

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg

Fakultät Life Sciences

Metallothionein in der Leber des Europäischen Aals (*Anguilla anguilla*) als Biomarker in der Umweltbewertung

Bachelorarbeit

im Studiengang Umwelttechnik

vorgelegt von
Anke Kasch
2026020
Hamburg

am 05.08.2014

Gutachterin: Prof. Dr. Susanne Heise (HAW, Hamburg)

Gutachterin: Dr. Ulrike Kammann (Thünen-Institut für Fischereiökologie, Hamburg)

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----|
| Tabellenverzeichnis..... | ii |
| Abbildungsverzeichnis | iii |
| 1. Einleitung..... | 1 |
| 1.1 Einführung | 1 |
| 1.2 Zielsetzung der Arbeit | 5 |
| 2. Material & Methoden..... | 5 |
| 2.1 Der Europäische Aal (<i>Anguilla anguilla</i>) | 5 |
| 2.2 Probenahme | 6 |
| 2.3 Aufbereitung der Proben und Cadmium-Sättigung..... | 11 |
| 2.4 Gel-Permeations-Chromatographie (GPC) | 12 |
| 2.5 Proteinbestimmung nach Bradford..... | 15 |
| 2.6 Thiolbestimmung nach Ellman et al. (1961) | 17 |
| 2.7 Bestimmung der Cadmiumkonzentration mit Atom-Absorptions-Spektrometrie | 19 |
| 2.8 Statistik | 21 |
| 3. Ergebnisse..... | 22 |
| 3.1 Ergebnisse der Proteinbestimmung | 22 |
| 3.2 Berechnung der MT-Gehalte nach Thiolbestimmung nach Ellman | 24 |
| 3.3 Berechnung der MT-Gehalte nach Cadmium-Messung | 29 |
| 3.4 Ergebnisse der Berechnungen..... | 30 |
| 4. Diskussion..... | 38 |
| 4.1 Metallothionein zur Umweltbewertung..... | 38 |
| 4.2 Vergleich der MT-Gehalte in Gelb- und Blankaalen | 42 |
| 4.3 Methodenvergleich..... | 43 |
| 4.4 Ausblick | 47 |
| 5. Zusammenfassung. | 48 |
| 6. Literaturverzeichnis..... | 49 |
| 7. Anhang..... | I |
| 7.1 Herstellung der Pufferlösungen..... | I |
| 7.2 Geräteliste | II |
| 7.3 Proteinbestimmung nach Bradford..... | III |
| 7.4 Cadmiummessung an der AAS | IV |
| 7.5 Thiolbestimmung nach Ellman et al. (1961) | V |

Tabellenverzeichnis

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Tabelle 1: Fangdaten, Masse und Länge der untersuchten Aale sowie ihr Reifestatus G (Gelbaal) oder B (Blankaal)..... | 10 |
| Tabelle 2: Protein Standards mit Molekülgröße und entsprechendem Elutionsvolumina für die Kalibration der Gel-Permeations-Chromatographie | 14 |
| Tabelle 3: Ergebnisse der Metallbestimmung nach Cadmium-Sättigung mit berechneten Metallothionein(MT)-Gehalten; <NWG: unterhalb der Nachweisgrenze | 21 |
| Tabelle 4: Ergebnisse aus der Proteinbestimmung nach Bradford mit entsprechendem Probengewicht, Fangort und Probennummer..... | 23 |
| Tabelle 5: Ergebnisse der verschiedenen Berechnungen für Metallothionein (MT)-Gehalte, mit entsprechender Probennummer, Fangort, Reifestatus (B(lank);G(elb)) und Proteingehalt | 32 |
| Tabelle 6: Mittelwerte und Standardabweichungen verschiedener Berechnungen für Metallothionein (MT)-Gehalte, bezogen auf Fangort und Reifestatus G(elb);B(lank)..... | 33 |
| Tabelle 7: Messergebnisse aus der Proteinbestimmung nach Bradford | III |
| Tabelle 8: Ergebnisse aus der Cadmium-Messung mit Atom-Absorptions-Spektrometrie (AAS)..... | IV |
| Tabelle 9: Ergebnisse der Cystein (Cys)-Bestimmung in der Metallothionein (MT)-Fraktion | V |

Abbildungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Schema der Reaktionskaskade einer Schadstoffexposition (Lacorn, 1999).. | 2 |
| Abbildung 2: Gelbaal ©Freese | 6 |
| Abbildung 3: Fangort der Aale aus der Eider: Nordfeld, in der Nähe der Schleuse (Markierung). | 7 |
| Abbildung 4: Fangort der Aale aus dem Rhein: Kalkar (Grieth) (Markierung) | 8 |
| Abbildung 5: Fangort der Aale aus der Elbe: Hoopte (Markierung) bei Winsen (Luhe) | 8 |
| Abbildung 6: Ablauf der Analyse der Leberproben | 12 |
| Abbildung 7: Gel-Permeations-Chromatographie-Anlage: Pufferlösung (1) – Pumpe (2) – Six-Port-Ventil (3) – Trennsäule (4) – Fraktionssammler (5) – Abfallgefäße (6&7) | 13 |
| Abbildung 8: Kalibrationsgerade: Zusammenhang zwischen Molekulargewicht und Verteilungskoeffizient K_{av} | 14 |
| Abbildung 9: Kupfer- und Zink-Konzentrationen [pg/ μ L] in 30 Teilfraktionen am Ausgang der Gel-Permeations-Chromatographie | 15 |
| Abbildung 10: Kalibrierkurve für die Proteinbestimmung nach Bradford. $y = 1,0546 x^2 + 0,1356 x$; mit $y = \text{mg/mL Protein}$, $x = \text{Extinktion bei 595 nm}$. BSA: Rinderserumalbumin, . | 17 |
| Abbildung 11: Reaktion von Thiolen mit dem Ellman Reagenz 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) (Riener, Kada, & Gruber, 2002) | 18 |
| Abbildung 12: Kalibration der Thiolbestimmung nach Ellman mit Cystein (Cys) | 19 |
| Abbildung 13: Kalibriergerade für die Cadmiumbestimmung mit Atom-Absorptions-Spektrometrie | 20 |
| Abbildung 14: Proteingehalt im Cytosol bezogen auf das Gewicht der Leberprobe und den Fangort | 24 |
| Abbildung 15: Vergleich der berechneten Metallothionein (MT)-Anteile ($\mu\text{g MT/mg Protein}$) aus Stoffmenge (x) bzw. Gewicht von Cystein (y) | 28 |
| Abbildung 16: Vergleich Cystein-Gehalt mit/ohne Hitzebehandlung | 29 |
| Abbildung 17: Box-Whiskers-Plot; Metallothionein (MT)-Gehalte in Blank(B)-Aalen aus Eider, Rhein und Elbe, berechnet aus Werten der Cadmium (Cd)-Messung | 34 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 18: Box-Whiskers-Plot: Metallothionein (MT)-Gehalte in Blank (B)- und Gelb (G)-Aalen aus der Eider, berechnet aus Werten der Cadmium (Cd) Messung | 35 |
| Abbildung 19: Metallothionein (MT)-Gehalte der B(lank) bzw. G(elb)-Aale aus Eider, Rhein und Elbe, berechnet aus Werten der Cystein-Messung in Bezug auf ihr Reifestadium (stage) entsprechend Silvering Index (si) nach Durif et al. (2005).. | 36 |
| Abbildung 20: Box-Whiskers-Plot: Vergleich der Metallothionein (MT)-Gehalte in B(lank)- und G(elb)-Aalen aus Eider, Rhein und Elbe; berechnet aus Werten der Cystein-Messung (hell) bzw. der Cadmium-Messung (dunkel). Median, Box: 25%-75%, Whiskers: Minimum/Maximum ohne Ausreißer..... | 37 |
| Abbildung 21: Box-Whisker-Plot von Metallothionein (MT)-Gehalten in Blank (B)-Aalen aus Eider, Rhein und Elbe, berechnet aus Werten der Cystein-Messung | 40 |
| Abbildung 22: Box-Whiskers-Plot: Metallothionein (MT)-Gehalte in Blank (B)- und Gelb (G)-Aalen aus der Eider, berechnet aus Werten der Cystein-Messung; signifikanter Unterschied (*)..... | 43 |
| Abbildung 23: Vergleich von Metallothionein (MT)-Gehalten, berechnet aus Cadmium (Cd)- bzw. Cystein-Messung..... | 44 |
| Abbildung 24: Vergleich von Metallothionein (MT)-Gehalten, berechnet aus Cadmium (Cd)- bzw. Cystein-Messung unter Ausschluss besonders hoher MT-Gehalte (>110 µg/mL im Cytosol, berechnet aus Cystein-Messung) | 45 |
| Abbildung 25: Metallothionein (MT)-Gehalte in Blankaaalen in Elbe und Rhein, berechnet aus Cystein- bzw. Cadmium (Cd)-Messung | 46 |

