersuchung:

Im 3. Versuch sollten noch einmal veränderte Konzentrationen untersucht werden. Die Konzentrationen betragen 0, 10, 100 und 1000 µM bzw. für den zweiten Expositionszeitraum kam noch 1 µM hinzu. Die Dauer der Expositionen waren 3 und 7 Tage. Abbildung 5.20 zeigt die Ergebnisse der Expressionsanalysen der

TSH-mRNA für den 3. Versuch. Für den Expositionszeitraum 3 Tage (Abbildung 5.20 A) zeigt sich ein leichter Anstieg im Expressionslevel im Vergleich zur Kontrolle für die Konzentration 1000  $\mu\text{M}$ . Die Konzentrationen 10 und 100  $\mu\text{M}$  haben, obwohl nicht signifikant, eine leichte Tendenz zu einem geringeren Level der Expression gegenüber der Kontrolle. Diese Tendenz verstärkt sich zu einem eindeutig geringeren Expressionslevel nach 7 Tagen Exposition. Im Gegensatz dazu waren die Expressionslevel der TSH-mRNA für die Konzentrationen 1 und 300  $\mu\text{M}$  im Vergleich zur Kontrolle um etwa das Doppelte erhöht.



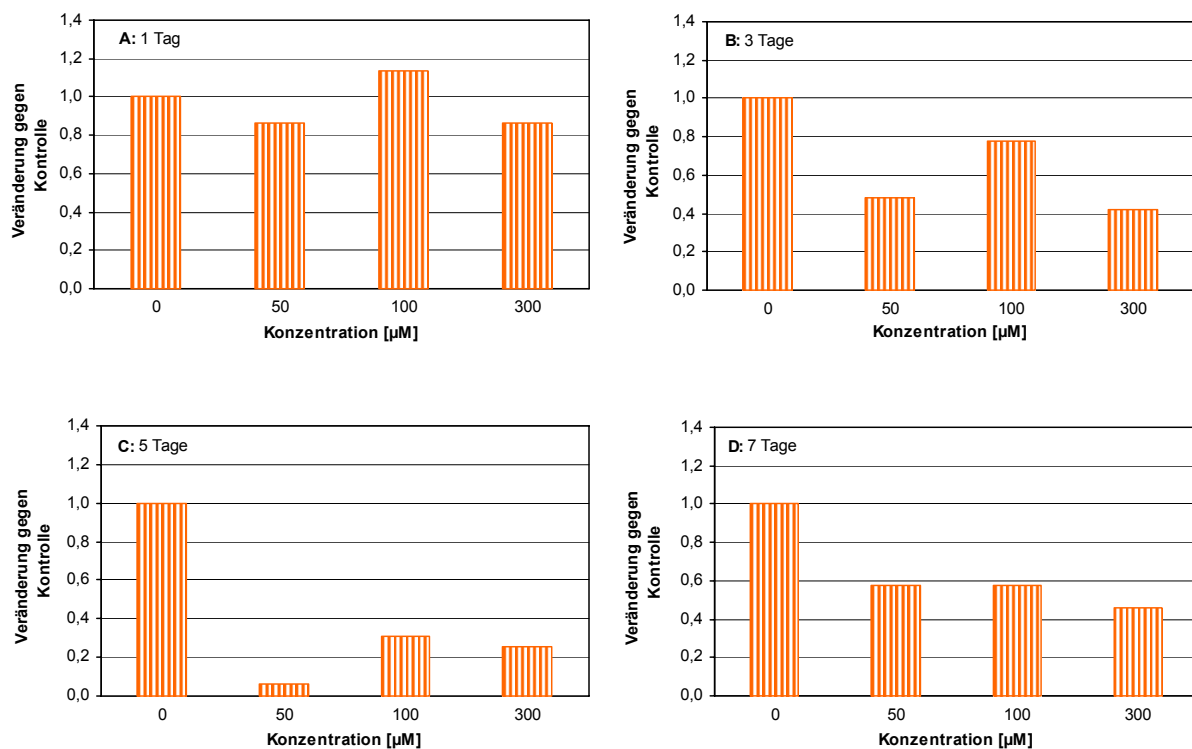
**Abbildung 5.20:** Darstellung der Effekte auf die Expression der TSH-mRNA nach einer *in vivo* Behandlung mit Methimazol in den Konzentrationen 0, 1, 10, 100 und 1000  $\mu\text{M}$  zu den Expositionszeiten **A:** 3 Tage und **B:** 7 Tage (3. Untersuchung). Jeder Balken repräsentiert das Ergebnis der real-time RT-PCR einer aus 100 Tieren gepoolten Probe. Die dargestellten Werte zeigen die mittels des internen Standards EF 1 $\alpha$  normalisierten Messwerte, wobei diese im Vergleich zu den Kontrollwerten aufgetragen wurden. EF 1 $\alpha$ : Elongationsfaktor 1 $\alpha$ , TSH: Schilddrüsenstimulierendes Hormon

### 5.3.2.1.2 Ergebnisse zur Expression der TR $\alpha$ -mRNA

Die Schilddrüsenrezeptoren spielen eine wichtige Rolle in der Vermittlung der Hormonantworten in den Zielgeweben. Ob die Rezeptoren ebenso eine Rolle bei den Wirkungen von ED spielen, ist bislang kaum untersucht. Im Rahmen dieser Versuche sollte der Einfluß von Methimazol auf die Expression der TR $\alpha$ -mRNA analysiert werden.

## 1. Untersuchung:

Die Ergebnisse zur ersten Teiluntersuchung sind in Abbildung 5.21 dargestellt. Bereits nach einem Tag Exposition konnte ein leichter Rückgang in der Expression an TR $\alpha$ -mRNA für die Konzentrationen 50 und 300  $\mu$ M im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden (Abbildung 5.21 A). Die Expression bei der Konzentration 100  $\mu$ M blieben nahezu unbeeinflusst. Nach 3 Tagen Exposition zeigten alle Konzentrationen verglichen mit der Kontrolle einen geringeren Expressionslevel (Abbildung 5.21 B) und nach 5 Tagen war dieser Effekt dann am stärksten ausgeprägt (Abbildung 5.21 C).



**Abbildung 5.21:** Darstellung der Effekte auf die Expression der TR $\alpha$ -mRNA nach einer *in vivo* Behandlung mit Methimazol in den Konzentrationen 0, 50, 100 und 300  $\mu$ M zu den Expositionszeiten **A:** 1 Tag, **B:** 3 Tage, **C:** 5 Tage und **D:** 7 Tage. Jeder Balken repräsentiert das Ergebnis der real-time RT-PCR einer aus 100 Tieren gepoolten Probe. Die dargestellten Werte zeigen die mittels des internen Standards EF 1 $\alpha$  normalisierten Messwerte, wobei diese im Vergleich zu den Kontrollwerten aufgetragen wurden. EF 1 $\alpha$ : Elongationsfaktor 1 $\alpha$ , TR $\alpha$ : Schilddrüsenrezeptor  $\alpha$

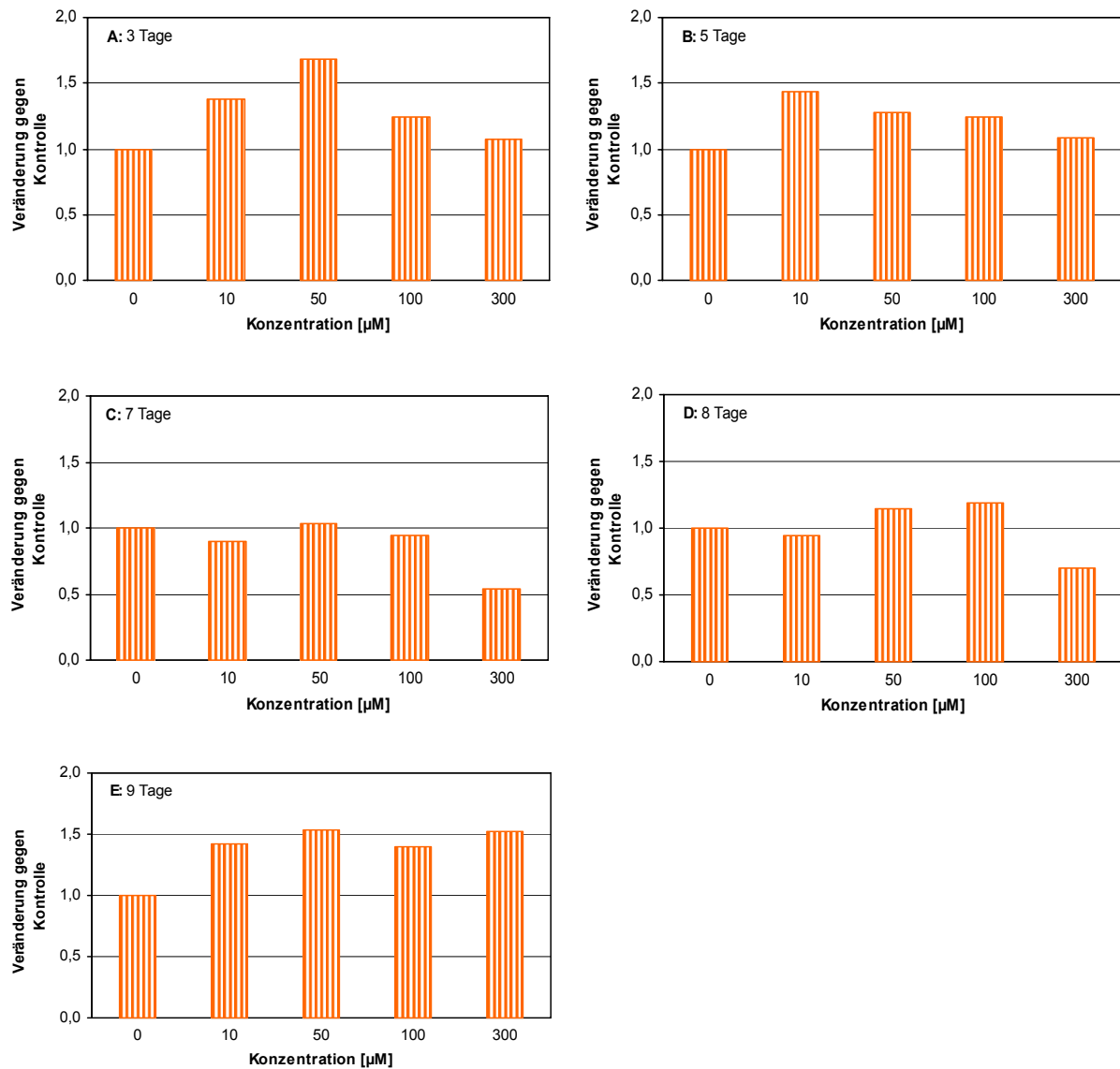
Besonders stark herunterreguliert war die Expression für die 50  $\mu$ M Konzentration. Bei noch längerer Exposition (7 Tage; Abbildung 5.21 D) war die Expression zwar immer noch deutlich gegenüber der Kontrolle herunterreguliert, jedoch gegenüber

---

der 5 Tage Exposition war sie wieder erhöht. Zusätzlich zeigte sich, dass nach 7 Tagen Exposition die Levels der Expression für die Konzentrationen von 50 und 100  $\mu\text{M}$  gleich waren und die der 300  $\mu\text{M}$  Konzentration den niedrigsten Level aufwies.

## **2. Untersuchung:**

Abbildung 5.22 zeigt die Ergebnisse zur Analyse der Expression der TR $\alpha$ -mRNA, bei der die Amplifikation mit den Primern aus Liu et al. (121) durchgeführt wurde. Im Gegensatz zum ersten Versuch konnte die deutlich verringerte Expression an TR $\alpha$ -mRNA nach einer Exposition mit Methimazol nicht bestätigt werden. Es zeigten sich lediglich kleinere Veränderungen gegenüber der Kontrolle. Ausnahmen bildeten die Expressionslevel nach 9 Tagen Exposition, bei dem die Levels im Vergleich zur Kontrolle um etwa ein Drittel höher waren (Abbildung 5.22 E). Des Weiteren zeigte sich für die Expression der mRNA bei der Konzentration 300  $\mu\text{M}$  zu den Expositionszeiten 7 und 8 Tage eine deutliche Herunterregulierung im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 5.22 C und D).

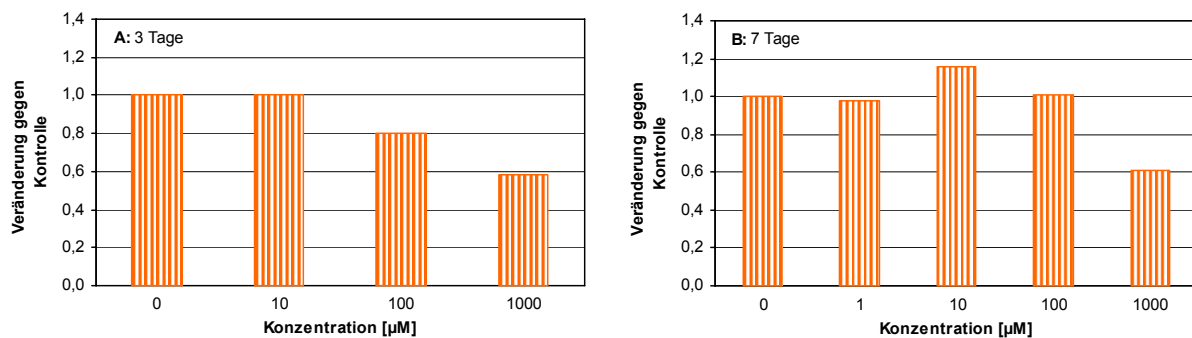


**Abbildung 5.22:** Darstellung der Effekte auf die Expression der TR $\alpha$ -mRNA nach einer *in vivo* Behandlung mit Methimazol in den Konzentrationen 0, 10, 50, 100 und 300  $\mu$ M zu den Expositionszeiten **A:** 3 Tage, **B:** 5 Tage, **C:** 7 Tage, **D:** 8 Tage und **E:** 9 Tage (2. Untersuchung). Jeder Balken repräsentiert das Ergebnis der real-time RT-PCR einer aus 100 Tieren gepoolten Probe. Die dargestellten Werte zeigen die mittels des internen Standards EF 1 $\alpha$  normalisierten Messwerte, wobei diese im Vergleich zu den Kontrollwerten aufgetragen wurden. EF 1 $\alpha$ : Elongationsfaktor 1 $\alpha$ , TR $\alpha$ : Schilddrüsenrezeptor  $\alpha$

### 3. Untersuchung:

Für die 3. Untersuchung, bei der nochmals eine höhere und eine niedrigere Konzentration gegenüber dem vorherigen Versuch getestet wurden, zeigte sich ein ganz ähnliches Bild. Der Level der Expression war für beide Expositionszeiträume

nur für die höchste Konzentration von 1000  $\mu\text{M}$  niedriger im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 5.23). Einen Einfluss auf die Expression der mRNA der Fische gab es ansonsten nur noch für die Behandlung mit 100  $\mu\text{M}$ , wo der Level ebenfalls im Vergleich zur Kontrolle niedriger war (Abbildung 5.23 A). Alle anderen Konzentrationen führten zu keinen deutlichen Änderungen im Expressionslevel der  $\text{TR}\alpha$ -mRNAs.



**Abbildung 5.23:** Darstellung der Effekte auf die Expression der  $\text{TR}\alpha$ -mRNA nach einer *in vivo* Behandlung mit Methimazol in den Konzentrationen 0, 1, 10, 100 und 1000  $\mu\text{M}$  zu den Expositionszeiten **A:** 3 Tage und **B:** 7 Tage (3. Untersuchung). Jeder Balken repräsentiert das Ergebnis der real-time RT-PCR einer aus 100 Tieren gepoolten Probe. Die dargestellten Werte zeigen die mittels des internen Standards EF 1 $\alpha$  normalisierten Messwerte, wobei diese im Vergleich zu den Kontrollwerten aufgetragen wurden. EF 1 $\alpha$ : Elongationsfaktor 1 $\alpha$ ,  $\text{TR}\alpha$ : Schilddrüsenrezeptor  $\alpha$

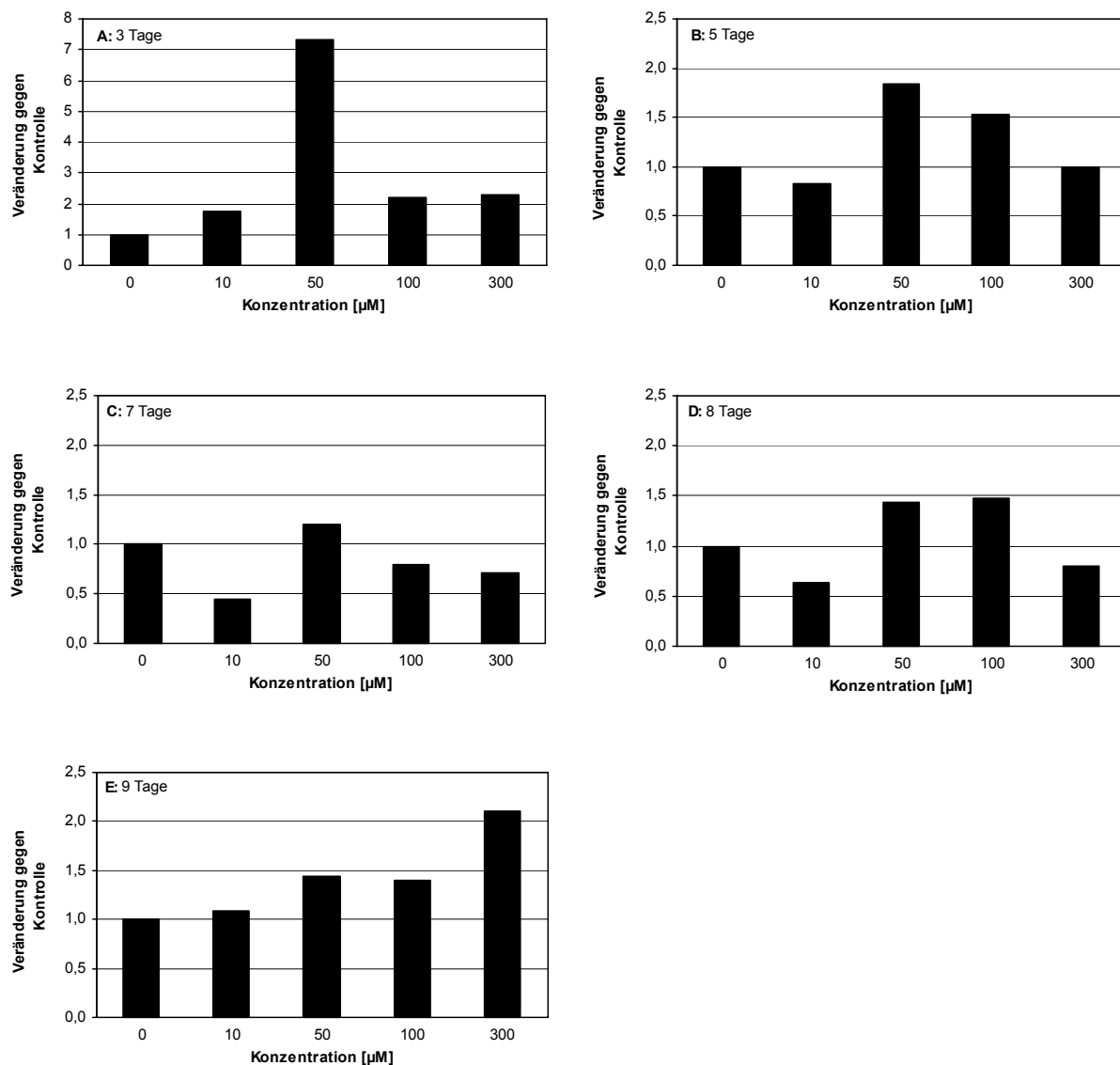
### 5.3.2.1.3 Ergebnisse zur Expression der $\text{TR}\beta$ -mRNA

Ebenso wie der Schilddrüsenrezeptor  $\text{TR}\alpha$  spielt der  $\text{TR}\beta$  für die Hormonantworten eine wichtige Rolle.  $\text{TR}\alpha$  und  $\text{TR}\beta$  sind Gegenregulatoren. Für den  $\text{TR}\beta$  gibt es wie für den  $\text{TR}\alpha$  kaum Studien, die die Effekte von ED auf diesen Rezeptor untersuchen. In dieser Arbeit sollte wie für  $\text{TR}\alpha$  der Einfluss von Methimazol auf die Expression der  $\text{TR}\beta$ -mRNA im juvenilen Zebrafisch untersucht werden. Dadurch, dass im Rahmen der ersten Untersuchung kein geeigneter Primer für  $\text{TR}\beta$  etabliert werden konnte, gibt es keine Ergebnisse zum ersten Expositionsversuch.



## 2. Untersuchung:

Die Expressionsergebnisse zum zweiten Expositionsversuch (erste Untersuchung zur TR $\beta$ -mRNA Expression) sind in Abbildung 5.24 dargestellt. Es zeigten sich große Schwankungen der Expression zwischen den einzelnen Expositionstagen und den Konzentrationen.

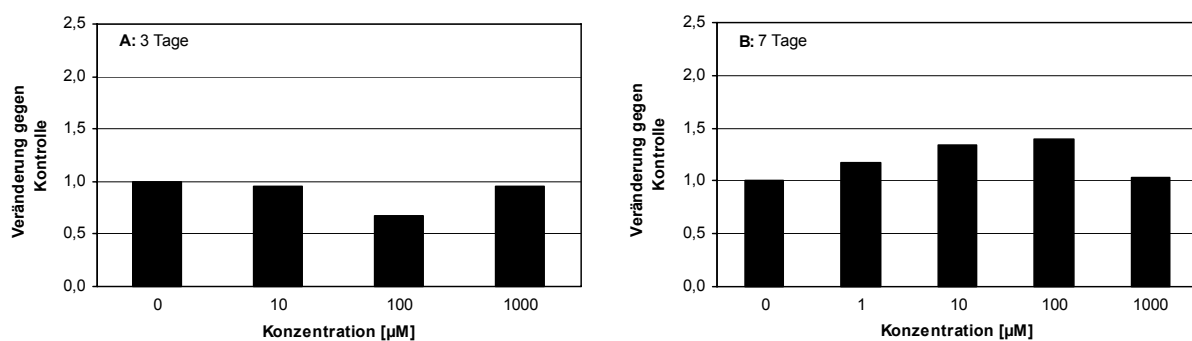


**Abbildung 5.24:** Darstellung der Effekte auf die Expression der TR $\beta$ -mRNA nach einer *in vivo* Behandlung mit Methimazol in den Konzentrationen 0, 10, 50, 100 und 300  $\mu$ M zu den Expositionszeiten **A:** 3 Tage, **B:** 5 Tage, **C:** 7 Tage, **D:** 8 Tage und **E:** 9 Tage (2. Untersuchung). Jeder Balken repräsentiert das Ergebnis der real-time RT-PCR einer aus 100 Tieren gepoolten Probe. Die dargestellten Werte zeigen die mittels des internen Standards EF 1 $\alpha$  normalisierten Messwerte, wobei diese im Vergleich zu den Kontrollwerten aufgetragen wurden. EF 1 $\alpha$ : Elongationsfaktor 1 $\alpha$ , TR $\beta$ : Schilddrüsenrezeptor  $\beta$

Für den 3. und 5. Expositionstag hatten die Konzentrationen 50, 100 und 300  $\mu\text{M}$  gegenüber der Kontrolle einen höheren Expressionslevel, wobei der größte Anstieg in der Expression für die Exposition mit der Konzentration 50  $\mu\text{M}$  festgestellt werden konnte (Abbildung 5.24 A und B). Nach 7 Tagen Exposition waren dagegen die Expressionslevel für alle Konzentrationen bis auf die der 50  $\mu\text{M}$  niedriger als die der Kontrolle (Abbildung 5.24 C). Danach wurde die Expression leicht hochreguliert; erst für die Expositionen mit 50 und 100  $\mu\text{M}$  (Abbildung 5.24 D; 8 Tage Exposition) und dann nach 9 Tagen auch für die Exposition mit 300  $\mu\text{M}$  (Abbildung 5.24 E).

### 3. Untersuchung:

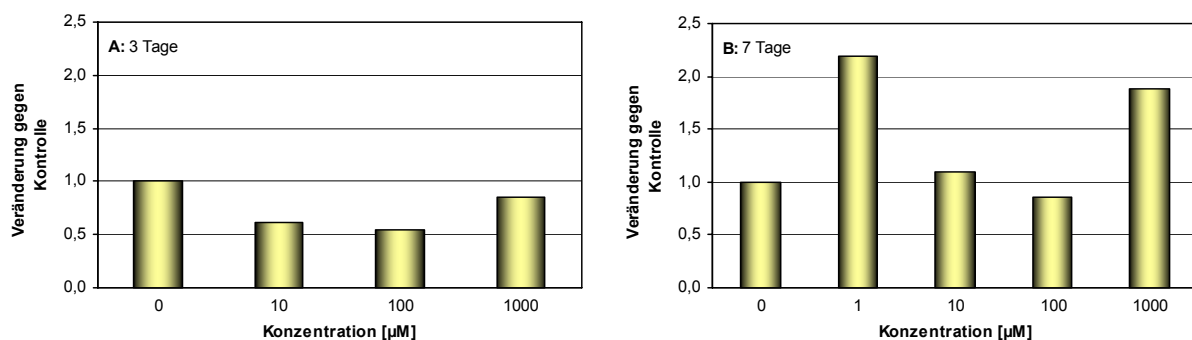
Für die 3. Untersuchung (zweite zur TR $\beta$ -mRNA Expression) sind die Ergebnisse in Abbildung 5.25 dargestellt. Es zeigte sich, dass bei dieser Untersuchung die Expression der TR $\beta$ -mRNA durch die Behandlungen mit Methimazol nicht signifikant beeinflusst wurden.



**Abbildung 5.25:** Darstellung der Effekte auf die Expression der TR $\beta$ -mRNA nach einer *in vivo* Behandlung mit Methimazol in den Konzentrationen 0, 1, 10, 100 und 1000  $\mu\text{M}$  zu den Expositionszeiten **A:** 3 Tage und **B:** 7 Tage (3. Untersuchung). Jeder Balken repräsentiert das Ergebnis der real-time RT-PCR einer aus 100 Tieren gepoolten Probe. Die dargestellten Werte zeigen die mittels des internen Standards EF 1 $\alpha$  normalisierten Messwerte, wobei diese im Vergleich zu den Kontrollwerten aufgetragen wurden. EF 1 $\alpha$ : Elongationsfaktor 1 $\alpha$ , TR $\beta$ : Schilddrüsenrezeptor  $\beta$

### 5.3.2.1.4 Ergebnisse zur Expression der cyp-mRNA

Die Expositionen mit Methimazol für die vorliegenden Ergebnisse zur Expression der cyp-mRNA in Abbildung 5.26 entsprachen der oben aufgeführten 3. Untersuchung. Aus Abbildung 5.26 A geht hervor, dass der Level der cyp-mRNA Expression für alle Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle herunterreguliert war. Ein besonders niedriger Level konnte dabei für 100  $\mu\text{M}$  festgestellt werden. Nach 7 Tagen Exposition waren die Levels aller Konzentrationen im Vergleich zur Expression nach 3 Tagen hochreguliert (Abbildung 5.26 B). Im Vergleich zur Kontrolle zeigten die Konzentrationen von 1 und 1000  $\mu\text{M}$  einen deutlich höheren Expressionslevel. Die Konzentrationen 10 und 100  $\mu\text{M}$  waren gegenüber der Kontrolle nahezu unbeeinflusst.



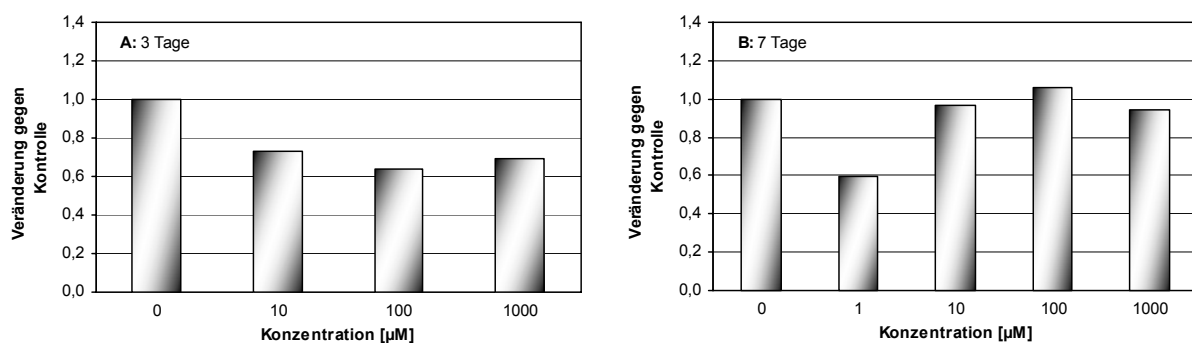
**Abbildung 5.26:** Darstellung der Effekte auf die Expression der cyp-mRNA nach einer *in vivo* Behandlung mit Methimazol in den Konzentrationen 0, 1, 10, 100 und 1000  $\mu\text{M}$  zu den Expositionszeiten **A:** 3 Tage und **B:** 7 Tage. Jeder Balken repräsentiert das Ergebnis der real-time RT-PCR einer aus 100 Tieren gepoolten Probe. Die dargestellten Werte zeigen die mittels des internen Standards EF 1 $\alpha$  normalisierten Messwerte, wobei diese im Vergleich zu den Kontrollwerten aufgetragen wurden. EF 1 $\alpha$ : Elongationsfaktor 1 $\alpha$ , cyp: Cytochrom P450 1A1

### 5.3.2.1.5 Ergebnisse zur Expression der ddc-mRNA

Das Enzym Dopa-Decarboxylase ist für die Umwandlung von L-Dopa zu Dopamin, dem Vorläufer der Stresshormone Noradrenalin und Adrenalin, durch

Decarboxylierung notwendig. Ob die Expression dieses Enzyms durch Methimazol beeinflusst wird, war Ziel dieses Versuches.

Die Ergebnisse zur Expression der ddc-mRNA sind in Abbildung 5.27 dargestellt. Es zeigt sich, dass für alle Konzentrationen nach einer Expositionsdauer von 3 Tagen die Expression im Vergleich zur Kontrolle um etwa 40 % niedriger ist (Abbildung 5.27 A). Nach 7 Tagen Exposition ist der Level der Expressionen für die Konzentrationen 10, 100 und 1000  $\mu\text{M}$  auf dem Niveau der Kontrolle reguliert (Abbildung 5.27 B). Die Expression zur Konzentration 1  $\mu\text{M}$  war dagegen im Vergleich zur Kontrolle herunterreguliert.

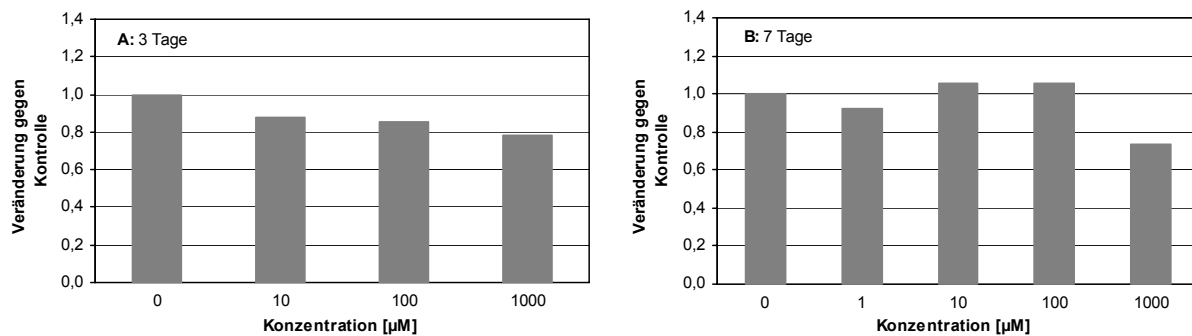


**Abbildung 5.27:** Darstellung der Effekte auf die Expression der ddc-mRNA nach einer *in vivo* Behandlung mit Methimazol in den Konzentrationen 0, 1, 10, 100 und 1000  $\mu\text{M}$  zu den Expositionszeiten **A:** 3 Tage und **B:** 7 Tage. Jeder Balken repräsentiert das Ergebnis der real-time RT-PCR einer aus 100 Tieren gepoolten Probe. Die dargestellten Werte zeigen die mittels des internen Standards EF 1 $\alpha$  normalisierten Messwerte, wobei diese im Vergleich zu den Kontrollwerten aufgetragen wurden. EF 1 $\alpha$ : Elongationsfaktor 1 $\alpha$ , ddc: Dopa-Decarboxylase

### 5.3.2.1.6 Ergebnisse zur Expression der th-mRNA

Durch Hydroxylierung mit Hilfe des Enzyms Tyrosin-Hydroxylase (th) wird aus der Aminosäure Tyrosin die Dopamin-Vorstufe L-Dopa. Inwieweit ED, die auf das Schilddrüsensystem wirken, die Expression der mRNA dieses Enzyms beeinflussen können, sollte im Rahmen dieser Untersuchung analysiert werden. Die Abbildung 5.28 zeigt die Ergebnisse der Expressionsanalysen für die th-mRNA. Nach 3 Tagen Exposition zeigt sich, ähnlich der Expression der ddc-mRNA, nur ein leicht

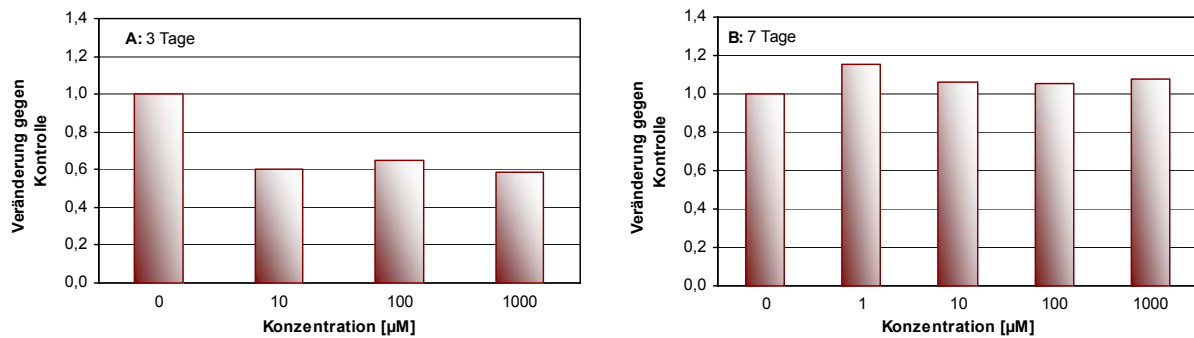
niedrigerer Level im Vergleich mit der Kontrolle (Abbildung 5.28 A). Ebenso wie für die Expression der ddc-mRNA wird die Expression der th-mRNA zum Tag 7 der Exposition hochreguliert, jedoch mit dem Unterschied, dass bei der th-mRNA Expression nicht die Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  die Ausnahme bildet und weiter einen niedrigeren Level als die Kontrolle hat, sondern die 1000  $\mu\text{M}$  Konzentration (Abbildung 5.28 B).



**Abbildung 5.28:** Darstellung der Effekte auf die Expression von th-mRNA nach einer *in vivo* Behandlung mit Methimazol zu den Expositionszeiten A: 3 Tage, B: 7 Tage. Jeder Balken repräsentiert das Ergebnis der real-time RT-PCR einer aus 100 Tieren gepoolten Probe. Die dargestellten Werte zeigen die mittels des internen Standards EF 1 $\alpha$  normalisierten Messwerte, wobei diese im Vergleich zu den Kontrollwerten aufgetragen wurden. EF 1 $\alpha$ : Elongationsfaktor 1 $\alpha$ , th: Tyrosin-Hydroxylase

### 5.3.2.1.7 Ergebnisse zur Expression der d $\beta$ h-mRNA

Das Enzym Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase (d $\beta$ h) wandelt Dopamin mittels Hydroxylierung zu Noradrenalin um. Wie auch für th und ddc existieren bisher keine Arbeiten zum Einfluss von ED auf die Expression der mRNA der d $\beta$ h.



**Abbildung 5.29:** Darstellung der Effekte auf die Expression der dβh-mRNA nach einer *in vivo* Behandlung mit Methimazol in den Konzentrationen 0, 1, 10, 100 und 1000 μM zu den Expositionszeiten **A:** 3 Tage und **B:** 7 Tage. Jeder Balken repräsentiert das Ergebnis der real-time RT-PCR einer aus 100 Tieren gepoolten Probe. Die dargestellten Werte zeigen die mittels des internen Standards EF 1α normalisierten Messwerte, wobei diese im Vergleich zu den Kontrollwerten aufgetragen wurden. EF 1α: Elongationsfaktor 1α, dβh: Dopamin-β-Hydroxylase

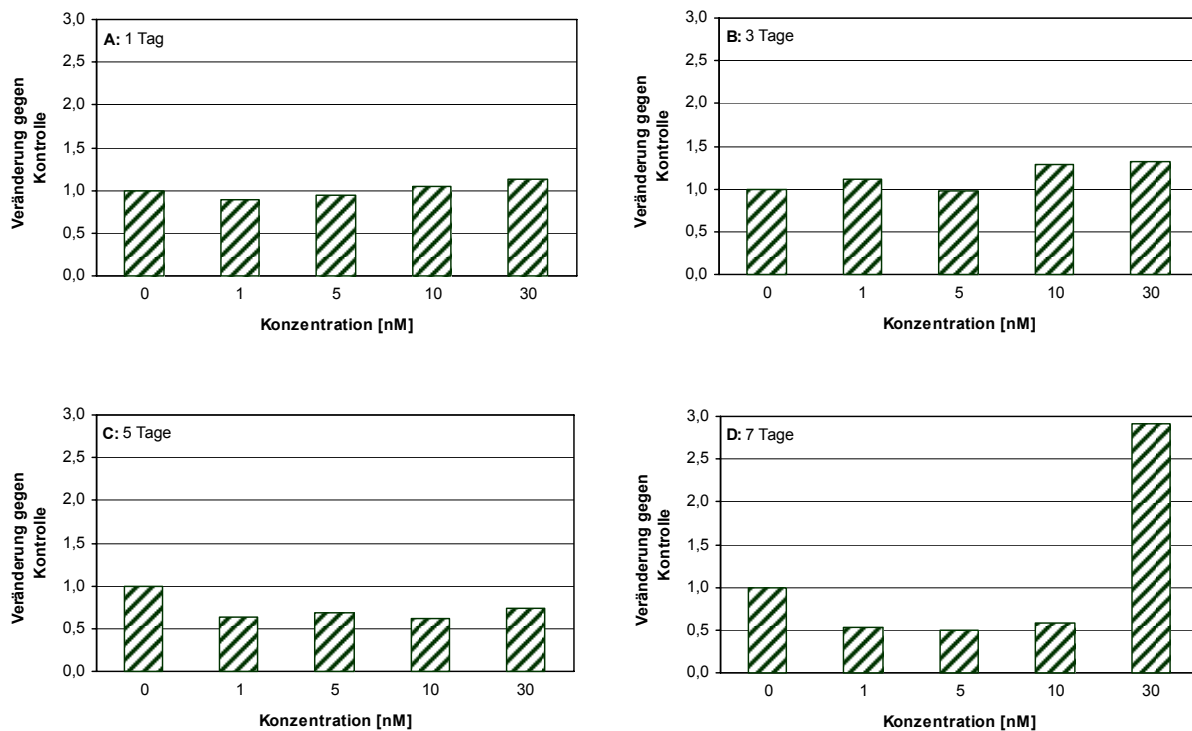
Die Abbildung 5.29 zeigt die Ergebnisse zur Untersuchung der Wirkung von Methimazol auf die Expression der dβh-mRNA. Wie für die anderen Gene der Stresshormonsynthese zeigt sich eine Herunterregulierung in der Expression im Vergleich zur Kontrolle bei allen Konzentrationen (Abbildung 5.29 A). Die Expression lag etwa 40 % niedriger als die der Kontrolle. Bei längerer Exposition (7 Tage; Abbildung 5.29 B) konnten keine deutlichen Einflüsse mehr auf die Expression bei allen Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden.

### 5.3.2.2 Analyse der Expression der mRNAs nach Expositionen mit T3

Im zweiten Teil der Untersuchungen wurden juvenile, frisch geschlüpfte Zebrafische (48 hpf) mit dem biologisch aktiven Schilddrüsenhormon Triiodthyronin (T3) in unterschiedlichen Konzentrationen über verschiedene Expositionszeiträume hinweg *in vivo* exponiert. Ziel war es, den Einfluss von exogen zugeführten Schilddrüsenhormonen auf die Expression der Gene der Schilddrüsenachse (TR, TR und TSH), sowie auf die Enzyme der Stresshormonsynthese (th, ddc, dβh) und des Cytochroms P4501A1 (cyp) zu analysieren.

### 5.3.2.2.1 Ergebnisse zur Expression der TSH-mRNA

Die Ergebnisse zur Expression der TSH-mRNA nach einer Behandlung mit T3 sind in Abbildung 5.30 dargestellt.



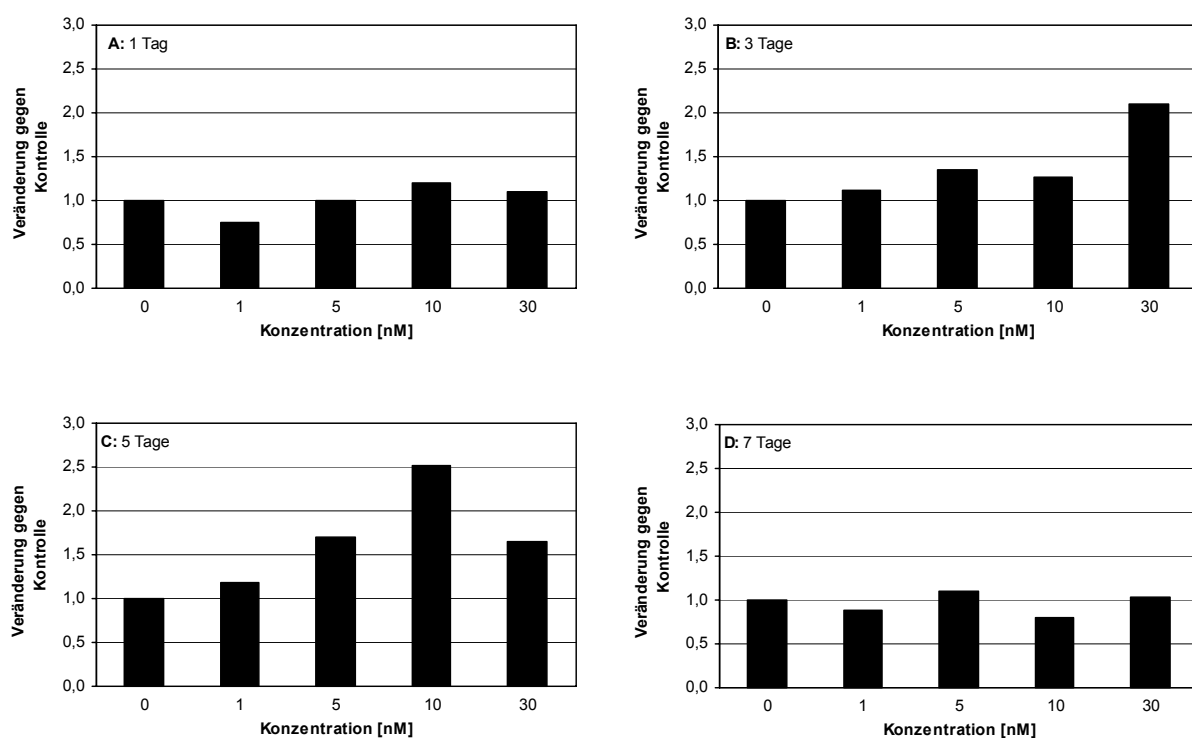
**Abbildung 5.30:** Darstellung der Effekte auf die Expression der TSH-mRNA nach einer *in vivo* Behandlung mit Triiodthyronin (T3) in den Konzentrationen 0, 1, 5, 10 und 30 nM zu den Expositionszeiten **A:** 1 Tag, **B:** 3 Tage, **C:** 5 Tage und **D:** 7 Tage. Jeder Balken repräsentiert das Ergebnis der real-time RT-PCR einer aus 100 Tieren gepoolten Probe. Die dargestellten Werte zeigen die mittels des internen Standards EF 1 $\alpha$  normalisierten Messwerte, wobei diese im Vergleich zu den Kontrollwerten aufgetragen wurden. EF 1 $\alpha$ : Elongationsfaktor 1 $\alpha$ , TSH: Schilddrüsenstimulierendes Hormon

In den ersten beiden untersuchten Expositionszeiträumen (1 und 3 Tage) konnten keine Veränderung im Expressionslevel im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt werden (Abbildung 5.30 A und B). Nach einer Expositionsdauer von 5 Tagen sank der Expressionslevel für alle Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle um etwa 40 % (Abbildung 5.30 C). Dieses Ergebnis zeigte sich auch mit Ausnahme für die Expression der 30 nM Behandlung (Abbildung 5.30 D). Die Expressionslevel waren im Vergleich zur Kontrolle etwa 50 % niedriger. Für die Expression der TSH-mRNA

zur Behandlung mit 30 nM zeigte sich dagegen ein fast 3-fach höherer Level gegenüber der Kontrolle.

### 5.3.2.2 Ergebnisse zur Expression der TR $\beta$ -mRNA

Die Abbildung 5.31 zeigt die Ergebnisse zur Expression der TR $\beta$ -mRNA nach einer *in vivo* Behandlung mit T3.



**Abbildung 5.31:** Darstellung der Effekte auf die Expression der TR $\beta$ -mRNA nach einer *in vivo* Behandlung mit Triiodthyronin (T3) in den Konzentrationen 0, 1, 5, 10 und 30 nM zu den Expositionszeiten **A:** 1 Tag, **B:** 3 Tage, **C:** 5 Tage und **D:** 7 Tage. Jeder Balken repräsentiert das Ergebnis der real-time RT-PCR einer aus 100 Tieren gepoolten Probe. Die dargestellten Werte zeigen die mittels des internen Standards EF 1 $\alpha$  normalisierten Messwerte, wobei diese im Vergleich zu den Kontrollwerten aufgetragen wurden. EF 1 $\alpha$ : Elongationsfaktor 1 $\alpha$ , TR $\beta$ : Schilddrüsenrezeptor  $\beta$

Für eine kurze Expositionsdauer von einem Tag konnten keine signifikanten Änderungen in den Expressionen zu den verschiedenen Konzentrationen festgestellt werden (Abbildung 5.31 A). Ebenso zeigte eine Expositionsdauer von 3 Tagen nur



bei der mRNA für die 30 nM Behandlung einen erhöhten Expressionslevel um das Doppelte im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 5.31 B). Die Expressionslevel der anderen Konzentrationen blieb fast unbeeinflusst. Lediglich eine kleine Tendenz zu einem erhöhten Level der Expression ließ sich für die Behandlungen mit 5 und 10 nM nachweisen.

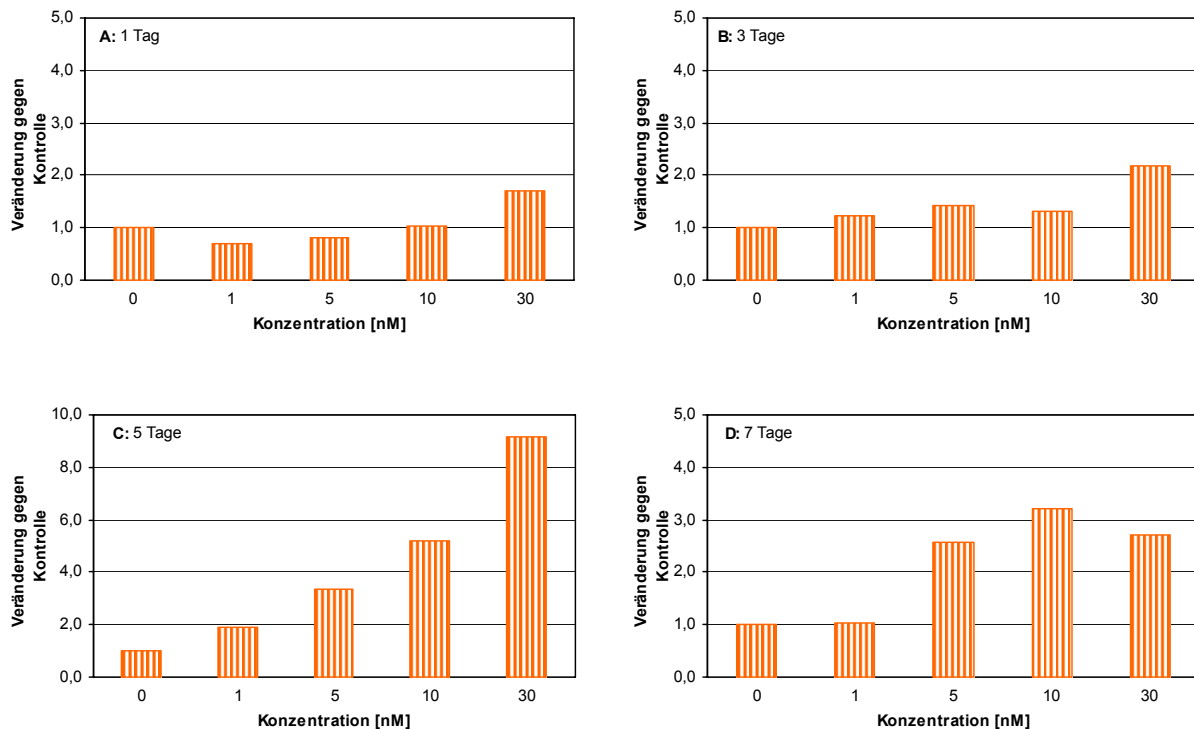
Nach 5 Tagen Exposition waren die Expressionslevel der Behandlungen mit 5, 10 und 30 nM mindestens 60 % höher als die Kontrolle (Abbildung 5.31 D). Für die Behandlung mit 10 nM war die Expression sogar um das 2,5-fache höher. Die Behandlung mit der Konzentration von 1 nM wies dagegen eine tendenziell erhöhte Expression auf. Eine weitere Verlängerung verstärkte diesen Effekt der erhöhten Expressionslevel nicht; nach 7 Tagen Exposition waren die Level der Expression für alle Behandlungskonzentrationen auf dem Niveau der Kontrolle (Abbildung 5.31 D).

### **5.3.2.2.3 Ergebnisse zur Expression der TR $\alpha$ -mRNA**

Die Abbildung 5.32 zeigte die Effekte von T3 auf die Expression der TR $\alpha$ -mRNA. Für die ersten beiden Expositionszeiträume von 1 und 3 Tagen zeigte sich für die Expression der TR $\alpha$ -mRNA ein der TR $\beta$ -mRNA sehr ähnliches Bild (Abbildung 5.32 A und B). Die Expression war außer für die Behandlung mit 30 nM relativ unbeeinflusst. Bei der Expression für die Behandlung mit 30 nM war der Level der mRNA nach einem Tag leicht erhöht und nach 3 Tagen etwa doppelt so hoch als bei den Kontrolltieren. Im Vergleich von Tag 1 und Tag 3 läßt sich ein tendenzieller Effekt hin zu einer leicht hochregulierten mRNA Expression auch für die Behandlungen mit den Konzentrationen 1, 5 und 10 nM feststellen.

In Abbildung 5.32 C wird ein Anstieg der Expressionslevel für die Behandlungen aller Konzentrationen gegenüber der Kontrolle deutlich. Dabei zeigt sich eine positive Korrelation der Expressionen mit den behandelten Konzentrationen. Die Behandlung mit der höchsten Konzentration an T3 (30 nM) wies einen 9-fach höheren Expressionslevel als die Kontrolle auf. Nach 7 Tagen Exposition war der Expressionslevel für die Behandlung mit 30 nM wieder herunterreguliert, jedoch immer noch fast 3-fach höher als der Wert der Kontrolle (Abbildung 5.32 D). Die Levels der mRNA Expressionen für die Konzentrationen von 5 und 10 nM lagen

ebenfalls gegenüber der Kontrolle etwa 3-fach höher. Die Behandlung mit 1 nM zeigte keine Beeinflussung mehr durch die Behandlung, so dass der Expressionslevel gleich dem der Kontrolle war.

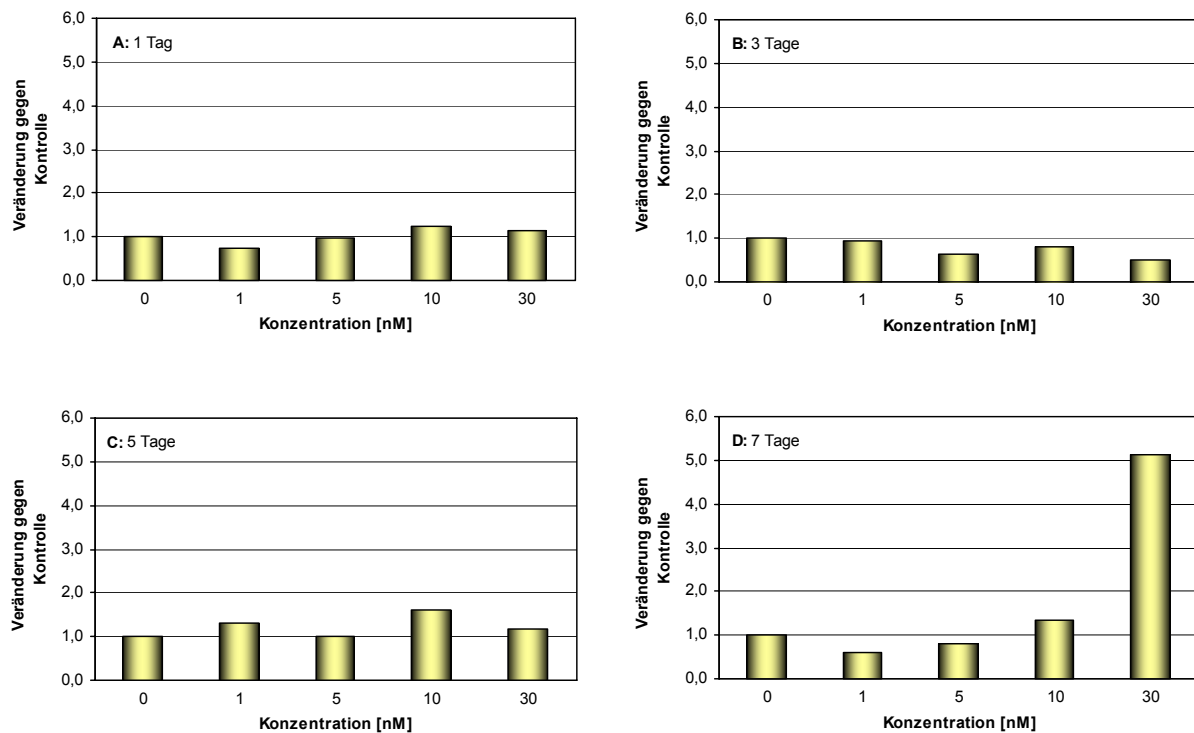


**Abbildung 5.32:** Darstellung der Effekte auf die Expression der TR $\alpha$ -mRNA nach einer *in vivo* Behandlung mit Triiodthyronin (T3) in den Konzentrationen 0, 1, 5, 10 und 30 nM zu den Expositionszeiten **A:** 1 Tag, **B:** 3 Tage, **C:** 5 Tage und **D:** 7 Tage. Jeder Balken repräsentiert das Ergebnis der real-time RT-PCR einer aus 100 Tieren gepoolten Probe. Die dargestellten Werte zeigen die mittels des internen Standards EF 1 $\alpha$  normalisierten Messwerte, wobei diese im Vergleich zu den Kontrollwerten aufgetragen wurden. EF 1 $\alpha$ : Elongationsfaktor 1 $\alpha$ , TR $\alpha$ : Schilddrüsenrezeptor  $\alpha$

#### 5.3.2.2.4 Ergebnisse zur Expression der cyp-mRNA

Die Ergebnisse zur Expression der cyp-mRNA nach einer *in vivo* Behandlung mit T3 sind in Abbildung 5.33 dargestellt. Für alle Expositionszeiträume zeigen sich bei fast allen Konzentrationen relativ geringe Beeinflussungen der Expressionslevel. Jedoch deutlich erhöht war die Expression nach der Behandlung mit 30 nM und 7 Tagen Dauer (Abbildung 5.33 D). Nach 3 Tagen Exposition lagen die Levels der

Expressionen von den Behandlungen mit 5, 10 und 30 nM niedriger gegenüber der Kontrolle (Abbildung 5.33 B). Dieser Effekt zeigte sich nach 5 Tagen Exposition nicht mehr, es konnte bei der Behandlung mit der Konzentration 10 nM sogar ein leicht höherer Level der Expression im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden (Abbildung 5.33 C).

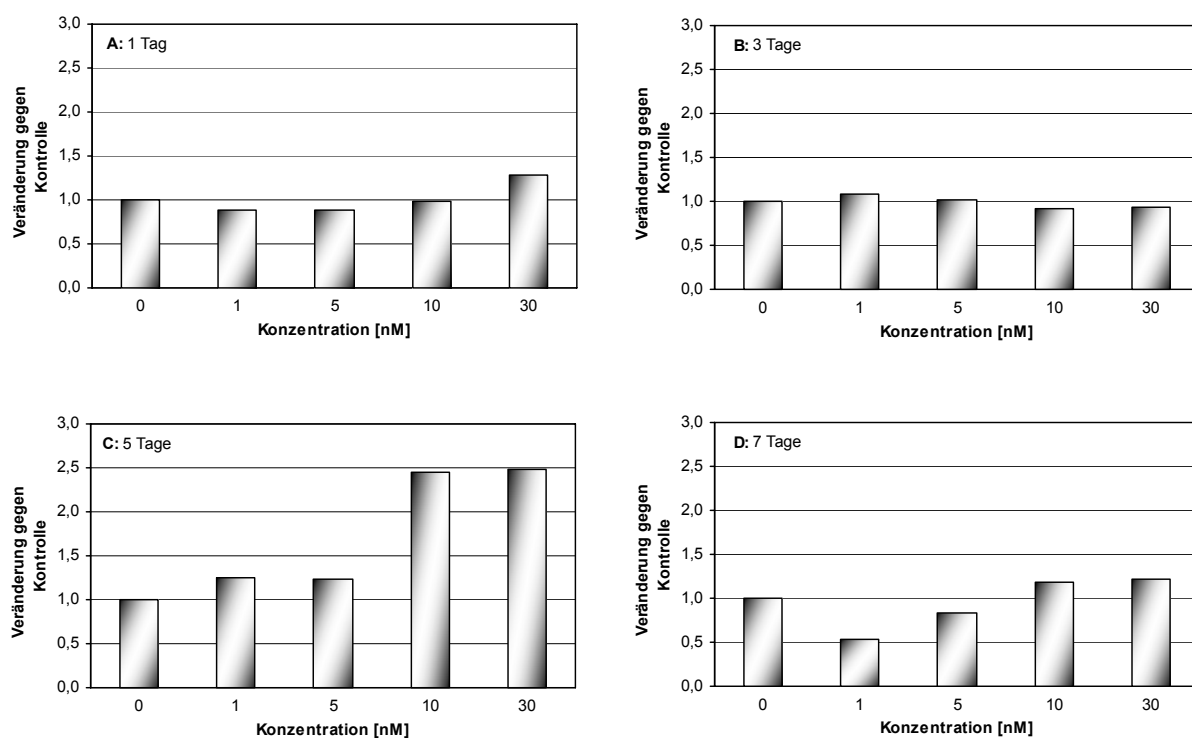


**Abbildung 5.33:** Darstellung der Effekte auf die Expression der cyp-mRNA nach einer *in vivo* Behandlung mit Triiodthyronin (T3) in den Konzentrationen 0, 1, 5, 10 und 30 nM zu den Expositionszeiten **A:** 1 Tag, **B:** 3 Tage, **C:** 5 Tage und **D:** 7 Tage. Jeder Balken repräsentiert das Ergebnis der real-time RT-PCR einer aus 100 Tieren gepoolten Probe. Die dargestellten Werte zeigen die mittels des internen Standards EF 1 $\alpha$  normalisierten Messwerte, wobei diese im Vergleich zu den Kontrollwerten aufgetragen wurden. EF 1 $\alpha$ : Elongationsfaktor 1 $\alpha$ , cyp: Cytochrom P450 1A1

### 5.3.2.2.5 Ergebnisse zur Expression der ddc-mRNA

Die Abbildung 5.34 zeigt die Ergebnisse zur Expressionsanalyse der ddc-mRNA nach einer *in vivo* Exposition mit T3. Nach Expositionszeiten von 1 und 3 Tagen konnte kein signifikanter Unterschied in der ddc-mRNA Expression zwischen den

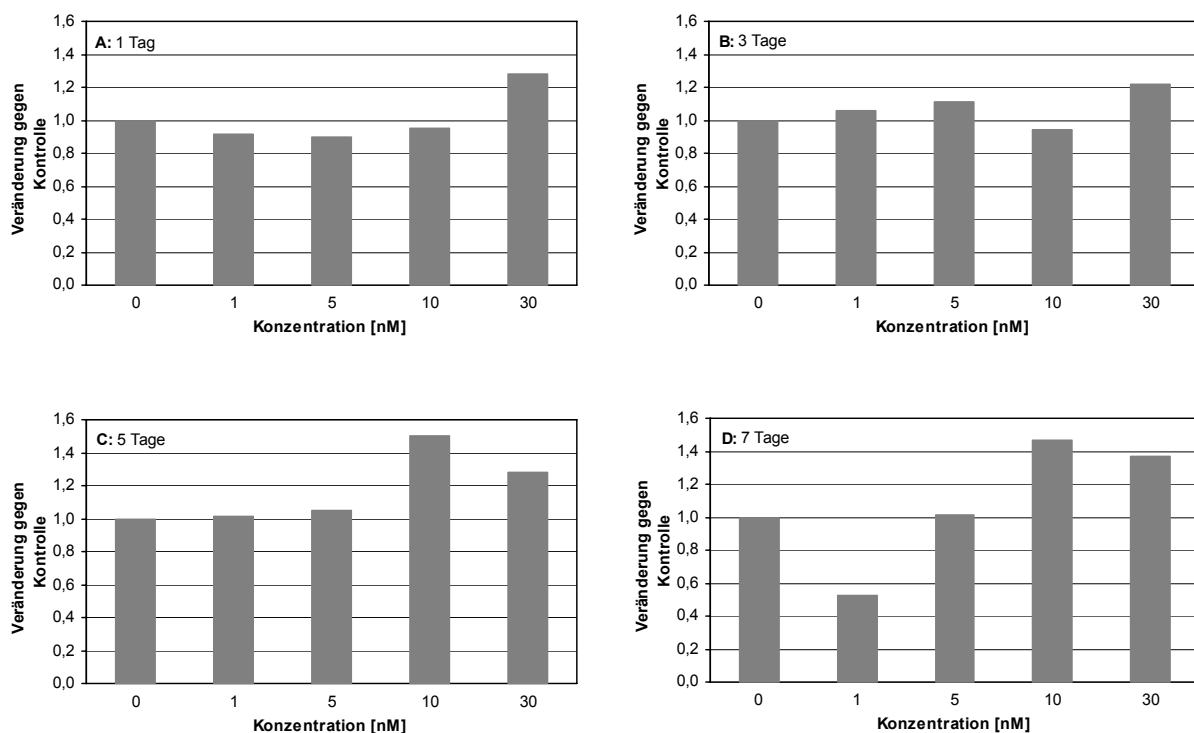
Behandlungen und der Kontrolle festgestellt werden (Abbildung 5.34 A und B). Nach 5 Tagen Exposition waren alle Behandlungen gegenüber der Kontrolle zumindest leicht erhöht. Bei den mRNAs, behandelt mit 10 und 30 nM, zeigte sich sogar eine signifikante, 2,5-fach höhere, Expressionen der mRNA im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 5.34 C). Diese beiden Konzentrationen zeigten auch nach einer Expositionsdauer von 7 Tagen noch eine tendenziell erhöhte Expression der ddc-mRNA im Vergleich zur Kontrolle. Die Behandlung mit 1 nM hatte zu diesem Zeitpunkt einen deutlich, die mit 5 nM einen leicht niedrigeren Level als die Kontrolle (Abbildung 5.34 D).



**Abbildung 5.34:** Darstellung der Effekte auf die Expression der ddc-mRNA nach einer *in vivo* Behandlung mit Triiodthyronin (T3) in den Konzentrationen 0, 1, 5, 10 und 30 nM zu den Expositionzeiten **A:** 1 Tag, **B:** 3 Tage, **C:** 5 Tage und **D:** 7 Tage. Jeder Balken repräsentiert das Ergebnis der real-time RT-PCR einer aus 100 Tieren gepoolten Probe. Die dargestellten Werte zeigen die mittels des internen Standards EF 1 $\alpha$  normalisierten Messwerte, wobei diese im Vergleich zu den Kontrollwerten aufgetragen wurden. EF 1 $\alpha$ : Elongationsfaktor 1 $\alpha$ , ddc: Dopa-Decarboxylase

### 5.3.2.2.6 Ergebnisse zur Expression der th-mRNA

Die Ergebnisse zur Expression der th-mRNA nach einer *in vivo* Behandlung mit T3 sind in Abbildung 5.35 gezeigt. Ähnlich wie für die Expression der ddc-mRNA zeigt sich bei den ersten beiden Expositionszeiträumen, außer bei der Behandlung mit der höchsten Konzentration von 30 nM, keine kennzeichnende Beeinflussung auf die Expression der th-mRNA (Abbildung 5.35 A und B). Die Expression zur Konzentration von 30 nM war gegenüber der Kontrolle leicht erhöht. Nach 5 Tagen Exposition war zusätzlich auch die Behandlung mit der Konzentration von 10 nM im Vergleich zur Kontrolle leicht erhöht (Abbildung 5.35 C).



**Abbildung 5.35:** Darstellung der Effekte auf die Expression der th-mRNA nach einer *in vivo* Behandlung mit Triiodthyronin (T3) in den Konzentrationen 0, 1, 5, 10 und 30 nM zu den Expositionszeiten **A:** 1 Tag, **B:** 3 Tage, **C:** 5 Tage und **D:** 7 Tage. Jeder Balken repräsentiert das Ergebnis der real-time RT-PCR einer aus 100 Tieren gepoolten Probe. Die dargestellten Werte zeigen die mittels des internen Standards EF 1 $\alpha$  normalisierten Messwerte, wobei diese im Vergleich zu den Kontrollwerten aufgetragen wurden. EF 1 $\alpha$ : Elongationsfaktor 1 $\alpha$ , th: Tyrosin-Hydroxylase

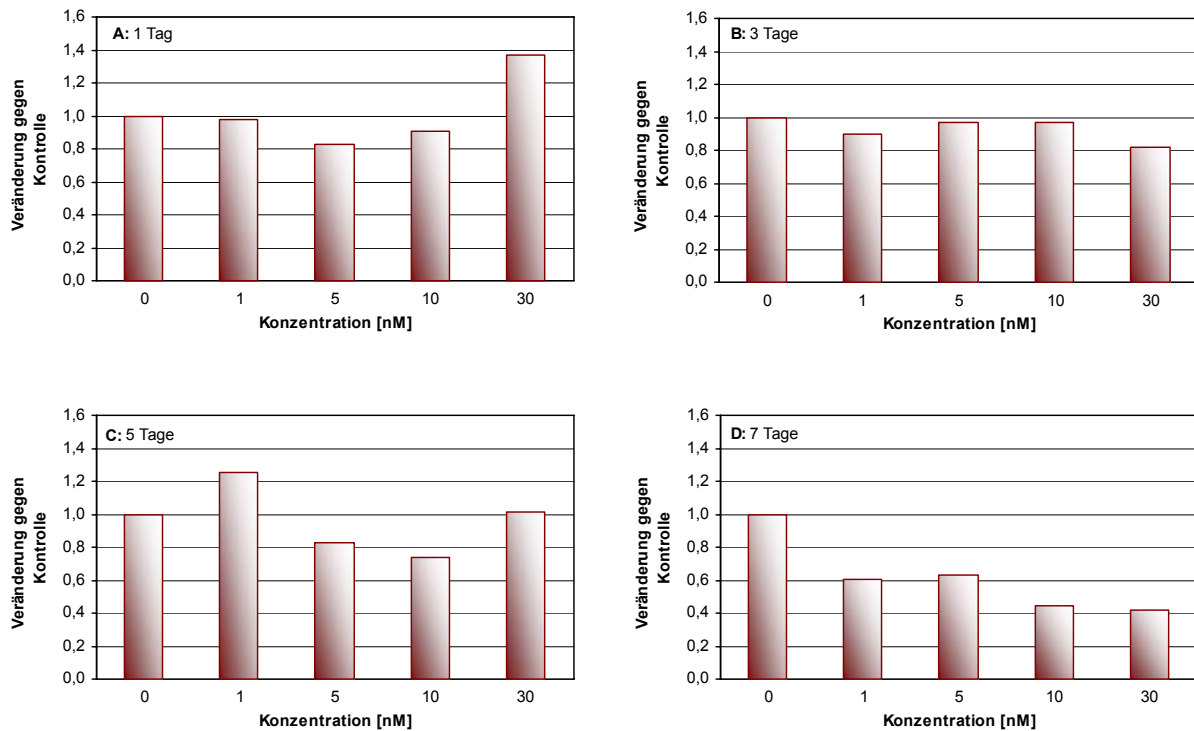
Die Expressionen der Behandlungen von 10 und 30 nM waren ebenfalls nach einer Expositionsdauer von 7 Tagen leicht erhöht (Abbildung 5.35 D). Der

Expressionslevel lag im ähnlichen Bereich wie zum Expositionszeitpunkt 5 Tage. Eine deutliche Herunterregulierung der Expression im Vergleich zur Kontrolle konnte für die Behandlung mit der Konzentration 1 nM zu diesem Zeitpunkt festgestellt werden. Die Expression der Behandlung mit 5 nM blieb dagegen unbeeinflusst.

#### 5.3.2.2.7 Ergebnisse zur Expression der $\delta\beta\text{h}$ -mRNA

Die Ergebnisse zur Expression der  $\delta\beta\text{h}$ -mRNA nach einer *in vivo* Behandlung mit T3 unterschieden sich deutlich von denen der anderen Enzyme der Stresshormonsynthese. Die Analysen zur Expression sind in Abbildung 5.36 dargestellt. Nach einem Tag Exposition konnte für die Expression der Behandlung mit 30 nM eine leichte Erhöhung des Expressionslevels im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden (Abbildung 5.36 A). Die anderen Behandlungen blieben in ihrer Expression der  $\delta\beta\text{h}$ -mRNA ohne Effekte.

Zum Expositionszeitpunkt 3 Tage zeigte sich ein ähnliches Bild, jedoch war die Expression der Behandlung 30 nM nicht mehr in der Expression erhöht, sondern der Expressionslevel lag leicht unter dem der Kontrolle. Eine Umkehrtendenz der Effekte vom Tag 3 zum Tag 5 konnte in der Abbildung 5.36 C festgestellt werden, obwohl diese Unterschiede nur sehr kleine Effekte darstellen. In Abbildung 5.36 C ist zu erkennen, dass die Expression für die Behandlungen 5 und 10 nM leicht herunterreguliert wurde und die der Behandlung mit 1 nM tendenziell leicht hoch. Die Behandlung mit 30 nM war dagegen gegenüber der Kontrolle nicht reguliert. Nach 7 Tagen Exposition waren die Expressionen aller Behandlungen niedriger als die der Kontrolle (Abbildung 5.36 D). Besonders deutlich herunterreguliert waren die Expressionen zu den Behandlungen mit 10 und 30 nM T3.



**Abbildung 5.36:** Darstellung der Effekte auf die Expression der dβh-mRNA nach einer *in vivo* Behandlung mit Triiodthyronin (T3) in den Konzentrationen 0, 1, 5, 10 und 30 nM zu den Expositionszeiten **A:** 1 Tag, **B:** 3 Tage, **C:** 5 Tage und **D:** 7 Tage. Jeder Balken repräsentiert das Ergebnis der real-time RT-PCR einer aus 100 Tieren gepoolten Probe. Die dargestellten Werte zeigen die mittels des internen Standards EF 1 $\alpha$  normalisierten Messwerte, wobei diese im Vergleich zu den Kontrollwerten aufgetragen wurden. EF 1 $\alpha$ : Elongationsfaktor 1 $\alpha$ , dβh: Dopamine- $\beta$ -Hydroxylase

### 5.3.3 Untersuchung der Genexpression mittels RAP-PCR

Für die Amplifikation zufälliger Produkte haben sich einige Methoden etabliert, zu denen Differential Display und RAPD als bekannteste gehören. Grundziel der Methoden ist, eine möglichst große Menge an DNAs, deren Sequenz nicht bekannt ist, zu analysieren. In einer ersten Studie wurden die Methoden in einem 8-wöchigen Forschungsaufenthalt an der Texas Tech University (TIEHH, Lubbock, USA) in Zusammenarbeit mit C. Theodorakis angeeignet und optimiert. Erste Veränderungen zwischen behandelten Proben und Kontrollen konnten in diesen Vorversuchen gezeigt werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine abgewandelte Methode der RAPD, die Methode des RAP-PCR, angewandt. Die Ergebnisse sind im folgenden Kapitel 5.3.3.1 dargestellt.

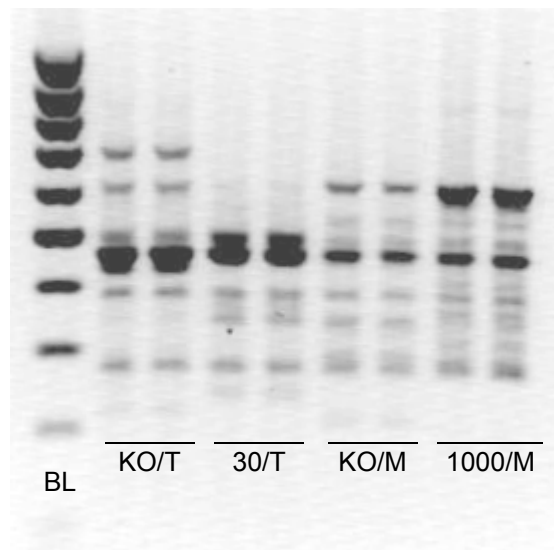
### 5.3.3.1 RAP-PCR

Für diese Untersuchung wurden Proben aus zwei unterschiedliche Behandlungen und die passenden Kontrollen dazu aus Versuchen zur Genexpression von juvenilen Fischen verwendet. Die Proben stammten aus der *in vivo* Behandlung mit 30 nM T3 und 5 Tagen Expositionsdauer und der passenden Kontrolle dazu, sowie aus der Behandlung mit 1000 µM Methimazol mit der dazu gehörigen Kontrolle. Getestet wurden 20 unterschiedliche Primer, deren Sequenz im Anhang, Kapitel 10.2, aufgeführt ist. Die Proben lagen somit als gelöste totalRNA vor. Bevor die Proben für die RAP-PCR verwendet werden konnten, wurde mit allen ein DNase-Verdau mit anschließender RNA-Isolierung durchgeführt und mittels denaturierendem Agarosegels die Reinheit sowie die Intaktheit der total RNA überprüft. Anschließend konnte mit den auf 0,5 µg/ µl verdünnten Proben die RAP-PCR Analyse (RT und PCR) durchgeführt werden. Es wurden insgesamt 20 verschiedene Primer getestet. Die Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese sichtbar gemacht. Von den 20 getesteten Primern brachten 9 keine Ergebnisse (Banden) im Agarosegel. Für die restlichen Primer konnten Muster von Banden in unterschiedlicher Anzahl und/ oder Stärke dargestellt werden.

Die Abbildung 5.37 zeigt ein ausgewähltes Gel mit kennzeichnenden Ergebnissen aus den Untersuchungen. Insgesamt konnten für die Analyse mit T3 113 Banden und für Methimazol 106 Banden amplifiziert und im Agarosegel dargestellt werden. Für die Auswertung der Bandenmuster wurden als Kriterien Unterschiede in der Anzahl der Banden und im Expressionslevel herangezogen. Dabei wurde zwischen signifikanten und schwachen Effekten unterschieden. Die Analyse aller auswertbaren Banden für die Behandlung mit T3 brachte 17 signifikante und 11 schwache Unterschiede im Bandenmuster im Vergleich mit der Kontrolle. Bei der Untersuchung zum Einfluss von Methimazol waren es 12 signifikante und 4 schwache Unterschiede. Des Weiteren konnte festgestellt werden, wie auch in der Abbildung



5.37 zu sehen, dass die Kontrollen aus den verschiedenen Behandlungen für einige Primer ebenfalls Unterschiede im Bandenmuster aufwiesen.