1. Einleitung

1.1 Einführung

Einen großen Teil seines Lebens verbringt der Europäische Aal (*Anguilla anguilla*) in belasteten deutschen Flüssen. Dort ist er aufgrund seiner benthischen Lebensweise Schadstoffen, wie z. B. Schwermetallen ausgesetzt. Belastungen durch Schadstoffe können dazu führen, dass das Wachstum und die Fortpflanzung von Fischen gestört werden. Außerdem können Schwermetalle die Ursache für Erkrankungen sein (Langston, Chesman, Burt, Pope, & McEvoy, 2002). Solche schädlichen Wirkungen von Umweltkontaminanten bleiben oft unentdeckt, bis es zu Veränderungen in der Population und damit gegebenenfalls auch im Ökosystem kommt. Die Population des Aals ist seit den 1980er Jahren auf 1 % der durchschnittlichen Population der 1970er zurückgegangen, sodass der Europäische Aal auf der Roten Liste gefährdeter Arten der Weltnaturschutzunion (IUCN) steht (IUCN Freyhof, Jörg; Brooks, Emma, 2011). Die Gründe dieses Rückgangs sind bislang ungeklärt. Diskutiert werden sowohl natürliche, als auch anthropogene Ursachen, wie Überfischung, Zerstörung von Lebensräumen, invasive Parasiten, Wasserkraftanlagen und chemische Verschmutzung (Sühring, et al., 2013b). Um dem Bestandrückgang entgegen zu wirken, gibt es in Deutschland Besatzmaßnahmen für den Aal, in deren Rahmen Glasaale in Aalfarmen vorgestreckt und in geeignete Besatzgewässer entlassen werden. Die Sterblichkeit der vorgestreckten Tiere im Gewässer ist niedriger als die der Glasaale, sodass nach Empfehlung der European Inland Fisheries Advisory Commission (EIFAC) verstärkt Besatzaale aus Aalfarmen als Besatzmaterial eingesetzt werden sollen (MUNLV NRW, 2003). Aale können aufgrund ihres hohen Fettgehalts großen Mengen an lipophilen, organischen Schadstoffen wie z. B. halogenierte Flammschutzmittel und polybromierte Diphenylether aufnehmen (Sühring, et al., 2013b). Auch Schwermetalle können im Aal bioakkumulieren, was zu schädlichen Effekten wie abnehmender genetischer Diversität führen kann (Esteve, Alcaide, & Urena, 2012). Bei Aalen, die chronisch Schwermetallbelastungen ausgesetzt sind, konnte ein verringertes Reproduktionspotential festgestellt werden, sodass Schwermetallbelastung auch als wichtiger Faktor für den Populationsrückgang betrachtet werden muss (Esteve, Alcaide, & Urena, 2012). Solchen Effekten gehen subletale Veränderungen auf Molekular- und Zellebene voraus (Langston, Chesman, Burt, Pope, & McEvoy, 2002) (Abbildung 1), die durch geeignete Verfahren detektiert und als

Einleitung

Indikator für die Bioverfügbarkeit und Auswirkungen des Schadstoffs dienen können. Langston et al. schlagen das Protein Metallothionein (MT) als Bioindikator für subletale Schäden durch Schwermetallbelastung vor. MTs sind metallbindende, cysteinreiche Proteine mit einem geringen Molekulargewicht (Linde, Sanchez-Galán, Vallés-Mota, & García-Vázquez, 2001). MT ist im Organismus ein Speicher- und Versorgungsort für essentielle Metalle wie Zink und Kupfer, die an der Proteinsynthese, dem Nukleinsäure-Metabolismus und anderen stoffwechsel-betreffenden Prozessen beteiligt sind (Langston, Chesman, Burt, Pope, & McEvoy, 2002). Auch toxische Metalle können an MT gebunden werden, um die Zellen vor der Toxizität von freien Schwermetall-Ionen zu schützen (Linde, Sanchez-Galán, Vallés-Mota, & García-Vázquez, 2001).

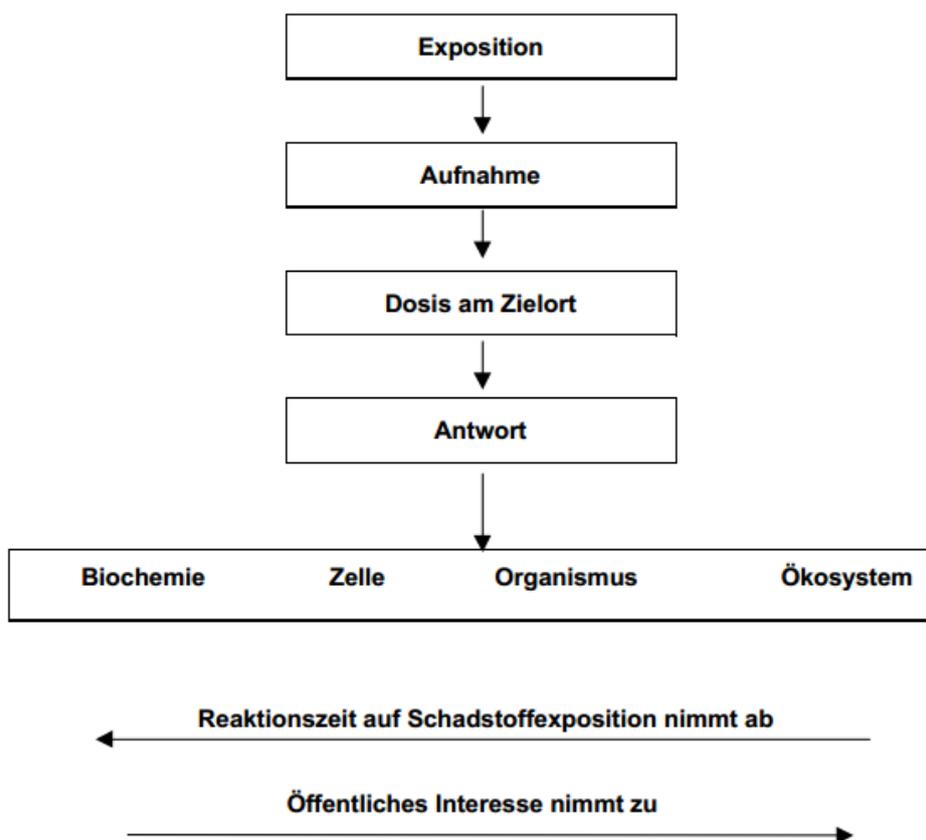


Abbildung 1: Schema der Reaktionskaskade einer Schadstoffexposition (Lacorn, 1999)

Die wasserlöslichen MT setzen sich in der Regel aus 61 Aminosäuren zusammen, wobei es sich bei etwa einem Drittel der Aminosäuren um Cystein handelt. Die Bindung der

Einleitung

Metalle erfolgt über das Schwefelatom des Cysteins. Pro MT sind sieben zweiwertige Metallionen (z.B. Cadmium, Zink) oder zwölf einwertige Metallionen (z.B. Silber) gebunden. Die Metallzusammensetzung in den MT kann unterschiedlich sein und verschieden-wertige Metalle können an ein MT gebunden sein (Lacorn, 1999). Unter Bedingungen mit erhöhtem Metallgehalt wird die Synthese von MT induziert, um im Organismus mehr Bindungsstellen für Metallionen bereit zu stellen. So werden Schäden durch Metallionen vermieden. Die Induktion von MT ist daher ein potentieller biochemischer Indikator für die physiologische Reaktion auf Schwermetallbelastung (Langston, Chesman, Burt, Pope, & McEvoy, 2002). Während die Bindungsaffinität der Cystein-Reste im MT für Quecksilber am höchsten ist, gefolgt von Kupfer, Cadmium und Zink, spiegelt dies nicht die Fähigkeit der Metalle wieder, die MT-Synthese zu induzieren. Bei Säugetieren wird Zink das größte Induktionspotential zugesprochen, Cadmium und Quecksilber wirken weniger stark induzierend und Kupfer hat nur eine geringe induzierende Wirkung auf die MT-Synthese. Im Organismus werden in der Regel alle Bindungsstellen von im Überschuss vorhandenem Zink besetzt, welches bei erhöhter Kupfer- oder Cadmiumkonzentration verdrängt werden kann. In aquatischen Wirbellosen, z. B. Muscheln, hat Cadmium das höchste Induktions-Potential und Zink das geringste (Langston, Chesman, Burt, Pope, & McEvoy, 2002). Aufgrund ihrer hohen Sensitivität für Metallbelastung sind Fische geeignet um Biomarker für Umweltverschmutzung zu untersuchen (Langston, Chesman, Burt, Pope, & McEvoy, 2002). Es ist zu beachten, dass der grundlegende MT-Gehalt auch von Jahreszeit, Fortpflanzungsstadium, Wassertemperatur und Entwicklungsstadium abhängt (Langston, Chesman, Burt, Pope, & McEvoy, 2002). Die Synthese von MT ist in der Leber von Fischen besonders hoch, was sie zu einem geeigneten Gewebe für die Untersuchung macht (Costa, et al., 2008).