**Abbildung 5.37:** Darstellung eines Agarose-Gels mit den mittels RAP-PCR und dem Primer ROTH-D 13 entstandenen PCR-Produkten. BL: Bioladder als Basenpaarstandard; KO/T: Kontrolle der T3 Behandlung; 30/T: Behandlung mit 30 nM T3 für 5 Tage; KO/M: Kontrolle der Methimazolbehandlung; 1000/M: Behandlung mit 1000 µM Methimazol für 7 Tage.

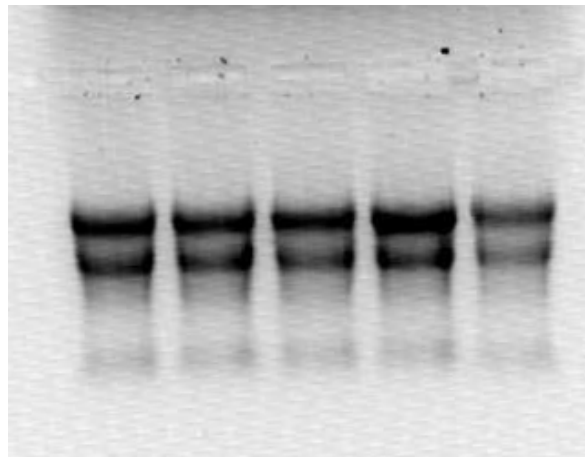
## 5.4 Methodenetablierung

Für die Untersuchungen zur Beeinflussung der Expression der verschiedenen mRNAs durch die Substanzen Methimazol und Triiodthyronin (T3) ist die Methode der semiquantitativen real-time RT-PCR, ebenso wie die RT-PCR, eine sehr sensitive Methode. Bevor diese Methoden und die Methode der RAP-PCR auf die Versuchsproben angewendet werden konnten, mussten verschiedene Parameter der RNA-Isolierung, der RT-PCR und der real-time RT-PCR, sowie der Methode zur RAP-PCR angepasst werden.

Dabei stellte sich als schwieriges Problem die Etablierung eines Methodenprotokolls für eine stabile Isolierung von RNA dar. Nach zahlreichen erfolgreichen Versuchen kam es zu Problemen, intakte total RNA aus juvenilen und adulten Zebrafischen zu isolieren. Durch Einstellung der richtigen Menge an verwendeter Trizol®-Reagenz und Verkürzung der Zeit, die für die Probennahmen benötigt wurde, konnte total

RNA in zufrieden stellender Qualität und Quantität isoliert werden. Die Abbildung 5.38 zeigt stellvertretend ein Agarosegel mit totalRNAs, isoliert mittels Trizol®-Reagenz von juvenilen Zebrafischen.

Ausgehend von einem bereits etablierten Methodenprotokoll für die real-time RT-PCR mit dem LightCycler® FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> SYBR Green I Kit (Roche, Mannheim) wurden einige Parameter der PCR verändert. Im Rahmen von Vorversuchen wurden verschiedene spezifische Primer für die PCRs und die zu untersuchenden Gene getestet. Von den Primern stellten sich die im Kapitel Material und Methoden aufgeführten und von der Firma Tib Molbiol (Berlin) synthetisierten als am besten geeignet für die spezifischen Amplifikationen dar.

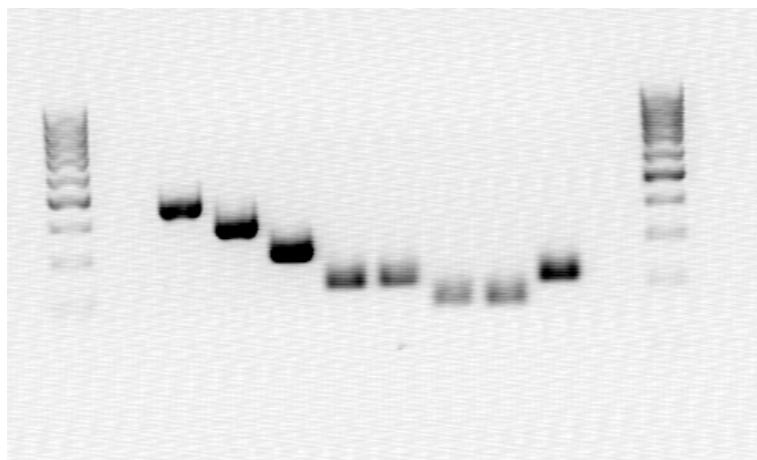


**Abbildung 5.38:** Darstellung eines denaturierenden Agarose-Gels mit totalRNA vom Zebrafisch nach einer RNA-Isolierung mittels Trizol®-Reagenz. Proben stammen aus der RNA-Isolierung zur Untersuchung des Einflusses von T3 auf die Genexpression bei juvenilen Zebrafischen nach 7 Tagen *in vivo* Behandlung.

Des Weiteren wurden verschiedene  $MgCl_2$ - und Primerkonzentrationen getestet, um möglichst keine unspezifischen Produkte in der real-time PCR zu haben. Beides führte zu keinen weiteren Verbesserungen in den PCR-Ergebnissen. In einigen Fällen zeigte sich, dass unspezifische Produktbildungen eine optimale Ausbeute in der PCR verhinderten. Damit keine PCR-hemmenden Substanzen in die Amplifikation eingebracht werden konnten, wurde daher die RT nach einigen Versuchen mittels Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) durchgeführt. Der Roche Kit für die RT war angepasst zur optimalen Amplifikation der cDNA unter Verwendung des PCR-Kits von Roche.

Außerdem wurden die Einstellungen des PCR-Programms am Roche LightCycler® hinsichtlich der Länge des Amplifikationsschrittes und der Primerspezifischen Annealingtemperatur hin optimiert. In Abbildung 5.39 verdeutlicht sich, dass diese Optimierungsschritte bei allen in dieser Arbeit untersuchten mRNAs zu spezifischen PCR-Produkten ohne unspezifische Dimere führten. Dazu wurden eine real-time PCR ohne die Schmelzkurvenanalyse durchgeführt und die Proben anschließend mittels eines 1,5 %-iges Agarosegels und Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Basenpaarlängen der amplifizierten cDNA-Teilstücken für TR $\beta$ , TR $\alpha$ , EF 1 $\alpha$ , cyp, TSH, ddc, d $\beta$ h und th entsprachen den erwarteten Längen (Siehe Kapitel 4.4.2.3.3). Die PCR-Produkte wurden mittels Gelextraktionskit (QIAquick, Qiagen, Hilden) extrahiert und nach einer Sequenzanalyse (MWG, Ebersberg) als die gesuchten cDNA Produkte identifiziert.

Ähnliche Anpassungs- und Optimierungsschritte wurden für die Methode der RT-PCR zur Untersuchung der Genexpression bei den adulten Zebrafischen und für die RAP-PCR durchgeführt.



**Abbildung 5.39:** Darstellung eines Agarose-Gels mit den real-time RT-PCR-Produkten aus juvenilen Zebrafischen für die Sequenzierung. Von links nach rechts: Bioladder, TR $\beta$ , TR $\alpha$ , EF 1 $\alpha$ , cyp, TSH, ddc, d $\beta$ h, th, Bioladder

Wichtig für eine Methodenetablierung ist die Reproduzierbarkeit der Daten. Die folgende Tabelle 5.1 zeigt die Ergebnisse der Expressionen der EF 1 $\alpha$ -mRNA aus zwei unabhängigen Untersuchungen für das „*Housekeeping Gene*“. Die dargestellten Standardabweichungen und Variationskoeffizienten zeigen, dass die Ergebnisse reproduzierbar waren und sich die Methode dadurch als stabil erwies.

**Tabelle 5.1:** Aufstellung der Expressionen der EF 1 $\alpha$ -mRNA während der Entwicklung vom *Danio rerio* in zwei unabhängigen Probenahmen, sowie der daraus resultierenden Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (SW) und Variationskoeffizienten (VK).

Entwicklungs- stadium	1.Probenahme	1.Probenahme	MW	SW	VK (%)
	EF	EF			
2hpf	16,785	18,695	17,74	1,35	8
6hpf	14,175	16,900	15,54	1,93	12
10hpf	13,140	14,710	13,93	1,11	8
18hpf	13,390	15,395	14,39	1,42	10
24hpf	13,510	15,170	14,34	1,17	8
2dpf	13,630	14,920	14,28	0,91	6
3dpf	13,690	14,970	14,33	0,91	6
4dpf	13,835	15,050	14,44	0,86	6
5dpf	13,665	14,920	14,29	0,89	6
6dpf	13,745	14,905	14,33	0,82	6
7dpf	13,300	14,270	13,79	0,69	5
8dpf	13,380	15,385	14,38	1,42	10
9dpf	13,295	14,210	13,75	0,65	5
10dpf	13,180	13,715	13,45	0,38	3
11dpf	13,100	14,445	13,77	0,95	7
12dpf	13,015	15,265	14,14	1,59	11
13dpf	13,170	14,670	13,92	1,06	8
14dpf	13,845	14,655	14,25	0,57	4
3wpf	13,260	15,060	14,16	1,27	9
4wpf	14,065	16,065	15,07	1,41	9

Zur erfolgreichen Methodenetablierung müssen des Weiteren auch die Ergebnisse innerhalb einer Probenahme, d.h. bei Wiederholung der Messung reproduzierbar sein. Tabelle 5.2 zeigt die Ergebnisse der Expression der gapdh-mRNA in zwei unabhängigen Messungen (Verdünnungsreihen). Die Ergebnisse zeigen eine sehr geringe Standardabweichung zwischen den zwei Messungen bei den verschiedenen Verdünnungsstufen.

**Tabelle 5.2:** Aufstellung der im Rahmen von Methodenoptimierungen und Methodenentwicklung erhaltenen Ergebnisse zweier Messungen der Expression der gapdh-mRNA einer Standardverdünnungsreihe, sowie der daraus resultierenden Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (SW) und Variationskoeffizienten (VK).

<b>Verdünnung</b>	<b>gapdh (1.Messung)</b>	<b>gapdh (2.Messung)</b>	<b>MW</b>	<b>SW</b>	<b>VK (%)</b>
1	17,061	17,226	17,14	0,12	0,68
1	17,010	17,206	17,11	0,14	0,81
1	17,113	17,217	17,16	0,07	0,43
1/10	20,296	20,339	20,32	0,03	0,15
1/10	20,447	20,524	20,49	0,05	0,27
1/10	20,459	20,441	20,45	0,01	0,06
1/100	23,791	23,911	23,85	0,08	0,36
1/100	23,830	23,837	23,83	0,01	0,02
1/100	23,824	23,853	23,84	0,02	0,09
1/1000	27,491	27,545	27,52	0,04	0,14
1/1000	27,419	27,422	27,42	0,00	0,01
1/1000	27,554	27,250	27,40	0,22	0,79

## 6 Diskussion

Die Erfassung und Bewertung möglicher nachteiliger Effekte von endokrin wirksamen Substanzen auf aquatische Lebewesen wird in einer zunehmenden Zahl von ökotoxikologischen Studien untersucht. Besondere Bedeutung kommt dabei der Entwicklung und Etablierung geeigneter Testsysteme zur schnellen und präzisen Gefährdungsabschätzung von *Endocrinen Disruptoren* (ED) zu. Dafür ist es jedoch wichtig, das Hormonsystem und seine Regulierungsmechanismen bei aquatischen Vertebraten weiter zu ergründen, um damit die Mechanismen, wie ED wirken, aufklären zu können.

In bisherigen Studien wurde vor allem der Einfluss von ED auf die Reproduktionsbiologie untersucht, wobei die Bewertung der Effekte von östrogen wirksamen Verbindungen auf die Sexualdifferenzierung im Mittelpunkt stand. Als ein geeignetes Studienmodell zum Nachweis von ED-Wirkungen und zur Untersuchung östrogenen Wirkmechanismen konnte das Amphib *Xenopus laevis* eingeführt werden (124, 153). Eine zweite Gruppe von aquatischen Lebewesen, die hinsichtlich der Effekte von ED auf die Reproduktionsbiologie bereits häufig untersucht wurden, stellen die Fische dar. Die wohl bekanntesten Studien zur Reproduktionsbiologie bei Fischen ist die Untersuchung zur verstärkten Produktion des Eidotterproteins Vitellogenin in männlichen Fischen (164). Weiterhin wurden Effekte von ED auf die Gonadenentwicklung und Ausbildung der sekundären Geschlechtsmerkmale bei Fischen beobachtet (91).

Im Vergleich zu den Untersuchungen zur Reproduktionsbiologie ist recht wenig bekannt zur Wirkung von ED auf das Schilddrüsensystem und auf die Entwicklung. Der überwiegende Teil der Arbeiten auf diesem Gebiet untersuchte die Einflüsse von ED bei Säugern (15, 42, 85). Trotz der frühen Beweise zur Bedeutung der Schilddrüsenhormone (TH) für die Entwicklung bei Amphibien durch Galton et al. (63) gibt es nur eine begrenzte Anzahl an Studien, die sich mit den Effekten von schilddrüsenwirksamen Substanzen bei Amphibien beschäftigen (24, 69, 70).

Bei Fischen und dem Zebrafisch im Speziellen, als dem Modellorganismus dieser Studie, wurde dagegen erst Ende der 90-iger Jahre die Rolle der TH für die Entwicklung erkannt (13). In Studien von Essner et al. (51) konnte in diesem

---

Zusammenhang mit der Untersuchung von TH und der Entwicklung auch die Rolle der TR mit den Entwicklungsstudien aufgezeigt werden.

## **6.1 Untersuchungen zur Genexpression während der Entwicklung**

Ziel dieser Studie war es, die Expression verschiedener Gene, der Schilddrüsenachse und der Stresshormonsynthese, sowie das Cytochrom P450 1A1 während der Entwicklung vom Zebrafisch mittels real-time RT-PCR zu analysieren.

### **6.1.1 Expression der Gene der Schilddrüsenachse**

Anders als bei Anuren ist die Schilddrüse bei vielen Fischen bereits sehr früh, noch vor Beginn der eigentlichen Metamorphose, funktionell entwickelt (185). Im Zebrafisch beginnt die Bildung der Schilddrüse ungefähr 40 Stunden nach der Befruchtung (hpf) (170) und die Iod-Aufnahme wird in einem Alter von 3 dpf initialisiert (13). Außerdem werden große Mengen an mütterlichen L-Thyroxin (T4) und 3,5,3'-Triiodthyronin (T3) bereits ins Ei eingelagert und es wird angenommen, dass sie wichtig für die Entwicklung und Wachstum des Embryos und der Larve vor dem Beginn der endogenen Produktion an TH sind (103). In den Ergebnissen der vorliegenden Studie zur Analyse der TSH-mRNA Expression konnte festgestellt werden, dass der erste deutliche Anstieg in der Expression genau mit der Bildung der ersten Schilddrüsenzellen einsetzte. Der Klimax dieses Anstiegs wurde mit 3 dpf als mit Beginn der Iod-Aufnahme, d.h. mit dem Beginn der Schilddrüsenfunktion und der endogenen Produktion an TH erreicht. Danach fiel die Expression wieder ab und stellte sich zumindest in der ersten Entwicklungsreihe nach einem erneuten Anstieg am Tag 7 der Entwicklung auf ein recht stabiles Niveau etwa 5 bis 10-fach über dem Ausgangsniveau ein. Bis zum jetzigen Zeitpunkt konnten keine vergleichbaren Daten zur Expression der TSH-mRNA aufgezeigt werden. Eine direkte Korrelation mit der Expression der Schilddrüsenrezeptoren TR $\alpha$  und TR $\beta$  konnte im Rahmen dieser Untersuchungen nicht festgestellt werden.

Für die TR $\alpha$ - und TR $\beta$ -mRNA kam es erst zu einer Hochregulierung in den Expressionslevel nachdem die Schilddrüse ihre TH-Synthese begonnen hatte und zwar in sehr unterschiedlicher Ausprägung. Die TR $\beta$ -mRNA wurde dabei deutlich stärker hochreguliert als die der TR $\alpha$ -mRNA. Trotz Schwankungen in der Expression dieser Gene war über den gesamten untersuchten Entwicklungszeitraum TR $\beta$  stets höher expremiert. Ein deutlicher Anstieg in der Expression für den TR $\alpha$  konnte erst nach 6 Wochen Entwicklung festgestellt werden. Ab diesem Zeitpunkt war die Expression erstmalig wieder über dem Level zu Beginn der Entwicklung und stieg dann rasch auf ein ähnliches Expressionsniveau wie die der TR $\beta$ -mRNA. Zu Beginn der Entwicklung (2 hpf) konnte für beide Gene ein deutlich höherer Expressionslevel gegenüber den nachfolgenden Entwicklungspunkten gezeigt werden. In der Arbeit von Liu et al. zeigte sich nach 3 hpf ebenfalls ein höherer Expressionslevel (121). Dagegen konnte in der Nachfolgearbeit von Liu und Chan beim Entwicklungszeitpunkt 5/ 6 hpf kein erhöhter Level der Expressionen im Vergleich zu den nachfolgend untersuchten Entwicklungspunkten aufgezeigt werden (120). Dies konnte in ähnlicher Weise in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass gemessen an der Menge von Schilddrüsenrezeptoren (TR), welche in den frühen Entwicklungsphasen der Zebrafischentwicklung (51, 121) vorhanden sind, TH's wahrscheinlich noch eine Reihe weiterer Entwicklungsprozesse, neben denen die bereits von Brown beschrieben wurden, kontrollieren (13). Wichtige Grundlage für weiterführende Studien wäre die Messung der TH—Level während der Entwicklung. Dass solche Untersuchungen zu sehr interessanten Ergebnissen führen können, zeigte sich bei Untersuchungen der T3- und T4-Level während der post-embryonalen Entwicklung des Steinbutts (*Scophthalmus maximus*) und der Flunder (*Paralichthys olivaceus*) (33, 184). In den Arbeiten konnte zwar ein hoher Level an T3 zu Beginn der Entwicklung festgestellt werden, der dann fiel, aber überraschenderweise kein T3-Peak während der Metamorphose (22 bis 30 Tag), obwohl dieser nach bisherigem Kenntnisstand bezüglich der THs eigentlich zu vermuten gewesen wäre. Das T4 hatte dagegen über den untersuchten Entwicklungszeitraum einen sehr geringen Level mit nur einem hohen Peak zum Entwicklungsklimaxstadium. Dieser Tag 30 beim Steinbutt ist der, an dem in der Metamorphose das sich verschiebende Auge seine endgültige Lage erreicht.



Für den Zebrafisch liegen bisher kaum Daten zu den TH während der Entwicklung vor. Der Grund dafür liegt wohl vor allem in der relativ neuen Erkenntnis der Bedeutung der TH und TR für Fische, die keiner solchen indirekten Metamorphose wie die Plattfische unterliegen. Jedoch sollte angemerkt werden, dass solche Fische, wie auch der Zebrafisch deutliche Anzeichen einer Metamorphose besitzen. Beim Zebrafisch kommt es zu deutlichen morphologischen Änderungen wie Veränderungen der Schwimmblase, strukturelle Veränderungen am Mund und Verdauungstrakt, sowie der Flossen und Hautpigmentierung, die die direkte Metamorphose, welche TH-gesteuert ist, deutlich machen. Ein wichtiger Grund ist natürlich auch die Fischgröße, die experimentell die Messung der TH erschwert. Bei bisherigen Studien wurde meist nur der TH-Gehalt im Blut gemessen und des Weiteren vor allem nur der freien TH. Es gibt Forschungsansätze in der Arbeitsgruppe von Prof. Schramm (GSF, IÖC), die darüber hinausgehen und in denen versucht wird, die TH-Mengen in Ganzkörperhomogenaten zu analysieren und die dabei auch die Menge an gebundenen TH berücksichtigen sollen.

In weiterführenden Studien der TH-Untersuchungen von de Jesus et al. (33) konnte zu den TRs bei der Entwicklung vom Steinbutt für den TR $\alpha$  ein starker Anstieg, mit einem Peak zum Entwicklungstag 26, während der Metamorphose gezeigt werden (127). Dieser Tag entspricht dem Zeitpunkt, wo die Migrationsgeschwindigkeit des Auges am höchsten ist. Vor und nach der Metamorphose war TR $\alpha$  in seiner Expression deutlich niedriger als zum Klimax. Im Gegensatz dazu steht die TR $\beta$  Expression, für die zu Beginn der Entwicklung eine nur sehr schwache Expression gezeigt werden konnte. Mit zunehmender Dauer der Entwicklung vom larvalen zum juvenilen Stadium stieg die Expression langsam an. Für die Flunder zeigten sich ähnliche Unterschiede in der TR $\alpha$  und TR $\beta$  Expression während der Entwicklung (207). So schien der TR $\alpha$  Level ebenfalls mit der Entwicklung zu korrelieren, jedoch zusätzlich im Gegensatz zum Steinbutt auch mit der Menge an TH.

Vergleicht man dazu die Situation bei der Metamorphose beim Krallenfrosch (*Xenopus laevis*), so zeigte sich ein sehr entgegengesetztes Bild, bei dem die Expression von TR $\beta$  und nicht TR $\alpha$  korreliert mit dem Klimax der Metamorphose und durch TH reguliert war (209). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich für den Zebrafisch, dass mit Beginn der postembryonalen Entwicklung (3 dpf) ähnlich wie

beim Krallenfrosch der TR $\beta$  hochreguliert wurde. Die Expression des TR $\alpha$  dagegen stieg langsam, vergleichbar wie für den Steinbutt der TR $\beta$ . Damit scheint der TR $\alpha$  für die Entwicklung eine eher untergeordnete Rolle zu spielen. Die Ergebnisse zeigen die Plastizität der Expression dieser Gene in Vertebraten.

### **6.1.2 Expression der Gene der Stresshomonbiosynthese und Cytochrom P450 1A1**

Bei den hier dargestellten Ergebnissen zur Expression der Gene der Stresshormonsynthese und für das Cytochrom P450 1A1 wird deutlich, dass bei allen Genen der zumeist deutliche Anstieg in der Expression mit dem Beginn der postembryonalen Entwicklung bzw. mit dem Erfolgen des Schlupfes der Larven einsetzte. Ein direkter Zusammenhang und damit eine Korrelation mit den Genen der Schilddrüsenachse konnte nicht festgestellt werden.

Für alle hier untersuchten Gene gab es vorher nur unzureichende Daten, wie und wann die Gene oder ihre Proteine bei Fischen aktiviert werden. Mittels Northern blot Analyse konnte die Cytochrom P450-mRNA (cyp-mRNA) bereits 15 h nach der Befruchtung (15 hpf) nachgewiesen werden (130). Eine Aktivität des Cytochrom P540 1A1 Proteins und Monooxygenaseaktivität zeigte sich dagegen erst 3 Tage nach der Befruchtung (3 dpf). Die Ergebnisse mittels real-time RT-PCR zeigen, dass cyp-mRNA bereits mit in der frühen Embryonalphase nachweisbar ist (Abbildung 5.5). Eine Induktion der mRNA erfolgte wie bei den Untersuchungen von Mattingly und Toscano (130) für das Protein erst mit dem Schlupf, einem signifikanten Ereignis in der Entwicklung. Zu diesem Zeitpunkt, etwa 28 bis 72 Stunden nach der Befruchtung, verlässt der Embryo die schützende Eihülle. Dies erfolgt jedoch nicht synchron bei allen Embryos. Dieses Konzept des Schlupfes oder der entsprechenden Entwicklungsereignisse korreliert mit dem Anstieg in der Cytochrom P450 1A1 Aktivität. Ähnliches wurde auch beim Schlupf der Forellen und in Säugersystemen gezeigt (125, 181).

Bei den Katecholaminen fehlen bis zu diesem Zeitpunkt Daten zu den Katecholaminen selbst und zu den Enzymen der Synthese, sowie von den mRNA's der Enzyme während der Entwicklung bei Fischen. Für Amphibien zeigte sich mittels

HPLC das die Katecholamine nicht vor dem Schlüpfen detektiert werden konnten (100). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Enzyme zur Synthese der Katecholamine ebenfalls erst nach dem Schlüpfen induziert werden, so wie es in dieser Arbeit für den Zebrafisch gezeigt werden konnte. Mit Erfolgen des Schlüpfens (2 bis 3 dpf) stiegen die Expressionen der ddc-, th- und dβh-mRNA stark an und blieben dann über den untersuchten Entwicklungszeitraum in etwa auf dem hohen Niveau. Die Rolle der Katecholamine für die Entwicklung ist aber bisher nur unzureichend aufgeklärt.

Für die Diskussion der Ergebnisse sollten zusätzlich die folgenden Punkte berücksichtigt werden. Während des Versuches war der Tierbesatz in den einzelnen Becken recht hoch. Es war zu beobachten, dass gegenüber einem geringeren Besatz die Größe der Tiere schneller zunahm und dass die Tiere früher geschlechtsreif wurden. Daher stellt sich im Zusammenhang mit den Untersuchungen zur Entwicklung die Frage, inwieweit die Tiere einem chronischem Stress ausgesetzt waren. So konnte in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden, dass Stress wie „*handling*“ Stress oder Futterstress die Konzentrationen der TH beeinflussen (35, 43, 60, 131). In der *Review*-Arbeit von Kühn et al. (102) wurde gezeigt, dass durch Stress (wie z.B. durch Hunger) die Sekretion von Glucocorticoiden angeregt wird, die zur Erhöhung von ACTH (adrenocorticotrope Hormon) führen, welches wiederum die Nebennierenrinde stimuliert. Eine Folge war der Anstieg von zirkulierendem T3. Inwieweit die Tiere aus den vorliegenden Versuchen einem solchen Stress (räumliche Enge und/ oder Futter) ausgesetzt waren, bleibt unaufgeklärt. Zum besseren Verständnis wären dazu Untersuchungen der Level der Stresshormone von großem Interesse.

## 6.2 Untersuchungen mit adulten Zebrafischen

Schilddrüsenhormone (TH) wirken auf Leber, Niere, Herz und Skelettmuskulatur, sowie auf das Nervensystem. Diese Gewebe werden gegenüber Adrenalin sensibilisiert, die Zellatmung, der Sauerstoffverbrauch und die Stoffwechselrate werden angeregt. Die Wirkungen der TH entwickeln sich langsam, so kann es nach

einem Anstieg der TH-Konzentration bis zum Sichtbarwerden der Wirkungen bis zu 48 h dauern. Bei homoiothermen Tieren (Vögel und Säugern) führt die TH-stimulierte Beschleunigung des Stoffwechsels zu einem Anstieg in der Wärmeproduktion. Die Katecholamine sind ebenfalls an der Thermoregulation beteiligt. Bei poikilothermen Tieren, wie den Fischen haben die TH nur eine begrenzte thermogenetische Wirkung. Dafür sind sie jedoch für Stoffwechsel- und, wie bereits besprochen, Entwicklungsvorgänge bedeutsam. Von TH wird zusätzlich berichtet, dass sie eine Rolle bei der physiologischen Anpassung an veränderte Umweltsalinitäten spielen, wie z. B. bei der Wanderung euryhaliner Teleostier (z. B. Lachs) vom Meerwasser ins Süßwasser. Bei einigen Knochenfischen löst die erhöhte Schilddrüsensekretion eine Präferenz für Salzwasser aus, bei anderen für Süßwasser. Damit zeigt sich, dass TH zahlreiche Aufgaben auch in den adulten Tieren aller Vertebratenklassen ausüben. Dass generell ED Auswirkungen auch auf adulte Fische haben können, wurde bereits in zahlreichen Studien gezeigt. Diese Studien bezogen sich jedoch überwiegend auf die Reproduktionsbiologie (76, 89, 97, 129, 149, 183). Dennoch lässt sich daraus die Vermutung aufstellen, dass ebenso spezielle schilddrüsenwirksame ED Effekte auf das Schilddrüsensystem und auf die Schilddrüsenhormonhomöostase bei adulten Fischen haben können. Tatsächlich wurde jedoch bisher der Einfluss von solchen Substanzen bei adulten Fisch kaum untersucht (197) Ziel dieser Studie war es, den Einfluss des schilddrüsenwirksamen Medikaments Methimazol auf die Expression der TR $\alpha$ - und TR $\beta$ -mRNA mittels RT-PCR zu analysieren, sowie mittels histologischer Studien auf die Schilddrüsenfollikel selbst.

### **6.2.1 Einflüsse von Methimazol auf die Expression der TR $\alpha$ - und TR $\beta$ -mRNA**

Bei den Untersuchungen zur Expression der TR $\alpha$ - und TR $\beta$ -mRNA nach einer *in vivo* Behandlung für 6 Wochen mit Methimazol konnten in einem Konzentrationsbereich von 0,05 bis 30 ppm in adulten Fischen keine deutlichen konzentrationsabhängigen Effekte auf die Genexpression aufgezeigt werden. Vergleichende Literaturdaten bei adulten Fischen fehlten bis zu diesem Zeitpunkt. Die meisten Studien bei adulten Fischen haben ausschließlich die zirkulierenden TH-Konzentrationen gemessen oder

untersuchten die Schilddrüsenhistologie. Bereits gezeigt wurde, dass in Säugern Methimazol ein potenter Inhibitor der Schilddrüsenperoxidase ist (23) und dass es ebenfalls die Hormonsynthese in Fischen blockieren kann (46).

Die vorliegenden Ergebnisse führten zusätzlich zu konzeptionellen Überlegungen, ob Effekte durch die Methodik der Analyse unaufgedeckt blieben. Zum einen sollte dabei die Expositionsdauer von 6 Wochen kritisch betrachtet werden. Es ist denkbar, dass Effekte in frühen Abschnitten der Behandlung aufgetreten sind, diesen jedoch auf Grund der Regulierungsmechanismen der Schilddrüsenachse entgegengewirkt wurde und somit am Ende der Behandlung nicht mehr aufzuzeigen waren.

Des Weiteren konnte in allen Proben ein nur sehr geringer Level an TR gemessen werden. Das Alter der Tiere betrug in etwa 6 Monate. In den Studien zur Expression der TRs während der Entwicklung wurde der Level an TRs nur bis zu einem Alter von 3 Monaten dargestellt. Es ist vorstellbar, dass nach Beendigung aller morphologischen Entwicklungsstadien, d.h. mit dem geschlechtsreifen Tier, die Expression an TRs wieder sinkt. Eine Schlussfolgerung daraus wäre, dass die TH und die TR keine wesentliche Rolle im adulten Zebrafisch mehr spielen und sie somit gegen exogene Eingriffe, wie in diesem Versuch, relativ unempfindlich sind. Das meiste Wissen zu den molekularen Mechanismen und Wegen, in die Störung des Schilddrüsen systems durch chemische Stressoren involviert sind, bezieht sich auf das Säugersystem. Es zeigten sich 4 Hauptmechanismen von endokrinen Störungen, wie bereits im Kapitel 2.5 aufgeführt. Methimazol beeinflusst die TH-Synthese und sollte somit zu einem geringeren Level an T3 und T4 führen. Behandlungen von verschiedenen Fischarten mit Umweltschadstoffen können sehr unterschiedliche Effekte auf die TH-Level hervorrufen. So zeigen sich nach Behandlungen in einigen Fällen niedrigere TH-Level (2, 82, 116, 179), in anderen ansteigende TH-Level (8, 59, 179, 212) oder keine Effekte (14). Bis zum jetzigen Zeitpunkt gibt es keine Studie, in der adulte Fische mit Methimazol exponiert und die TH-Level bestimmt wurden. Obwohl die Bedeutung und Funktion der TH auch für Fische bereits gut untersucht sind, ist es Tatsache, dass nur wenige Studien die Effekte von Umweltschadstoffen auf die Schilddrüsenfunktion im Detail untersuchen. Bisherige Studien sind vor allem begrenzt auf Untersuchungen von sich entwickelnden Fischen.

Einige wenige Studien untersuchen die Möglichkeit, dass endokrin wirksame Substanzen wie PCBs und PCDDs, ähnlich wie die Sexualsteroiden, ihre Wirkung über Rezeptoren (TR) vermitteln (132, 133). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie deuten darauf hin, dass Methimazol in adulten Fischen nicht bzw. nur sehr schwach, an die Rezeptoren bindet. Des Weiteren scheint es, dass es durch die Blockierung der Peroxidase zu einer Veränderung im Hormonhaushalt gekommen ist, die jedoch nicht zu Veränderungen in der Expression der Rezeptoren führte. Es bleibt zu prüfen, was dafür die Ursachen waren. Zum einen kann es sein, dass durch eine Behandlung mit Methimazol die Feedbackmechanismen dieses Schilddrüsen-Hypothalamus-Hypophysensystem nicht angesprochen wurden. Daher bestünde als Folge einer verringerten Hormonmenge durch die Blockierung der Synthese die Vermutung, dass es zu einer Herunterregulierung in der Expression der TR-mRNA hätte kommen sollen. Oder es könnte zum anderen sein, dass die Regulierung nicht auf der genetischen Ebene erfolgte. Es zeigt sich in Arbeiten, dass nicht nur in der Entwicklung, sondern auch in adulten Tieren einzelne Organe unterschiedlich an physiologischen Prozessen beteiligt sind. Es stellt sich die Frage, inwiefern einzelne Organsysteme Veränderungen in der Expression hatten. Dabei ist es möglich, dass hoch- und herunterregulierende Effekte sich überlagern und zu keinen effektiven Veränderungen im Ganzkörperhomogenat führten.

Auf Grundlage dieser Ansätze wäre es erforderlich, die Hormonverhältnisse während solch einer Exposition zu untersuchen. Dabei wäre es von Interesse, nicht nur die Plasmalevel der freien Hormone zu messen, wie es in den meisten bisherigen Studien der Fall war, sondern besonders die der gebundenen Hormone. Ansätze zur Methodenetablierung auch für den Zebrafisch finden sich bei Simon et al. (178) und Hollosi et al. (81). Zusätzlich sollte das schilddrüsenstimulierende Hormon (TSH) gemessen werden, zu dem es ebenfalls bisher keine genaueren Untersuchungen gibt.

Weitere Ansätze für zukünftige Studien bieten die konzeptionellen Überlegungspunkte in Hinsicht auf die Untersuchung von Ganzkörperhomogenaten und die Expositionsdauer. Dabei bleibt es zu klären, ob hier potentielle Effekte durch die Verwendung von Ganzkörperhomogenaten und/ oder durch die Expositionsdauer aufgezeigt werden konnten. Um diese Fragestellungen bearbeiten zu können, müssten zum einen die Expositionen wiederholt und nur einzelne Organe, wie die Leber oder das Gehirn, untersucht werden. Hormonelle Antworten auf Stressoren

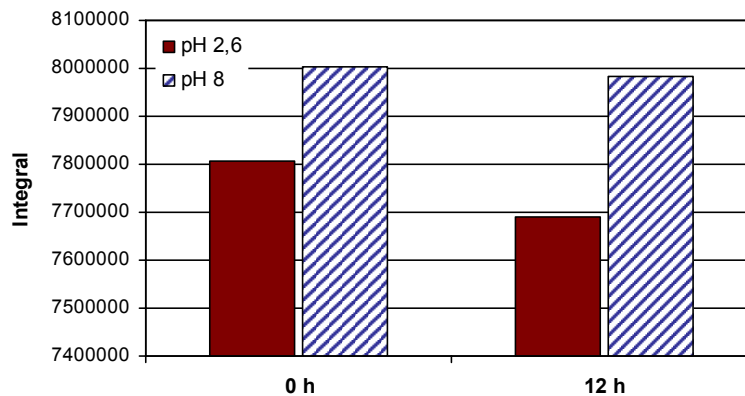
zeigen sich zwar oft erst einige Stunden später, jedoch wäre es interessant zu überprüfen, ob es während einer Exposition über einen solchen langen Zeitraum von 6 Wochen zu einem spezifischen zeitabhängigen Reaktionsverlauf kommt. Es ist durchaus möglich, dass durch die Regulationsmechanismen des Schilddrüsensystems Effekten von ED entgegen gesteuert wurde.

Als letzter Punkt sei die Expositions- und Probennahmetechnik erwähnt. Prinzipiell ist die Durchführung von Expositionen mittels Durchflussanlage eine sehr geeignete Methode durch die eine gleich bleibende Exposition mit der Testsubstanz gewährleistet wird. Die Folgen, die ein möglicher Abbau der Testsubstanz auf die Exposition und damit den Versuch hätte, werden durch eine Exposition mittels Durchflussanlage somit verringert. Die zusätzliche Aufzeichnung der Konzentrationen in geregelten Zeitabständen ist dabei unabdinglich. In der Abbildung 5.10 zeigt sich, dass im Rahmen dieser Untersuchung die Konzentrationen an Methimazol gerade zu Beginn des Versuches stark schwankten. Die Folgen auf die Ergebnisse zur Expression sind dabei kaum abschätzbar. Des Weiteren ist es unklar, in welcher Art und Weise die Probennahmen erfolgten. Da ein Teil der Tiere für die Etablierung der Methode zur Bestimmung von Methimazolkonzentration im Ganzkörperhomogenaten vom Zebrafisch dienten (80, 81), war es möglich, dass die Tiere nach dem Abtöten nicht schnell genug eingefroren wurden. Die Folge wäre, dass bereits ein unbestimmbarer Teil der RNA zerfallen sein könnte.

### **6.2.2 Einfluss von Methimazol auf die Schilddrüsenfollikel**

Für die histologischen Untersuchungen wurden Expositionen mit einem semistatischen System durchgeführt. Die Gefahr bei einem derartigen System ist, dass im Gegensatz zum System der Durchflussanlage die Substanz leichter abgebaut werden bzw. sich ans Futter oder an die Oberfläche des Expositionsgefäßes binden kann und somit nicht mehr frei im Medium für die Exposition zur Verfügung steht. Daher ist es besonders im semistatischen Expositionsregime wichtig, die Konzentrationen der Testsubstanz sowie sein Abbauverhalten zu untersuchen. In

einer Studie von Hollosi (80) konnte die Stabilität von Methimazol über einen Zeitraum von 72 h unter Versuchsbedingungen für verschiedene Konzentrationen gezeigt werden. Diese Ergebnisse sind ebenso wichtig für die Festlegung eines geeigneten Rhythmus für die Mediumserneuerung.



**Abbildung 6.1:** Darstellung der Ergebnisse zum Stabilitätstest einer 50 ppm Methimazolösung in pH 2,6 und pH 8 (80).

Für die Festlegung des Rhythmus der Mediumserneuerung ist der Tierbesatz ebenso wie die Futtermenge, sowie physikalische Parameter wie der pH-Wert von Bedeutung. Im Rahmen dieser Studie wurde bei den Expositionen der adulten Zebrafische ein durchschnittlicher pH-Wert von  $8,4 \pm 0,2$  gemessen. In einer Vorversuchsstudie wurde von Hollosi (80) die Stabilität von Methimazol bei unterschiedlichen pH-Werten bestimmt. Das Ergebnis ist in Abbildung 6.1 zu sehen. Dabei wird deutlich, dass bei einer Konzentration an Methimazol von 50 ppm und in dem für diesen Versuch relevanten pH-Wertbereich die Substanz nicht abgebaut wurde.