In Laborversuchen wurde die Induktion von MT bei Exposition durch Zink, Kupfer und Cadmium festgestellt (Linde, Sanchez-Galán, Vallés-Mota, & García-Vázquez, 2001). Die Induktion in Fischen, die umweltbedingt einer Schwermetall-Belastung ausgesetzt sind, ist schwieriger zu bewerten, da die Rahmenbedingungen, anders als im Laborversuch, nicht exakt definiert sind. Es ist daher wichtig, möglichst viele Begleitinformationen, wie Länge, Gewicht, Reifestatus und Fettgehalt der untersuchten Aale zu erhalten, um Ergebnisse aus der MT-Untersuchung zur Umweltbewertung heranziehen zu können.

Einleitung

Die Belastungssituation in deutschen Flüssen ist in den letzten Jahrzehnten stark zurückgegangen (LANUV NRW), allerdings werden im Rhein nach wie vor große Mengen Schwermetall nachgewiesen (Arndt-Dietrich, 2002). Aale im Rhein gelten allgemein als belastet, da sie sowohl mit bromierten Flammschutzmitteln und Insektiziden (Sühling, et al., 2013a) als auch mit polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAH) stark kontaminiert sind (Kammann et al., 2014). Auch in der Tideelbe wurden hohe Schwermetall-Belastungen insbesondere mit Cadmium, Quecksilber und Zink festgestellt, die im Vergleich zu den Bewertungskriterien der Wasserrahmenrichtlinie (WRRL) als „erhöht“ eingestuft wurden (BfG, 2008). Entlang der Eider befinden sich nur wenige Gewerbe- und Industriestandorte, sodass die Schwermetallbelastung im Sediment der Eider deutlich geringer ist als in Rhein und Elbe (MLUR SH, 2009). Europäische Aale aus deutschen Flüssen wurden noch nicht auf den Biomarker MT untersucht. Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen diese Lücke zu schließen. Außerdem soll ein Vergleich zwischen Gelb- und Blankaalen aus demselben Fluss Auskunft darüber geben, inwiefern die verschiedenen Entwicklungsstadien einen Einfluss auf den MT-Gehalt in der Leber des Aals haben.

Um den MT-Gehalt in Organismen zu bestimmen, muss das MT zuerst von anderen Proteinen isoliert werden und kann danach über seine Charakteristika (z.B. Thiole, Metalle) quantifiziert werden. Für die Trennung der MTs von anderen Proteinen hat sich die Gel-Permeations-Chromatographie (GPC) als geeignetes Verfahren herausgestellt (Hauser-Davis, et al., 2014; Langston, Chesman, Burt, Pope, & McEvoy, 2002; Campenhout, et al., 2008), welches auch im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde. Eine Berechnung der MT-Gehalte kann über die Messung der Metall-Konzentrationen in den MT-enthaltenden Fraktionen der GPC geschehen (Langston, Chesman, Burt, Pope, & McEvoy, 2002; Campenhout, et al., 2008). Allerdings sind eine Reihe unterschiedlicher Metalle an das MT gebunden und müssten einzeln quantifiziert werden. Durch eine Cadmiumsättigung sollen alle Bindungsstellen der MTs mit Cadmium besetzt werden, sodass nur noch die Cadmiumkonzentration gemessen wird, um die MT-Konzentration berechnen zu können. Ein weniger etabliertes Verfahren ist die Berechnung des MT-Gehalts aus der Thiolbestimmung nach Ellman et al. (1961). Diese wurde bereits zur qualitativen Bestimmung von MT verwendet (Grumiaux, Bulet, Salzet, Demuyne, & Dhainaut-Courtois, 1998), jedoch konnte sich das Verfahren lange Zeit nicht durchsetzen.

Material & Methoden

Erst in aktuellen Studien findet eine quantitative Bestimmung der MT-Konzentrationen nach der Reaktion nach Ellman et al. (1961) statt (Hauser-Davis, et al., 2014; Tenório-Daussat, et al., 2014).

1.2 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Bachelorarbeit sollten die folgenden Ziele erreicht werden:

- (1) Quantifizierung von MT in der Leber von Aalen für eine Bewertung der Flüsse Eider, Rhein und Elbe in Bezug auf Schwermetall-Belastung
- (2) Vergleich von MT-Gehalt in Gelb- und Blankaalen aus der Eider zur Untersuchung der Bedeutung von MT während der Reifung des Aals
- (3) Anwendung und Vergleich der Methoden Cadmium-Sättigung und Thiolbestimmung nach Ellman zur Berechnung der MT-Konzentrationen im Cytosol

2. Material & Methoden

2.1 Der Europäische Aal (*Anguilla anguilla*)

Beim Europäischen Aal handelt es sich um einen katadromen Wanderfisch, der sein Laichgebiet in der Sargassosee südlich von Bermuda hat. Im Larvenstadium (Weidenblattlarven) reisen die Aale, getragen von den Meeresströmungen, zu den Kontinentalkanten Nordafrikas und Europas. Während der Reise verwandeln sie sich in sogenannte Glasaale und erreichen so die Mündungsgebiete der Flüsse. Ein Großteil der Aale erschließt neue Lebensräume in den Süßwasser-Flüssen (Tesch, 1999). Es beginnt ein weiterer Lebensabschnitt, der Aal wächst heran, entwickelt Farbpigmente und wird zum sogenannten Gelbaal (Abbildung 2). In dieser mehrere Jahre dauernden stationären Phase baut der Gelbaal Fettreserven für die Laichwanderung auf. Er hält sich in dieser Zeit vor allem im Sediment auf. Der Gelbaal kann einen Körperfettanteil von 40 Prozent oder mehr erreichen, bevor die Entwicklung zum Blankaal beginnt. Sein Rücken wird dunkler und sein Bauch erhält einen silbrigen Glanz. Die Augen des Aals sind dann deutlich vergrößert und die Brustflossen werden länger. Der Blankaal stellt das Fressen

Material & Methoden

ein und begibt sich auf die Wanderung zurück in das etwa 7000 Kilometer entfernte Laichgebiet. Für die Wanderung und die Entwicklung der Ovarien muss das aufgebaute Körperfett als Energiereserve reichen (Tesch, 1999). Der Aal kann sich nur ein einziges Mal fortpflanzen. Für Weibchen dauert die Entwicklung bis dahin in der Regel über 10 Jahre. Maßnahmen, die den Bestandrückgang aufhalten sollen, sind zum einen saisonale Fangbeschränkungen und Mindestmaßerhöhungen. Zum anderen gibt es Besatzmaßnahmen, die der Bestandsstützung dienen sollen. Dabei sollen die Glasaale bestmöglich auf die Europäischen Flüsse verteilt werden. Momentan ist der Aalbesatz, bei dem,

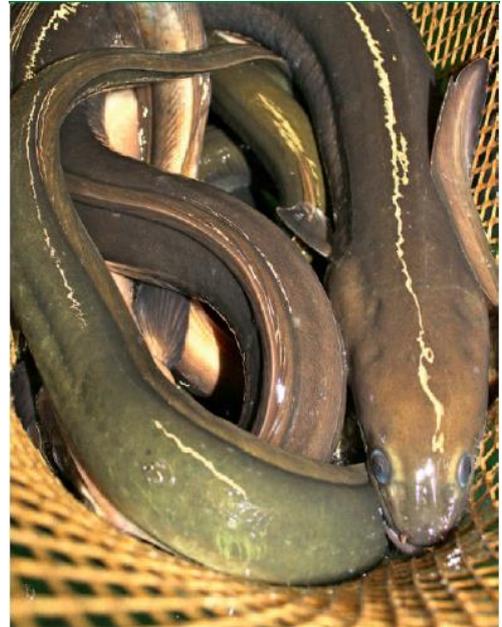


Abbildung 2: Gelbaal ©Freese

anders als bei anderen Besatzprogrammen, die Fische aus Wildfängen und nicht aus künstlicher Reproduktion stammen, wissenschaftlich umstritten. Die Glasaale werden in Aalfarmen vorgestreckt bevor sie wieder in Gewässer entlassen werden. Beim Fang der Glasaale treten Sterblichkeiten von 40 Prozent auf, außerdem gibt es Verluste bei Transport und Vorstrecken in den Aufzuchtanlagen. Des Weiteren ist noch unklar, ob die Jungtiere nach einem solchem Besatz überhaupt in der Lage sind in ihr Laichgebiet in der Sargassosee zurückzufinden um zum Erhalt des Bestandes beizutragen (Freese, 2012). Wissenschaftliche Forschung muss zeigen, ob der Aalbesatz zu einer Stützung des Laichbestandes führt und dadurch dem Schutz des Fortbestandes des Aals dient. Zertifikate und Standards zu geringen Verlusten bei Fang und Transport sowie ausschließlicher Besatz in Gewässer mit hoher Eignung sind erste Schritte, die den Aalbesatz nachhaltig zu gestalten (Freese, 2012).