Während der Durchführung der Expositionsversuche wurden immer wieder die Konzentrationen an Methimazol in Medium mittels HPLC in Zusammenarbeit mit L.Hollosi überprüft. Es zeigte sich (Abbildung 5.13), dass die nominal dosierten Konzentrationen an Methimazol im Testmedium annähernd identisch mit den gewünschten Sollkonzentrationen übereinstimmten und es nur zu kleinen Schwankungen gekommen war. Messungen ohne Fischbesatz brachten identische Ergebnisse. Zusätzlich wurde innerhalb einer Studie ein Versuchsbecken ohne Fische und Wasserwechsel wie im Rest des Versuches mit analysiert. Auch in



diesem Becken entsprach die gemessene Konzentration annähernd der Sollkonzentration. Lediglich eine gering höhere Konzentration war gemessen worden, die jedoch Folge einer Aufkonzentrierung der Substanz Methimazol durch Wasserverdunstung war. Damit konnte gezeigt werden, dass zum Einen kein bzw. nur wenig Methimazol zwischen den Substanzerneuerungen im Rahmen der Wasserwechsel abgebaut wurde und Zweitens das Methimazol sich nicht oder zu vernachlässigend gering ans Futter oder die Glasoberflächen angelagert hatte.

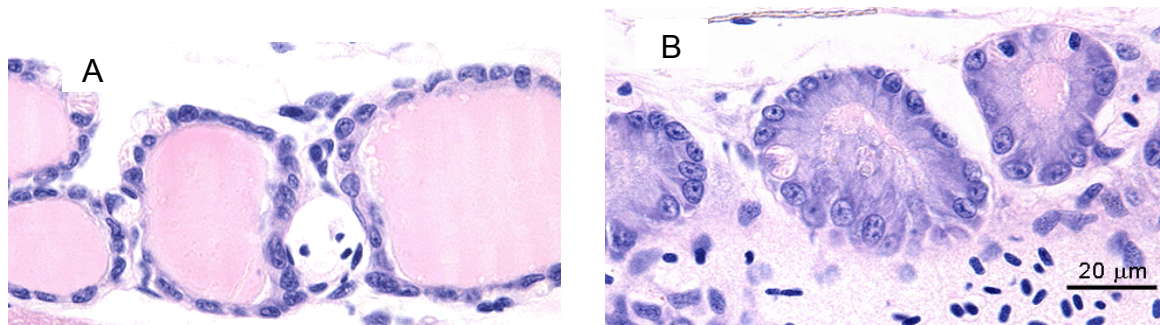
Wie oben bereits angeführt konnte in einigen Studien bereits die Wirkung von exogenen T3 bzw. von ED auf die Hormonlevel in verschiedensten Fischarten dargestellt werden. Es gibt zusätzlich einige wenige Studien über die Veränderungen in der Schilddrüsenhistopathologie (14, 197, 212). Allgemein lässt sich jedoch festzustellen, dass bei Fischen die Reaktionen der Schilddrüse auf Behandlungen mit verschiedenen Chemikalien keinen vorhersagbaren Mustern folgen (112).

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Effekte von Methimazol auf die Schilddrüse im Zebrafisch untersucht werden. Dazu wurden mehrere Expositionen von unterschiedlicher Dauer und mit verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. Konzentrationen unter 1 mM führten unabhängig von der Dauer der Exposition zu keinen Veränderungen bei den Schilddrüsenfollikeln. Erst bei Konzentrationen von 1 mM und höher konnten Substanzeinflüsse festgestellt werden. Die Follikelzellen waren aktiviert und die Follikel zunehmend entleert. Im zweiten Versuch konnte dabei zumindest für die Weibchen eine Konzentrationsabhängigkeit aufgezeigt werden. Die Männchen waren ebenfalls beeinflusst, zeigten aber keine deutliche Korrelation mit der Konzentration. Vielmehr gab es in den höheren Konzentrationen keine signifikanten Effekte. Im dritten Versuch zeigten sich bei Weibchen und Männchen zwar die gleichen oben aufgeführten Effekte für alle Konzentrationen, jedoch wiederum keine direkten Korrelationen mit der Behandlungskonzentration. Es konnte ähnlich wie bei den Männchen im zweiten Versuch festgestellt werden, dass einige Tiere, besonders in der extrem hohen Konzentration von 10 mM, keine Veränderung in der Schilddrüse aufwiesen. Die Ursache dafür ist unklar. Eindeutig war jedoch, dass die hohen Konzentrationen von über 1 mM einen deutlichen chemischen Stress für die Tiere darstellten. Dies machte sich durch ein für die Zebrafische untypisches Verhalten bemerkbar. Die Tiere waren mit zunehmender

Konzentration deutlich weniger agil und haben weniger Futter aufgenommen. Die Folge war, dass die Tiere mit andauernder Exposition immer schwächer wurden und an Gewicht verloren (Daten dazu nicht vorhanden).

Vergleichende Literaturdaten gibt es, wie bereits angeführt, kaum. In einer Arbeit von Elsalini und Rohr (49) wurden im Rahmen von Untersuchungen mit Propylthiouracil (PTU) Zebrafischlarven mit unterschiedlichen Konzentrationen an Methimazol behandelt. Es wurde mit Hilfe einer Antikörperfärbung die TH detektieren sollten gezeigt, dass bei Konzentrationen von 1,5 mM und höher die Immunoaktivität von T4 blockiert wurde. Entsprechendes konnte bei einer Konzentration von 1 mM Methimazol in einer Studie von Brown (13) gezeigt werden. In dieser konnte mit Hilfe von radioaktiv gekennzeichneten Iodionen die Hemmung des Iodeinbaus in das Schilddrüsenhormon bestimmt werden. Es bleibt also festzustellen, dass wie in der vorliegenden Arbeit übereinstimmend dargestellt Methimazol erst in sehr hohen Konzentrationen die Peroxidase deutlich blockiert.

Die in letzten Jahren wohl bekannteste histopathologische Studie zum Zebrafisch wurde von Wester et al. (197) durchgeführt. In dieser ging es um die Entwicklung einer Detektionsmethode für Umweltschadstoffe mit endokriner Aktivität in der aquatischen Umwelt. Dazu wurden verschiedene Untersuchungen im Hinblick auf allgemeine Aspekte, Reproduktion und die Histopathologie mit dem Zebrafisch durchgeführt. Eine Testsubstanz war PTU. PTU ist ein bekannter Inhibitor der Schilddrüsen synthese und wird in der Zebrafischforschung zur Unterdrückung der Pigmentierung in sich entwickelnden Embryonen verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit interessierten besonders die Ergebnisse zur Histopathologie. Ein Ergebnis von Wester et al. (197), dargestellt in der Abbildung 6.2 A und B, zeigt die Veränderung in den Schilddrüsenfollikeln durch PTU, die denen von Methimazol in der Konzentration von 10 mM stark ähnlich sehen. In der Studie von Wester et al. (197) zeigte sich ebenfalls wie in der vorliegenden Arbeit bei Methimazol, dass erst bei hohen Konzentration Effekte auf die Follikel auftraten.



**Abbildung 6.2:** Darstellung histologischer Schnitte einzelner Schilddrüsenfollikel eines Zebrafisch Weibchens nach einer *in vivo* Behandlung mit PTU für 10 Tage. **A:** Kontrolle und **B:** behandelt mit 320 mg/ L PTU (197).

Damit konnte gezeigt werden, dass Methimazol für die Schilddrüse in Zebrafischen keinen starken ED darstellt. Welche anderen Einflüsse Methimazol bei Zebrafisch z.B. auf die Reproduktion hat ist weiterhin unklar.

Ob Methimazol die Reproduktion beeinflusst war ebenfalls Teilziel der vorliegenden Arbeit. Dazu sollten die Fische getrennt nach Geschlechtern exponiert und während des Versuches mehrfach gepaart werden. Anschließend sollte die Zahl der befruchteten und unbefruchteten Eier bestimmt und ein Teil der Eier weiter bis zum Schlupf mit Methimazol exponiert werden. Ein anderer Teil sollte dagegen unbehandelt bis zum Schlupf aufgezogen werden. Damit sollte dann bestimmt werden wie viele Eier in Abhängigkeit von Methimazol befruchtet werden und wie hoch die Schlupfraten sind und ob eine Weiterbehandlung mit der Substanz noch andere Einflüsse auf die Entwicklung hervorruft. Aus diesem Grund wurden nach der Quarantänezeit die Tiere nach Männchen und Weibchen für eine Woche getrennt und anschließend gepaart (Siehe dazu auch Kapitel 4.2.2). Eine Paarung vor dem eigentlichen Versuch war notwendig um die Tiere an das Paaren zu gewöhnen. Fische die noch nie gepaart wurden brauchen einige Zeit bis sie kontinuierlich in etwa die gleichen Mengen an befruchteten Eiern ablegen. Die Paarungen sollten vor Versuchsbeginn daher mehrfach wiederholt und die Zahl der befruchteten Eier als Grundwert bzw. Nullwert bestimmt werden. Es bleibt jedoch festzuhalten, dass wiederholtes Paaren der Fische ohne Erfolg blieb, d.h. dass es keine Eier, auch keine unbefruchteten gab. Da der Zeitrahmen der Arbeit begrenzt war, musste der Expositionsversuch für die histologischen Arbeiten ohne Paarungen durchgeführt werden. Daher fehlen die Ergebnisse zur Reproduktion unter den Einfluss von

Methimazol. Die Ergebnisse zur Behandlung von Embryonen im Kapitel 5.3.1.1 zeigen jedoch zumindest, welchen Einfluss Methimazol auf die Entwicklung der Embryonen und die Schlupfrate hatte. Für weiterführende Arbeiten auch im Zusammenhang mit der Untersuchung anderer ED wäre die Wiederholung des Versuchs von Bedeutung. Mit diesem Versuch könnten die Vermutungen über die Bedeutung der TH im Rahmen der Reproduktion und über das Zusammenwirken verschiedener endokriner Systeme weiter erforscht und aufgeklärt werden.

Die Ursachen für die nicht erfolgreiche Paarung können kaum geklärt werden, da unter anderem die Tiere nicht aus der eigenen Nachzucht kamen. Die Aufzuchtbedingungen waren im Gegensatz zu den Tieren, die sonst in den Versuchen verwendet und selber aufgezogen wurden bzw. die aus der Aufzuchtanlage von Dr. Bally-Cuif stammen (auf dem Gelände des GSF-Forschungszentrums), nicht genau bekannt. Außerdem ist es möglich, dass die Regenerationszeit der Tiere zwischen Lieferung und Paarungsversuche nicht ausreichte bzw. es zu Verstopfungen im Eikanal bei den Weibchen gekommen sein kann.

### **6.2.3 Bestimmung der Methimazolkonzentration im Ganzkörperhomogenat mittels HPLC**

Zur Diskussion der Ergebnisse aus der Genexpressionsversuchen und den histopathologischen Untersuchungen war es wichtig die Menge an Methimazol zu bestimmen, die in das Gewebe aufgenommen wurde. Die Frage war, welche Menge an Methimazol im Gewebe verfügbar ist, die das endokrine System beeinflussen könnte. Die Versuche dazu wurden in Zusammenarbeit mit Dr. L.Hollosi durchgeführt, der die exponierten Proben mittels HPLC gemessen hat. Exponiert wurden männliche und weibliche Zebrafische mit Methimazol im Konzentrationsbereich von 10 bis 300  $\mu\text{M}$  für 5, 10 und 15 Tage. Tendenziell zeigte sich, dass in den Männchen mehr Methimazol eingelagert wurde und eine längere Expositionszeit die Menge an Methimazol im Fisch nicht deutlich erhöhte. Die Ursachen sind nicht eindeutig. Daten in der Literatur gab es bis zu diesem Zeitpunkt keine. Zum einen könnte es sein, dass sich die hydrophile Substanz Methimazol in

die Muskulatur einlagerte. Da Weibchen im Verhältnis zu den Männchen mehr Fett als Muskelmasse besitzen, könnte darin die unterschiedliche Konzentration begründet sein. Der überwiegende Anteil des Methimazols ist jedoch wohl in der Gewebeflüssigkeit und vor allem im Blut zu finden. Anhand des ermittelten Biokonzentrationsfaktors (BCF) konnte außerdem festgestellt werden, dass besonders bei der niedrigen Konzentration von 10 µM für die Expositionszeiten von 5 und 15 Tagen sich prozentual deutlich mehr Methimazol in den Fischen befand als bei den höheren Konzentrationen. Ob dieses Ergebnis tatsächlich ein Substanzeffekt darstellt, oder auf Messungenauigkeiten beruhte lies sich im Rahmen dieser Studie nicht klären. Weitere Untersuchungen mit höheren Tierzahlen und weiteren Konzentrationzbereichen sollten durchgeführt werden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse deutlich wie wichtig multidisziplinäre Versuchsansätze in allen Bereichen der Forschung sind, jedoch vor allem in der Ökotoxikologie- und ED-Forschung. Ohne zusätzliche Daten aus unterschiedlichen Analysemethoden lassen sich Ergebnisse oft nur schwer eindeutig deuten.

### **6.3 Untersuchungen mit juvenilen Zebrafischen**

Im Zebrafisch sind die augenscheinlichsten Veränderungen, während der Umwandlung von der Larve zum juvenilen Fisch, die Veränderung der Flossen, das gestreifte Muster und die Bildung von Schuppen. Durch Zugabe von exogenem TH wird die unreife Differenzierung der pectoralen Flossen induziert und die Bildung der Afterflosse beschleunigt. Dagegen führt eine Inhibierung der TH-Synthese zur Hemmung der Umwandlung von Larve zum juvenilen Zebrafisch. Mit der Studie von Brown (13) konnte die Bedeutung der TH endlich auch für die Entwicklung bei den Fischen wie dem Zebrafisch bewiesen werden. Die Folge war, dass ab dieser Zeit die Fische wieder mehr ins Interesse der ED-Forschung rückten. In einigen Arbeiten wurde gezielt die Aufklärung der genauen Funktionsweise des Schilddrüsensystems und der Rolle der TH in der Entwicklung der Fische in den Mittelpunkt gestellt (88, 104, 120, 162). Bisher gibt es jedoch nur wenige Studien sich mit den Effekte von ED auf die Schilddrüsenfunktion im Detail beschäftigen. Ziel der vorliegenden Studie war

es die Wirkungen von Methimazol und T3 auf sich entwickelnde Zebrafischlarven zu untersuchen.

### **6.3.1 Einflüsse von Methimazol, T3 und BPA auf die Entwicklung vom Zebrafisch**

In einem ersten Teilabschnitt der Arbeit wurden Embryonen des Zebrafisches mit Methimazol und T3 behandelt. Diese Expositionen dienten dafür zu bestimmen, ob die eingesetzten Konzentrationen in den *in vivo* Test zur Genexpression keine direkten toxischen Effekte laut Definition für ED hervorriefen. Es zeigte sich, dass bei allen getesteten Konzentrationen für Methimazol (10, 100 und 1000  $\mu\text{M}$ ), sowie für T3 (1, 5, 10 und 30 nM) es zu keinen deutlich erkennbaren Effekten auf die Entwicklung gekommen ist. Alle Larven entwickelten sich im untersuchten Zeitfenster wie die Kontrolltiere. Damit waren die Konzentrationen der Testsubstanzen in einem nicht toxisch Bereich und somit geeignet für die Untersuchungen als ED. Was mit dieser Arbeit nicht geklärt werden konnte war, ob die Untersuchungen eventuell in einem zu niedrigen Konzentrationsbereich erfolgten. Diese Frage konnte zum Teil im zweiten Teil dieses Versuches, sowie in den Analysen zu Expression verschiedener mRNAs nach weiteren *in vivo* Behandlungen mit den Testsubstanzen (Kapitel 5.3.2) näher erörtert werden.

Im zweiten Teil sollte durch die Expositionen mit höheren Konzentrationen, als im *in vivo* Test zur Genexpression, die Wirkungen der Substanzen Methimazol und T3 auf die Entwicklung analysiert werden. Zusätzlich wurden die Embryonen mit Bisphenol A (BPA) exponiert. BPA ist ein bekannter sehr potenter östrogenener ED und wird in der Industrie unter anderem für die Herstellung von Plastikprodukten, einschließlich vieler Arten von Nahrungs- und Getränkebehälter, Konserven und in der Zahntechnik verwendet. Bereits 1936 wurde von BPA als Substanz mit östrogenen Wirkung berichtet (40, 41).

Bis zum jetzigen Zeitpunkt gab es keine Literaturdaten zur Toxizität von BPA in der Entwicklung vom Zebrafisch. Aus einigen Arbeiten ist jedoch bekannt das bereits sehr niedrige Mengen an BPA im ng/ml Bereich das endokrine System bei Fischen beeinflussen konnten (190, 192). Daher diente der Versuch unter anderem auch erst

einmal dazu die Grenze der Toxizität von BPA für Zebrafischlarven festzustellen. Dafür wurden die Konzentrationen 1, 10 und 100  $\mu\text{M}$  getestet. Es konnte festgestellt werden, dass BPA bereits in Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$  zu Entwicklungsstörungen führte und dass die Embryonen bis zum Alter von 72 hpf ohne zu Schlüpfen abgestorben waren. Nur die Tiere in der Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  wiesen keine Störungen auf und entwickelten sich wie die Kontrolltiere. Aus diesem Grund sollten für weiterführende ökotoxikologische Untersuchungen und Untersuchungen von BPA als ED im Zebrafisch stets Konzentrationen unterhalb bis maximal 1  $\mu\text{M}$  verwendet werden.

Für die Exposition mit Methimazol in den höheren Konzentrationen (1 und 5 mM), als für die Genexpressionsanalysen, konnte gezeigt werden, dass die Embryonen sich anfänglich normal entwickelten. Nach 48 h Exposition waren die mit 5 mM behandelten Embryonen zunehmend in ihrer Entwicklung gegenüber den Kontrolltieren verzögert. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass die Tiere nicht schlüpften und im weiteren Entwicklungsverlauf ab einem Alter von 5 dpf starben. Die Ursache dieser Mortalität liegt wohl vor allem am ungenügenden Sauerstoff, der durch die Eihülle diffundieren konnte bzw. da mit einem Alter von 5 dpf der Eidottersack als Nahrungsvorrat aufgebraucht war am Futtermangel. Da ansonsten keine Störungen sichtbar wurden, scheinen diese Ursachen am Wahrscheinlichsten, zumal die Behandlung von geschlüpften Tieren mit der identischen Konzentration zu keinen deutlich sichtbaren Störungen in der Entwicklung führte.

In Studien von Elsalini und Rohr (49) konnten ähnliche Beeinträchtigungen in der Entwicklung bei hohen Methimazolkonzentrationen dargestellt werden. Bei Konzentrationen von 1,5 mM gab es bereits Verzögerungen im Schlupf und nur 25 % der Tiere schlüpften überhaupt. Weiterhin wurden die Konzentrationen 3 und 6 mM getestet. Schon bei 3 mM war die Schlupfrate mit gerade 3% nahe null und ähnlich wie in der vorliegenden Studie schlüpfte bei der Konzentration von 6 mM kein Tier mehr.

Bei der Exposition mit T3 wurden die Konzentrationen 10, 100 und 1000 nM getestet. Für die Konzentrationen 100 und 1000 nM zeigten sich schnell sichtbare Einflüsse auf die Entwicklung wie geringere Pigmentierung und Missbildungen. Mit zunehmender Expositionsdauer konnten immer mehr Einflüsse, auch für die Konzentration von 10 nM, festgestellt werden. Die Tiere wiesen Verkrümmungen des

Körpers und Beeinträchtigungen in der Motorik auf und mit zunehmender Expositionsdauer und Konzentration starben die Tiere ab.

Im Rahmen der Versuche zur Genexpression mit den juvenilen Zebrafischen wurden verschiedene Entwicklungsphasen mit T3 behandelt. Zum einen wie in der Arbeit angeführt ab 2 dpf und zum anderen ab einem Alter von 7 dpf. Dazu kommt der hier geschilderte Entwicklungsversuch ab 2 hpf. Es zeigte sich, dass bei einer Exposition ab 2 dpf, zumindest auf die Expositionen mit T3, die Larven deutlich sensibler reagierten, als bei einer Behandlung ab einem Alter von 2 hpf (grafisch nicht dargestellt). Die Tiere behandelt ab einem Alter von 2 dpf wiesen bereits bei den Konzentrationen von 50 und 100 nM motorische Beeinflussungen in der Entwicklung auf und starben ebenfalls ab dem Tag 5 der Exposition, also mit zunehmender Expositionsdauer. Noch sensibler waren die Larven exponiert ab einem Alter von 7 dpf. Bei diesem Alter reichte eine Expositionsdauer von 3 bis 4 Tagen bis in den Konzentrationen von 50 und 100 nM die Larven gestorben waren. Zusätzlich waren auch die Konzentrationen von 10 nM stark beeinflusst und nach 7 Tagen Exposition der überwiegende Anteil der Larven gestorben. Daher lässt sich vermuten, dass es bei Larven unterschiedlich sensitive Phasen in der Entwicklung gibt. Vergleichende Literaturdaten dazu fehlen. Bei Amphibien deuten Arbeiten von Miyata et al. (139) und Rabelo et al. (165) zumindest darauf hin, dass Unterschiede in der Sensitivität von Kaulquappen gegenüber (anti)östrogenen Substanzen, während der verschiedenen Abschnitte der Larvalentwicklung bestehen. Die Unterschiede in der Sensitivität bei den Tieren behandelt ab 2 hpf bzw. ab 2 dpf zeigen den Einfluss der Schilddrüse auf. Mit einem Alter von 60 hpf wird die Schilddrüse erst funktional und es beginnt die endogene Schilddrüsenhormonproduktion, die entscheidend für alle nachfolgenden Entwicklungsvorgänge ist.

### **6.3.2 Einflüsse von Methimazol und T3 auf die Genexpression**

#### **Schilddrüsenachse**

ED können über verschiedene Mechanismen auf Organismen wirken. Bei östrogen wirksamen Substanzen hat sich in zahlreichen Arbeiten gezeigt, dass sie direkt auf die Rezeptoren wirken in dem sie die Funktion der natürlichen Hormone nachahmen



oder ihre Funktion blockieren und damit die transkriptionale Aktivität des Rezeptors beeinflussen (96, 124, 180). Nur wenige Studien untersuchten bisher die Möglichkeit der Beeinflussung der Schilddrüsenfunktion von schilddrüsenendokrinen Substanzen vermittelt durch die Schilddrüsenrezeptoren (25, 132, 133).

Bei Veränderungen in der natürlichen Schilddrüsenhormonhomöostase kommt es durch verschiedene Mechanismen zur Gegenregulation in der Hormonsynthese. Bei diesen Mechanismen wird nach einem Absinken im TH-Level TSH vermehrt ausgeschüttet. Dieses führt in der Schilddrüse zum Anstieg in der TH-Produktion und TH-Freisetzung. Die Freisetzung an TSH wird zum einen durch die Sekretion des *TSH-releasing Factors* (TRH) gesteuert, aber auch direkt durch den Gehalt an zirkulierenden Schilddrüsenhormonen. Man spricht dabei von einem chemischen Regulationsmechanismus.

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen sollte analysiert werden, welchen Einfluss die Substanz Methimazol als Hemmer der Schilddrüsenperoxidase und somit der Schilddrüsenhormonsynthese auf die Expression der TSH-mRNA hat. Des Weiteren galt es zu untersuchen, ob die Substanzen ebenfalls, ähnlich wie bei den (anti)östrogen oder (anti)androgen wirkenden ED die Östrogen- und Androgenrezeptoren, die Schilddrüsenhormonrezeptoren  $TR\alpha$  und  $TR\beta$  beeinflussen. Die Auswirkungen von zusätzlichem TH sollte durch die Exposition mit exogenem T3 analysiert werden. T3 ist das im Organismus aktive Hormon und ein Überschuss an T3 führt im Regelkreis der Schilddrüsenachse zu einer Hemmung der TSH Ausschüttung. Die Folge von Behandlungen mit ED auf die Expressionen der TSH-mRNA und vor allem auf die beiden Schilddrüsenrezeptoren  $TR\alpha$  und  $TR\beta$  war bis zu diesem Zeitpunkt in der Literatur kaum beschrieben.

In den vorliegenden Ergebnissen zeigten sich sehr unterschiedliche Veränderungen nach den Expositionen mit Methimazol und T3 in den Expressionen der untersuchten Gene (TSH,  $TR\alpha$  und  $TR\beta$ ). Besonders die Behandlung mit Methimazol wies unabhängig von den Konzentrationen und den Expositionszeiten eine Beeinflussung in der Genexpressionen auf; die Expressionen schwankten stark. An einem Expositionstag waren die Level deutlich herunter reguliert und zu den nächsten Untersuchungszeitpunkten kehrte sich dieser Effekt wieder um. Diese Effekte wurden für alle Untersuchungen und alle untersuchten Gene deutlich. Die Ursachen können vielfältig sein und waren im Rahmen dieser Arbeit, auch auf Grund der

Tatsache, dass es bis zu diesem Zeitpunkt kaum vergleichende Literaturdaten dazu gab, nicht eindeutig klärbar. In einer Studie von Liu et al. (120) wurde beim Zebrafisch ebenfalls die Wirkung von Methimazol auf die Expression der TR $\alpha$ - und TR $\beta$ -mRNA untersucht. Nach einer Exposition mit Methimazol (0,3 mM) von frisch geschlüpften Zebrafischlarven bis zum Alter von 5 dpf zeigte sich, dass die Expression von TR $\alpha$ - und TR $\beta$ -mRNA nicht wesentlich beeinflusst wurde. Weiterführende Untersuchungen zu verschiedenen Konzentrationen und Expositionszeiträume fehlten in dieser Studie von Liu et al. (120).

Bei den Behandlungen mit T3 zeigte sich ein deutlicher Anstieg in der Expression für die TR $\alpha$ -mRNA nach den Expositionen von 5 und 7 Tagen besonders für die Konzentrationen 5, 10 und 30 nM. Die TR $\beta$ -mRNA war nach der Behandlung mit T3 vor allem nach 5 Tagen erhöht und in der höchsten Konzentration für den 3. Expositionstag. Der Anstieg war jedoch in der Expression insgesamt nicht so deutlich wie für die TR $\alpha$ -mRNA. Dagegen war die Expression für die TSH-mRNA ab dem 5. Tag der Exposition herunter reguliert, mit einer Ausnahme für die höchste Konzentration von 30 nM nach 7 Expositionstagen, wo diese deutlich hoch reguliert war. In der Studie von Liu et al. (121) konnte ebenfalls ein Hochregulierung der Transkription der TR $\alpha$ - und TR $\beta$ -mRNA durch Behandlungen mit T3 festgestellt werden. Behandelt wurden frisch geschlüpfte Zebrafischlarven mit 5, 50 und 100 nM T3 für 48 h.

In der vorliegenden Studie führte eine Behandlung mit T3 in der ersten Probennahme (ein Tag Behandlung; Alter 3 dpf) zu keinen Veränderungen in der Transkription der TR $\alpha$ - und TR $\beta$ -mRNA. Dieser Zeitpunkt entspricht einer sehr frühen Entwicklungsphase, wo die Schilddrüse noch nicht aktiv ist und auch der Eidottersack noch nicht zurück gebildet worden ist. Es wurde angenommen, dass der Eidottersack nicht nur ein Nährstoffreservoir darstellt, bis sich der Mund und Verdauungstrakt auf exogene Nahrungsaufnahme eingestellt hat, sondern auch essentielle Quelle von TH ist, bis die Schilddrüse ihre Funktion aufgenommen hat (31, 103). Es kann daher vermutet werden, dass das zusätzliche exogen zugeführte T3 den Level an aktiven T3 nicht wesentlich erhöhte und somit zu keiner Veränderung der Transkription führte. Außerdem gibt es bis zum jetzigen Zeitpunkt keinerlei Studien, die etwas zu den tatsächlich aktiven Konzentrationen in den

Gewebe an T3 nach Expositionen aussagen. In bisherigen Studien wurde nur der Level an freiem T3 im Blut gemessen.

### **Cytochrom P450 1A1**

Die Cytochrom P450 Enzyme bestehen aus einer großen Familie von verwandten Enzymen, welche die Aktivierung und Insertion von Sauerstoff in verschiedensten Substraten katalysieren. Liganden des Ah-Rezeptors induzieren Mitglieder der Cytochrom 1 Unterfamilie von Enzymen wie das Cytochrom P450 1A1. Es wird angenommen, dass die Induktion der Cytochrom P450 1A1 Aktivität wichtige physiologische Reaktionen in Hinsicht einer schützenden Rolle gegenüber toxischen Substanzen in Organismen hervorruft. Die Induktion der cyp-mRNA und cyp-Aktivität erfolgt gewöhnlich innerhalb von Stunden nach einer Behandlung mit Liganden, die an den Ah-Rezeptor in adulten Systemen der meisten Spezies binden können (169, 200). Dennoch, die Induktion der Cytochrom 1A1 in sich entwickelnden Organismen ist bisher nicht ausreichend untersucht.

In dieser Arbeit wurde bereits der Level an cyp-mRNA während der Entwicklung analysiert. In diesem Teil der Studie sollte festgestellt werden, ob T3 oder Methimazol Einfluss auf die Transkription der cyp-mRNA haben und ob es Gemeinsamkeiten in der Expression und Regulierung anderer in der Arbeit untersuchter Gene gibt. Bei Behandlungen mit T3 und Methimazol konnte nur nach einer Expositionszeit von 7 Tagen und in den Konzentration von 1 und 1000  $\mu\text{M}$  bei Methimazol bzw. bei 30 nM T3 eine Erhöhung im Expressionslevel festgestellt werden. Bei T3 war diese Erhöhung besonders ausgeprägt! Obwohl einige Studien auf die Rolle von Cytochrom P450 1A1 in der Entwicklung hindeuten, gibt es wenige direkte Beweise für die funktionale Aktivität während der Embryogenese (90, 94, 125). Daten von Mattingly und Toscana (130) deuten darauf hin, dass während der Entwicklung das Cytochrom P450 1A1 Protein und seine Aktivität stillgelegt sind. Es wird vermutet, dass dies ein Schutz gegenüber den Effekten von Ah-Rezeptor-Liganden (Arylhydrocarbonrezeptor-Liganden) oder anderen Signalmolekülen aus der Entwicklung sein könnte. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass in Abhängigkeit von der Konzentration T3 und Methimazol an den Ah-Rezeptor binden und somit die Transkription der cyp-mRNA beeinflussen! Zur besseren Analyse der Ergebnisse fehlen jedoch Daten zur

Expression des Cytochrom 1A1 Proteins nach einer solchen Behandlung mit Methimazol bzw. T3.

Als weiterer Hemmer der Schilddrüsenhormonsynthese ist neben Methimazol Propylthiouracil (PTU) bekannt. Es wird in der Zebrafischforschung zum Blockieren der Melaninsynthese und dem Verhindern der Pigmentbildung während der Entwicklung benutzt (138). PTU wirkt aber auch als schwacher Aktivator der Ah-Rezeptor-Kaskade. Der Ah-Rezeptor hat ansonsten hohe Affinitäten zu HAHs (halogenated polycyclic aromatic hydrocarbons), PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons) und TCDD (2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin) (36, 37, 173), was zu verschiedensten toxischen und biologischen Effekten führt. Durch eine Aktivierung des Ah-Rezeptors durch PTU kam es zu einer schwachen Induzierung der cyp Transkription (194).

Im Vergleich der Expressionen konnte festgestellt werden, dass die Menge an cyp-mRNA nach den Behandlungen mit Methimazol und T3 stets ähnlich der von TSH-mRNA war. Deutlich wurde dies vor allem in den oben besprochenen Erhöhungen in der Transkription für die cyp-mRNA. Diese Erhöhungen konnten für identische Konzentrationen ebenfalls für die Expression der TSH-mRNAs gezeigt werden. Eine genaue Interpretation dieser Ergebnisse lässt sich an dieser Stelle noch darlegen. Es ist zu vermuten, dass die Regulierung der Transkription der TSH- und cyp-mRNA in ähnlicher Weise konzentrationsabhängig ist. Vergleichende Literaturdaten dazu fehlen bis zu diesem Zeitpunkt.

### **Stresshormonsystem:**

Das Stresshormonsystem und vor allem die Expression der Enzyme der Stresshormonbiosynthese (Tyrosin-Hydroxylase (th), Dopa-Decarboxylase (ddc) und die Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase (d $\beta$ h) sind bisher nur unzureichend untersucht worden. Einflüsse von chemischen Stressoren bezogen sich in der Literatur vor allem auf die Langzeiteffekte und somit auf die Corticosteroide. Die Katecholamine wurden bisher mit solchen Effekten nicht in Verbindung gebracht. In dieser Studie sollte getestet werden, ob kurzzeitige Expositionen mit Methimazol und T3 zur Beeinflussung der Genlevel der Enzyme führen und Zusammenhänge zwischen dem Schilddrüsen- und dem Stresshormonsystem festgestellt werden können.

Bei den Untersuchungen zu den Expressionsleveln zeigte sich eine Regulierung der Expressionen zu Beginn der Exposition für alle Konzentrationen und alle untersuchten Gene. Nach 7 Tagen Behandlung waren jedoch fast keine Unterschiede mehr zwischen den Behandlungen und den Kontrollen erkennbar. Diese Ergebnisse können durch die bekannten Regulationsmechanismen für akuten Stress gedeutet werden, bei dem erst die Stresshormone Noradrenalin und Adrenalin ausgeschüttet und bei anhaltendem Stress dann die erhöhten Level der Stresshormonen wieder abgebaut werden. In weiterführenden Studien sollten Messungen der tatsächlichen Menge an Stresshormonen durchgeführt und zusätzlich versucht werden die Expression der Corticosteroide auf RNA und Proteinebene zu bestimmen. Grundsätzlich zeigen jedoch die Ergebnisse, dass die getesteten Konzentrationen an Methimazol vom Organismus als chemischer Stressor erkannt worden sind!

Die Ergebnisse nach den Expositionen mit T3 waren nicht so eindeutig. Zum Teil konnte eine Aktivierung in den Expressionen der Gene bei Behandlungen mit höheren Konzentrationen festgestellt werden und zum anderen ähnliche herunterregulierende Effekte wie nach den Behandlungen mit Methimazol. Eine Herunterregulierung der Expression war besonders deutlich nach 7 Tagen Behandlung für die  $d\beta h$ -mRNA (Abbildung 5.35).

In diesem Zusammenhang unklar bleibt, wie Methimazol und T3 die Stressantworten auslösen, d.h. welche Rezeptoren die Regulierung der Transkriptionen der Enzyme auslösten. In diesem Zusammenhang sollte der Dopaminrezeptor als möglicher potentieller Angriffspunkt genannt werden, da dieser in der Pharmakologie als Rezeptor für Arzneimittel beschrieben wurde (50). Mit den vorliegenden Ergebnissen kann zumindest die Vermutung bestätigt werden, dass Zusammenhänge zwischen den endokrinen Systemen und insbesondere zwischen dem Schilddrüsensystem und dem Stresshormonsystem bestehen. Es könnte des Weiteren sein, dass Methimazol über die Bindung an den Ah-Rezeptor die Transkription der Enzyme der Stresshormonachse beeinflusst. Jedoch bleibt ungeklärt warum Methimazol als chemischer Stressor die Expression herunter reguliert hat. Die Vermutung wäre, dass chemischer Stress zu einer Aktivierung der Transkription führt, wie er zum Teil nach den Expressionen mit T3 festgestellt wurde.

### 6.3.3 Amplifikation zufälliger Produkte

Effekte von Umweltkontaminationen auf die genetische Struktur von Populationen ist ein bereits bekanntes Phänomen (71, 144). Diese Veränderungen im Genotyp durch Umweltsubstanzen können entweder das Überleben oder den reproduktiven Erfolg eines einzelnen Individuums und damit der gesamten Population beeinflussen und beruhen im Wesentlichen auf zwei unterschiedliche Mechanismen. Als erstes können die Substanzen zur Reduktion der Populationsgröße und damit zu einem Rückgang in der genetischen Diversität führen (3, 9, 71). Zum zweiten führen solche Kontaminationen mit Umweltsubstanzen zur natürlichen Selektion und späteren Adaptation an die Substanz, bedingt durch Verschiebungen im Genotyp.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von Methimazol auf den Genotyp von juvenilen Zebrafischen mittels RAP-PCR untersucht. Die Methode der RAP-PCR ist eine PCR-basierte DNA *fingerprinting* Technik, bei welcher 10 bp Oligonucleotidprimer zur Amplifikation kurzer Fragmente von cDNA verwendet wurden. Zur Analyse der Fragmente wurden diese mittels Gelelektrophorese sichtbar gemacht. Es konnten für die Behandlungen mit Methimazol und T3 verschiedene Bandenmuster gegenüber ihren Kontrollen aufgezeigt werden. Ob diese wirkliche Veränderungen im Genotyp darstellen bleibt im Rahmen dieser Studie ungeklärt. Häufig wird festgestellt, dass es sich bei den Musterunterschieden vor allem um Artefakte handelt. Da bei den untersuchten Proben jedoch eine recht große Anzahl von Bandenunterschieden festgestellt werden konnten, ist es durchaus wahrscheinlich, dass einige dieser Banden Effekte durch die Substanzen darstellen. Im Rahmen der Untersuchungen kam es bei den Kontrollen ebenfalls zu Unterschieden im Bandenmuster. Die Ursachen sind schwer zu analysieren. Zum einen könnte es sich um unterschiedliche Genotypen handeln oder die Unterschiede im unterschiedlichen Alter der Fische begründet sein. Zum anderen kann die Amplifikation der cDNA Fragmente nicht immer exakt nachvollzogen werden, so dass häufig einzelne Banden nicht unterschieden werden können. Des Weiteren ist die Methode in der Literatur häufig Mittelpunkt der Kritik. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass die Amplifikation bei allen Kontrollen und damit auch den behandelten Proben nicht gleich ablief, was zu Unterschieden in den

Bandenmustern führen kann. In Meunier und Grimont (137) wurden Probleme der Methode analysiert.