2.2 Probenahme

Im Rahmen des „Data Collection Framework“ (DCF) führt das Thünen-Institut (TI) für Fischereiökologie eine jährliche Bestandsaufnahme der Europäischen Aale in deutschen Gewässern durch. Ein Teil der im Rahmen des DCF genommenen Proben standen für die

Material & Methoden

vorliegende Arbeit zur Verfügung. Die untersuchten Proben stammen von Aalen aus Eider, Rhein und Elbe. Sie wurden von kommerziellen Fischern gefangen und im Anschluss von Mitarbeitern des TI weiter bearbeitet. Die Fische aus der Eider wurden in Nordfeld, nahe der Schleuse gefangen (Abbildung 3). Die Aale aus dem Rhein stammen aus Kalkar (Grieth) in Nord-Rhein-Westfalen (Abbildung 4) und die Aale aus der Elbe aus Hoopte bei Winsen (Luhe) noch in der Tideelbe (Abbildung 5).

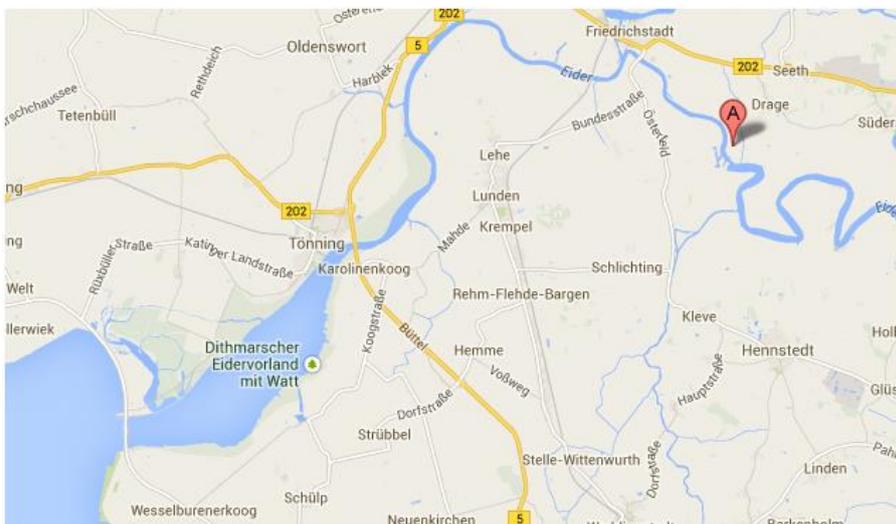


Abbildung 3: Fangort der Aale aus der Eider: Nordfeld, in der Nähe der Schleuse (Markierung).

Material & Methoden

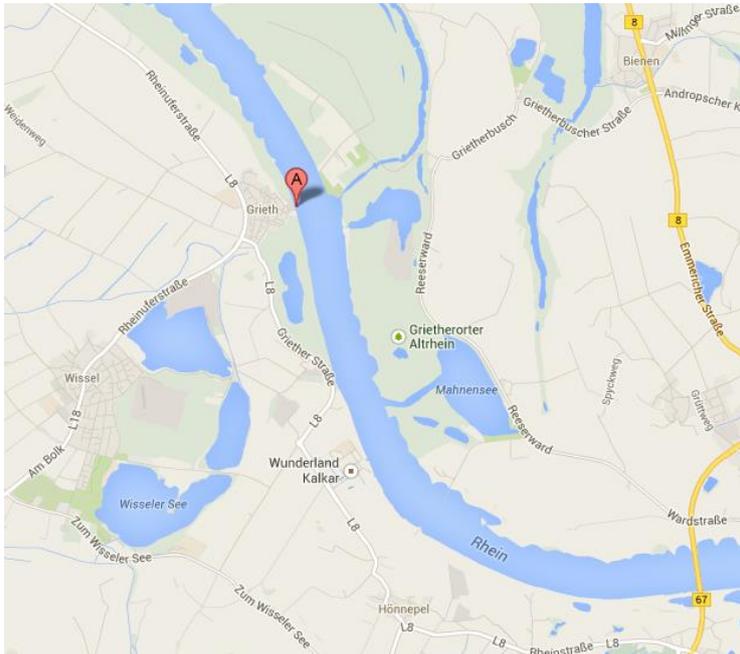


Abbildung 4: Fangort der Aale aus dem Rhein: Kalkar (Grieth) (Markierung)

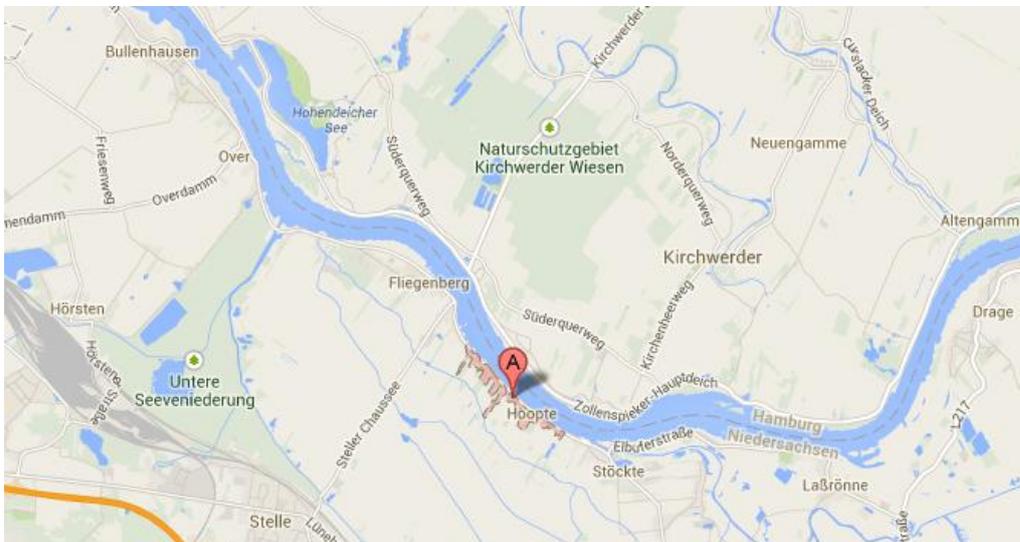


Abbildung 5: Fangort der Aale aus der Elbe: Hoopte (Markierung) bei Winsen (Luhe)

Nach dem Fang wurden die Fische für maximal zehn Tage in einem Fließwasser-Tank gehalten. Durch Mitarbeiter des TI wurden die Aale einzeln mit verdünntem Nelkenöl betäubt, gewogen, die Körperlänge gemessen und ihr Reifestatus nach Durif et al. (2005) bestimmt. Außerdem fand eine Einschätzung des Reifestatus in Gelb- oder Blankaal nach optischem Ermessen statt. Nach der Tötung durch Enthauptung wurden die Lebern

Material & Methoden

heraus präpariert, Teile (ca. 0,5 g) davon in Probengefäße gegeben und direkt in flüssigem Stickstoff bei -196 °C eingefroren. Gelagert werden die Proben in einem -80 °C Kühlschrank und stehen zur weiteren Analyse zur Verfügung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Lebern von 38 Aalen untersucht. Zwanzig davon stammen aus der Eider, wobei jeweils zehn dem Stadium des Gelbaals bzw. Blankaals zuzuordnen sind. Außerdem stammen zehn Blankaale aus dem Rhein und acht Blankaale aus der Elbe. Die Tiere waren zwischen 42 cm und 90 cm lang und wogen zwischen 103 g und 1659 g (Tab. 1).

Material & Methoden

Tabelle 1: Fangdaten, Masse und Länge der untersuchten Aale sowie ihr Reifestatus G (Gelbaal) oder B (Blankaal) und nach Durif (1-5)

| Probennummer | Fangort | Fangmonat/ -jahr | Tötungsdatum/ Bearbeitungsdatum | Masse (g) | Länge (cm) | G/B | Reifestatus |
|--------------|---------|------------------|---------------------------------|-----------|------------|-----|-------------|
| 1387 | Eider | 08/12 | 17.08.2012 | 655 | 68 | B | 5 |
| 1389 | Eider | 08/12 | 17.08.2012 | 684 | 74 | B | 3 |
| 1393 | Eider | 08/12 | 17.08.2012 | 589 | 67 | B | 3 |
| 1410 | Eider | 08/12 | 22.08.2012 | 891 | 71 | B | 4 |
| 1434 | Eider | 10/12 oder 11/12 | 20.11.2012 | 432 | 58 | B | 5 |
| 1735 | Eider | 10/12 oder 11/13 | 20.11.2012 | 418 | 61 | B | 5 |
| 1736 | Eider | 10/12 oder 11/14 | 20.11.2012 | 631 | 70 | B | 5 |
| 1737 | Eider | 10/12 oder 11/15 | 20.11.2012 | 456 | 64 | B | 5 |
| 1738 | Eider | 10/12 oder 11/16 | 20.11.2012 | 466 | 58 | B | 5 |
| 1739 | Eider | 10/12 oder 11/17 | 20.11.2012 | 482 | 61 | B | 5 |
| 1396 | Eider | 08/12 | 22.08.2012 | 325 | 57 | G | 3 |
| 1401 | Eider | 08/12 | 22.08.2012 | 859 | 74 | G | 5 |
| 1402 | Eider | 08/12 | 22.08.2012 | 315 | 57 | G | 3 |
| 1404 | Eider | 08/12 | 22.08.2012 | 218 | 52 | G | 3 |
| 1405 | Eider | 08/12 | 22.08.2012 | 103 | 43 | G | 2 |
| 1418 | Eider | 08/12 | 23.08.2012 | 134 | 46 | G | 2 |
| 1419 | Eider | 08/12 | 23.08.2012 | 316 | 60 | G | 3 |
| 1432 | Eider | 08/12 | 24.08.2012 | 119 | 42 | G | 1 |
| 1436 | Eider | 08/12 | 24.08.2012 | 121 | 42 | G | 1 |
| 1440 | Eider | 08/12 | 24.08.2012 | 154 | 45 | G | 2 |
| 1466 | Rhein | 09/12 | 19.09.2012 | 1509 | 86 | B | 4 |
| 1468 | Rhein | 09/12 | 19.09.2012 | 1549 | 88 | B | 4 |
| 1469 | Rhein | 09/12 | 19.09.2012 | 879 | 78 | B | 3 |
| 1473 | Rhein | 09/12 | 20.09.2012 | 1659 | 90 | B | 4 |
| 1476 | Rhein | 09/12 | 20.09.2012 | 1284 | 82 | B | 4 |
| 1477 | Rhein | 09/12 | 20.09.2012 | 1182 | 77 | B | 4 |
| 1478 | Rhein | 09/12 | 20.09.2012 | 1284 | 84 | B | 4 |
| 1485 | Rhein | 09/12 | 25.09.2012 | 174 | 45 | B | 3 |
| 1486 | Rhein | 09/12 | 25.09.2012 | 474 | 66 | B | 5 |
| 1491 | Rhein | 09/12 | 25.09.2012 | 804 | 75 | B | 5 |
| 2013 | Elbe | 07/13 | 22.07.2013 | 587 | 70 | B | 3 |
| 2015 | Elbe | 07/13 | 22.07.2013 | 636 | 73 | B | 3 |
| 2025 | Elbe | 07/13 | 23.07.2013 | 481 | 62 | B | 3 |
| 2031 | Elbe | 07/13 | 23.07.2013 | 675 | 68 | B | 3 |
| 2039 | Elbe | 07/13 | 24.07.2013 | 417 | 60 | B | 2 |
| 2040 | Elbe | 07/13 | 24.07.2013 | 204 | 49 | B | 2 |
| 2042 | Elbe | 07/13 | 24.07.2013 | 270 | 54 | B | 2 |
| 2044 | Elbe | 07/13 | 24.07.2013 | 330 | 59 | B | 2 |

Material & Methoden

2.3 Aufbereitung der Proben und Cadmium-Sättigung

Die Leberproben wurden zunächst schonend auf Eis aufgetaut. Im Anschluss wurden die Proben mit 2 mL Homogenisierungspuffer eingewogen. Der Homogenisierungspuffer, bestehend aus einer Tris-HCl-Pufferlösung (pH 9,0; 0,1 M), Dithiothreitol (DTT) und den Protease-Hemmern Phenylmethansulfonylfluoride (PMSF) und Leupeptin (Jebali, et al., 2008), sorgten für alkalische und reduktive Bedingungen, sodass die Proteine in der Probe stabil blieben. Durch die Enzymhemmer PMSF und Leupeptin wurde gewährleistet, dass die durch die Homogenisierung freigesetzten Proteasen kein MT abbauen. Reduktive Bedingungen durch DTT waren nötig um zu verhindern, dass die Thiolgruppen im MT durch Luftsauerstoff oxidieren und dadurch die Metallbindung gelöst wird. Die Homogenisierung erfolgte mit dem Potter-Homogenisator im Eisbad bei 750 Umdrehungen pro Minute. Daraufhin wurden zu dem Homogenat 400 µL bzw. 800 µL einer CdCl₂-Lösung (0,56 mg Cd/L) gegeben und auf 3,5 mL mit Homogenisierungspuffer aufgefüllt. Durch diesen Schritt werden die an MT gebundenen Metalle Kupfer und Zink durch Cadmium aus ihren Bindungsstellen im Molekül verdrängt. Danach ruhten die Proben bei Raumtemperatur für 10-15 Minuten. Anschließend wurde das Homogenat in der Ultrazentrifuge bei 100.000 x g bei 4°C für 1 h 15 min zentrifugiert. Das entstandene klare Cytosol trennte sich von den festen Zellbestandteilen und konnte mit einer Pipette abgesaugt werden. 100 µL des Cytosols wurden zur späteren Proteinbestimmung eingefroren, während 2 mL des Cytosols zur Trennung der löslichen Proteine auf die Gel-Permeations-Chromatographie (GPC)-Säule gegeben wurden.