## 6.4 Qualität und Reproduzierbarkeit der Daten und Methoden

Die Methode der RT-PCR und besonders die weiterentwickelte Methode der real-time RT-PCR ist eine sehr sensitive Methode zur Detektierung kleinster Mengen an mRNA (18). Dabei können die zuvor in cDNAs umgeschriebenen mRNA-Sequenzen sehr spezifisch detektiert werden. An die Amplifikation anschließende Kontrollen der entstandenen PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese, Schmelzkurvenanalysen und/oder Sequenzierungen können in der Regel die erfolgreiche spezifische Amplifikation bestätigen.

Damit sind die Methoden zwar sehr genau was das PCR-Produkt aus der Amplifikation der cDNA betrifft, jedoch gibt es andere methodisch kritische Punkte, die zusätzlich beachtet werden sollten. Bei der Methode der RT-PCR und real-time RT-PCR bereitet oft die aus der Reversen Transkription (RT) erhaltene cDNA Probleme, die häufig nicht eindeutig abschätzbar sind. So kann die cDNA Ausbeute bei der RT stark schwanken; Komponenten in der cDNA-Lösung die weitere Amplifikation während der PCR hemmen oder die cDNA während der Lagerung abgebaut werden.

Des Weiteren ist der Vermehrungsfaktor der cDNA wie im optimalen Fall angenommen nicht für jeden Zyklus 2. Nach Mülhardt (143) ist in der Praxis der Multiplikationsfaktor während der Amplifikationszyklen variabel mit Werten zwischen 1,6 und 1,8. Bei der real-time PCR wird dagegen nach nur wenigen Zyklen am „*crossing point*“ ( $c_p$ ) gemessen, so dass die Multiplikationswerte nahezu 2 sind (Roche LightCycler® Handbuch). Das ist einer der größten Vorteile der real-time PCR. Ein anderer Vorteil ist die direkte Beobachtung der Zyklengänge am Bildschirm. Zusätzlich spielt jedoch auch die Wahl der Primer eine entscheidende Rolle für eine erfolgreiche PCR. Diese und weitere kritische methodische Punkte in der PCR sind in Mülhardt (143) erläutert.

Im Hinblick auf die zuvor genannten methodischen Grenzen der PCR sind die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stets kritisch zu betrachten. Für die

Untersuchungen der Genexpressionen im Entwicklungsverlauf wurden mehrere Versuchsreihen angesetzt und diese getrennt analysiert. Für die Vergleichbarkeit der Daten wurde die Umwandlung der mRNA in cDNA aus einer Entwicklungsserie zusammen in einer RT durchgeführt. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass für die Proben die identischen Premixe verwendet und so Konzentrationsunterschiede durch die Zusammensetzung der Premix-Komponenten minimiert wurden. Damit methodische Fehler durch unbestimmbaren Abbau von cDNA-Proben weitgehend ausgeschlossen werden konnten, wurden die Proben nach der RT unverzüglich in der anschließenden PCR weiter verarbeitet bzw. bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Abweichungen in den Amplifikationen sind wie vorangehend geschildert trotzdem nicht völlig auszuschließen.

Im Rahmen von Methodenoptimierungen durchgeführte Wiederholungen einzelner PCRs mit denselben Proben zeigten, dass die Ergebnisse wiederholbar waren und sich damit die PCR-Methode als reproduzierbar erwies (Tabelle 5.2). Die Abweichungen zwischen den einzelnen PCR-Ergebnissen lagen im Bereich von kleiner 1 %.

Für jede Probe wurde in einem PCR-Lauf eine Doppelbestimmung durchgeführt. Der Mittelwert dieser beiden Werte diente als Berechnungsgrundlage für die aufgeführten Ergebnisse und zeigte Quantitätsunterschiede von deutlich kleiner 1 %.

Jede Probenserie einer zusammengehörigen Entwicklungsstudie wurde gemeinsam in RT und PCR analysiert und ausgewertet. Durch identische PCR-Bedingungen konnten methodische Fehler innerhalb einer Entwicklungsserie minimiert werden. Der Vergleich der Ergebnisse aus den zwei Untersuchungen für die Entwicklung zeigte unter Berücksichtigung der biologischen und methodisch bedingten Schwankungen sehr ähnliche Transkriptionsverläufe für die untersuchten Gene und somit eine qualitative Reproduzierbarkeit der Methode und Ergebnisse. Es lässt sich somit feststellen, dass die Ergebnisse auch ohne Signifikanztest sehr aussagekräftig sind! Dieses lässt sich an den Ergebnissen für die Expressionsverläufe der mRNA des HG EF  $1\alpha$  zeigen. In Abbildung 5.1 ist der Verlauf der Expression der EF  $1\alpha$ -mRNA während der Entwicklung für zwei unabhängige Untersuchungen dargestellt. Um EF  $1\alpha$  als HG einsetzen zu können sollte das Gen über den Untersuchungszeitraum hinweg nicht reguliert werden. Des Weiteren sind ähnliche Mengen für die gleichen Entwicklungsstadien zu erwarten gewesen. Tabelle 5.1 zeigt



Abweichungen zwischen den einzelnen Entwicklungspunkten der jeweiligen Untersuchung. Die Variationskoeffizienten liegen im erwarteten Bereich von 5-10%. Die Ursachen liegen vor allem in den natürlichen Schwankungen und den unterschiedlichen Ausbeuten an mRNA aus der RNA Extraktionen.

Ein wichtiger Punkt in den Untersuchungen zur Genexpression bei den Larven war die Verwendung eines großen Probenumfangs. Auf Grund der breit gefächerten Zielstellung der Studie sollten auch verschiedene Konzentrationen an Testsubstanz und verschiedene Expositionszeiten bei den Untersuchungen berücksichtigt werden. Als methodisch schwierig erwies sich die Extraktion von ausreichendem mRNA-Material für die weiteren Genexpressionsanalysen aus nur wenigen Larven (n=10). Die Methode der real-time RT-PCR ist eine kostenintensive Methode, vor allem in Anbetracht des entstehenden Probenumfangs. Zur Reduktion des Probenumfangs und zur Erhöhung der Ausbeute in der RNA-Extraktion wurden im Mittel  $100 \pm 5$  Tiere gepoolt. Damit konnten für die Genexpressionsversuche mit den Larven und den Entwicklungsstudien zwar keine Standardabweichungen bestimmt werden, jedoch wegen der großen Gesamtmenge von einem repräsentativen Mittelwert ausgegangen werden.

Die Expressionsergebnisse aus den bis zu 3 verschiedenen Untersuchungen je Gen mit den juvenilen Zebrafischen sind in unterschiedlichen Phasen von Methodenoptimierungen entstanden. Für die erste Untersuchung wurden neue Primer für TR $\alpha$ , TR $\beta$  und TSH entwickelt. Die Ergebnisse aus der zweiten und dritten Untersuchung entstanden mit Primern für den TR $\alpha$  und TR $\beta$ , die bereits in vorangehenden Studien von Liu et al. (120, 121) verwendet wurden. Dadurch sollte die Vergleichbarkeit der Daten erhöht werden. Unterschied zwischen der 2. und 3. Untersuchung waren die verwendeten Konzentrationen in den Expositionen. Die Studie zeigte, dass deutliche Abhängigkeiten zu den Konzentrationen und Expositionszeiten nicht bestehen. In gelektrophoretischer Trennung und anschließender Sequenzierung konnte bestätigt werden, dass die richtigen Gene amplifiziert wurden. In der vorliegenden Arbeit zeigten sich keine signifikanten Effekte auf die Genexpression nach Behandlungen mit Methimazol und T3. In einer Studie von Liu et al. (120) konnte nach einer Exposition von frisch geschlüpften Larven mit 0,3 mM Methimazol ebenfalls kein Effekt auf die TR $\alpha$ - und TR $\beta$ -mRNA Level aufgezeigt werden. Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass die Methode

der real-time RT-PCR in der vorliegenden Arbeit funktionierte, jedoch es keine Substanzeffekte auf die untersuchten Gene durch die Testsubstanzen gab. Die aufgetretenen Schwankungen in den Expressionsleveln haben wahrscheinlich ihre Ursache in biologischen und eventuell methodischen Schwankungen.

Die große Relevanz von biologischen Schwankungen zeigte sich auch in den histologischen Untersuchungen mit adulten Zebrafischen. Wiederholungen der Expositionsversuche mit ähnlichen Konzentrationen und Expositionszeiten führten oberhalb von Konzentrationen von 1 mM zu reproduzierbaren Veränderungen bei den Schilddrüsenfollikeln. Es zeigte sich jedoch, dass stets einige Fische weniger signifikante Effekte zeigten als andere und manche keinerlei Effekte aufwiesen. Diese hohe Streubreite der Effekte konnten auch bei hohen, sehr toxischen Konzentrationen von über 5 mM festgestellt werden und lag in der Größenordnung von 20-30 %. Die Ursache dieser Effekte ist wahrscheinlich mit der hohen biologischen Variabilität zu erklären.

## 6.5 Gesamtdiskussion

Bei den Vertebraten spielen die Schilddrüsenhormone (TH) eine Schlüsselrolle in der Regulation der Entwicklung, der Zelldifferenzierung und im Metabolismus (1, 29, 161, 189). Außerdem gibt es Beweise dass die TH's ebenfalls eine bedeutende Rolle in der Gonadenentwicklung und Gonadenfunktion spielen (29). Das überwiegende Wissen in diesem Bereich beruht jedoch auf Forschungen über den Menschen. Erst Ende des 20. Jahrhunderts konnte die Bedeutung der TH auch für die Fische aufgezeigt und ähnlich wie für den Menschen das Vorhandensein von Schilddrüsenrezeptoren (TR), welche die Hormonantworten in den Zielgeweben vermitteln, bestätigt werden. Die Aufgabe der TR besonders in der Entwicklung ist jedoch nur unzulänglich untersucht und nur sehr wenige Studien bezogen sich bisher auf Fragestellungen zum Thema TR und ED.

Ziel dieser Arbeit war es die Einflüsse von schilddrüsen-endokrin-wirksamen Substanzen auf den Zebrafisch (*Danio rerio*) zu untersuchen und ein Modellsystem zur Untersuchung von ED zu etablieren. Besonderes Augenmerk sollte dabei auf Untersuchungen zur Genexpression gelegt werden. Als erster Schritt war es daher wichtig geeignete Biomarker für diese Untersuchungen zu etablieren. In der

vorliegenden Arbeit konnten die Zebrafischgene der Schilddrüsenachse (TSH, TR $\alpha$  und TR $\beta$ ), Enzyme für die Stresshormonbiosynthese (th, ddc und dh) und das Cytochrom P450 1A1 (cyp) als Biomarker etabliert werden. Ihre Transkription während der Entwicklung vom Embryo (2 hpf) bis zum juvenilen Fisch (Alter von 3 Monaten) wurde mittels real-time RT-PCR analysiert. Im weiteren Verlauf der Arbeit sollten die Expressionslevel nach Behandlungen mit T3 und Methimazol als Modellschubstanz untersucht werden.

Die vorliegende Studie demonstriert, dass die mRNA Expressionen von TR $\beta$  und in geringerem Umfang auch die von TR $\alpha$  während der embryonalen und larvalen Stadien entwicklungsabhängig reguliert wurden. Dies konnte in ähnlicher Weise bei Liu et al. (120, 121) für embryonale und frühe larvale Stadien gezeigt werden. Die Level von TR $\beta$ - und TR $\alpha$ -mRNA waren ab dem Blastulastadium präsent und damit weit vor der Bildung der Schilddrüse, welche erst nach dem Schlupf erfolgt (13). Dies wurde ebenfalls von Essner et al. (51) und Liu et al. (121) dargestellt. Die TR $\beta$ -mRNA wurde deutlich hochreguliert nach dem Schlupf und verblieb mit einzelnen Schwankungen auf diesem Niveau.

Im Vergleich dazu war der TR $\alpha$ -mRNA-Expressionslevel sehr niedrig reguliert, vor allem während der embryonalen Stadien. Mit dem Schlupf erhöhte sich die Transkription nur gering. Ein Anstieg in der Expression erfolgte während der larvalen Stadien nur sehr langsam und erst am Ende der larvalen Entwicklungsphase, (2 Monate) wurde die Expression der TR $\alpha$ -mRNA deutlicher hoch reguliert.

Das Vorhandensein von TR $\beta$ - und TR $\alpha$ -mRNA Leveln bereits in den frühen embryonalen Entwicklungsphasen vor dem MBT bestätigte ähnlich wie bei Liu et al. (121) den maternalen Ursprung. Das 512-Zellstadium der Blastulaperiode (*midblastula transition*, MBT), welches während des 10. Zellzykluses beginnt (98), stellt eine bedeutende Phase in der Entwicklung beim Zebrafisch dar. In dieser Phase beginnen die Zellteilungsprozesse nicht mehr synchron zu laufen und die Dauer der Zyklen verlängert sich. Die Genexpression und die Bildung der YSL (*yolk syncytial layer*), die sich später zum Eidottersack entwickelt beginnen (98). Bei Teleostern wurde gezeigt, dass im Eidottersack große Mengen an TH vorkommen. Dieser hohe Level an TH verringert sich jedoch im Laufe der Entwicklungsprozesse. Es wird angenommen, dass diese Quelle an TH essentiell für die Entwicklung bis

zum Zeitpunkt der Bildung der Schilddrüse und damit der Produktion von neuen endogenen TH ist (31, 103). Ob die TR's oder nur einer der beiden Rezeptoren in den frühen Entwicklungsabschnitten involviert sind, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter aufgeklärt werden. In Hühnerembryos konnte während der Neurulation in der frühen Embryogenese nur der TR $\alpha$  detektiert werden (58). Des Weiteren wurde in dieser Studie unter anderem im Hensen-Knoten, während der Gastrulation, eine große Menge an T3 gefunden. In den frühen Entwicklungsphasen bei Fröschen konnte nur der TR $\alpha$  identifiziert werden, vermutlich involviert in der retinoidsäurevermittelten Achsenbildung (7). Im Krallenfrosch waren beide TR $\alpha$  und TR $\beta$  während der Metamorphose expressioniert, jedoch war nur die TR $\alpha$  Transkription kurz nach dem Schlupf der Kaulquappe aktiviert (177). In der vorliegenden Studie verhielt es sich ähnlich, nur dass hier die Transkription des TR $\beta$  nach dem Schlupf aktiviert wurde, so dass vermutet werden kann, dass vorwiegend der TR $\beta$  in die Entwicklung vom Zebrafisch nach dem Schlupf involviert ist. Obwohl beide TR in frühen Entwicklungsphasen nachweisbar sind, bleibt die Rolle der TR in dieser Phase weiter ungeklärt und somit ebenfalls die Art und Weise wie die TH-Achse in frühen Fischlarven funktioniert.

Einige Aspekte der mRNA Expressionsprofile des Zebrafisch TR $\alpha$ 's und TR $\beta$ 's zeigten interessante Gemeinsamkeiten wie sie zuvor für die Vorgänge während der Metamorphosen von Larven zu Juvenilen beim Krallenfrosch, *Xenopus laevis* beschrieben wurden (95, 209), sowie bei *Eleutherodactylus coqui*, einer sich direkt entwickelnden Anurenart (20) und bei der Flunder *Paralichthys olivaceus* (207). Für den Krallenfrosch konnte z.B. ein sehr niedriger Level an TR $\beta$ -mRNA vor der Metamorphose festgestellt werden, der dann innerhalb der Metamorphose, wo die Schilddrüse ihre höchste Aktivität besitzt, jedoch stark hoch reguliert wurde (209).

Ebenfalls konnte in Brassen TR und TTR bereits nachgewiesen werden, obwohl auch hier noch funktionierende Schilddrüsenfollikel fehlen (175). Zahlreiche andere Spezies von Fischlarven wurden mit exogenen TH behandelt, aber es existieren nur wenige Studien zur Rezeptorexpression und –wirkungen.

Exogene Behandlungen von Fischlarven zeigen positive und negative Effekte. Durch Behandlungen über das Umgebungswasser zeigten einige Spezies beschleunigte Eidotterabsorptionseffekte, sowie Größenwachstum, Flossendifferenzierung und

besseres Überleben (32, 104-107, 145, 167, 202). Dabei scheinen die Effekte jedoch abhängig von der Dosis und dem Entwicklungsstadium zu sein (84). Dies zeigte sich ebenfalls in der vorliegenden Arbeit. Bei Larven ab 7 dpf war die Überlebensrate bei gleichen Expositionskonzentrationen deutlich geringer. Und auch die Entwicklung wirkte verzögert (nicht in Abbildungen gezeigt).

Große Mengen von exogenen TH's haben dagegen negative Effekte auf Wachstum, Entwicklung und Überlebensrate, obwohl es den Anschein hat, dass die effektive Hormonkonzentration bei den verschiedenen Spezies unterschiedlich sein kann (12, 104, 107, 145, 202). Die Effekte der TH's auf die Gewebe und Organentwicklung in Fischlarven wurden nicht beschrieben. Faustino und Power (54-56) zeigten zur Untersuchung der Effekte von TH's detaillierte Charakterisierungen der skelettalen Ontogenese bei der Brasse. Es konnte gezeigt werden, dass bereits bei Konzentrationen von 0,1 oder 0,01  $\mu\text{M}$  T3 Einflüsse auf die skelettale Ontogenie der Larven und der Skelettanomalien hatten.

In der vorliegenden Studie scheint die Expression von TR $\beta$ - und TR $\alpha$ -mRNA ebenfalls durch die TH induziert zu sein. Eine exogene Behandlung von frisch geschlüpften Larven mit T3 führte in einigen Fällen zu erhöhten Expressionsleveln von TR $\beta$ - und TR $\alpha$ -mRNA. Ähnliche Ergebnisse konnten ebenfalls in der Studie von Liu et al. (120) gezeigt werden.

Eindeutige Unterschiede in der Sensitivität der Larven in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium konnten nicht festgestellt werden. Ein Vergleich der Ergebnisse aus den Genexpressionsuntersuchungen mit denen aus der Histologie lässt vermuten, dass die embryonalen und juvenilen Zebrafische wesentlich weniger sensitiv gegenüber Methimazol reagieren als die Adulten. Jedoch sollten für weitergehende Diskussionen dieser These weitere Tests durchgeführt werden. So müssten von juvenilen Larven, bei denen die Schilddrüse bereits ausgebildet ist histopathologische Analysen der Schilddrüse nach einer ähnlichen Exposition wie bei den Adulten durchgeführt werden. Es kann angenommen werden, dass bei den juvenilen Fischen die Schilddrüsenfunktion (Ausprägung der Schilddrüsenfollikel) bereits bei deutlich niedrigeren Konzentrationen beeinflusst wird als durch tatsächliche physiologische Effekte sichtbar wird.

Durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchung zu Genexpressionen während der Entwicklung und nach Behandlungen mit Methimazol

und T3 konnten die Eignung von TR $\beta$ , TR $\alpha$  und TSH als Biomarker sowohl in adulten als auch in juvenilen Fischen prinzipiell dargestellt werden. Die Frage stellt sich jedoch, ob schilddrüsenwirksame ED die Transkription dieser Gene beeinflussen kann. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass ED wie Methimazol nur sehr schwach an die TR bindet bzw. die Transkription nur wenig beeinflussen kann. Damit ließe sich vermuten, dass Schilddrüsen ED Effekte nicht oder nur kaum durch die TR vermittelt werden können. In der Literatur gibt es einige wenige Studien, die sich mit der Bindung von ED an die TR beschäftigen. Bisher konnten dabei nur schwache Bindungseigenschaften von verschiedenen Substanzen an die TR gezeigt werden (25, 132, 134). Obwohl es bislang keine eindeutigen Beweise einer Veränderung der Schilddrüsenfunktion durch Interaktionen von ED mit dem TR gibt, kann nicht von der Hypothese ausgegangen werden, dass ED die Schilddrüsenfunktion nicht über TR vermittelte Reaktionen beeinflussen können. Die vorliegende Arbeit bietet zwar weitere Indizien, jedoch fehlen weitere genauere Untersuchungen.

Die geringe Beeinflussung durch Methimazol könnte ebenfalls in der Methodik der RT-PCR ihre Ursache haben. Um festzustellen, ob die verwendeten Primer die Genabschnitte von Interesse tatsächlich amplifiziert haben, wurden die entstandenen PCR-Produkte sequenziert. Die Sequenzierung erbrachte die Bestätigung der Richtigkeit der Amplifikation. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Gene von Interesse wirklich amplifiziert wurden und somit methodisch keine Fehler aufgetreten sind.

Ebenfalls uneindeutig waren die Ergebnisse für die Expression nach einer Behandlung mit Methimazol in den adulten Fischen. Es konnten keine Effekte festgestellt werden. Jedoch sollte dabei beachtet werden, dass verschiedene Faktoren dargestellt werden konnten, wie die Expositionszeit, das Verwenden von Ganzkörperhomogenaten und die Probennahmetechnik, welche die Ergebnisse hätten beeinflussen können. Dass Methimazol sich im Fischkörper befand und einlagert wurde, konnte ebenfalls im Rahmen der Arbeit und Zusammenarbeit mit Dr. L. Hollosi gezeigt werden. Gegenüber der exponierten Konzentration wurde jedoch nur sehr wenig Methimazol im Organismus nachgewiesen. Auch eine zunehmende Expositionszeit erhöhte die Menge an eingelagertem Methimazol nur unwesentlich.

Als zweiter Teil der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob andere endokrine Systeme durch schilddrüsen wirksame Substanzen mit beeinflusst sind. Dazu sollte zum einen die Methode der RAP-PCR eingesetzt werden. Die Methode konnte im Rahmen der Arbeit erfolgreich optimiert werden; es zeigten sich erste Unterschiede in den erhaltenen Bandenmustern. In weiterführenden Untersuchungen wäre es wichtig diese Banden weiter zu untersuchen um festzustellen, ob es sich dabei um Artefakte oder tatsächliche Genunterschiede aus Regulationsprozesse, als Folge der Behandlungen mit T3 und Methimazol, handelte.

Das Cytochrom P450 System wurde häufig für Untersuchungen von Xenobiotika und deren Effekte auf Organismen verwendet. Daher wurde im Rahmen dieser Untersuchungen die Expression des Genes Cytochrom P450 1A1 (cyp) im Verlauf der Entwicklung vom Embryo zum juvenilen Zebrafisch und nach Expositionen mit Methimazol und T3 bestimmt. Mit dem Schlupf erfolgte ein erster deutlicher Transkriptionsanstieg; mit einem Alter von 4 Wochen ein zweiter noch deutlicherer Anstieg in der Expression des Genes. Da solche Daten in der Literatur bisher fehlen, lassen sich für die Ursachen nur Vermutungen anstellen. Der geringe Gehalt an cyp während der Embryonalphase ist zum einen wohl entwicklungsbedingt und zum anderen auf die Schutzfunktion der Eihülle zurückzuführen. Die Eihülle bietet dem heranwachsenden Organismus nicht nur mechanischen Schutz und sichert die Nährstoff- bzw. Sauerstoffversorgung, sondern stellt ebenfalls eine Barriere für diverse Substanzen dar. Die Untersuchungen zum Einfluss von Methimazol, Bisphenol A und T3 an den Embryonen mit intakter Eihülle zeigten jedoch, dass die Substanzen in die Embryonen gelangen konnten und diese schädigten. Die Tiere wirkten besonders sensitiv gegenüber Bisphenol A und T3, welche in kleinsten Konzentrationen, im nM-Bereich, toxische Effekte auslösten. Wahrscheinlich begünstigten die geringe Molekülgröße und die hydrophilen Eigenschaften der Substanzen die Aufnahme durch die Eihülle. Des Weiteren ist der Embryo in dieser Entwicklungsphase noch ohne weitere Schutzmechanismen ausgerüstet. Die Frage welche Rolle cyp in diesem Zusammenhang spielt bleibt weiter ungeklärt. Bekannt ist, dass über den Ah-Rezeptor Cytochrom P450 abhängige Zellantworten initialisiert werden. Für weiterführende Untersuchungen sollte daher zusätzlich zur Expression der cyp-mRNA auch die Menge des Ah-Rezeptors, als potentielle Ligandenbindungsstelle für Xenobiotikas, zum einen während der Entwicklung und

zum anderen nach einer Exposition mit Methimazol, Bisphenol A, T3 oder andern Xenobiotikas analysiert werden.

Des Weiteren beschäftigt sich die Arbeitsgruppe Ökotoxikologie am Institut für Ökologische Chemie an der GSF mit Stresshormonen. Primäres Ziel dieser Arbeit war es die Einflüsse von Xenobiotika auf die Stresshormonbiosynthese in juvenilen und adulten Fischen zu untersuchen. Die Frage ist, ob chemische Stressoren, die das Schilddrüsensystem beeinflussen, ebenfalls Effekte auf die Biosynthese der Stresshormone haben. Dazu sollte ein Modellsystem anhand der Substanz Methimazol etabliert werden. Als grundlegende Studie wurde dazu als Erstes der Stresshormonlevel während der Entwicklung vom Zebrafisch mittels real-time RT-PCR bestimmt. Dazu wurden Primer für die gesuchten Gene designed und durch die Sequenzierung der aus den Amplifikationen entstandenen PCR-Produkte diese mit hoher Wahrscheinlichkeit bestätigt.

Die Ergebnisse zu den Expressionen nach Behandlungen mit Methimazol und T3 zeigten eindeutige Effekte jedoch waren Korrelationen zu Konzentrationen oder Expositionszeiten nicht deutlich feststellbar. An dieser Stelle interessant wird der Vergleich zu den Messungen der Stresshormone. Die Messungen dazu dauerten bis zu diesem Zeitpunkt noch an.

Zahlreiche Interaktionen von Umweltsubstanzen, die ihre Wirkungen über Nuklearrezeptoren initialisieren wurden bereits beschrieben und beinhalten unter anderem die Xenobiotika, die an Rezeptoren binden oder diese indirekt durch die Modulation assoziierter Reaktionswege beeinflussen können. Die meisten Nuklearrezeptoren werden durch niedermolekulare Liganden aktiviert (Steroidhormone, Vitamin A Derivate, Schilddrüsenhormone). Diese Liganden besitzen oft strukturelle Ähnlichkeiten zu vielen Umweltkontaminanten, wie polychlorierte Dibenzodioxine und Dibenzofurane (PCDD/Fs), polychlorierte Biphenyle (PCB's), Polycyclische aromatische Hydrocarbone (PAHs) oder Phthalate (66, 79).

Es gibt Hinweise das POP's (*persistent organic pollutants*) die Homöostase der Schilddrüsenhormone verändern können und so zu einer Reduktion von freiem T3 im Silberkarpfen führten (204). Bei vielen POP's und andere Komponenten konnte gezeigt werden, dass sie adverse Wirkungen an verschiedenen Punkten des Schilddrüsenhormonsystems *in vitro* und *in vivo* hervorrufen. *In vivo* führt ein



abfallender Level an TH im Serum durch negative Regulationsmechanismen zur Freisetzung von TSH. Die Folge sind ein Anstieg histologischer Veränderungen und im Gewicht der Schilddrüse. Diese Effekte wurden nach Expositionen mit POP's in Säugern, Vögeln, Fischen und beim Menschen beschrieben (11, 27, 171).

Nur wenige Komponenten binden dabei direkt an TR. Überwiegend binden diese Komponenten, genauso wie viele PCB's (160) und ihre Metabolite (64)) an die Transportproteine (TBP, *thyroid-binding protein*). Ähnliche Effekte wurden ebenso für die Gruppe der Pestizide wie DDT und seine Metabolite gezeigt (25).

Abschließend soll diskutiert werden, warum gerade Methimazol als Modellschubstanz verwendet wurde. Es gab verschiedene Gründe warum im Rahmen dieser Arbeit Methimazol als Testschubstanz interessant war. Zum einen war es geeignet, da die Wirkungsweise auf die Schilddrüse bereits bekannt war. Und zum zweiten ist Methimazol ein weit verbreitetes Schilddrüsenmedikament zur Behandlung von Hyperthyreose, Schilddrüsenüberfunktion. Nach dem Arzneimittelgesetz sind Arzneimittel u.a. dazu bestimmt Krankheiten und Leiden zu heilen, zu lindern, zu verhüten oder zu erkennen. Diese positiven Zweckbestimmungen täuschten in der Vergangenheit oft über potentielle Nebenwirkungen im Zielorganismus hinweg. Des Weiteren blieben Betrachtungen der Arzneimittel im Hinblick auf ihre Umweltverträglichkeit eher selten. Eine veränderte Situation ergab sich diesbezüglich in den neunziger Jahren, als vermehrt Arzneimittelwirkstoffe bzw. deren Metabolite in Oberflächen-, Grund- und Trinkwässern nachgewiesen wurden (77, 78, 101, 186).

Da Arzneimittelwirkstoffe als biologisch hochaktive Stoffe teilweise in ähnlichen Konzentrationen wie Pflanzenschutzmittel in der aquatischen Umwelt anzutreffen sind, ergab sich die Frage nach eventuellen Auswirkungen auf Nichtzielorganismen im aquatischen Ökosystem zwangsläufig. Bei der Bewertung derartiger Schadbildungen sollte nicht nur das Augenmerk auf die Konzentrationen im Umweltkompartiment und den Wirkschwellen bzw. Effektkonzentrationen gelegt werden, sondern ebenso auf nicht direkt toxische Wirkungen. Dazu ist es wichtig die Wirkmechanismen der Substanzen oder Substanzklassen auf die verschiedensten Organismen des betroffenen Umweltkompartiments aufzuklären, um dann damit weiterreichende Folgen für den Organismus und das Ökosystem abschätzen zu können.

## 7 Ausblick

Störungen der normalen Schilddrüsenfunktion durch xenobiotische Substanzen sind ein bedeutendes ökotoxikologisches Gebiet. Es wurde gezeigt, dass Dioxine den Schilddrüsenhormonlevel beeinflussen können (150). Des Weiteren konnte in zahlreichen Arbeiten festgestellt werden, dass die Entwicklung von Organismen und die Effekte von Substanzen nicht nur von der Dosis sondern auch von den Entwicklungsstadien der Organismen abhängig sind. In der vorliegenden Arbeit am Zebrafisch konnte ebenfalls die Bedeutung der unterschiedlichen Entwicklungsphasen aufgezeigt werden und dass die Konzentrationsmenge entscheidende Einflüsse auf die Effekte hinsichtlich der Entwicklung und der Expression der Gene haben kann. In weiterführenden Studien sollte daher vor allem Augenmerk auf die Untersuchung von Effekten von ED in verschiedenen Entwicklungsstadien gelegt werden.

Wie sich in der Arbeit zeigte, bietet der Ansatz über Biomarker grundsätzlich eine gute und schnelle Möglichkeit zur Einschätzung von Effekten durch ED auf den Zebrafisch. Es zeichnete sich jedoch ebenfalls ab, dass in umweltrelevanten Konzentrationen Effekte der schilddrüsenwirksamen Substanzen Methimazol auf die Transkription der TSH-, TR $\alpha$ - und TR $\beta$ -mRNA eher gering sind. Ziel sollte es daher sein zu Prüfen, ob eventuell andere Biomarker zur Untersuchung von solchen schilddrüsenrelevanten ED in Frage kommen. Die Methode des RAP-PCR bietet einen guten Ansatz dafür und die erhaltenen Ergebnisse dazu sollte in weiteren Versuchen näher analysiert werden. Diese Methode eröffnet ebenfalls die Möglichkeit für die Etablierung eines Modellsystems zur Untersuchung der Effekte von schilddrüsenwirksamen ED die Berücksichtigung von in der Literatur bisher gründlicher untersuchten Mechanismen von ED-Wirkungen.

Es gibt bisher nur wenige Studien, die sich mit den Zusammenhängen bzw. dem Zusammenwirken zweier oder mehrerer endokriner Systeme beschäftigt haben. Die vorliegenden Ergebnisse konnten zwar nicht eindeutig Zusammenhänge zwischen dem Schilddrüsen-System und der Stresshormonbiosynthese, sowie zum Cytochrom P450 System aufzeigen, jedoch wurde deutlich dass alle Systeme auf

---

Veränderungen z.B. durch endogenen Substanzen reagieren. Daher sollte an dieser Stelle dringend weiter geforscht werden. Interessant könnten Versuche mit Xenobiotika, wie Tetrabrombisphenol A (TBBPA), Bisphenol A, TCDD (2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin) werden. Anhand ihrer Strukturähnlichkeiten zu den natürlichen Hormonen ergeben sich zahlreiche Effektmöglichkeiten in verschiedensten Systemen. Bei Untersuchungen insbesondere zu den Zusammenhängen von verschiedenen endokrinen Systemen sollte zukünftig auch der Bereich der Reproduktionsbiologie mehr berücksichtigt werden und Effekte von ED auf die Rezeptoren und die Zahl bzw. das Geschlecht der Nachkommen untersucht werden. In Versuchen von Wester et al. (197) wurde durch die Gabe von PTU auch die Nachkommenschaft beeinflusst.

Da nicht immer von der Menge an mRNA auf die Menge der aktiv vorhandenen Proteine geschlossen werden kann sollten in weiteren Studien neben den mRNAs auch die Proteine analysiert werden.

Ebenfalls sollten die Untersuchungen mit den adulten Fische weiter geführt werden, in dem die kritisch angesprochenen methodischen Punkte verändert und neue Expositionen mit weiteren Substanzen durchgeführt werden. Dabei sollte vor allem Rücksicht auf die Analyse gewebespezifischer Unterschiede Wert gelegt werden.

## 8 Zusammenfassung

Eine zunehmende Zahl von verschiedensten Substanzen und Substanzklassen stehen im Verdacht Einflüsse auf das endokrine System von Organismen zu haben und als Endokrine Disruptoren (ED) die Funktion der natürlichen Hormone nachzuahmen oder diese zu beeinflussen.

Rückblickend auf die Ziele der Arbeit sollen im Folgenden die gestellten Fragen beantwortet werden.

### 1. **Wie stellt sich die Transkription der TSH-, TR $\alpha$ -, TR $\beta$ -, cyp-, ddc-, th- und d $\beta$ h-mRNA während der Entwicklung dar?**

Es konnte gezeigt werden, dass die untersuchten Gene alle bereits im frühen Midblastulastadium exponiert waren. Die Messungen der Genexpression mittels real-time RT-PCR während der Entwicklung vom Ei bis zum adulten Tier ergaben, dass die Transkription der TR $\alpha$ -mRNA geringer war, als die der TR $\beta$ -mRNA, jedoch beide im Verlauf der Entwicklung reguliert wurden. Eine deutliche Erhöhung der Transkription erfolgte für die TR $\beta$ -mRNA bereits nach dem Schlupf mit der Bildung der Schilddrüse (etwa 2 bis 4 dpf) und für die TR $\alpha$ -mRNA beginnend mit einem Alter von 5 wpf.

Eine Erhöhung der Transkription der TSH-mRNA erfolgte bereits mit 18 hpf, jedoch war die Expression der TSH-mRNA über den gesamten Entwicklungszeitraum einigen Schwankungen unterworfen. Die Gene der Stresshormonbiosynthese und des Cytochrom P450 1A1 wurden nach dem Schlupf deutlich in ihrer Expression hochreguliert und verblieben mit leichten Schwankungen auf diesem hohen Niveau.

### 2. **Welchen Einfluss hat die Testsubstanz Methimazol auf den Zebrafisch?**

In den ökotoxikologischen Untersuchungen an Embryonen und Larven und bei den histologischen Studien der Schilddrüsenfollikel kam es erst ab Konzentrationen von über 1 mM zu Effekten. In den Untersuchungen zur Expression der Gene nach *in vivo* Behandlungen mit Methimazol konnten ebenfalls Beeinflussungen durch die Substanz dargestellt werden. Es zeigten sich jedoch keine deutlichen Abhängigkeiten zur Konzentration oder Behandlungszeit.

**3. Sind TR $\alpha$ , TR $\beta$  und TSH geeignete Biomarker zur Untersuchung von Effekten durch schilddrüsen ED?**

Im Rahmen dieser Arbeit konnten TR $\alpha$ , TR $\beta$  und TSH als Biomarker etabliert werden, jedoch zeigten die Untersuchungen mit Methimazol und T3, dass in den untersuchten Konzentrationsbereichen die Gene zwar reguliert wurden, jedoch Änderungen in der Expression der Gene nicht eindeutig auf die Behandlungen zurückgeführt werden konnten. Es wurde vermutet, dass der schilddrüsen ED Methimazol nicht bzw. nur sehr schwach an die TR bindet.

**4. Wirken Methimazol bzw. T3 als chemische Stressoren auf die Gene der Enzyme der Stresshormonbiosynthese (ddc, th und d $\beta$ h)?**

Die Untersuchungen zeigten, dass in einzelnen Konzentrationsbereichen der Behandlungen mit Methimazol bzw. T3 die Expression beeinflusst wurde. Deutliche Effekte, welche die Vermutung hätten bestätigen können, dass das Stresshormonsystem direkt mit dem Schilddrüsenensystem korreliert ist, konnten nicht dargestellt werden.

**5. Gibt es Zusammenhänge zwischen dem Schilddrüsenensystem und anderen endokrinen Systemen, wie dem Stresshormonsystem?**

Es konnte festgestellt werden, dass die Expression der cyp-mRNA nach Behandlungen mit Methimazol und T3 ähnlich mit der Expression der TSH-mRNA war. Untersuchungen mittels RAP-PCR brachten deutlich Unterschiede in den Bandenmustern von Kontrollen und Behandlungen, die eventuell unterschiedliche Genexpressionen und somit Substanzeffekte darstellen.

**6. Ist Methimazol eine geeignete Modellsubstanz zur Etablierung eines Schilddrüsen-ED-Testsystems?**

Aufgrund der hemmenden Eigenschaften von Methimazol auf die Schilddrüsenperoxidase sollte die Substanz prinzipiell eine geeignete Testsubstanz sein. Es konnte jedoch in den durchgeführten verschiedenen Untersuchungen festgestellt werden, dass Methimazol erst in sehr hohen Konzentrationen Effekte hervorrief. Daher ist nach dem jetzigen Stand der Arbeiten Methimazol nur in Abhängigkeit von den zu untersuchenden Fragestellungen eine geeignete

Modellsubstanz. Im Rahmen dieser Arbeit zur Etablierung eines Testsystems war Methimazol durchaus geeignet, jedoch sollte für weitere ökotoxikologischen Untersuchungen zusätzlich andere Chemikalien bzw. Xenobiotika, wie Bisphenol A herangezogen werden. Nachteil vieler bekannter Xenobiotika als Modellchemikalien ist, dass die Mechanismen ihrer Wirkung bisher noch unzureichend untersucht sind, vor allem in Hinsicht auf Untersuchungen der Effekte auf die Schilddrüsenfunktion. Angesichts der vorliegenden Studie ist es schwierig eine neue geeignetere Modellsubstanz für weitere Untersuchungen vorzuschlagen. Als Referenzsubstanz vorstellbar wäre T3. Jedoch sollte dabei berücksichtigt werden, dass das Testsystem mit der Messung der TR-mRNA Expressionen möglicherweise keine potentiellen Angriffspunkte für ED darstellen, so dass in diesem Fall auch T3 nicht geeignet wäre. Aufschlussreich für weitere Studien könnte die Bestimmung der Bindungseigenschaften der möglichen Testsubstanz an die Rezeptoren, sowie die Bestimmung der gebundenen und freien Hormone (T3 und T4) im Organismus mit und ohne Behandlungen mit der Testsubstanz sein.

#### **7. Lässt sich *Danio rerio* als Modellorganismus zur Bestimmung von Störungen des endokrinen Systems durch chemische Stressoren etablieren?**

Die vorliegende Arbeit zeigte die besondere Eignung des Zebrafisches für Untersuchungen der Effekte von ED auf aquatische Organismen. Im Rahmen der Arbeit war es möglich verschiedenste Untersuchungsmethoden mit einem Organismus durchzuführen, was die Vergleichbarkeit und Diskutierbarkeit der Ergebnisse deutlich erhöhte. Vor allem auf molekularbiologischer Ebene ist der Zebrafisch ein geeigneter Modellorganismus. Grenzen der Untersuchungen ergaben sich nur durch die geringe Größe des Fisches, z.B. bei der Betrachtung von einzelnen Organsystemen. Für die Untersuchung einzelner Organe ist die Methode der *in situ* Hybridisierung für Zebrafischembryonen sehr geeignet, da sie Effekte auf einzelne Organe optisch sichtbar machen kann.

## 9 Abstract

An increasing number of various chemical substances are suspected of affecting the endocrine system of organism. These substances are called endocrine disruptors (ED). They are able to imitate or affect the functions of natural hormones. Topic of this project was to establish a method to examine the effects of thyroid ED on zebrafish (*Danio rerio*). First objective was the investigation of direct effects of ED on gene expression on thyroid axis and in addition the effects on other endocrine system or genes using a model substance for thyroid endocrine disruption. Model substance of this project was methimazole being a thyroid active drug and inhibitor of the thyroid peroxidase which disrupts the formation of thyroid hormones. Methimazol has like many other drugs and industrial substances a similar chemical structure as the natural hormones.

First of all the expression of mRNA of genes of the thyroid axis was analysed during the development of zebrafish from egg to adult fish using real-time RT-PCR. Genes of interests were the thyroid hormone receptors  $TR\alpha$  and  $TR\beta$  and the thyroid stimulating hormone (TSH). The measurements demonstrated that all genes were detectable in the early midblastula transition. The transcription of  $TR\alpha$  mRNA was lower than that of  $TR\beta$  mRNA but both are regulated during the development. A noticeable increase in the transcription of  $TR\beta$  mRNA was shown after hatching and formation of thyroid (from 2 to 4 dpf). The  $TR\alpha$  mRNA was weakly up-regulated until 5 wpf and subsequently up-regulate expression increased strongly.

Next step of this study was the examination of effects of methimazole on zebrafish. The analysis of adult whole body fish homogenates using RT-PCR caused no effects on the expressions of  $TR\alpha$  mRNA and  $TR\beta$  mRNA in concentration ranges from 50 till 300  $\mu$ M methimazole. Although there were no observable effects on gene expression the presence of methimazole in adult fish homogenates was demonstrated in HPLC measurements. Concentrations of methimazole in zebrafish were considerably lower than concentrations in exposition water revealing that exposure time did not further enhance detectable methimazole.

Histopathological effects onto the thyroid follicle of adult fish were examined after exposure with methimazole. Concentrations above 1 mM methimazole showed activation of thyroid epithelium with associated depletion of follicle colloid.

Larvae were exposed to methimazole and T3 and the expression levels of TR $\alpha$ , TR $\beta$  and TSH mRNA were analysed using real-time RT-PCR. Expression patterns indicated changes in gene expression, but there was no clear correlation on concentration or exposition time.

In ecotoxicological examinations the *in vivo* effects of methimazole, T3 and bisphenol A on development of zebrafish embryo were investigated. Expositions started at 2 hpf after hatching respectively and effects were visualized within 5 days. Concentrations of 5 mM methimazole inhibited completely hatching of larvae and above 10 mM all larvae died. Bisphenol A showed stronger toxic effects. Only embryos exposed to concentrations below 1  $\mu$ M showed no direct toxic and inhibitory effects on development. Results of exposure to T3 indicated different sensitive stages at zebrafish development. Until ages of 4 dpf significant disturbances in the development of larvae were recognised for concentrations of 1000 nM T3. After formation of thyroid and the production of endogenous T3 (3 dpf) disturbances of development were recognised for concentrations from 100 nM.

Second part of this project was the investigation of effects of methimazole and T3 on other endocrine systems and other genes. Differences in the complete gene pool after exposures with methimazole and T3 were investigated using RAP-PCR (*Random Amplified Polymorphic-PCR*). Analysis of the gels stained with ethidiumbromide demonstrated noticeable differences in the band patterns.

There are evidences that thyroid is associated to adrenal and other endocrine systems. For this reason the expression of genes of stress hormone synthesis and the gene cytochrom P450 1A1 were also investigated in this study. Cytochrom P450 1A1 is described to be induced by different compounds like PAHs, PCBs and halogenated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans. Similar to genes of thyroid axis the expression of th-, ddc-, d $\beta$ h- und cyp-mRNA (tyrosine-hydroxylase, dopa-decarboxylase, dopamine- $\beta$ -hydroxylase, cytochrom P450 1A1) were analysed during the development of zebrafish. All genes were detectable 2 hpf and up-regulations were recognised after hatching (from 2 until 4 dpf). Results of gene expressions after exposure to methimazole and T3 demonstrated that the genes of



stress hormone synthesis and cyp were regulated. However there was no simple trend line between concentrations respectively exposure time and the transcription levels.

## 10 Literaturverzeichnis

1. **Abu, E. O., S. Bord, A. Horner, V. K. K. Chatterjee, and J. E. Compston.** 1997. The expression of thyroid hormone receptors in human bone. *Bone* **21**:137-142.
2. **Alkindi, A. Y. A., J. A. Brown, C. P. Waring, and J. E. Collins.** 1996. Endocrine, osmoregulatory, respiratory and haematological parameters in flounder exposed to the water soluble fraction of crude oil. *Journal of Fish Biology* **49**:1291-1305.
3. **Anderson, S., W. Sadinski, L. Shugart, P. Brussard, M. Depledge, T. Ford, J. Hose, J. Stegeman, W. Suk, I. Wirgin, and G. Wogan.** 1994. Genetic and molecular ecotoxicology: A research framework. *Environmental Health Perspectives* **102**:3-8.
4. **Babin, P. J.** 1992. Binding of thyroxine and 3,5,3'-triiodothyronine to trout plasma lipoproteins. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* **262**.
5. **Bailey, G. S., D. E. Williams, and J. D. Hendrick.** 1996. Fish models for environmental carcinogenesis: The rainbow trout. *Environmental Health Perspectives* **104**:5-21.
6. **Balon, E. K.** 1990. Epigenesis of an epigeneticist: the development of some alternative concepts on the early ontogeny and evolution of fishes. *Guelph Ichthyol Rev* **1**:1-48.
7. **Banker, D. E., and R. N. Eisenman.** 1993. Thyroid hormone receptor can modulate retinoic acid-mediated axis formation in frog embryogenesis. *Molecular and Cellular Biology* **13**:7540-7552.
8. **Besselink, H. T., S. Van Beusekom, E. Roex, A. D. Vethaak, J. H. Koeman, and A. Brouwer.** 1996. Low hepatic 7-ethoxyresorufin-o-deethylase (EROD) activity and minor alterations in retinoid and thyroid hormone levels in flounder (*Platichthys Flesus*) exposed to the polychlorinated biphenyl (PCB) mixture, clophen A50. *Environmental Pollution* **92**:267-274.
9. **Bickham, J. W., and M. J. Smolen.** 1994. Somatic and heritable effects of environmental genotoxins and the emergence of evolutionary toxicology. *Environmental Health Perspectives* **102**:25-28.
10. **Blaxter, J. H. S.** 1988. Pattern and variety in development. In "Fish Physiology," Vol.XI, "The Physiology of Developing Fish" (W. S. Hoar and D.J. Randall, Eds.), Part A: 1-58. Academic Press, San Diego.

11. **Brouwer, A., D. C. Morse, M. C. Lans, A. G. Schuur, A. J. Murk, E. Klasson-Wehler, A. Bergman, and T. J. Visser.** 1998. Interactions of persistent environmental organohalogenes with the thyroid hormone system: Mechanisms and possible consequences for animal and human health. *Toxicology and Industrial Health* **14**:59-84.
12. **Brown, C. L., and B. G. Kim.** 1995. Combined application of cortisol and triiodothyronine in the culture of larval marine finfish. *Aquaculture* **135**:79-86.
13. **Brown, D. D.** 1997. The role of thyroid hormone in zebrafish and axolotl development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:13011–13016.
14. **Brown, S. B., R. E. Evans, K. W. Finnson, and L. Vandenbyllardt.** 1997. Thyroid function in lake trout (*Salvelinus namaycush*) exposed to co-planar 3,3H,4,4H,5-pentachlorobiphenyl. In: Proceedings of the 24th Annual Aquatic Toxicity Workshop, 20-22 October. Niagara Falls, Ontario. Canadian Technical Report of Fisheries Aquatic Science 2192:135.
15. **Brucker-Davis, F.** 1998. Effects of environmental synthetic chemicals on thyroid function. *Thyroid* **8**:827-56.
16. **Bucheli, T. D., and K. Fent.** 1995. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* **25**:201-268.
17. **Buhler, D. R., and J. L. Wang-Buhler.** 1998. Rainbow trout cytochrome P450s: Purification, molecular aspects, metabolic activity, induction and role in environmental monitoring. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology* **121**:107-137.
18. **Bustin, S. A.** 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* **25**:169-193.
19. **Byrne, B. C., J. J. Li, and B. J. Poiesz.** 1988. Detection of HIV-1-RNA sequences by in vitro DNA amplification. *Nucleic Acids Research*; 4165-4170.
20. **Callery, E. M., and R. P. Elinson.** 2000. Thyroid hormone-dependent metamorphosis in a direct developing frog. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**:2615–2620.
21. **Campbell, P. M., and R. H. Devlin.** 1996. Expression of CYP1A1 in livers and gonads of Pacific salmon: Quantitation of mRNA levels by RT-cPCR. *Aquatic Toxicology* **34**:47-69.
22. **Cao, Z., J. Hong, R. E. Peterson, and J. M. Aiken.** 2000. Characterization of CYP1A1 and CYP1A3 gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* **49**:101-109.

23. **Capen, C. C.** 1996. Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, Eds: Klassen, C. D., Amdur, M. O., Doull, J. Pergamon Press, New York; 617.
24. **Cheek, A. O., C. F. Ide, J. E. Bollinger, C. V. Rider, and J. A. McLachlan.** 1999. Alteration of leopard frog (*Rana pipiens*) metamorphosis by the herbicide acetochlor. Archives of Environmental Contamination and Toxicology **37**:70-77.
25. **Cheek, A. O., K. Kow, J. Chen, and J. A. McLachlan.** 1999. Potential mechanisms of thyroid disruption in humans: Interaction of organochlorine compounds with thyroid receptor, transthyretin, and thyroid-binding globulin. Environmental Health Perspectives **107**:273-278.
26. **Chomczynski, P., and N. Sacchi.** 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Analytical Biochemistry **162**:156-159.
27. **Colborn, T.** 2002. Clues from wildlife to create an assay for thyroid system disruption. Environmental Health Perspectives **110**:363-367.
28. **Colborn, T., F. S. vom Saal, and A. M. Soto.** 1994. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. Environ Health Perspect. **102**:256-257.
29. **Cooke, P. S., D. R. Holsberger, R. J. Witorsch, P. W. Sylvester, J. M. Meredith, K. A. Treinen, and R. E. Chapin.** 2004. Thyroid hormone, glucocorticoids, and prolactin at the nexus of physiology, reproduction, and toxicology. Toxicology and Applied Pharmacology **194**:309-335.
30. **Cousinou, M., B. Nilsen, J. López-Barea, and G. Dorado.** 2000. New methods to use fish cytochrome P4501A to assess marine organic pollutants. Science of the Total Environment **247**:213-225.
31. **Cyr, D. G., and J. G. Eales.** 1996. Interrelationships between thyroidal and reproductive endocrine systems in fish. Reviews in Fish Biology and Fisheries **6**:165-200.
32. **Dales, S., Hoar, W. S.** 1954. Effects of thyroxine and thiourea on the early development of chum salmon (*Oncorhynchus keta*). Can. J. Zool. **32**:244-251.
33. **De Jesus, E. G., T. Hirano, and Y. Inui.** 1991. Changes in cortisol and thyroid hormone concentrations during early development and metamorphosis in the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. General and Comparative Endocrinology **82**:369-376.
34. **De Jesus, E. G., Toledo, J. D., Simpas, M. S.** 1998. Thyroid hormones promote early metamorphosis in grouper (*Epinephelus coioides*) larvae. Gen. Comp. Endocrinol. **112**:10-16.

35. **Decuypere, E., and E. R. Kühn.** 1984. Effects of fasting and feeding time on circadian rhythms of serum thyroid hormone concentrations, glucose, liver monodeiodinating activity and rectal temperature in growing chickens. *Dom. Anim. Endocrinol.* **1**:251-262.
36. **Denison, M. S., and S. R. Nagy.** 2003. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **43**:309-334.
37. **Denison, M. S., A. Pandini, S. R. Nagy, E. P. Baldwin, and L. Bonati.** 2002. Ligand binding and activation of the Ah receptor. *Chemico-Biological Interactions* **141**:3-24.
38. **DeVito, M., L. Biegel, A. Brouwer, S. Brown, F. Brucker-Davis, A. Oliver Cheek, R. Christensen, T. Colborn, P. Cooke, J. Crissman, K. Crofton, D. Doerge, E. Gray, P. Hauser, P. Hurley, M. Kohn, J. Lazar, S. McMaster, M. McClain, E. McConnell, C. Meier, R. Miller, J. Tietge, and R. Tyl.** 1999. Screening methods for thyroid hormone disrupters. *Environmental Health Perspectives* **107**:407-415.
39. **DiStefano, J. J., Ron, B., Nguyen, T.T., Weber, G.M., Grau, E.G.** 1988. 3,5,3'-Triiodothyronine (T3) clearance and T3-glucuronide (T3G) appearance kinetics in plasma of freshwater-reared male tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **111**:123-140.
40. **Dodds, E. C., and W. Lawson.** 1936. Synthetic oestrogenic agents without the phenanthrene nucleus. *Nature* **137**:996.
41. **Dodds, E. C., W. Lawson, and R. L. Noble.** 1938. BIOLOGICAL EFFECTS OF THE SYNTHETIC OESTROGENIC SUBSTANCE 4 : 4'-DIHYDROXY-[alpha] : [beta]-DIETHYLSTILBENE. *The Lancet* **231**:1389-1391.
42. **Doerge, D. R., and R. S. Takazawa.** 1990. Mechanism of thyroid peroxidase inhibition by ethylenethiourea. *Chem. Res. Toxicol.* **3**:98 - 101.
43. **Eales, J. G.** 1988. The influence of nutritional state on thyroid function in various vertebrates. *Am. Zool.* **28**:351-362.
44. **Eales, J. G.** 1979. Thyroid function in cyclostomes and fishes. In: Barrington, E. J. W. (Ed), *Hormones and Evolutio*, 1. Academic press, London; 341-436.
45. **Eales, J. G., and S. B. Brown.** 1993. Measurement and regulation of thyroidal status in teleost fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **3**:299-347.
46. **Ebbesson, L. O. E., B. T. Björnsson, S. O. Stefansson, and P. Ekström.** 1998. Propylthiouracil-induced hypothyroidism in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*: Effects on plasma total thyroxine, total triiodothyronine, free thyroxine, and growth hormone. *Fish Physiology and Biochemistry* **19**:305-313.

47. **Eckert, R.** 1986. Tierphysiologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart.
48. **Ellis, T., B. R. Howell, and J. Hayes.** 1997. Morphological differences between wild and hatchery-reared turbot. *Journal of Fish Biology* **50**:1124-1128.
49. **Elsalini, O. A., and K. B. Rohr.** 2003. Phenylthiourea disrupts thyroid function in developing zebrafish. *Development Genes and Evolution* **212**:593-598.
50. **Emilien, G., J.-M. Maloteaux, M. Geurts, K. Hoogenberg, and S. Cragg.** 1999. Dopamine receptors--physiological understanding to therapeutic intervention potential. *Pharmacology & Therapeutics* **84**:133-156.
51. **Essner, J. J., J. J. Breuer, R. D. Essner, S. C. Fahrenkrug, and P. B. Hackett.** 1997. The zebrafish thyroid hormone receptor a1 is expressed during early embryogenesis and can function in transcriptional repression. *Differentiation* **62**:107-117.
52. **European, Comission** 1996. European Workshop on the impact of Endocrine Disruptors on Human Ealth and Wildlife. Report of Proceedings, Weybridge, UK, December 2-4:119.
53. **Facemire, C. F., T. S. Gross, and L. J. Guillette Jr.** 1995. Reproductive impairment in the Florida panther: Nature or nurture? *Environmental Health Perspectives* **103**:79-86.
54. **Faustino, M., and D. M. Power.** 1998. Development of osteological structures in the sea bream: Vertebral column and caudal fin complex. *Journal of Fish Biology* **52**:11-22.
55. **Faustino, M., and D. M. Power.** 1999. Development of the pectoral, pelvic, dorsal and anal fins in cultured sea bream. *Journal of Fish Biology* **54**:1094-1110.
56. **Faustino, M., and D. M. Power.** 2001. Osteologic development of the viscerocranial skeleton in sea bream: Alternative ossification strategies in teleost fish. *Journal of Fish Biology* **58**:537-572.
57. **Finnson, K. W., J. M. McLeese, and J. G. Eales.** 1999. Deiodination and Deconjugation of Thyroid Hormone Conjugates and Type I Deiodination in Liver of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology* **115**:387-397.
58. **Flamant, F., and J. Samarut.** 1998. Involvement of thyroid hormone and its a receptor in avian neurulation. *Developmental Biology* **197**:1-11.
59. **Folmar, L. C., W. W. Dickhoff, and W. S. Zaugg.** 1982. The effects of Aroclor 1254 and no. 2 fuel oil on smoltification and sea-water adaptation of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquatic Toxicology* **2**:291-299.

60. **Foo, J. T. W., and T. J. Lam.** 1993. Serum cortisol response to handling stress and the effect of cortisol implantation on testosterone level in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Aquaculture* **115**:145-148.
61. **Frith, S. D., and J. G. Eales.** 1996. Thyroid Hormone Deiodination Pathways in Brain and Liver of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology* **101**:323-332.
62. **Fry, D. M.** 1995. Reproductive effects in birds exposed to pesticides and industrial chemicals. *Environmental Health Perspectives* **103**:165-171.
63. **Galton, V. A.** 1992. The role of thyroid hormone in amphibian metamorphosis. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **3**:96-100.
64. **Gerlienke Schuur, A., A. Brouwer, A. Bergman, M. W. H. Coughtrie, and T. J. Visser.** 1998. Inhibition of thyroid hormone sulfation by hydroxylated metabolites of polychlorinated biphenyls. *Chemico-Biological Interactions* **109**:293-297.
65. **Glass, A. S., and R. Dahm.** 2004. The zebrafish as a model organism for eye development. *Ophthalmic Research* **36**:4-24.
66. **Gray Jr., L. E.** 1998. Tiered screening and testing strategy for xenoestrogens and antiandrogens. *Toxicology Letters* **102-103**:677-680.
67. **Gu, Y.-Z., J. B. Hogenesch, and C. A. Bradfield.** 2000. The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **40**:519-561.
68. **Guillette, L. J. Jr. and M. P. Gunderson.** 2001. Alterations in development of reproductive and endocrine systems of wildlife populations exposed to endocrine-disrupting contaminants. *Reproduction* **122**:857-864.
69. **Gutleb, A. C., J. Appelman, M. Bronkhorst, J. H. J. Van Den Berg, and A. J. Murk.** 2000. Effects of oral exposure to polychlorinated biphenyls (PCBs) on the development and metamorphosis of two amphibian species (*Xenopus laevis* and *Rana temporaria*). *Science of the Total Environment* **262**:147-157.
70. **Gutleb, A. C., J. Appelman, M. C. Bronkhorst, J. H. J. Van Den Berg, A. Spenkelink, A. Brouwer, and A. J. Murk.** 1999. Delayed effects of pre- and early-life time exposure to polychlorinated biphenyls on tadpoles of two amphibian species (*Xenopus laevis* and *Rana temporaria*). *Environmental Toxicology and Pharmacology* **8**:1-14.
71. **Guttman, S. I.** 1994. Population genetic structure and ecotoxicology. *Environmental Health Perspectives* **102**:97-100.
72. **Hahn, M. E.** 1998. The aryl hydrocarbon receptor: A comparative perspective. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology* **121**:23-53.

73. **Hahn, M. E., and J. J. Stegeman.** 1994. Regulation of cytochrome P4501A1 in teleosts: Sustained induction of CYP1A1 mRNA, protein, and catalytic activity by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran in the marine fish *Stenotomus chrysops*. *Toxicology and Applied Pharmacology* **127**:187-198.
74. **Hanisch, B., B. Abbas, W. Kratz, and G. Schüürmann.** 2004. Humanarzneimittel im aquatischen Ökosystem. Bewertungsansatz zur Abschätzung des ökotoxikologischen Risikos von Arzneimittelrückständen. *UWSF-Z Umweltchem Ökotox* **16**:223-238.
75. **Hawkins, W. E., R. M. Overstreet, and W. W. Walker.** 1988. Carcinogenicity tests with small fish species. *Aquatic Toxicology* **11**:113-128.
76. **Heppel, S. A., N. D. Denslow, L. C. Folmar, and C. V. Sullivan.** 1995. Universal assay of vitellogenin as a biomarker forenvironmental estrogens. *Environ Health Perspect.* **103**:9-15.
77. **Herberer, T., K. Schmidt-Bäumler, and H. J. Stan.** 1998. Occurrence and Distribution of Organic Contaminants in the Aquatic System in Berlin. Part I. Drug Residues and other Polar Contaminants in Berlin Surface and Groundwater. *Acta hydrochim hydrobiol* **26**:272-278.
78. **Herberer, T., and H. J. Stan.** 1997. Determination of clofibric acid and N-(phenylsulfonyl)-sarcosine in sewage, river and drinking water. *Inter. J. Environ. Anal. Chem.* **67**:113-124.
79. **Hilscherova, K., M. Machala, K. Kannan, A. L. Blankenship, and J. P. Giesy.** 2000. Cell bioassays for detection of aryl hydrocarbon (AhR) and estrogen receptor (ER) mediated activity in environmental samples. *Environmental Science and Pollution Research* **7**:159-171.
80. **Hollosi, L.** 2005. Development and Application of Analytical Methods for the Determination of Methimazole and its Metabolites and their Effects to Thyroid Homeostasis in Zebrafish (*D. rerio*). Doktorarbeit an der Technischen Universität München - WZW.
81. **Hollosi, L., A. Kettrup, and K.-W. Schramm.** 2004. MMSPE-RP-HPLC method for the simultaneous determination of methimazole and selected metabolites in fish homogenates. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **36**:921-924.
82. **Hontela, A., P. Dumont, D. Duclos, and R. Fortin.** 1995. Endocrine and metabolic dysfunction in yellow perch, *Perca flavescens*, exposed to organic contaminants and heavy metals in the St. Lawrence River. *Environmental Toxicology and Chemistry* **14**:725-731.
83. **Houeto, P., G. Bindoula, and J. R. Hoffman.** 1995. Ethylenebisdithiocarbamates and Ethylenethiourea: Possible Human Health Hazards *Environmental Health Perspectives* **103**.



84. **Huang, L., A. M. Schreiber, B. Soffientino, D. A. Bengtson, and J. L. Specker.** 1998. Metamorphosis of summer flounder (*Paralichthys dentatus*): Thyroid status and the timing of gastric gland formation. *Journal of Experimental Zoology* **280**:413-420.
85. **Hurley, P. M., R. N. Hill, and R. J. Whiting.** 1998. Mode of carcinogenic action of pesticides inducing thyroid follicular cell tumors in rodents. *Environmental Health Perspectives* **106**:437-445.
86. **Inui, Y., and S. Miwa.** 1985. Thyroid hormone induces metamorphosis of flounder larvae. *General and Comparative Endocrinology* **60**:450-454.
87. **Inui, Y., S. Miwa, K. Yamano, and H. T.** 1994. Hormonal Control of flounder metamorphosis. In Davey, K.G., Peter, R.E., Tobe, S.S. (Eds.), *Perspectives in Comparative Endocrinology*. National Research Council, Canada; 408-411.
88. **Inui, Y., K. Yamano, and S. Miwa.** 1995. The role of thyroid hormone in tissue development in metamorphosing flounder. *Aquaculture* **135**:87-98.
89. **Islinger, M., S. Pawlowski, H. Hollert, A. Völkl, and T. Braunbeck.** 1999. Measurement of vitellogenin-mRNA expression in primary cultures of rainbow trout hepatocytes in a non-radioactive dot blot/RNase protection-assay. *Science of the Total Environment* **233**:109-122.
90. **Iwata, H., and J. J. Stegeman.** 2000. In Situ RT-PCR Detection of CYP1A mRNA in Pharyngeal Epithelium and Chondroid Cells from Chemically Untreated Fish: Involvement in Vertebrate Craniofacial Skeletal Development? *Biochemical and Biophysical Research Communications* **271**:130-137.
91. **Jobling, S., D. Sheahan, J. A. Osborne, P. Matthiessen, and J. P. Sumpter.** 1996. INHIBITION OF TESTICULAR GROWTH IN RAINBOW TROUT (*ONCORHYNCHUS MYKISS*) EXPOSED TO ESTROGENIC ALKYLPHENOLIC CHEMICALS. *Environmental Toxicology and Chemistry* **15**:194-202.
92. **Jobling, S., and J. P. Sumpter.** 1993. Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: An in vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquatic Toxicology* **27**:361-372.
93. **Jones, I., S. A. Rogers, P. Kille, and G. E. Sweeney.** 2002. Molecular Cloning and Expression of Thyroid Hormone Receptor Alpha during Salmonid Development. *General and Comparative Endocrinology* **125**:226-235.
94. **Juchau, M. R., and H. Chen.** 1998. Developmental enzymology: xenobiotic biotransformation. In: Slikker W Jr, Chang L. W., (Eds.). *Handbook of developmental neurotoxicology*. San Diego, CA: Academic Press, Inc. :321-337.

95. **Kanamori, A., and D. D. Brown.** 1992. The regulation of thyroid hormone receptor beta genes by thyroid hormone in *Xenopus laevis*. *The Journal Of Biological Chemistry* **267**:739-745.
96. **Kelce, W. R., C. R. Stone, S. C. Laws, L. E. Gray, J. A. Kemppainen, and E. M. Wilson.** 1995. Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature* **375**:581-585.
97. **Kime, D. E., J. P. Nash, and A. P. Scott.** 1999. Vitellogenesis as a biomarker of reproductive disruption by xenobiotics. *Aquaculture* **177**:345-352.
98. **Kimmel, C. B., W. W. Ballard, S. R. Kimmel, B. Ullmann, and T. F. Schilling.** 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics* **203**:253-310.
99. **Kloas, W.** 2002. Amphibians as a model for the study of endocrine disruptors. *International Review of Cytology* **216**:1-57.
100. **Kloas, W., M. Reinecke, and W. Hanke.** 1997. Stage-Dependent Changes in Adrenal Steroids and Catecholamines during Development in *Xenopus laevis*. *General and Comparative Endocrinology* **108**:416-426.
101. **Kratz, W., B. Abbas, and I. Linke.** 2000. Arzneimittelwirkstoffe in der Umwelt. *UWSF - Z Umweltchem. Ökotox.* **12**:343-349.
102. **Kühn, E. R., K. L. Geris, S. Van Der Geyten, K. A. Mol, and V. M. Darras.** 1998. Inhibition and activation of the thyroidal axis by the adrenal axis in vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology* **120**:169-174.
103. **Lam, T. J.** 1994. Hormones and egg/larval quality in fish. *Journal of the World Aquaculture Society* **25**:2-12.
104. **Lam, T. J.** 1985. Role of thyroid hormone on larval growth and development in fish. In: Lofts, B., Holmes, W.N. (Eds.), *Current Trends in Comparative Endocrinology*. Hong Kong University Press, Hong Kong 481-485.
105. **Lam, T. J.** 1980. Thyroxine enhances larval development and survival in *Sarotherodon (Tilapia) mossambicus Ruppell*. *Aquaculture* **21**:287-291.
106. **Lam, T. J., J. V. Juario, and J. Banno.** 1985. Effect of thyroxine on growth and development in post-yolk-sac larvae of milkfish, *Chanos chanos*. *Aquaculture* **46**:179-184.
107. **Lam, T. J., and R. Sharma.** 1985. Effects of salinity and thyroxine on larval survival, growth and development in the carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture* **44**:201-212.

108. **Lange, R., T. H. Hutchinson, C. P. Croudace, F. Siegmund, H. Schweinfurth, P. Hampe, G. H. Panter, and J. P. Sumpter.** 2001. EFFECTS OF THE SYNTHETIC ESTROGEN 17 $\alpha$ -ETHINYLESTRADIOL ON THE LIFE-CYCLE OF THE FATHEAD MINNOW (*PIMEPHALES PROMELAS*). *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**:1216-1227.
109. **Lans, M. C., C. Spiertz, A. Brouwer, and J. H. Koeman.** 1994. Different competition of thyroxine binding to transthyretin and thyroxine-binding globulin by hydroxy-PCBs, PCDDs and PCDFs. *European Journal of Pharmacology - Environmental Toxicology and Pharmacology Section* **270**:129-136.
110. **Larsen, H. v. E., M. Celandier, and A. GoksÅ\_yr.** 1992. The cytochrome P450 system of Atlantic salmon (*Salmo salar*): II. Variations in hepatic catalytic activities and isozyme patterns during an annual reproductive cycle. *Fish Physiology and Biochemistry* **10**:291-301.
111. **Latonnelle, K., F. Le Menn, and C. Bennetau-Pelissero.** 2000. In vitro estrogenic effects of phytoestrogens in rainbow trout and Siberian sturgeon. *Ecotoxicology* **9**:115-125.
112. **Leatherland, J. F.** 2000. Contaminant-altered thyroid function in wildlife. In: Guillette L.J., Crain D.A., (Eds.), *Environmental Endocrine Disruptors: An Evolutionary Perspective*. Taylor and Francis, New York, NY, USA: 155–181.
113. **Leatherland, J. F.** 1982. Environmental physiology of the teleostean thyroid gland: a review. *Environmental Biology of Fishes* **7**:83-110.
114. **Leatherland, J. F.** 1994. Reflections on the thyroidology of fishes: from molecules to humankind. *Guelph Ichthyol. Rev.* **2**:1-67.
115. **Leatherland, J. F.** 1987. Thyroid hormones and reproduction. In: Norris, D.O., Jones, R.E. (Eds.), *Reproductive Endocrinology of Fishes, Amphibians and Reptiles*. Plenum Press, New York: 411-431.
116. **Leatherland, J. F., and R. A. Sonstegard.** 1978. Lowering of Serum Thyroxine and Triiodothyronine Levels in Yearling Coho Salmon, *Oncorhynchus Kisutch*, by Dietary Mirex and PCBs. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* **35**:1285-1289.
117. **Leonard, J. L., and T. J. Visser.** 1986. Biochemistry of deiodination. In: Henneman, G. (Ed.), *Thyroid Hormone Metabolism*. Marcel Dekker, New York: 189-230.
118. **Liang, P., and A. B. Pardee.** 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257**:967-971.
119. **Liang, P., and A. B. Pardee.** 1993. Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. *Nucleic Acids Research* **21**:3269-3275.

120. **Liu, Y.-W., and W.-K. Chan.** 2002. Thyroid hormones are important for embryonic to larval transitory phase in zebrafish. *Differentiation* **70**:36-45.
121. **Liu, Y.-W., L.-J. Lo, and W.-K. Chan.** 2000. Temporal expression and T3 induction of thyroid hormone receptors  $\alpha 1$  and  $\beta 1$  during early embryonic and larval development in zebrafish, *Danio rerio*. *Molecular and Cellular Endocrinology* **159**:187-195.
122. **Llewellyn, L., M. A. Nowell, V. P. Ramsurn, T. Wigham, G. E. Sweeney, B. Kristjánsson, and O. Halldórsson.** 1999. Molecular cloning and developmental expression of the halibut thyroid hormone receptor- $\alpha$ . *Journal of Fish Biology* **55**:148-155.
123. **Lottspeich, F., and H. Zorbas.** 1998. *Bioanalytik. 1.*, Heidelberg - Berlin, Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
124. **Lutz, I., and W. Kloas.** 1999. Amphibians as a model to study endocrine disruptors: I. Environmental pollution and estrogen receptor binding. *The Science of The Total Environment* **225**:49-57.
125. **Mannering, G. J.** 1985. Drug metabolism in the newborn. *Fed. Proc.* **44**:2302-2308.
126. **Mansuy, D.** 1998. The great diversity of reactions catalyzed by cytochromes P450. *Comparative Biochemistry and Physiology-C Pharmacology Toxicology and Endocrinology* **121**:5-14.
127. **Marchand, O., M. Duffraisse, G. Triqueneaux, R. Safi, and V. Laudet.** 2004. Molecular cloning and developmental expression patterns of thyroid hormone receptors and T3 target genes in the turbot (*Scophthalmus maximus*) during post-embryonic development. *General and Comparative Endocrinology* **135**:345-357.
128. **Martin, R.** 1996. *Elektrophorese von Nukleinsäuren, Reihe Labor im Fokus, 1.* Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin.
129. **Matthews, J., T. Celius, R. Halgren, and T. Zacharewski.** 2000. Differential estrogen receptor binding of estrogenic substances: A species comparison. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **74**:223-234.
130. **Mattingly, C. J., and W. A. Toscano.** 2001. Posttranscriptional silencing of cytochrome P4501A1 (CYP1A1) during zebrafish (*Danio rerio*) development. *Developmental Dynamics* **222**:645-654.
131. **May, J. D.** 1978. Effect of fasting on T3 and T4 concentrations in chicken serum. *General and Comparative Endocrinology* **34**:323-327.
132. **McKinney, J., R. Fannin, and S. Jordan.** 1987. Polychlorinated biphenyls and related compound interactions with specific binding sites for thyroxine in rat liver nuclear extracts. *Journal of Medicinal Chemistry* **30**:79-86.

133. **McKinney, J. D., J. Fawkes, and S. Jordan.** 1985. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) as a potent and persistent thyroxine agonist: A mechanistic model for toxicity based on molecular reactivity. *Environmental Health Perspectives* **VOL. 61**:41-53.
134. **McKinney, J. D., and C. L. Waller.** 1994. Polychlorinated biphenyls as hormonally active structural analogues. *Environmental Health Perspectives* **102**:290-297.
135. **McLachlan, J. A., and S. F. Arnold.** 1996. Environmental estrogens. *American Scientist* **84**:452-461.
136. **McLachlan, J. A., K. S. Korach, R. R. Newbold, and G. H. Degen.** 1984. Diethylstilbestrol and other estrogens in the environment. *Fundamental and Applied Toxicology* **4**:686-691.
137. **Meunier, J. R., and P. A. D. Grimont.** 1993. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Research in Microbiology* **144**:373-379.
138. **Milos, N., and A. D. Dingle.** 1978. Dynamics of pigment formation in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. I. Establishment and regulation of the lateral line melanophore stripe during the first eight days of development. *J. exp. Zool.* **205**:205-216.
139. **Miyata, S., S. Koike, and T. Kubo.** 1999. Hormonal reversal and the genetic control of sex differentiation in *Xenopus*. *Zoological Science* **16**:335-340.
140. **Mol, K., E. Kaptein, V. M. Darras, W. J. De Greef, E. R. Kuhn, and T. J. Visser.** 1993. Different thyroid hormone-deiodinating enzymes in tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver and kidney. *FEBS Letters* **321**:140-144.
141. **Mol, K. A., S. Van Der Geyten, C. Burel, E. R. Kuhn, T. Boujard, and V. M. Darras.** 1998. Comparative study of iodothyronine outer ring and inner ring deiodinase activities in five teleostean fishes. *Fish Physiology and Biochemistry* **18**:253-266.
142. **Mol, K. A., S. Van Der Geyten, V. M. Darras, T. J. Visser, and E. R. Kuhn.** 1997. Characterization of Iodothyronine outer ring and inner ring Deiodinase activities in the blue Tilapia, *Oreochromis Aureus*. *Endocrinology* **138**:1787-1793.
143. **Mühlhardt, C.** 2002. *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics-3.Aufl.* Heidelberg; Berlin: Spektrum, Akademischer Verlag.
144. **Mulvey, M., and S. A. Diamond.** 1991. Genetic factors and tolerance acquisition in populations exposed to metals and metalloids. In: Newman, M. C., McIntosh, A. W. (Eds.), *Metal Ecotoxicology: Concepts and Applications.* Lewis Publishers, Chelsea, MI.