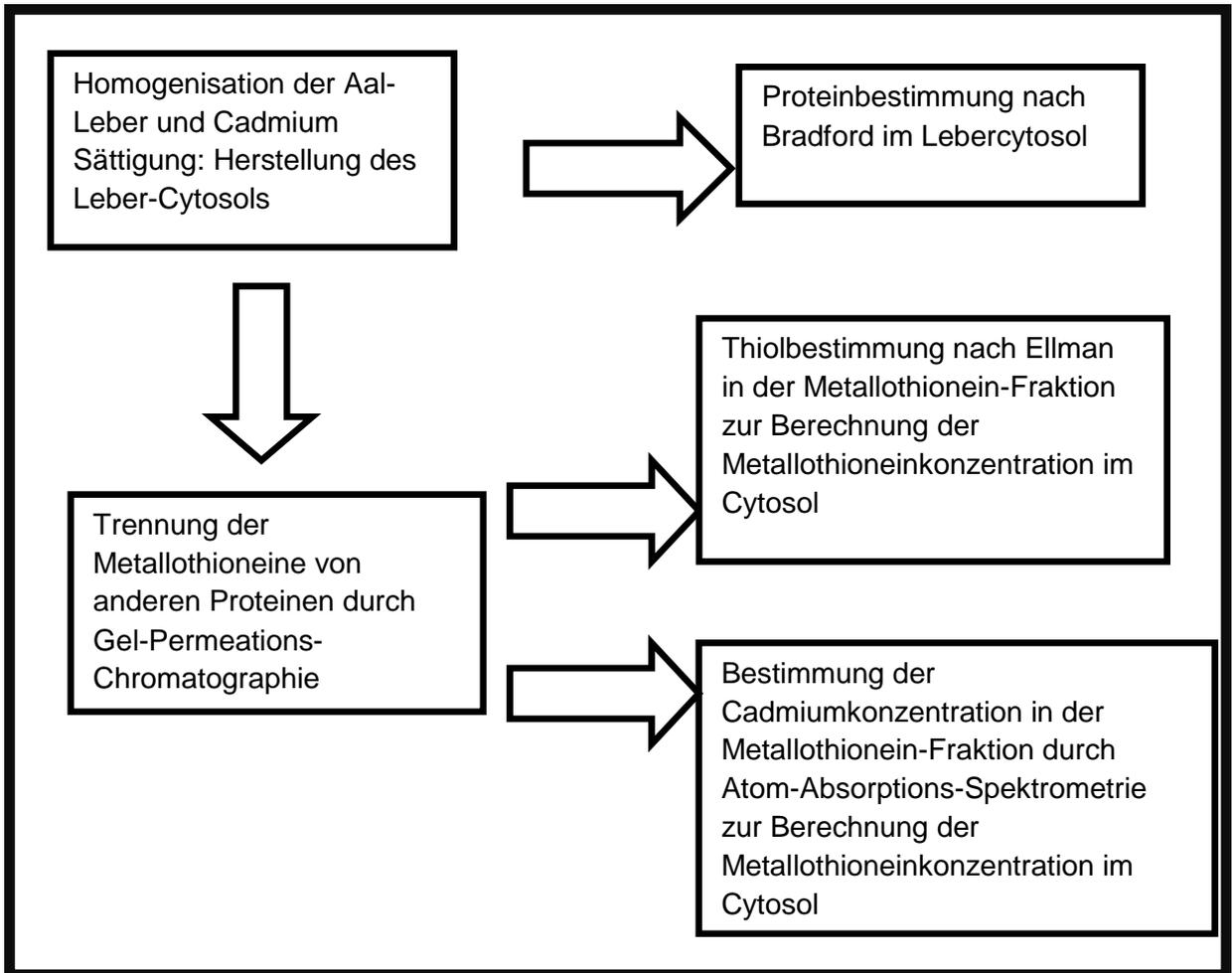


Abbildung 6: Ablauf der Analyse der Leberproben

2.4 Gel-Permeations-Chromatographie (GPC)

Die Trennung der MTs von anderen löslichen Proteinen erfolgt über GPC. Bei der GPC werden Substanzen aufgrund ihrer Molekülgröße getrennt. Die Anlage, die zur Untersuchung der Lebercytosole genutzt wurde, beinhaltet eine Trennsäule, die manuell mit dem Füllmaterial Sephadex G-75 gepackt wurde. Sephadex besteht aus Dextran mit querverbundenem Epichlorhydrin, wobei sich die verschiedenen Typen in ihrem Quellungsgrad und somit in ihrem Trennungsbereich unterscheiden. Sephadex G-75 hat einen Trennungsbereich von 3000 bis 70000 Da für kugelförmige Proteine. MTs haben eine spezifische Molekülgröße von 6000 Da, verhalten sich aber aufgrund ihrer Molekülform in ihrem Elutionsvolumen wie Moleküle der Größe 10000 Da (Lacorn, 1999) und fallen damit in den Trennbereich des Sephadex G-75. An die Säule angeschlossen ist ein programmierbarer Fraktionssammler. Die Anlage wird mit einem Phosphatpuffer (pH

Material & Methoden

8,0) betrieben, welcher durch eine Pumpe bei einem Volumenstrom von 0,4 mL/min über die Anlage gepumpt wird. Das Lebercytosol wird über ein Six-Port-Ventil auf die GPC-Anlage gegeben. Die Probenschleife umfasst 2 mL. Am Ausgang des Fraktionssammlers und am Ausgang des Six-Port-Ventils sind jeweils ein Abfallgefäß angeschlossen (Abbildung 7).

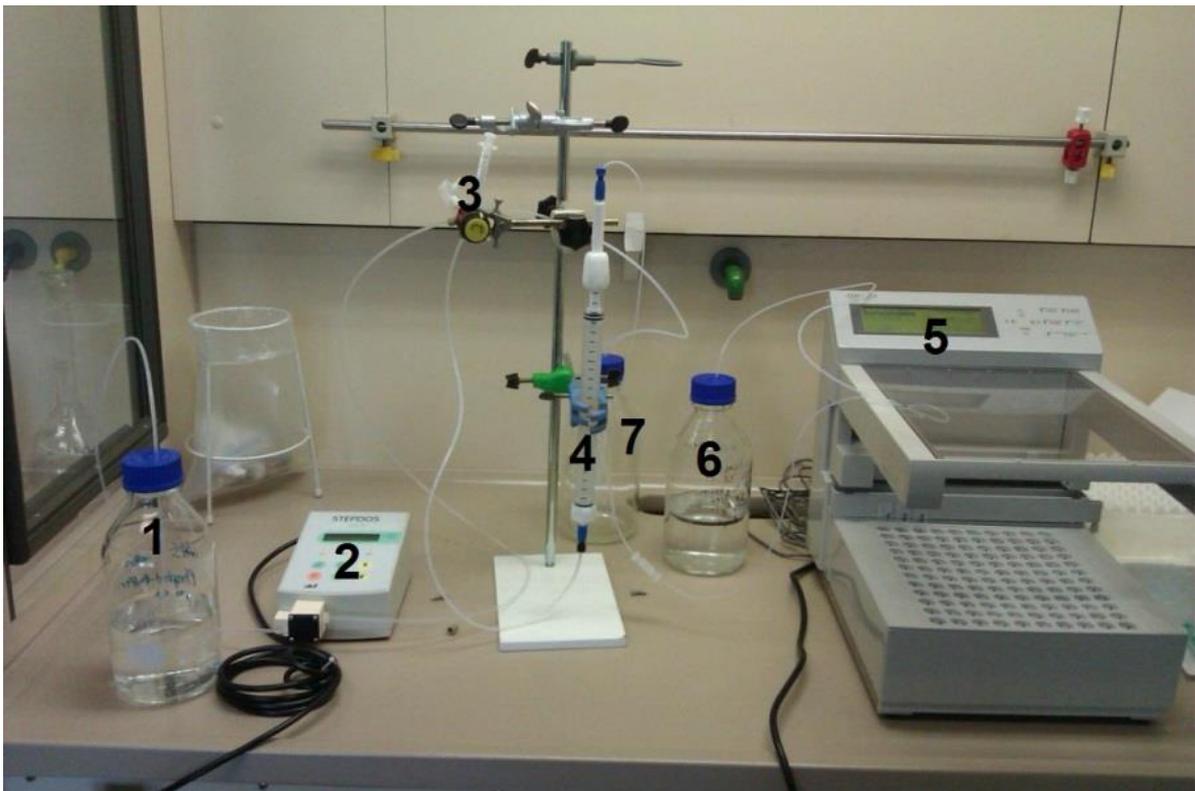


Abbildung 7: Gel-Permeations-Chromatographie-Anlage: Pufferlösung (1) – Pumpe (2) – Six-Port-Ventil (3) – Trennsäule (4) – Fraktionssammler (5) – Abfallgefäße (6&7)

Kalibriert wurde die Säule mit mehreren wasserlöslichen Proteinen im passenden Größenbereich: Vitamin B12, β -Lactoglobulin, Soybean trypsin Inhibitor, Ovalbumin, Rinderserumalbumin und Blue Dextran (Tab. 2). Das Leer- bzw. Ausschlussvolumen (V_0) und das Totale Volumen (V_t) beschreiben die Grenzen der Anlage. Alle Moleküle, die größer sind als 70.000 Da, eluieren bei einem Volumen von V_0 . Alle Moleküle, die kleiner sind als 3000 Da bei einem Volumen von V_t . Zur Bestimmung dieser Grenzen wurden Vitamin B12 (1360 Da) und Blue Dextran (2.000.000 Da) verwendet. Außerdem wurden für die übrigen Kalibrationsstandards die jeweiligen Elutionsvolumina (V_e) bestimmt, sodass sich für jede dieser Substanzen der Verteilungskoeffizient K_{av} berechnen ließ.

Material & Methoden

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

Aus dem Verhältnis von Logarithmus der Molekülgröße und Verteilungskoeffizient lässt sich eine Kalibriergerade und damit das erwartete Elutionsvolumen der MTs berechnen (Abbildung 8).

Tabelle 2: Protein Standards mit Molekülgröße und entsprechendem Elutionsvolumina für die Kalibration der Gel-Permeations-Chromatographie

| Protein | Molekülgröße [kDa] | Elutionsvolumen [mL] |
|---------------------------|--------------------|----------------------|
| Vitamin B12 | 1,36 | 35 |
| b-Lactoglobulin | 18,4 | 23 |
| Soybean trypsin Inhibitor | 20,1 | 22 |
| Ovalbumin | 42,8 | 17 |
| Rinderserumalbumin | 66 | 15 |
| Blue Dextran | 2000 | 13 |
| Metallothionein | 10 | 27 (berechnet) |

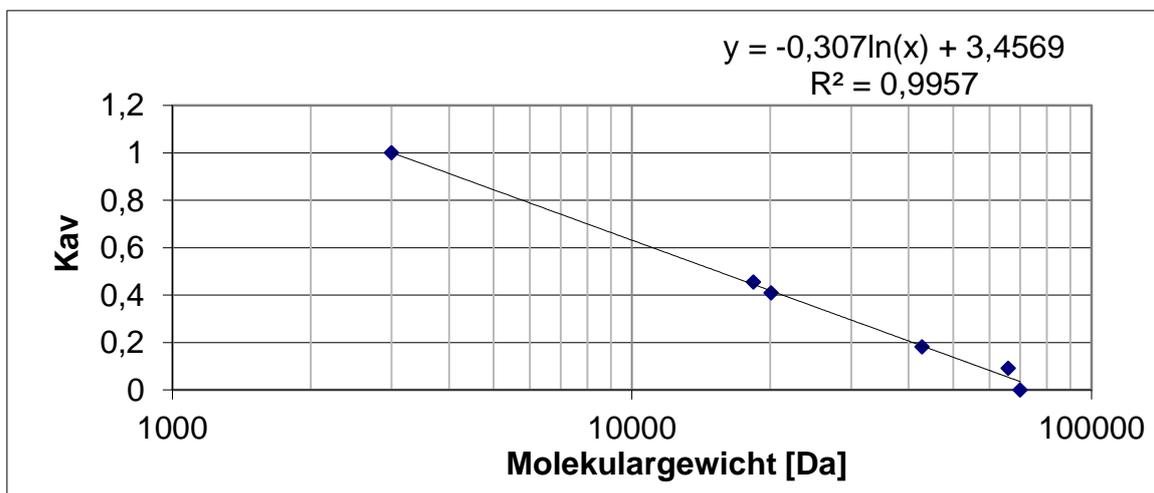


Abbildung 8: Kalibriergerade: Zusammenhang zwischen Molekulargewicht und Verteilungskoeffizient K_{av}

Für die GPC-Anlage besteht laut Kalibration folgender Zusammenhang:

$$K_{av} = -0,307 \times \ln(x) + 3,4569; \text{ mit } x = \text{Molekulargewicht in Da}$$

Material & Methoden

Daraus ergibt sich für die MTs mit einem Molekulargewicht von 10 kDa ein Elutionsvolumen von ca. 27 mL.

Mit Hilfe des Fraktionssammlers wurden drei Fraktionen mit je 10 mL Eluat gesammelt. Die erste Fraktion enthielt große Moleküle, die zweite die MTs und die dritte kleine Moleküle. Die Sammelfraktionen ergaben sich aus vorhergegangenen Untersuchungen von 30 kleineren Teilfraktionen am Ausgang der GPC. In diesen Teilfraktionen wurden die Metallkonzentrationen von Kupfer und Zink gemessen. Dabei wurde die Trennung von Metallen, die an große Moleküle gebunden sind (z. B. Fraktion 6) von Metallen, die an MT gebunden sind (z. B. Fraktion 18) deutlich. Für die weitere Analyse wurden jeweils 12 Fraktionen gesammelt betrachtet (1-12; 13-24; 25-36), wobei der Fokus auf der MT-Fraktion lag (Abbildung 9).

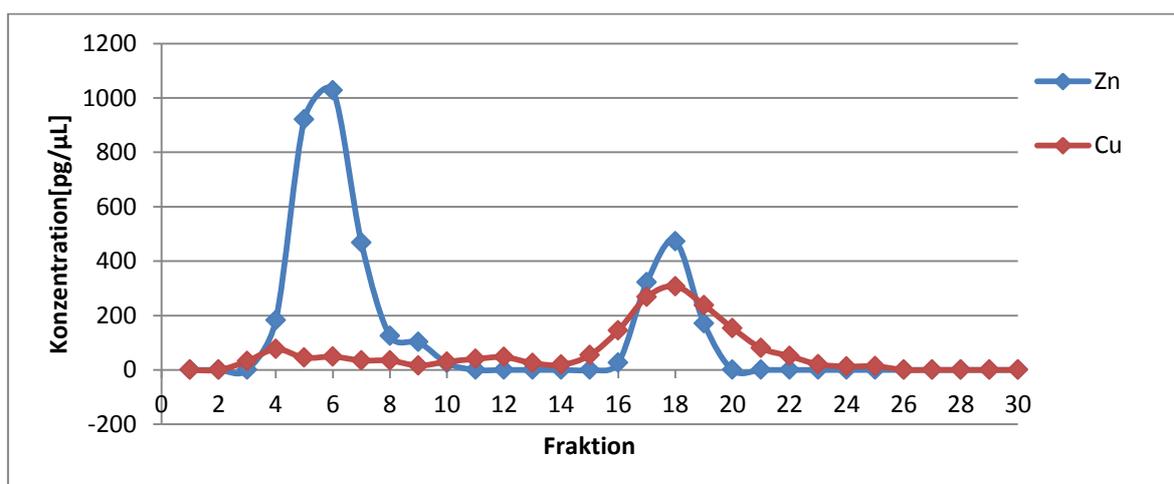


Abbildung 9: Kupfer- und Zink-Konzentrationen [pg/µL] in 30 Teilfraktionen am Ausgang der Gel-Permeations-Chromatographie

2.5 Proteinbestimmung nach Bradford

Bei den Teilproben des Cytosols, die nicht über die GPC-Anlage gelaufen sind, wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration dient dazu, die MT-Konzentrationen zum Gesamtproteingehalt ins Verhältnis zu setzen, denn es sollen nicht die absoluten MT-Gehalte sondern die MT-Gehalte bezogen auf die gesamten löslichen Proteine im Cytosol verglichen werden, da

Material & Methoden

so das Gewicht der Leberproben und z. B. Unterschiede im Fettgehalt vernachlässigbar werden.

Grundlage der Methode nach Bradford ist die Farbveränderung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blau als Folge seiner Bindung an Proteine. Dabei verändert sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 495 nm zu 595 nm. Nur die anionische blaue Form (595 nm) bindet an das Protein, sodass die Messlösung in Anwesenheit von Protein von einem bräunlichen Blau in ein kräftiges Dunkelblau umschlägt (Bradford, 1976).

Die Kalibration wurde mit Rinderserumalbumin (bovine serum albumin, BSA) durchgeführt, wobei aus der Stammlösung (1 mg/mL) Kalibrierlösungen mit Konzentrationen zwischen 0 und 0,15 mg/mL angesetzt wurden. 300 µL der jeweiligen Lösung wurden mit 2350 µL der Coomassie-Farblösung gemischt und davon jeweils 300 µL in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Für jeden Standard fand eine achtfache Bestimmung statt. Für den Blindwert eine 16-fache. 15 Minuten nach der Zugabe der Farblösung erfolgte die photometrische Messung bei 595 nm. Die Kalibration hat eine Kurve ergeben (Abbildung 10), die sich mit der Formel

$$y = 1,0546 \times x^2 + 0,1356 x; \text{ mit } y: \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \text{ Protein, } x: \text{Extinktion bei 595 nm}$$

beschreiben lässt.

Material & Methoden

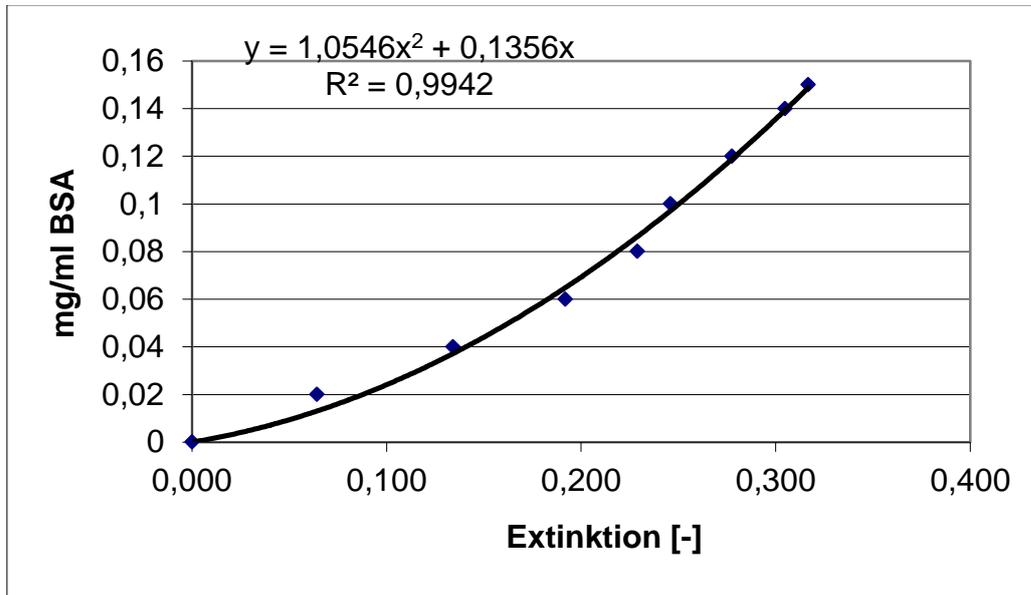


Abbildung 10: Kalibrierkurve für die Proteinbestimmung nach Bradford. $y = 1,0546 x^2 + 0,1356 x$; mit $y = \text{mg/mL Protein}$, $x = \text{Extinktion bei 595 nm}$. BSA: Rinderserumalbumin,

Das Lebercytosol wurde am Anschluss an die Kalibration in zwei Schritten 1:100 verdünnt. Daraufhin wurden die verdünnten Proben genau wie die Standards behandelt. Auf der jeweiligen Mikrotiterplatte wurden 16 Blindproben gemessen, während für die Proben eine achtfache Bestimmung durchgeführt wurde. Bei einer Verdünnung von 1:100 lagen alle Extinktionswerte im Bereich der Kalibrierkurve, sodass die zugehörigen Proteinkonzentrationen im Cytosol berechnet werden konnten.

Die Nachweisgrenze (NWG) wurde aus der dreifachen Standardabweichung des Blindwertes ermittelt. Die NWG liegt demnach bei einer Extinktion von 0,066 und damit in etwa bei der unteren Grenze des praktischen Arbeitsbereichs.