145. **Nacario, J. F.** 1983. The effect of thyroxine on the larvae and fry of *Sarotherodon niloticus* L. (*Tilapia nilotica*). *Aquaculture* **34**:73-83.
146. **Nash, J. P., D. E. Kime, L. T. M. Van der Ven, P. W. Wester, F. Brion, G. Maack, P. Stahlschmidt-Allner, and C. R. Tyler.** 2004. Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethynylestradiol causes reproductive failure in fish. *Environmental Health Perspectives* **112**:1725-1733.
147. **Nelson, D. R., L. Koymans, T. Kamataki, J. J. Stegeman, R. Feyereisen, D. J. Waxman, M. R. Waterman, O. Gotoh, M. J. Coon, R. W. Estabrook, I. C. Gunsalus, and D. W. Nebert.** 1996. P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* **6**:1-42.
148. **Newton, C. R., and A. Graham.** 1994. PCR. 2.Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
149. **Nimrod, A. C., and W. H. Benson.** 1997. Xenobiotic interaction with and alteration of channel catfish estrogen receptor. *Toxicology and Applied Pharmacology* **147**:381-390.
150. **Nugegoda, D., W. Z. Wu, Y. Xu, J. Zhang, J. Lichtmannegger, and K.-W. Schramm.** 2000. Thyroid hormones in fish exposed to PCDD/F and TCDD, from the Yangtze River region, China. *Organohalogen Compounds* **49**:469-472.
151. **Orozco, A., J. E. Silva, and C. Valverde-R.** 1997. Rainbow trout liver expresses two iodothyronine phenolic ring deiodinase pathways with the characteristics of mammalian types I and II 5'-deiodinases. *Endocrinology* **138**:254-258.
152. **Pack, M., L. SolnicaKrezel, J. Malicki, S. C. F. Neuhauss, A. F. Schier, D. L. Stemple, W. Driever, and M. C. Fishman.** 1996. Mutations affecting development of zebrafish digestive organs. *Development* **123**:321-328.
153. **Palmer, B. D., and S. K. Palmer.** 1995. Vitellogenin induction by xenobiotic estrogens in the red-eared turtle and African clawed frog. *Environmental Health Perspectives* **103**:19-25.
154. **Parry, J. E., C. Zhang, and J. G. Eales.** 1994. Urinary excretion of thyroid hormones in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology* **95**:310-319.
155. **Pelisero, C., and J. P. Sumpter.** 1992. Steroids and "steroid-like" substances in fish diets. *Aquaculture* **107**:283-301.
156. **Peterson, M. E.** 1989. *Current Veterinary Therapy X, Small Animal Practice* (Kirk, R. W. & Bonagura, J. D. Eds.). WB Saunders Co, Philadelphia, USA:1002-1008.

157. **Peterson, M. E.** 2000. Textbook of Veterinary Internal Medicine, Volume II (Ettinger, S. J. & Feldman, E. C. Eds.). WB Saunders Co, Philadelphia, USA: 1400-1419.
158. **Pittman, K., A. Jelmert, T. Næss, T. Harboe, and K. Watanabe.** 1998. Plasticity of viable postmetamorphic forms of farmed Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L. *Aquaculture Research* **29**:949-954.
159. **Porter, T. D., and M. J. Coon.** 1991. Cytochrome P-450: Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms. *Journal of Biological Chemistry* **266**:13469-13472.
160. **Porterfield, S. P.** 2000. Thyroidal dysfunction and environmental chemicals-potential impact on brain development. *Environmental Health Perspectives* **108**:433-438.
161. **Porterfield, S. P., and C. E. Hendrich.** 1993. The role of thyroid hormones in prenatal and neonatal neurological development - Current perspectives. *Endocrine Reviews* **14**:94-106.
162. **Power, D. M., L. Llewellyn, M. Faustino, M. A. Nowell, B. T. Bjornsson, I. E. Einarsdottir, A. V. M. Canario, and G. E. Sweeney.** 2001. Thyroid hormones in growth and development of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **130**:447-459.
163. **Powers, D. A.** 1989. Fish as model systems. *Science* **246**:352-358.
164. **Purdom, C., P. Hardiman, V. Bye, N. Eno, T. C., and J. Sumpter.** 1994. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem. Ecol.* **8**:275-285.
165. **Rabelo, E. M. L., B. S. Baker, and J. R. Tata.** 1994. Interplay between thyroid hormone and estrogen in modulating expression of their receptor and vitellogenin genes during *Xenopus* metamorphosis. *Mechanisms of Development* **45**:49-57.
166. **Reddy, P. K., and T. J. Lam.** 1992b. Effect of thyroid hormones on morphogenesis and growth of larvae and fry of telescopic-eye black goldfish, *Carassius auratus*. *Aquaculture* **107**:383-394.
167. **Reddy, P. K., and T. J. Lam.** 1992a. Role of thyroid hormones in tilapia larvae (*Oreochromis mossambicus*) 1: Effects of the hormones and an antithyroid drug on yolk absorption, growth and development. *Fish Physiol. Biochem.* **9**:473-485.
168. **Ribeiro, R. C., J. W. Apriletti, R. L. Wagner, B. L. West, W. Feng, R. Huber, P. J. Kushner, S. Nilsson, T. Scanlan, and a. Fletterick et.** 1998. Mechanisms of thyroid hormone action: insights from X-ray crystallographic and functional studies. *Recent Progress In Hormone Research* **53**:351-392; discussion 392-394.

169. **Ricci, M. S., D. G. Toscano, and W. A. J. Toscano.** 1999. ECC-1 human endometrial cells as a model system to study dioxin disruption of steroid hormone function. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* **35**:183-9.
170. **Rohr, K. B., and M. L. Concha.** 2000. Expression of nk2.1a during early development of the thyroid gland in zebrafish. *Mechanisms of Development* **95**:267-270.
171. **Rolland, R. M.** 2000. A review of chemically-induced alterations in thyroid and vitamin A status from field studies of wildlife and fish. *J Wildl Dis* **36**:615-635.
172. **Rubinstein, A. L.** 2003. Zebrafish: From disease modeling to drug discovery. *Current Opinion in Drug Discovery and Development* **6**:218-223.
173. **Safe, S. H.** 1994. Polychlorinated biphenyls (PCBs): environmental impact. *Crit. Rev. Toxicol.* 87-149 **24**:87-149.
174. **Safe, S. H., and K. Gaido.** 1998. Phytoestrogens and anthropogenic estrogenic compounds. *Environmental Toxicology and Chemistry* **17**:119-126.
175. **Santos, C. R. A., and D. M. Power.** 1999. Identification of Transthyretin in Fish (*Sparus aurata*): cDNA Cloning and Characterisation. *Endocrinology* **140**:2430-2433.
176. **Semenza, J. C., P. E. Tolbert, C. H. Rubin, Guillette L. J. Jr., and R. J. Jackson.** 1997. Reproductive toxins and alligator abnormalities at Lake Apopka, Florida. *Environmental Health Perspectives* **105**:1030-1032.
177. **Shi, Y. B., J. Wong, M. Puzianowska-Kuznicka, and M. A. Stolow.** 1996. Tadpole competence and tissue-specific temporal regulation of amphibian metamorphosis: Roles of thyroid hormone and its receptors. *BioEssays* **18**:391-399.
178. **Simon, R., J. Tietge, B. Michalke, S. Degitz, and K.-W. Schramm.** 2003. Iodine species and the endocrine system: thyroid hormone levels in adult *Danio rerio* and developing *Xenopus laevis*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **376**:481-485.
179. **Sinha, N., B. Lal, and T. P. Singh.** 1991. Pesticides induced changes in circulating thyroid hormones in the freshwater catfish *Clarias batrachus*. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology* **100**:107-110.
180. **Sohoni, P., and J. P. Sumpter.** 1998. Several environmental oestrogens are also anti-androgens. *Journal of Endocrinology* **158**:327-339.
181. **Stegeman, J. J., and P. J. Kloepper-Sams.** 1987. Cytochrome P450 isozymes and monooxygenase activity in aquatic animals. *Environ. Health Perspect.* **71**:87-95.



182. **Stegeman, J. J., J. J. Schlezinger, J. E. Craddock, and D. E. Tillitt.** 2001. Cytochrome P450 1A expression in midwater fishes: Potential effects of chemical contaminants in remote oceanic zones. *Environmental Science and Technology* **35**:54-62.
183. **Sumpter, J. P., and S. Jobling.** 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Health Perspectives* **103**:173-178.
184. **Tagawa, M., S. Miwa, Y. Inui, E. G. De Jesus, and T. Hirano.** 1990. Changes in Thyroid Hormone concentration during early development and metamorphosis of the flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Zoological Science* **7**:93-96.
185. **Tanaka, M., J. B. Tanangonan, M. Tagawa, E. G. deJesus, H. Nishida, M. Isaka, R. Kimura, and T. Hirano.** 1995. Development of the pituitary, thyroid and interrenal glands and applications of endocrinology to the improved rearing of marine fish larvae. *Aquaculture* **135**:111-126.
186. **Ternes, T., R. Hirsch, M. Stumpf, T. Eggert, B. Schuppert, and K. Haberer.** 1999. Nachweis und Screening von Arzneimittelrückständen, Diagnostika und Antiseptika in der aquatischen Umwelt. Abschlussbericht des ESWE-Institutes für Wasserforschung und Wassertechnologie GmbH zum Forschungsvorhaben 02WU9567/3 des BMBF 234 S.
187. **Thoday, K. L., and C. T. Mooney.** 1992. *Current Veterinary Therapy XI, Small Animal Practice* (Kirk, R. W. & Bonagura, J. D. Eds.). WB Saunders Co, Philadelphia, USA:338-345.
188. **Trepanier, L. A.** 1990. The Use of Antithyroid Drugs in the Medical Management of Feline Hyperthyroidism *Probl Vet Med* **2**:668-682.
189. **Turner, C. D., and J. T. Bagnara.** 1976. *General Endocrinology*. W. B. Saunders Company, Philadelphia, PA, USA.
190. **Van den Belt, K., R. Verheyen, and H. Witters.** 2003. Comparison of vitellogenin responses in zebrafish and rainbow trout following exposure to environmental estrogens. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **56**:271–281.
191. **Van der Geyten, S., J. P. Sanders, V. M. Darras, E. R. Kuhn, J. L. Leonard, and T. J. Visser.** 1998. Cloning of tilapia type I and III deiodinases. *Annals of the New York Academy of Sciences* **839**:498-499.
192. **vom Saal, F. S., and W. V. Welshons.** 2006. Large effects from small exposures. II. The importance of positive controls in low-dose research on bisphenol A. *Environmental Research* **100**:50-76.
193. **Wang, A. M., M. V. Doyle, and D. F. Mark.** 1989. Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:9717-9721.

194. **Wang, W.-D., Y. Wang, H.-J. Wen, D. R. Buhler, and C.-H. Hu.** 2004. Phenylthiourea as a weak activator of aryl hydrocarbon receptor inhibiting 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced CYP1A1 transcription in zebrafish embryo. *Biochemical Pharmacology* **68**:63-71.
195. **Welsh, J., K. Chada, S. S. Dalal, R. Cheng, D. Ralph, and M. McClelland.** 1992. Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. *Nucleic Acids Research* **20**:4965-4970.
196. **Wendl, T., K. Lun, M. Mione, J. Favor, M. Brand, S. W. Wilson, and K. B. Rohr.** 2002. pax2.1 is required for the development of thyroid follicles in zebrafish. *Development* **129**:3751-3760.
197. **Wester, P. W., L. T. M. van der Ven, and J. G. Vos.** 2004. Comparative toxicological pathology in mammals and fish: some examples with endocrine disrupters. *Toxicology* **205**:27-32.
198. **Westerfield, M.** 1995. *The Zebrafish Book*, University of Oregon Press.
199. **White, R., S. Jobling, S. A. Hoare, J. P. Sumpter, and M. G. Parker.** 1994. Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology* **135**:175-182.
200. **Whitlock, J. P. J.** 1999. Induction of cytochrome P4501A1. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **39**:103-125.
201. **Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, and S. V. Tingey.** 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* **18**:6531-6535.
202. **Woodhead, A. D.** 1966. Effects of thyroid drugs on the larvae of brown trout, *Salmo trutta*. *J. Zool. Lond.* **149**.
203. **Wu, Y., and R. J. Koenig.** 2000. Gene Regulation by Thyroid Hormone. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **11**:207-211.
204. **Xu, Y., J. Zhang, W. Li, K. W. Schramm, and A. Kettrup.** 2002. Endocrine effects of sublethal exposure to persistent organic pollutants (POPs) on silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Environmental Pollution* **120**:683-690.
205. **Yamano, K., K. Araki, K. Sekikawa, and Y. Inui.** 1994. Cloning of thyroid hormone receptor genes expressed in metamorphosing flounder. *Developmental Genetics* **15**:378-382.
206. **Yamano, K., and Y. Inui.** 1995. cDNA Cloning of Thyroid Hormone Receptor [beta] for the Japanese Flounder. *General and Comparative Endocrinology* **99**:197-203.

207. **Yamano, K., and S. Miwa.** 1998. Differential Gene Expression of Thyroid Hormone Receptor  $\alpha$  and  $\beta$  in Fish Development. *General and Comparative Endocrinology* **109**:75-85.
208. **Yamano, K., M. Tagawa, E. G. deJesus, T. Hirano, S. Miwa, and Y. Inui.** 1991b. Changes in whole body concentrations of thyroid hormones and cortisol in metamorphosing conger eel. *J. Comp. Physiol. B* **161**:371-375.
209. **Yaoita, Y., and D. D. Brown.** 1990. A correlation of thyroid hormone receptor gene expression with amphibian metamorphosis. *Genes Dev* **4**:1917–1924.
210. **Yen, P. M., and W. W. Chin.** 1994. New advances in understanding the molecular mechanisms of thyroid hormone action. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **5**:65-72.
211. **Youson, J. H.** 1988. First metamorphosis. In: Hoar, W.S. and Randall, J.R. (eds) *Fish Physiology*. Academic Press, San Diego, Vol 11, Part B:135–196.
212. **Zhou, T., H. B. John-Alder, P. Weis, and J. S. Weis.** 1999. Thyroidal status of mummichogs (*Fundulus heteroclitus*) from a polluted versus a reference habitat. *Environmental Toxicology and Chemistry* **18**:2817-2823.

## 11 Anhang

### 11.1 Genverzeichnis

#### Schilddrüsenrezeptor $\alpha$ (TR $\alpha$ ; *thyroid hormone receptor $\alpha$* ):

Genbank *accession no.*: NM\_131396

Sequenzgröße: 2200 bp

Länge des PCR-Produkts: **380 bp** / 411 bp

Nukleotidsequenz:

```

1 ccagccgaaa ccgaatcgtt tcaaacgtg gtcaaacaaa taacatacta acactttcct
61 tctaagtga tataatccga acataggcta ttatttaag tagttcttag cggtttgaa
121 gggatcgca ggcggcagc gggcgactcg cgacgaagaa gaccgctcgt taaggagact
181 gctggtgga ctcaatgta ccatttcgcg ttgtttgga agcagttgt gtttctcgt
241 aaggaatgg cagtggcgtc ctgtaactgc tgaatgagcg accgtgagct gatcgtatgc
301 tgacgtcag agggtcgagt ccgcctcagt ctgctgtgat tggatgctgg atggaatcaa
361 ggtgaatgga aaacacagag caggagcaca acctgccaga aggagatgag acgcaatggc
421 caaatggagt gaagaggaaa agaaagaata gtcaatgctc tatgaacagc acatccgaca
481 agagcatctc tgttcctggg tacgttcca gttatctgga gaaagatgag cctgtgtgg
541 tgtgaggaga caaggccact ggctatcatt accgctgcat cacatgtgag ggctgcaagg
601 gtttctcag gaggacaata cagaaaaacc tcatccgctc ctattcctgt aaatagaca
661 gctgctgcat cattgacaaa atcacccgca accagtgccg gctgtgccgc ttcaggaagt
721 gcatctcagt gggcatggcc atggacttgg tgctggatga ttcgaagcgc gtggccaaga
781 ggcgtctgat cgaagaaaat cgggagaaga gaaagaaaga ggagatttg aagacgttac
841 acaatcgacc tgagcccacc gtgtcagagt ggaactcat tcgtatggtg acggaggctc
901 atcggcacac caatgcccag ggcctcact ggaacagaa acgcaagttc ctaccagaag
961 acattggaca gtctccagc ccgacatcag acaatgataa agtggacctg gaggcctca
1021 gtgagtttac caagatcatt acgcctgcca tcacacgagt tgtggacttt gccaaaaaac
1081 tgccatggt cctgagctg ccctgtgaag accagatcat ctgtgaaa ggctgctgta
1141 tggagatcat gtcattgcca gcagcgggtc ggtacgacc cgagagcgag actctgacc
1201 tgagcggaga gatggccgtc agtcgagagc agctgaaaaa cggagggctc ggagtggttt
1261 ctgatccat ctttgattg gggaagagcc tgtcacagtt taacctggat gactctgagg
1321 tggcactgct acaagctgtg ctgctcatga gctcagatcg ctctggactg acatgtgtgg
1381 agaagatcga gaagtgtcag gagatgtacc tgttggcatt cgagcactac atcaaccacc
1441 gcaagcacia catctccac ttctggcca agctgctgat gaaggtgacg aacctgcgca
1501 tgatcggcgc ctgccagcc agccgcttc tcacatgaa ggtggagtgt ccaacagaac
1561 tgttccgcc gctctctc gaggctctc aggatcagga gggaagcact ggagtggcag
1621 cacaggaaga cggttcctgc ttaaggtaga cctcgtttc gtccccgacc tccaaccac

```

1681 atccattcac gtgcatcaca agaggtttac ctgttctgc tgctgcca aaataaaaag  
 1741 gacacagcca gactccccg aaagcatctt ttggaatagt ttaacccgct gggtcagatg  
 1801 catagctggg ttcagcgtc cttttgacc gatattgtgt cattatggct ccaggagttc  
 1861 gggacgtggt ctccattfaa agtgacacag aggaacaaaa gggcaaaaag gacaaactca  
 1921 ctgtgactcg ctaatctcag ctcaatgcaa cccaccagca ctgcagacac aactgcccc  
 1981 cagacgcaat ctacagcacc agcacgggga atcaggaaga cctctatctt tttctctct  
 2041 ctctggacgt acagtacaga actggtttac agcagcactt ttattagaac agaacattca  
 2101 gttctttaca cttagccaga tgatgaatat gttgattgag aagttggctc taaaatgggt  
 2161 catattataa tgtttgaaa taaaagtga ttgtgctatg

### Schilddrüsenrezeptor $\beta$ (TR $\beta$ ; *thyroid hormone receptor $\beta$* ):

Genbank *accession no.*: NM\_131340

Sequenzgröße: 2198 bp

Länge des PCR-Produkts: **457 bp** / 291 bp

Nukleotidsequenz:

1 cttcttctg tgtctcggg tccatgttg agttgatctg ctctgctgg tcafttcagg  
 61 ccacgtatgt ccgatcacag gagcaaacat taaagttaca gagatatcaa tgaaggacat  
 121 acacacatgc tgtgttcag ctctgagggt ctctcatctg aatgaatgca ttgccatga  
 181 agtcagcgtg gggcgcttc aagaggggct ctggctctta tgacatgggt tagaggatga  
 241 aaggcaggat gtaaggctct gcttctcat accactctgg gacaactca aaatcacaaa  
 301 gcacgagata tcagcgagtc tgtggacaac aaaagaatga tggtaaggc ctaatatact  
 361 gcagtatgtc agagcaagca gacaaatgca actcccgtg gaaagatgag gccatgcaga  
 421 atgggtacat accaagttac ctggacaagg atgagctgtg tgtgtttgt ggagacaaag  
 481 caactggta tcactatcgc tgcattacat gtgagggctg caaaggtttc tttcagcga  
 541 caattcagaa gaactaaac ccaacatacg catgcaagta tgaaggaaag tgtgtcattg  
 601 acaaagttac ccgaaaccag tgccaagaat gtcgctcaa gaaatgcatc gctgttggca  
 661 tggctacaga cttgtattg gatgacagta aacgtttagc caagcggaag ctgattgagg  
 721 agaaccgtga acgcccagc cgtgaggagc tgcagaagac tttatgggat cgaccagagc  
 781 ccacacagga agagtggag atgatacggg ttgtcacaga ggcccatatg gccacaaatg  
 841 cccaaggcaa ccaactgaaa caaaagcga aatctctgcc agaagacatt ggatcggcac  
 901 ctattgtcaa tgcaccagag gggaacaaag tggacattga agccttcagt cagtttcaa  
 961 aaattatcac ccccgcac actcgtgtc tggattttgc caaaaagcta cccatgttct  
 1021 gtgagctgcc ttgtgaggac cagatcattt tgctgaagg ttgtgcatg gagatcatgt  
 1081 ctcttcagc agcagtcgt tatgacccc agagcgatac tctgacgcta aacggggaga  
 1141 tggctgtcac acggggccag ctcaagaatg ggggttggg tgtgtctca gatccatct  
 1201 ttgatctggg tctctcgtg tctcttta acttgacga ttcagagggt gcgtgttac  
 1261 aagccgtgat tctgcttcc tctgatcgtc caggtttaa aagcgttgag cgatagagc  
 1321 gtgtcagga ggagtttct ttgaccttg aacattacat caactaccgt aagcacaagg

1381 tggctcactt ttggcccaaa ctgctgatga aggtgacaga cctgcgcatg attggtgcct  
 1441 gccatgccag ccgcttcctg cacatgaagg tggaatgtcc cacagagctc ttccgcccc  
 1501 tcttctgga agtgttgaa gactgatggc aatccaatca ggccaagctg ctcccacaa  
 1561 caccaacctc cacaaatcag acctctacag tctccctgtt cctggtcata tgttctagc  
 1621 actactgaac atcatttcat tccatagagt taggagtagc tctggggcct attgatggg  
 1681 atccattcct ttacaaagc gggfacattt gaatagcata aaaaaataaa ttctgttact  
 1741 attgtttgt ttttcagaa atgtttgata tctggtcata gttgtggata ccgctcaaca  
 1801 gaaatgatg aactatgcat tcaggtttca tgtcacatca ggcctcagaa ataagtcaaa  
 1861 tagcgccaca ctgcaaagga taatagcaat atttgtttc aatttacgtc cttattctat  
 1921 tggctatag gtcttttaa gcttatgta agctataggt tgtttattgt tttgtccag  
 1981 aaccctgtaa agcacttaca gtacctagac cgaatttcat tacatcaata ggcgcaaagt  
 2041 aaaatcacia ttgtgggcta tattattaca atactttgt cctagacaaa atcactaaat  
 2101 ggaaaatgca ttactactg taactttaat ttgcatagtt taggagcagt accacaaaaa  
 2161 tagatcttag actctttatt gtctcaggtt tgtcagaa

### Schilddrüsenstimulierendes Hormon (TSH; *thyroid stimulating hormone*):

Genbank *accession no.*: NM\_181494

Sequenzgröße: 816 bp

Länge des PCR-Produkts: 221 bp

Nukleotidsequenz:

1 aggttaatcc agaccctcca gacagacatc ctacataact gccacctatc atgtctctcc  
 61 tgtatgttat tggcatgctg ggacttttaa tgaaggttgc cgtgcctatg tgtgccccca  
 121 ctgactacac catctacatt gagagacagg agtgcaatta ctgtgtggct gtcaacacca  
 181 ccatctgcat gggcttctgt ttctccaggg acagtaacat aaaggagtgt gtgggtcctc  
 241 gtttt**attgt tcagagggga tgcact**tatc aggaagtga gtaccggaca gccgtcttgc  
 301 cgggatgccc ttcacatgca gatcctcact tcacctacc agtggcactt agctgccact  
 361 gcagcacctg caaaaccac agtgatgaat gtgcccttag aaccgcagc gctgggatga  
 421 gatgctcaa acctgtgcat **catctgtacc ccgaggagaa** caactacgcc caagcatatt  
 481 gggaccagta tgagtaatat ttgattatc cttggctgaa tctaaaatta aagtcttcat  
 541 gctcatggga acagttgttt gttagataat tgttgagtaa acctatgtc ataaagttac  
 601 ctaatccatt acggttactg ggtttatat ccagcatctg atgtgttat tgaagccaaa  
 661 catgatttaa aaagaagggt tggtttaat agggttcaaa tatttatgct ttaaggatg  
 721 atatacttt tgtgaactt aatggtgttt tagtgtttga ctggcaggtt tgccataaaa  
 781 aatacagga aaaaagaaa aaaaaaaaaa aaaaaa

**Elongationsfaktor 1 $\alpha$  (EF 1 $\alpha$ ):**Genbank *accession no.*: NM\_131263

Sequenzgröße: 1753 bp

Länge des PCR-Produkts: 295 bp

Nukleotidsequenz:

1 ctcctcttt ctgttacctg gcaaagggga gcagcagctg aggagtgatc tctcaatctt  
61 gaaactatc aatcatggga aaggaaaaga cccacattaa catcgtgggt attggccacg  
121 tcgactccgg aaagtccacc accaccggcc atctgatcta caaatgcggt **ggaatcgaca**  
181 **agagaacct cg**agagaagtc gagaaggaag ccgctgagat gggcaagggc tcctcaagt  
241 acgcctgggt gttggacaaa ctgaaggccg agcgtgagcg tggatcacc atgacattg  
301 ctctctggaa atcgagacc agcaaatact acgtcacat tattgatgcc cctggacaca  
361 gagactcat caagaacatg atcactggta ctctcaggc tgactgtgct gtgctgattg  
421 ttgctgggtg tgcggtgag tttgag**gctg gtatctcaa gaacgg**acag acccgtgagc  
481 acgccctcct ggcttcacc ctgggagtga aacagctgat cgttgagtc aacaagatgg  
541 actccactga gccccctac agccaggctc gtttgagga aatcaccaag gaagtcagcg  
601 catacatcaa gaagatcggc tacaaccctg ccagtgttc ctctgccca atttcaggat  
661 ggcacgggta caacatgctg gaggccagct caaacatggg ctggtcaag ggatggaaga  
721 ttgagcga gagggtaat gctagcggta ctactcttct tgatgccctt gatgccattc  
781 tgccccctag ccgtcccacc gacaagcccc tccgtctgcc acttcaggat gtgtacaaaa  
841 ttgaggat tggaactga cctgtgggtc gtgtggagac tgggtcctc aagcctggta  
901 tggttgtgac ctctgcccc gccaatgtaa cactgaggt caagtctgtt gagatgcacc  
961 acgagtctct gactgagcc actcctgggtg acaacgttgg ctcaacgtt aagaacgtgt  
1021 ctgtcaagga catccgtctg ggtaatgtgg ctggagacag caagaacgac ccacccatgg  
1081 aggctgcaa ctcaacgct caggatcatca tctgaacca ccttggtcag atctctcagg  
1141 gttacgccc agtgctggat tgccacactg ctacatcgc ctgcaagttt gctgagctca  
1201 aggagaagat cgaccgtctg tctggcaaga agcttgaaga caacccaag gctctcaaat  
1261 ccggagatgc cgccattgtt gagatggctc ctggcaagcc catgtgtgtg gagagcttct  
1321 ctacctacc tcctctgggt cgcttctgtg tgcgtgacat gaggcagacc gttgctgtcg  
1381 gcgcatcaa gagcgttgag aagaaaatcg gtgggtctgg caaggcaca aagtctgcac  
1441 agaaggctgc caagaccaag tgaatttccc tcaatcacac cgttccaaag gttgcggcgt  
1501 gttcttcca acctcttga atttctctaa acctgggcac tctacttaag gactggataa  
1561 tgctgattaa aacctatcg aaaaatttc gcaggaaagg aaaacaactt ggatttaagt  
1621 gtggctcat ttattgactg atagtgcctc ttcagttat taaattgtg tttgatggt  
1681 ttagaactgc acctgttccc acagtacaat ttggaacgc tgatgaataa actaataaag  
1741 gtattaaaaa ttg

**Dopa-Decarboxylase (ddc):**Genbank *accession no.*: NM\_213342

Sequenzgröße: 4136 bp

Länge des PCR-Produkts: 173 bp

Nukleotidsequenz:

1 gtgtgtgtgt gtgtctgtgt gttgtatat gtgtgttga aaccggcaga aagcgtacga  
 61 ggatcaacag gaggaggac tcttcttctt ttgcccgaca ctactaaaag atggatgccg  
 121 cagagtttcg gagacgcggg agggagatgg ttgattatgt ggcggattat atagagaaca  
 181 ttgagaaaag gcaggttct cctgatgtgg aaccgggata tctgaggta ctgattcctg  
 241 aggaggcccc ggaggagcca gagagctatg aggatgtggt caaagacatc gagagggtga  
 301 tcatgccagg ggtcaccac tggcacagcc catacttcta tgcatatctt cccactgccc  
 361 actcttatcc tgcaatgctc gcagacatac tgtgtggagc cattggctgc attggattct  
 421 cttgggctgc aagtctgcc tgtacggagc tagagacagt gatgctggac tggctgggaa  
 481 agatgctgaa actaccgaa gattttctg ctgggacaa aggcaaagga ggtgggtca  
 541 tccagagcac tgccagtga gccactctca taaccttct tgcctctgc tccaaaatcg  
 601 tcaggctgat ccaggcggac catcctgacc gatctgagac tgacattata tccaaactag  
 661 ttgcctatc atctgatcag gcacactcat cggaggagag ggcagggtg ataggaggag  
 721 tgagaatgaa gaaaattcct accgacagca agtttctgt gcgaggagat gcactggaga  
 781 ggatcctgaa ggaggataaa gctgctggac ttataccatt ttttctgt gcaacactgg  
 841 gaacaactgc atctgtgca ttcgactgca tctactgagct gggccctata tgcaatgcag  
 901 agaaaatgtg gatgcacatc gatgctgcat atgccgggag tgctttatc tgcaggagt  
 961 tcagaccct gctgaacggc attgagttg cagactctt caattcaat cctcataaat  
 1021 ggctcctgat caacttgat tgcctg**ggcga tgtgggtaaa gaaa**agagca gacattattg  
 1081 gagcattaa aatggagcca cttatctaa agcatgatca ccaagagtca ggactgtca  
 1141 ctgattatag aactggcag atcccgtgg gtcggaggtt tcgctctc aaaat**tggt**  
 1201 **ttgtttccg catgtac**gga ctcaaagctc tcaaagccta catccgcaag catgtaggac  
 1261 tggctaaaga gttcaggct ttcgtgagag ctgatcaacg cttgagatc tcagctgatg  
 1321 tggatgagg tctcgtctgc tttagactca agggcccaa tgaattaagt gaaaatctgc  
 1381 tgaagaggat caacagcgca cgaagattc atctggtcc tggcacctg gctggcctgt  
 1441 ttgtctcg gttgccgtg tgtcccgcg ctactgagtc acggcatgtc caggaggcct  
 1501 ggtgccacat cgtcagctg gcatcagagc tgctcagga actgctacac tgaccactgc  
 1561 aatgtacatc acattgtac actctcaaaa ataaaggtat ctagttgca ctggggtgt  
 1621 aactttcaa aaggtagct tttgtcctg aaaggccat attaatactt attatatagt  
 1681 tctgaggtag taatgtggat tctcaagta caagtgtga caaaaaggta ccaccaagt  
 1741 gacagcgctc ataccttat tctgaaagt gtaccacatc tgcttcaca ctgtctaat  
 1801 tccactctat cgctgattca taatattat tggctaaata tgtgtatctg tgcgtccgtg  
 1861 attgcataa tgggtctgc catgagtgt tagcattcca ggctctggaa tatatcctc  
 1921 gcctacattt aatgacatga tgcctcaaaa aggcacatca tatcatgtt gtcgattga  
 1981 gatttcttt tcacgatatt cctctcacc ccgtaatca ttatagacct gcaagaaaga



2041 ttattataat aatcaattaa ccaacaacta atcgctaaat atttcaataa ctaatcagta  
2101 ggttttaat gattgttcaa cttttgtgac gagtfgaaac agttgtagat cctaagcaat  
2161 catttaaaaa ataatacaat tgtcagcttt tgaatgttc ttatgaactt gagatgtttt  
2221 aatgaacttt gatcaaaactg aacagatcac tctcttcag tttctgatt ttgtcattga  
2281 atcatttca ctcaaacca aaaataaaaa tataatgttg taaacaaatc tcttcacgac  
2341 agaatctctg tcaacagttc gatgtaatta aaaaaaaggg acagaaaaag ggcattttac  
2401 ttcaggacag ccacaatggc aaagtattaa ccggtaaaca attattagaa aaattattgt  
2461 acaataaaaa agacaagcag cggctttctc ataagtaact gatatgattt tttcccaac  
2521 atgtctgttt ttaaagtttt tacaatatg gaaaaaatt aagtcataat actcatatcg  
2581 gcgacgtggt ggcgcagtag gtagtctgt cgcctcacag caagaaggtc gctggttcga  
2641 gcctcggctg ggtcagttag catttctctg tggagtgtgc atgttctccc catgtttgca  
2701 tgggttttct ccgggtgctc gggtttccc ccacagtcca aagacatgtg gtacagggtga  
2761 attgggtaag ctaaaattgt ccatagtgtg tgagtgtgaa tgagagtgtg tggatgttcc  
2821 ccagtactgg gttgaagctg gaagggcatc cgctcgtaa aacatattgcc aaaatagtta  
2881 gctgttcaat ctgctgtgga aggaaaatga atgaattaat tacttaattt cattagtttg  
2941 tttaaattca ggggaagca gtggcgcagt aggtagtgtt gtcgcctcac agcaagaagg  
3001 tcgctgggtt gctggttcga gcctcggctc agttggcgtt tctgtgtgga gtttgtatgt  
3061 tctccctgtg ttcgcgtggg tttctccgg gtgctccgg tttccccaca gtccaaagac  
3121 atgcagtaca ggtgaattgg gtaggctaaa ttgtccgtag tgtatgggtg tcgggtgtgat  
3181 tgtgtgtgtg attttgcca gagatgggtt gctggctgaa gggcattcgc tgcgtaaaaa  
3241 tgtgctggat aagttgacgg ttcatccgc tgtggcgacc ccggattaat aaagggacta  
3301 agctgacacg aaaatgaatg aatgaatgtt taaattcagc ccataaaaaat tgtttgtaac  
3361 catttacatt ttaaaaatga agtaaatca atacaatgaa tcatttttcc agttagaca  
3421 cctcgctaag ttttaaac acttagatca gtcggatgag aagtttaaaa aatcaaagta  
3481 agggatttat caaccaaca aacaaaaca aacaaaaaaa atctgtccct ccaatagaca  
3541 agaatattag tcaacaattt ttttaagag tcgacattgg cgactaattg ttgcagccct  
3601 tgcaatcatc aaactttgtc aaaaaagaac aaaagtagca ttcacttga ctagaactg  
3661 cagtatgtag gccgtcacat atttctactg agtgtgtctc tgtttttgtg agcttttatg  
3721 cttatatcat gtgtcctcca gctgtaagca cttgtccaa aaatgtaccg tcgtgcactt  
3781 gaaaatgagt ctattataaa aatgaaatgt ttttaccta ttcagagaat gatttatctt  
3841 taaaatggct acagagaata tttgtggat tgatttatag aacattagc ctttattgtt  
3901 tgttttctc tgcactgtcg ctcaatgaaa tgaaatattg agcctaata gagtctaatt  
3961 cctttcattt ctaaaaaaat attgttctg attcagcaag gctcacgtag ttattgttat  
4021 tgtgcctgat aagtttaaaa gatctgactc tggaaactat taaaacagta gttgtgtact  
4081 gtgtgttaac gttcacaata aagtgcatth ctcccaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa

**Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase (d $\beta$ H):**Genbank *accession no.*: AF075385

Sequenzgröße: 663 bp

Länge des PCR-Produkts: 180 bp

Nukleotidsequenz:

```
1 gggccgtgtg attggaagat gaagccgctg aatcttaatt attgagaca tgttctggct
61 gcctgggcca tgggagcaga gccattctac tctctgctg acgctgggtt gcctatggga
121 ggagaaggat ctctagggtt tctctgtctt gaagttcatt accacaacct tctccttta
181 tcagggcgga gggactcctc gggcattcgt ttatgttaca gtccatctct gcgagggtt
241 gacgcaggca tcatggagct tgggctggct tacactcctg tgatggccat tccccccgc
301 cagcgtctt tccagctcac tggatactgc accgccaat gcacacagac ggctcttcca
361 agttagggggc atacacatct ttgcctcca gctgcacact catctggccg gtcttgggt
421 caggactgtc ttggtgag gaggtcaaga ngtgnagggtg gtgcaaggag gacagacatt
481 tcaagcacac attaccagat catccgtgtt ttacataaaga tgggtgactgg tctgccangc
541 cgatgctctg ctacnacgt tgcagattca aacacccgag ggacagnaana caaagtttac
601 tgtgggngtg gntttgggaa ttatggaggg aaaatgtgcc gtcaanctaa tgttcaaaa
661 gcc
```

**Tyrosin-Hydroxylase (th):**Genbank *accession no.*: AF075384

Sequenzgröße: 332 bp

Länge des PCR-Produkts: 223 bp

Nukleotidsequenz:

```
1 ggtgttcgag acgtttgagg ccaaaatcca ccatctgaa accagacca gccgaaaacc
61 aaaggatggc ttgaggacc tagaatatta tgttagtgt gaagtgcacc tgtcgatgt
121 tagcacgctg gtcagctctt tgaagagaag tgcagaggat gtcaaacca caaaggagggt
181 caaattcat tggttcca gaaaaatagc tgagcttgat aaatgccatc atctgtcac
241 caaatatgat ccggatctgg atcaggatca cccaggattt actgaccctg ttacagaaa
301 acgacggaag atgatcgccc aaatgcctt cc
```

**Cytochrom P450 A1 (cyp):**Genbank *accession no.*: AB078927

Sequenzgröße: 2610 bp

Länge des PCR-Produkts: 217 bp

Nukleotidsequenz:

1 actcctctgg agctaattgg cactggftag aaagagctga gaactggaaa gtatccactc  
61 gatcgctccg ggttataaa tcagcaatgg ctctgactat tcttcaata ttgggtccga  
121 tttctgtgc tgagagtctc gtggccatta taacaatag tttggtgat ctgctcatgc  
181 gcctaaaccg cagcaaaatc ccagacgggc tacagaagct tcccggcccg aagcctctgc  
241 cgattatcgg aatg**tctg gaaatcggaa acaacc**caca ttgagtctg acggccatga  
301 gtaagtgcta tggcccgggt ttcagatcc agatcggcat gcgtctgtt gtcgtactca  
361 gtgggaatga tgtgatccga caggcgctcc taaaacaggg cgaagagttt tccggacgtc  
421 cagaattgta cagcaccaag ttcacagtg **atggaaagag tctggcgttc agt**acggatc  
481 aagtcggagt ctggagagca cgccgaaagc tggcgctcaa tgcctgcga acatttcaa  
541 cggtcaggg aaagagtccc aaatattcct gcgccctaga ggagcacatc agtaatgagg  
601 gtttatattt ggtccagagg ctgcactctg ttatgaaagc cgatggaagc ttgatccat  
661 tcagacatat cgtagtatcc gtggctaacg taatctgcgg gatctgttc ggacgccggc  
721 atagcatga tgatgatgaa ctggtgcgac tggtaatat gagcgtatgag ttcgggaaga  
781 tctggggcag cggaaaccct gccgattca tcccttctc gcgcattctg ccgagcacga  
841 cgatgaagaa gttcctggat atcaacgaac gcttcagtaa atcatgaag aggctgggta  
901 tggagcatta cgatacgttc gataaggaca acatcagaga catcaccgac tctctatca  
961 accactgcga agaccgaaaa ctggacgaaa actccaacct gcaagtgtcc gatgagaaga  
1021 tcttaggaat cgtcaatgac ctattcggag ccggtttcga cactatcagt acggctctgt  
1081 cctggggcgt tgtctatcta gtgcactacc cagaggtcca ggagcgactg caaagagaat  
1141 tggatgaaaa gatcgggaag gatcgcacac cactgttacc tgacagggcg aacctgccg  
1201 tctggagtc cttcattctg gagatctcc gtcattcatc cttcctccc tcaccattc  
1261 ctactgcac atccaaagac acgtcactca atggctattt tattccaaa gacacctgcg  
1321 tgtttgtaa ccagtggcaa gtcaacatg acccagaact gtggaaggat ccctcgtctt  
1381 ttattcccga ccggttctc actgcggacg gtactgaact gaataagttg gaaggcgaga  
1441 aggtgttgg tttcggttg gaaagcgcc gctgcattgg agagtccatc ggacgcgctg  
1501 aagtcttct gttcctggcc atctgctgc aaaggtaaa gttcaccggg atgccaggag  
1561 aatgctgga tatgaccca gagtacgggt tgaccatgaa acacaagcgg tctctctc  
1621 gggtcacacc acagcctggg tctagatcc agaactcctc atcatgcatc caaaaatcaa  
1681 agattgagct cctgaaatcc aggaaactgg ccatgcaggt ggagatgctg aatattagag  
1741 atgtttgtc gcaggcmeta gcacccgat cattctgatg caagcacact gcaaaatata  
1801 tgcattatt acttactatt agagttttg tctgtctct agtccaaata tctcaaactg  
1861 cattaatcaa gaagcattg ttggcaagtt gaacatctg tctgtctg tttcaata  
1921 taatgagtga aaattaaatg acgtttccg taaaacaagc aaaataatct gcttgctctg  
1981 ttaaaaaac tctgtaaac agctcttgg taaggaactt taataattg atagtttgt

2041 tgtaaattgt gcatatatgc atatcagatg cagccttgca tggccttgtc cttcaaaac  
2101 tggaatgctg ataatgtatt tgtgctttca aacataccgc ggtaaagcac agatcaggat  
2161 gaagagtgcc tgttttagct gcggttagc tgtctatcaa agcaatgctt tctgtctca  
2221 taagcttaat gcagattcat ctgcctgtcg acatacactg atgctgtttt ctaattgatg  
2281 atgatccccg aatgtgatcc acatgtaaat acgcagcggc tgttcaata tgcacattt  
2341 tttcccatg tgccctgatt tacttggtga cagatttga atatctactt tttgtattta  
2401 tcaaagtgc taaatcagatg tttatttctc tgagatatcg tgtctgtgac ctgctgaaac  
2461 tcttcgagg tgcataat tgtattatga aggaattctg aagtactact gctataatta  
2521 atcatgcta acatggtctc caatggcagt ttgtgtgac atagcatatt tatgatgtg  
2581 gcaaaataaa taataaaact tctactgctg

### **Glycerinaldehyd-3-phosphate Dehydrogenase (gapdh):**

Genbank *accession no.*: CA854263

Sequenzgröße: 650 bp

Länge des PCR-Produkts: 163 bp

Nukleotidsequenz:

1 aaacgaggac acaaccaa at caggcataat ggtaaagtt ggtattaacg gattcggctg  
61 cattggccgt ctgggaccc gtgctgctt ctgaccaag aaagtgagaga tctggccat  
121 caatgaccca ttcattgacc ttgattacat ggttfacatg ttccagtacg actccacca  
181 tggaaagtac aagggtgagg ttaaggcaga **ga aggtggcaaa ctggtcattg** atggctatgc  
241 aatcacagtc tatagcagaga gggaccagc caacattaag tggggtgatg cagggtctac  
301 ttatgttgag gactctactg gtgtctcac tactattgag aaggcttctg **ctcacattaa**  
361 **gggtgggtgca** aagagagtca tcatctctgc ccaagtgc gatgccccca tgtttgcat  
421 ggggtgcaac catgagaaat atgacaactc ttcacagtt gtaagcaatg cctcctgcac  
481 caccaactgc ctggctcctt tggcaaaggt catcaatgat aactttgca tcttgaagg  
541 tcttatgagc actgttcagc ccatcacagc aacacagaag accgttgatg ggcctctgg  
601 gaagctgtgg agggatggcc gtgggtgccag tcaaaacatc atcccagcct

**$\beta$ -actin:**Genbank *accession no.*: NM\_131031

Sequenzgröße: 1700 bp

Länge des PCR-Produkts: 201 bp

Nukleotidsequenz:

```
1 ggcacgagag atctcactc ccctgttca caataaccta ctaatacaca gccatggatg
61 aggaaatcgc tgcctgggc gttgacaacg gctccggtat gtgcaaagcc ggftttgctg
121 gagatgatgc ccctcgtgct gtttcccct ccattgttg acgaccaga catcagggag
181 tgatggttg catggacag aaagactcct atgtgggaga tgaggctcag agcaagagag
241 gtatcctgac cctcaaatac ccattgagc acggtattgt gaccaactgg gatgacatgg
301 agaagatctg gcatcacacc ttctacaatg agctccgtgt tgcccctgag gaccaccctg
361 tcgtgctcac tgaggctccc ctgaatccca aagccaacag agagaagatg acacagatca
421 tgttcgagac ctcaacacc cctgccatgt atgtggccat ccaggctgtg ctctctctgt
481 acgcttctgg tcgtactact ggtattgtga tggactctgg tgatggtgtg acccacaccg
541 tgcccatcta tgagggttac gctctcccc atgccatcct gcgtctggat ctgctggtc
601 gtgacctgac agactacctg atgaagatcc tgaccgagcg tggctacagc ttcaccacca
661 cagccgaaag agaaattgtc cgtgacatca aggagaagct gtgctatgtg gccctggact
721 tcgacgagga gatgggaacc gctgcctctt ctctctccct ggagaagagc tatgagctgc
781 ctgacggta ggatcacc atcggcaatg agcgtttccg tgcctccgag gctctctcc
841 agccttctt cctgggtatg gaatcttgcg gtatccacga gaccacctc aactccatca
901 tgaagtgcga cgtggacatc cgtaaggacc tgatgcca cacagtgtg tctggaggta
961 ccaccatgta cctggcatt gctgaccgta tgcagaagga aatcacctct ctgtctctt
1021 ccaccatgaa gatcaagatc atgtctccc ctgagcgcaa atactccgc tggatcggg
1081 gctccatctt gccctccctg tccacctcc agcagatgtg gatcagcaag caggagtacg
1141 atgagtctgg cccatccatc gttcacagga agtgcttcta aacagaactg ttgccacctt
1201 aatggccta gcaatgagat tcaaacgaac gaccaaccta aactctgaa cagaacaaga
1261 tgacatcagc atggctctg ctctgtatgg cgattgact caggatgagg aaactggcaa
1321 agggaggtag tgttctaaca ggggagagct ttccccgaga ggacaacaat gtacattct
1381 tttagtcatt ccagaagcgt ttaccactt gccctctca caatgggcgt ccatgacctt
1441 tttgtatag tgtttatgt aaattatgta ctcgatacat tgttttctt tttgtacttc
1501 agccttaaac ttggcccagt ttgtattgt tgcaatgagg ggaaagcttt acctttaaa
1561 aagtgaagat ctgcaggac ttccctaggg tatgtgaata agggatgtcc ctgaaaatg
1621 taagccaggg tgtctctgta cactgacaag tcaaccctaaa taaaacgtgc acatgtaaaa
1681 ccaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
```

## 11.2 Auflistung der Primersequenzen für die RAP-PCR

<b>Primer</b>	<b>Sequenz</b>
ROTH-D 01	5'-acc gcg aag g-3'
ROTH-D 02	5'-gga ccc aac c-3'
ROTH-D 03	5'-gtc gcc gtc a-3'
ROTH-D 04	5'-tct ggt gag g-3'
ROTH-D 05	5'-tga gcg gac a-3'
ROTH-D 06	5'-acc tga acg g-3'
ROTH-D 07	5'-ttg gca cgg g-3'
ROTH-D 08	5'-gtg tgc ccc a-3'
ROTH-D 09	5'-ctc tgg aga c-3'
ROTH-D 10	5'-ggg cta cac c-3'
ROTH-D 11	5'-agc gcc att g-3'
ROTH-D 12	5'-cac cgt atc c-3'
ROTH-D 13	5'-ggg gtg acg a-3'
ROTH-D 14	5'-ctt ccc caa g-3'
ROTH-D 15	5'-cat ccg tgc t-3'
ROTH-D 16	5'-agg gcg taa g-3'
ROTH-D 17	5'-ttt ccc acg g-3'
ROTH-D 18	5'-gag agc caa c-3'
ROTH-D 19	5'-ctg ggg act t-3'
ROTH-D 20	5'-acc cgg tca c-3'

### 11.3 Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
Ah	Arylhydrocarbon
AMV	Avian Myeloblastosis Virus
BCF	Biokonzentrationsfaktor ( <i>bioconcentration factor</i> )
bp	Basenpaare
BPA	Bisphenol A
cDNA	komplementäre ( <i>complementary</i> ) DNA
C <sub>P</sub>	<i>Crossing-Point</i>
cyp	Cytochrom P450 1A1
d	Tag ( <i>day</i> )
dβh	Dopamin-β-Hydroxylase
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
ddc	Dopa-Decarboxylase
DDT	Dichordiphenyltrichlorethan
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DIT	Dijodthyrosin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynucleosidtriphosphate, umfasst dATP, dCTP, dGTP und dTTP
dpf	Tage nach der Befruchtung ( <i>days post fertilization</i> )
dsDNA	doppelsträngige ( <i>double-stranded</i> ) DNA
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E	Extinktion
ED	Endokrine(r) Disruptor(en) ( <i>endocrine disruptor(s)</i> )
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF 1 $\alpha$	Elongationsfaktor 1 $\alpha$
g	Gramm
<i>g</i>	relative Erdbeschleunigung
gapdh	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GC-Gehalt	GuanosinCytosin-Gehalt
h	Stunde
HAH	Halogenierte polycyclische aromatische Hydrocarbone ( <i>halogenated polycyclic aromatic hydrocarbons</i> )

---

HE	Hämatoxylin und Eosin
HG	<i>Housekeeping Gene</i>
hpf	Stunden nach der Befruchtung ( <i>hours post fertilization</i> )
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i>
KO	Kontrolle
l	Liter
M	Molar
MBT	<i>midblastula transition</i>
Min.	Minute(n)
MIT	Monojodthyrosin
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
M-MuLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA ( <i>messenger RNA</i> )
mWW	mit Wasserwechsel
nm	Nanometer
no.	number
OD <sub>260</sub>	optische Dichte bei 260nm Wellenlänge
Oligo-dT	Oligodeoxythymidin
oWW	ohne Wasserwechsel
PAH	Polycyclische aromatische Hydrocarbone ( <i>polycyclic aromatic hydrocarbons</i> )
PCB	polychlorierte Biphenyle
PCDD/Fs	polychlorierte Dibenzodioxine und Dibenzofurane
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
poly-A <sup>+</sup>	Polyadenyl-
POP	<i>persistent organic pollutants</i>
ppm	<i>parts per million</i>
PTU	Propylthiouracil
RNA	Ribonucleinsäure
RNAse	Ribonuclease
RP	Umkehrphase („reverse phase“)
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RT	Reverse Transkriptase
sec	Sekunden
SH	Schilddrüsenhormon
T3	3,5,3'-Triiodthyronin
T4	L-Thyroxin
TAE	Tris-Eisessig-EDTA



---

Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBBPA	Tetrabrombisphenol A
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBP	<i>thyroid-binding protein</i>
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin
TE	Tris-EDTA-Puffer
TF	Transkriptionsfaktor
TH	Schilddrüsenhormon(e) ( <i>thyroid hormone</i> )
th	Thyrosine-Hydroxylase
TPO	Schilddrüsen-Peroxidase
TR	Schilddrüsenhormonrezeptor ( <i>thyroid hormone receptor</i> )
TRE	Schilddrüsenresponsives Element ( <i>thyroid hormone response element</i> )
TRH	TSH-releasing-Faktor
TSH	Schilddrüsenstimulierendes Hormon ( <i>Thyroid stimulating hormone</i> )
TTR	Transthyretin
u	Units
UV	Ultraviolett
V	Volt
VK	Variationskoeffizient
wpf	Wochen nach der Befruchtung ( <i>weeks post fertilization</i> )
YSL	<i>yolk syncytical layer</i>

## 11.4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Schematische Verteilung der Schilddrüsen-Follikel im adulten Zebrafischkopf. blau: Schilddrüsenfollikel; rot: Herz und ventrale Aorta, gelb: Kiemenbogen (Wendl et al., 2002).....	6
Abbildung 2.2: Strukturformeln der Schilddrüsenhormone .....	7
Abbildung 2.3: Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse. I: Iod, RE: responsive Element; TH: Schilddrüsenhormon; TRH: Thyreotropin-Releasing Hormon; TSH: Schilddrüsenstimulierende Hormon; TTR: Transthyretin; T4: 3,3',5,5'-Tetraiodthyronin (L-Thyroxin); T3: 3,5,3'-Triiodthyronin; 5'-MD: 5-Monodeiodinase.....	9
Abbildung 2.4: Darstellung der Biosynthese von Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin.....	10
Abbildung 2.5: Chemische Strukturformel von Methimazol. ....	14
Abbildung 4.1: Aufzucht von Larven des Zebrafisches ( <i>Danio rerio</i> ).....	21
Abbildung 4.2: Becken für die Aufzucht und Pflege vom Zebrafisch ( <i>Danio rerio</i> )... ..	22
Abbildung 4.3: Übersicht zum Versuchsaufbau für die <i>in vivo</i> Behandlungen mit Methimazol von adulten Zebrafischen ( <i>Danio rerio</i> ).....	24
Abbildung 4.4: Versuchsaufbau für die <i>in vivo</i> Expositionen zur histologischen Untersuchung des Einflusses von Methimazol auf die Schilddrüse bei <i>Danio rerio</i> .....	27
Abbildung 4.5: Versuchsaufbau für die <i>in vivo</i> Behandlung von frisch geschlüpften <i>Danio rerio</i> Larven (48 hpf; Stunden nach der Befruchtung) mit Methimazol und Triiodothyronin (T3).....	30
Abbildung 4.6: Schema des Prinzips der PCR. ....	33
Abbildung 4.7: Schema LightCycler System. ....	39
Abbildung 4.8: Überblick über die Phasen der PCR der real-time PCR unter Verwendung von SYBR Green I als Fluoreszenzsignal. ....	40
Abbildung 5.1: Darstellung der Expressionen der gapdh- und EF 1 $\alpha$ -mRNA während der Entwicklung vom Zebrafisch ( <i>Danio rerio</i> ) in 2 unabhängigen Probenahmen.....	60

---

Abbildung 5.2: Darstellung der Expression der TSH-mRNA während der Entwicklung vom Zebrafisch ( <i>Danio rerio</i> ) in 2 unabhängigen Probenahmen.....	62
Abbildung 5.3: Darstellung der Expression der TR $\beta$ -mRNA während der Entwicklung vom Zebrafisch ( <i>Danio rerio</i> ) in 2 unabhängigen Probenahmen.....	63
Abbildung 5.4: Darstellung der Expression der TR $\alpha$ -mRNA während der Entwicklung vom Zebrafisch ( <i>Danio rerio</i> ) in 2 unabhängigen Probenahmen.....	65
Abbildung 5.5: Darstellung der Expression der cyp-mRNA während der Entwicklung vom Zebrafisch ( <i>Danio rerio</i> ) in 2 unabhängigen Probenahmen.....	66
Abbildung 5.6: Darstellung der Expression der ddc-mRNA während der Entwicklung vom Zebrafisch ( <i>Danio rerio</i> ).....	67
Abbildung 5.7: Darstellung der Expression von th-mRNA während der Entwicklung vom Zebrafisch ( <i>Danio rerio</i> ).....	68
Abbildung 5.8: Darstellung der Expression von d $\beta$ h-mRNA während der Entwicklung vom Zebrafisch ( <i>Danio rerio</i> ).....	69
Abbildung 5.9: Darstellung der Effekte auf die Expression von TR $\alpha$ - und TR $\beta$ -mRNA nach einer <i>in vivo</i> Behandlung von adulten Zebrafisch ( <i>Danio rerio</i> ) Weibchen. ....	71
Abbildung 5.10: Aufzeichnung des Verlaufes der Methimazolkonzentration in den Versuchsbecken über den Versuchszeitraum; .....	71
Abbildung 5.11: Darstellung der Methimazolkonzentrationen in Ganzkörperhomogenaten von männlichen ( $\sigma$ ) und weiblichen ( $\rho$ ) adulten Zebrafischen ( <i>Danio rerio</i> ) nach einer 5, 10 und 15-tägigen <i>in vivo</i> Behandlung mit Methimazol in den Konzentrationen 0 (Kontrolle), 10, 50, 100 und 300 $\mu$ M.....	72
Abbildung 5.12: Darstellung der ermittelten Biokonzentrationsfaktoren (BCF) von männlichen (A) und weiblichen (B) adulten Zebrafischen ( <i>Danio rerio</i> ) nach einer 5, 10 und 15-tägigen <i>in vivo</i> Behandlung mit Methimazol in den Konzentrationen 0 (Kontrolle), 10, 50, 100, 300 und 900 $\mu$ M. ....	73

---

Abbildung 5.13: Darstellung der Ergebnisse zur Bestimmung der tatsächlichen Methimazolkonzentration im Expositionsmedium, sowie Test der Stabilität von Methimazol unter Versuchsbedingungen.....	75
Abbildung 5.14: Darstellung histologischer Schilddrüsenschnitte von <i>Danio rerio</i> nach einer <i>in vivo</i> Behandlung mit B: 4 mM und C: 10 mM Methimazol, A: Kontrolle. ....	76
Abbildung 5.15: Darstellung der Entwicklungsstadien bei <i>Danio rerio</i> nach einer <i>in vivo</i> Behandlung mit Methimazol vom 64 cell-Stadium (2 hpf) bis zum Zeitpunkt 3 dpf. A: Kontrolle, B: 5 mM.....	79
Abbildung 5.16: Darstellung der Entwicklungsstadien bei <i>Danio rerio</i> nach einer <i>in vivo</i> Behandlung mit T3 vom 64 cell-Stadium (2 hpf) bis zu den Zeiten 3 dpf: A: KO, B: 1000 nM; 4 dpf: C: KO, D: 1000 nM und 5 dpf: E: KO, F: 100 nM. ....	80
Abbildung 5.17: Darstellung der Entwicklungsstadien bei <i>Danio rerio</i> nach einer <i>in vivo</i> Behandlung mit Bisphenol A vom 64 cell-Stadium (2 hpf) bis zu den Zeiten 9 hpf: A: KO, B: 10 $\mu$ M und 24 dpf: C: KO, D: 10 $\mu$ M.	82
Abbildung 5.18: Darstellung der Effekte auf die Expression der TSH-mRNA nach einer <i>in vivo</i> Behandlung mit Methimazol in den Konzentrationen 0, 50, 100 und 300 $\mu$ M zu den Expositionszeiten A: 1 Tag, B: 3 Tage, C: 5 Tage und D: 7 Tage (1. Untersuchung). ....	85
Abbildung 5.19: Darstellung der Effekte auf die Expression der TSH-mRNA nach einer <i>in vivo</i> Behandlung mit Methimazol in den Konzentrationen 0, 10, 50, 100 und 300 $\mu$ M zu den Expositionszeiten A: 3 Tag, B: 5 Tage, C: 7 Tage, D: 8 Tage und E: 9 Tagen (2. Untersuchung).....	87
Abbildung 5.20: Darstellung der Effekte auf die Expression der TSH-mRNA nach einer <i>in vivo</i> Behandlung mit Methimazol in den Konzentrationen 0, 1, 10, 100 und 1000 $\mu$ M zu den Expositionszeiten A: 3 Tage und B: 7 Tage (3. Untersuchung). ....	88
Abbildung 5.21: Darstellung der Effekte auf die Expression der TR $\alpha$ -mRNA nach einer <i>in vivo</i> Behandlung mit Methimazol in den Konzentrationen 0, 50, 100 und 300 $\mu$ M zu den Expositionszeiten A: 1 Tag, B: 3 Tage, C: 5 Tage und D: 7 Tage.....	89

- Abbildung 5.22: Darstellung der Effekte auf die Expression der TR $\alpha$ -mRNA nach einer *in vivo* Behandlung mit Methimazol in den Konzentrationen 0, 10, 50, 100 und 300  $\mu$ M zu den Expositionszeiten A: 3 Tage, B: 5 Tage, C: 7 Tage, D: 8 Tage und E: 9 Tage (2. Untersuchung)..... 91
- Abbildung 5.23: Darstellung der Effekte auf die Expression der TR $\alpha$ -mRNA nach einer *in vivo* Behandlung mit Methimazol in den Konzentrationen 0, 1, 10, 100 und 1000  $\mu$ M zu den Expositionszeiten A: 3 Tage und B: 7 Tage (3. Untersuchung). ..... 92
- Abbildung 5.24: Darstellung der Effekte auf die Expression der TR $\beta$ -mRNA nach einer *in vivo* Behandlung mit Methimazol in den Konzentrationen 0, 10, 50, 100 und 300  $\mu$ M zu den Expositionszeiten A: 3 Tage, B: 5 Tage, C: 7 Tage, D: 8 Tage und E: 9 Tage (2. Untersuchung)..... 93
- Abbildung 5.25: Darstellung der Effekte auf die Expression der TR $\beta$ -mRNA nach einer *in vivo* Behandlung mit Methimazol in den Konzentrationen 0, 1, 10, 100 und 1000  $\mu$ M zu den Expositionszeiten A: 3 Tage und B: 7 Tage (3. Untersuchung). ..... 94
- Abbildung 5.26: Darstellung der Effekte auf die Expression der cyp-mRNA nach einer *in vivo* Behandlung mit Methimazol in den Konzentrationen 0, 1, 10, 100 und 1000  $\mu$ M zu den Expositionszeiten A: 3 Tage und B: 7 Tage..... 95
- Abbildung 5.27: Darstellung der Effekte auf die Expression der ddc-mRNA nach einer *in vivo* Behandlung mit Methimazol in den Konzentrationen 0, 1, 10, 100 und 1000  $\mu$ M zu den Expositionszeiten A: 3 Tage und B: 7 Tage..... 96
- Abbildung 5.28: Darstellung der Effekte auf die Expression von th-mRNA nach einer *in vivo* Behandlung mit Methimazol zu den Expositionszeiten A: 3 Tage, B: 7 Tage. .... 97
- Abbildung 5.29: Darstellung der Effekte auf die Expression der d $\beta$ h-mRNA nach einer *in vivo* Behandlung mit Methimazol in den Konzentrationen 0, 1, 10, 100 und 1000  $\mu$ M zu den Expositionszeiten A: 3 Tage und B: 7 Tage..... 98
- Abbildung 5.30: Darstellung der Effekte auf die Expression der TSH-mRNA nach einer *in vivo* Behandlung mit Triiodthyronin (T3) in den

Konzentrationen 0, 1, 5, 10 und 30 nM zu den Expositionszeiten A: 1 Tag, B: 3 Tage, C: 5 Tage und D: 7 Tage. ....	99
Abbildung 5.31: Darstellung der Effekte auf die Expression der TR $\beta$ -mRNA nach einer <i>in vivo</i> Behandlung mit Triiodthyronin (T3) in den Konzentrationen 0, 1, 5, 10 und 30 nM zu den Expositionszeiten A: 1 Tag, B: 3 Tage, C: 5 Tage und D: 7 Tage. ....	100
Abbildung 5.32: Darstellung der Effekte auf die Expression der TR $\alpha$ -mRNA nach einer <i>in vivo</i> Behandlung mit Triiodthyronin (T3) in den Konzentrationen 0, 1, 5, 10 und 30 nM zu den Expositionszeiten A: 1 Tag, B: 3 Tage, C: 5 Tage und D: 7 Tage. ....	102
Abbildung 5.33: Darstellung der Effekte auf die Expression der cyp-mRNA nach einer <i>in vivo</i> Behandlung mit Triiodthyronin (T3) in den Konzentrationen 0, 1, 5, 10 und 30 nM zu den Expositionszeiten A: 1 Tag, B: 3 Tage, C: 5 Tage und D: 7 Tage. ....	103
Abbildung 5.34: Darstellung der Effekte auf die Expression der ddc-mRNA nach einer <i>in vivo</i> Behandlung mit Triiodthyronin (T3) in den Konzentrationen 0, 1, 5, 10 und 30 nM zu den Expositionszeiten A: 1 Tag, B: 3 Tage, C: 5 Tage und D: 7 Tage. ....	104
Abbildung 5.35: Darstellung der Effekte auf die Expression der th-mRNA nach einer <i>in vivo</i> Behandlung mit Triiodthyronin (T3) in den Konzentrationen 0, 1, 5, 10 und 30 nM zu den Expositionszeiten A: 1 Tag, B: 3 Tage, C: 5 Tage und D: 7 Tage. ....	105
Abbildung 5.36: Darstellung der Effekte auf die Expression der d $\beta$ h-mRNA nach einer <i>in vivo</i> Behandlung mit Triiodthyronin (T3) in den Konzentrationen 0, 1, 5, 10 und 30 nM zu den Expositionszeiten A: 1 Tag, B: 3 Tage, C: 5 Tage und D: 7 Tage. ....	107
Abbildung 5.37: Darstellung eines Agarose-Gels mit den mittels RAP-PCR und dem Primer ROTH-D 13 entstandenen PCR-Produkten. ....	109
Abbildung 5.38: Darstellung eines denaturierenden Agarose-Gels mit totalRNA vom Zebrafisch nach einer RNA-Isolierung mittels Trizol®-Reagenz. ....	110

---

Abbildung 5.39: Darstellung eines Agarose-Gels mit den real-time RT-PCR-Produkten aus juvenilen Zebrafischen für die Sequenzierung.....	111
Abbildung 6.1: Darstellung der Ergebnisse zum Stabilitätstest einer 50 ppm Methimazolösung in pH 2,6 und pH 8. ....	124
Abbildung 6.2: Darstellung histologischer Schnitte einzelner Schilddrüsenfollikel eines Zebrafisch Weibchens nach einer <i>in vivo</i> Behandlung mit PTU für 10 Tage.....	127

## 11.5 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Die Hauptwirkungen der Vertebratenhormone .....	4
Tabelle 2.2: Endokrine Disruptoren anthropogenen und natürlichen Ursprungs. ....	12
Tabelle 4.1: Aufstellung der Konzentrationen der Stammlösungen für die Herstellung des Hank-Embryomediums. ....	19
Tabelle 4.2: Probenahmezeitpunkte zur Untersuchung der Veränderung der Genlevel während der Entwicklung vom Zebrafisch ( <i>Danio rerio</i> ). ....	23
Tabelle 4.3: Zusammensetzung der Bouin'sche Fixierungslösung für die Histologie.....	25
Tabelle 4.4: Übersicht über die Expositionssansätze zu den histologischen Untersuchungen. ....	26
Tabelle 4.5: Aufstellung der eingesetzten Konzentrationen zur Untersuchung des Einflusses von Methimazol, Triiodothyronin (T3) und Bisphenol A auf die Entwicklung von <i>Danio rerio</i> . ....	28
Tabelle 4.6: Aufstellung der Teilversuche für die <i>in vivo</i> Behandlungen mit Methimazol zur Untersuchung der Genexpressionen bei juvenilen Zebrafischen.....	30
Tabelle 4.7: Aufstellung der <i>in vivo</i> Behandlungen mit T3 zur Untersuchung von Genexpressionen bei juvenilen Zebrafischen. ....	32
Tabelle 4.8: Aufstellung der verwendeten Proben für die RAP-PCR aus den Larvenversuchen.....	52
Tabelle 5.1: Aufstellung der Expressionen der EF 1 $\alpha$ -mRNA während der Entwicklung vom <i>Danio rerio</i> in zwei unabhängigen Probenahmen, sowie der daraus resultierenden Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (SW) und Variationskoeffizienten (VK).....	112
Tabelle 5.2: Aufstellung der im Rahmen von Methodenoptimierungen und Methodenentwicklung erhaltenen Ergebnisse zweier Messungen der Expression der <i>gapdh</i> -mRNA einer Standardverdünnungsreihe, sowie der daraus resultierenden Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (SW) und Variationskoeffizienten (VK). ....	113



## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. A. Kettrup und Herrn Prof. Dr. K.-W. Schramm für die Vergabe dieses interessanten Themas und die Möglichkeit, im Rahmen verschiedener Kooperationen an der Texas Tech University (TIEHH, Lubbock, USA), sowie an der Ecole Normale Supérieure de Lyon (ENS Lyon, Frankreich) in Form von verschiedenen Forschungsaufenthalten, an diesem Thema zu arbeiten. Darüber hinaus möchte ich meinen Betreuern Herrn Prof. Dr. K.-W. Schramm und Herrn Prof. Dr. Jerzy Adamski für ihre ständige Bereitschaft zur Diskussion fachlicher und organisatorischer Fragen danken und für ihr Vertrauen, das mir ein selbständige Arbeit mit verschiedensten Untersuchungsmethoden ermöglichte. Ebenfalls möchte ich mich bei Herrn Dr. S. Schulte-Hostede für die Unterstützung in der Durchführung der Arbeit und sein Vertrauen bedanken.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Kloas für die Übernahme des Koreferats.

In diesem Zusammenhang gilt mein Dank auch Herrn Prof. Dr. J. Adamski für die Mitbenutzung des Genomanalysezentrum des Institutes für Experimentelle Genetik und seiner gesamten Arbeitsgruppe, die mir mit Rat und Tat stets zur Seite stand.

Am Institut für Entwicklungsgenetik danke ich Frau Dr. L. Bally-Cuif für die Nutzung der Fischhalle und Fischquarantäne, sowie für die Unterstützung meiner Forschungsarbeit. Ebenso danke ich den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe um Frau Dr. L. Bally-Cuif und besonders Frau S. Topp für die Aufzucht der von mir benötigten adulten Zebrafische und für die kleinen und großen Hilfestellungen zum Thema Fischeaufzucht und Paarung der Fische. Darüberhinaus danke ich Herrn Dr. K. Imai für Mitnutzung des Roche LightCyclers und der dazugehörigen Software.

Ich danke Herrn Dr. C. Theodorakis für die freundliche Aufnahme an der Texas Tech University (TIEHH, Lubbock, USA), wo ich im Rahmen einer Kooperationszusammenarbeit die Möglichkeit eines Forschungsaufenthaltes hatte.

Ebenso danke ich Herrn Dr. V. Laudet für die Ermöglichung eines Forschungsaufenthaltes an der École Normale Supérieure de Lyon (ENS-CNRS, Lyon, Frankreich), wo ich die Technik der *in situ* Hybridisierung erlernen konnte.

Für die Durchführung der histologischen Arbeiten möchte ich Herrn Dr. L. van den Ven und seinen Mitarbeitern vom National Institute for Public Health and the Environment (rivm, Niederlande) meinen Dank aussprechen.

Am Institut für Ökologische Chemie möchte ich mich bei Herrn Dr. Andreas Stocker für seine zahlreichen Hilfestellungen, Ratschläge und seine stete Bereitschaft zur Diskussion bedanken. Ebenso bei Monika und Ursula, für ihre Unterstützung bei der Fischeaufzucht und bei der Durchführung der Expositionsversuche. Mein Dank gilt auch Herrn Dr. L. Hollosi für die Durchführung der Messungen an der HPLC. Weiterhin danke ich Frau Danzer für ihre freundliche Unterstützung in allen verwaltungstechnischen Angelegenheiten und allen Kollegen und Kolleginnen, insbesondere Daniela, Naima, Marcella und Andreas für die nette Arbeitsatmosphäre.

Abschließend möchte ich mich ebenso bei meinen Eltern für ihre Unterstützung während meiner gesamten schulischen und beruflichen Ausbildung bedanken.

## Publikationsliste

### Paperbeiträge:

**Lutz, I., Würtz, S., Schulz, A., Levy, G., Bögi, C., Opitz, R. and Kloas, W. (2002):** Establishment of estrogenreceptor-mRNA as estrogenic biomarker in the amphibian *Rana temporaria*. *Proceeding of the 21<sup>st</sup> Conference of the European Comparative Endocrinologists*, August 26-30, 2002 Bonn, Germany, Monduzzi Editore, 95-98.

**Schulz, A., Stocker, A., Hollosi, L., Schramm, K.-W. (2004):** TR $\alpha$ - and TSH-mRNA levels after temporal exposition with methimazole in zebrafish, *Danio rerio*. *Organohalogen Compounds* 66, 3052-3056

### Abstracts für Poster / Poster / Vorträge:

**Schulz, A.E.I., Hollosi, L., Stocker, A., Theodorakis, C.W., Schramm, K.-W. (2004):** Effects of thyroid endocrine disruptors on Gene Expression in *Danio rerio*. SETAC Europe 14<sup>th</sup> Annual Meeting, April 18-22, 2004, Prague, Czech Republic; Poster

**Schulz, A.E.I., Hollosi, L., Stocker, A., Schramm, K.-W (2004):** TR $\alpha$ - and TSH-mRNA levels after temporal exposition with methimazole in zebrafish, *Danio rerio*. DIOXIN, 24<sup>th</sup> International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs, October, 6-10, 2004; Berlin, Germany; Poster

**Schulz, A.E.I., Hollosi, L., Stocker, A., Schramm, K.-W. (2004):** Thyroid endocrine disruptors and the effects on gene expression in zebrafish (*Danio rerio*) CASCADE summer School on Nuclear Hormone Receptors Ecole Normale Supérieure de Lyon, September 13-17, 2004, Lyon, France; Poster

**Schulz, A.E.I., Hollosi, L., Stocker, A., Schramm, K.-W. (2005):** Effects of a temporal exposition with the thyroid drug methimazole on zebrafish, *Danio rerio*. 1<sup>st</sup> International Conference on Environmental Science and Technology, Januar, 23-26, 2005, New Orleans, USA. p.44

**Schulz, A., Stocker, A., Hollosi, L., Kettrup, A., Schramm, K.-W. (2005):** Methimazole and the effect on gene expression in zebrafish larvae. CASCADE Annual Meeting, January 20-23, 2005, Orvieto, Italy

**Stocker, A., Jaser, W., Schulz, A., Hollosi, L., Kettrup, A., Schramm, K.-W. (2005):** Stress hormones in fish exposed to endocrine disruptors. CASCADE Annual Meeting, January 20-23, 2005, Orvieto, Italy

**Hollosi, L., Schulz, A., Stocker, A., Kettrup, A., Schramm, K.-W. (2005):** Simultaneous determination of the thyreostatic drug methimazole and metabolites using SPE-RP-HPLC from fish homogenates. CASCADE Annual Meeting, January 20-23, 2005, Orvieto, Italy

**Stocker, A., Jaser, W., Schulz, A., Hollosi, L., Schramm, K.-W. (2005):** Katecholamines in zebrafish exposed to endocrine disruptors. 1<sup>st</sup> International Conference on Environmental Science and Technology, Januar, 23-26, 2005, New Orleans, USA. p.45

**Stocker, A., Theimer, S., Jaser, W., Schulz, A., Hollosi, L., Kettrup, A., Schramm, K.-W. (2005):** Stress hormones in fish exposed to endocrine disruptors. 3. Dresdner Tagung endokrin active Stoffe in Abwasser und Klärschlamm, 14./15. März 2005, Tagungsband, Beiträge zu Abfallwirtschaft/Altlasten, Band 38, p. 115

**Hollosi, L., Schulz, A., Stocker, A., Kettrup, A., Schramm, K.-W. (2005):** Determination of the thyreostatic drug methimazole in water and biological matrices using SPE-RP-HPLC. 3. Dresdner Tagung endokrin active Stoffe in Abwasser und Klärschlamm, 14./15. März 2005, Tagungsband, Beiträge zu Abfallwirtschaft/Altlasten, Band 38, p. 115

**Schulz, A., Stocker, A., Hollosi, L., Schramm, K.-W. (2005):** Methimazole and the effect on gene expression in zebrafish larvae. CREDO WORKSHOP ON ENDOCRINE DISRUPTORS, May 10-12, 2005, Prague, Czech Republic

**Stocker, A., Theimer, S, Jaser, W., Schulz, A.E.I., Hollosi, L., Kettrup, A., Schramm, K.-W. (2005):** Stress hormones in fish exposed to endocrine disruptors. CREDO WORKSHOP ON ENDOCRINE DISRUPTORS, May 10-12, 2005, Prague, Czech Republic

**Schulz, A., Hollosi, L., Stocker, A., Schramm, K.-W. (2005):** The thyroid drug methimazole and the effects on *Danio rerio*. SETAC Europe 15<sup>th</sup> Annual Meeting, May 22-26, 2005, Lille, France, Proceedings p. 279

**Schulz, A., Stocker, A., Hollosi, L., Schramm, K.-W. (2005):** Effects of short term expositions on zebrafish larvae. SETAC Europe 15<sup>th</sup> Annual Meeting, May 22-26, 2005, Lille, France, Proceedings p. 280

**Stocker, A., Schulz, A., Hollosi, L., Jaser, W., Schramm, K.-W. (2005):** Endocrine disruptors and stress response in zebrafish. SETAC Europe 15<sup>th</sup> Annual Meeting, May 22-26, 2005, Lille, France, Proceedings p. 360

**Stocker, A., Jaser, W., Schulz, A., Hollosi, L., Pfister, G., Kettrup, A., Schramm, K.-W. (2005):** Stress hormones in fish exposed to endocrine disruptors. MESAEP, 13<sup>th</sup> International Symposium, October 8-12, 2005, Thessaloniki, Greece, Proceedings p.359

**Stocker, A., Jaser, W., Schulz, A., Hollosi, L., Pfister, G., Kettrup, A., Schramm, K.-W. (2005):** Stress hormones in fish exposed to endocrine disruptors. ECOTOX 2005, September 5-8, 2005, Brno, Czech Republic

#### **Forschungskooperationen:**

- Dr. C. Theodorakis (Texas Tech University, TIEHH, USA) 8 Wochen Forschungsaufenthalt
- Dr. V. Laudet (ENS-CNRS Lyon, Frankreich) 2 Wochen Forschungsaufenthalt
- Dr. L. van der Ven (National Institute for Public Health and the Environment, rivm, NL)