2.6 Thiolbestimmung nach Ellman et al. (1961)

Da die MTs zu etwa einem Drittel (30%) aus Cystein bestehen (Olsson & Haux, 1985), welches eine Thiolgruppe (SH-Gruppe) aufweist, ist es möglich aus der Thiolkonzentration in der MT-Fraktion der GPC die MT-Konzentration zu berechnen. Um die Thiolkonzentration zu messen, wurde eine Thiolbestimmung nach Ellman et al. (1961) durchgeführt. Für die Kalibration wurde L-Cystein genutzt. Zunächst wurden 40 mg des

Material & Methoden

sogenannten Ellman Reagenz, 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), in 10 mL Phosphatpuffer (pH 7,4) gelöst (Grumiaux, Bulet, Salzet, Demuynck, & Dhainaut-Courtois,

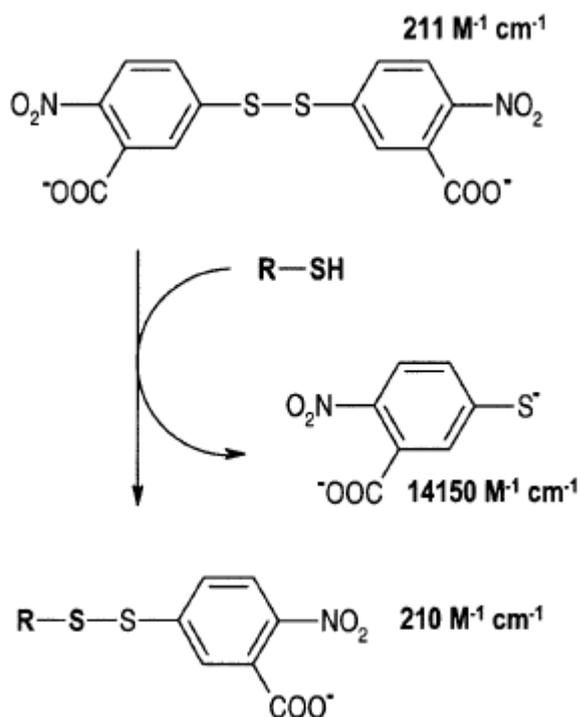


Abbildung 11: Reaktion von Thiolen mit dem Ellman Reagenz 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) (Riener, Kada, & Gruber, 2002)

11). Es entstehen zwei Produkte: zum einen 5-Thio-2-nitrobenzoessäure (TNB²⁻), das eine gelbe Färbung aufweist und abhängig von der SH-Konzentration bei 412 nm absorbiert, zum anderen entsteht R-S-TNB⁻, welches wie das Ausgangsprodukt bei 412 nm nur eine geringe Absorption aufweist (Riener, Kada, & Gruber, 2002). Aus der Kalibration mit Cystein (Abbildung 12) hat sich ergeben, dass sich die

Cystein-Konzentration nach der Formel:

$$c = \frac{A}{0,011012}$$

mit $c = \text{Cystein Konzentration} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{L}} \right]$; $A = \text{Extinktion bei } 412 \text{ nm}$

berechnen lässt. Von den gemessenen Extinktionswerten wurde jeweils der Blindwert (0 $\mu\text{mol/L}$ Cystein) abgezogen.

1998). Für die Kalibration wurden Cystein-Standardlösungen von 0 bis 150 $\mu\text{mol/L}$ angesetzt. 1,5 mL einer Standardlösung wurden im Anschluss mit 250 μL der DTNB-Lösung vermischt, und nach 20 Minuten im Photometer in einer Halb-Mikro Küvette bei 412 nm gemessen. Dabei findet eine Reaktion zwischen dem Ellman Reagenz und Cystein statt (Abbildung

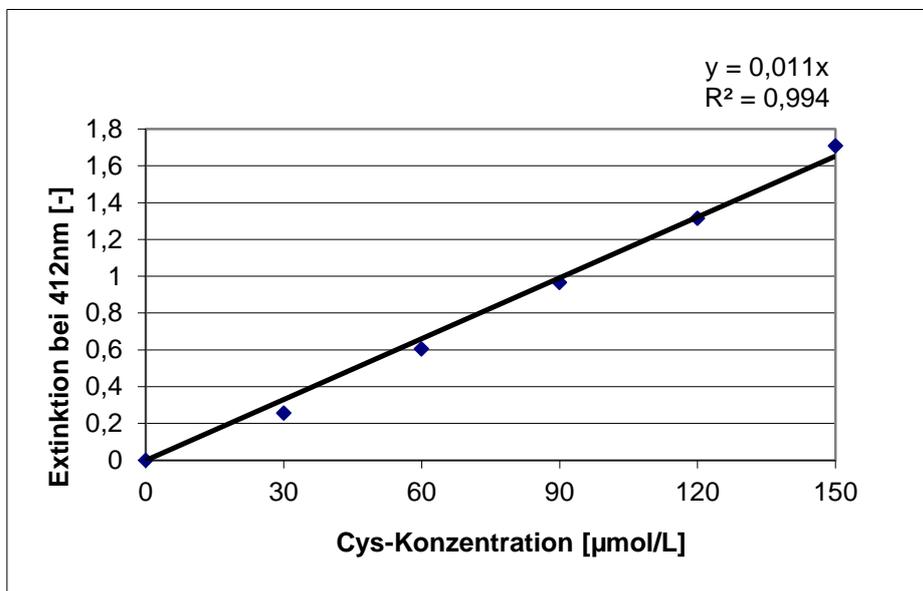


Abbildung 12: Kalibration der Thiolbestimmung nach Ellman mit Cystein (Cys)

Die Cystein-Konzentration wurde in der MT-Fraktion am Ausgang der GPC bestimmt. Hierzu wurde eine dreifache Bestimmung durchgeführt, wobei 1500 µL der Probe bzw. 750 µL Probe und 750 µL Phosphatpuffer (Verdünnung 1:2) mit 250 µL der DTNB-Lösung gemischt und die Absorption bei 412 nm nach 20 Minuten gemessen wurde. Als Blindwert wurde die Absorption von Phosphatpuffer und Ellman-Reagenz nach 20 Minuten gemessen. Aus den drei um den Blindwert korrigierten Extinktionswerten wurde der Mittelwert berechnet, aus dem wiederum die Cystein-Konzentration ermittelt wurde. Die Nachweisgrenze liegt ermittelt aus der dreifachen Standardabweichung des Blindwerts bei einer Extinktion von 0,05. Die untere Grenze des praktischen Arbeitsbereichs liegt bei einer Extinktion von 0,26, unterhalb dieser Grenze wird eine quantitative Bestimmung des Cystein-Gehalts ungenau.

2.7 Bestimmung der Cadmiumkonzentration mit Atom-Absorptions-Spektrometrie

Die Bestimmung der Cadmiumkonzentration nach der Cadmiumsättigung erfolgte in den MT-Fractionen mit der Atom-Absorptions-Spektrometrie (AAS). Dabei wurde zunächst eine Kalibration mit einem gelösten Cadmium-Standard durchgeführt (Abbildung 13).

Material & Methoden

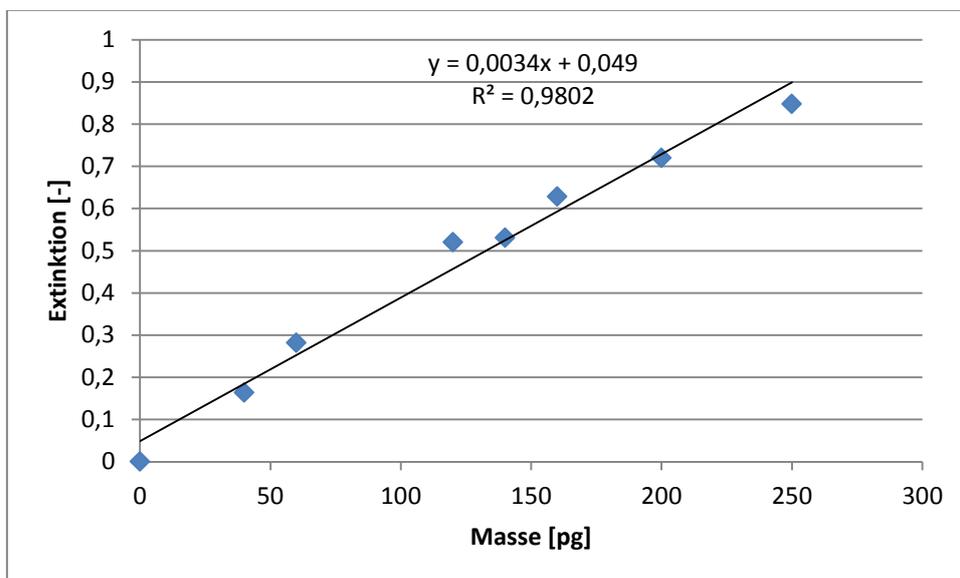


Abbildung 13: Kalibriergerade für die Cadmiumbestimmung mit Atom-Absorptions-Spektrometrie

Die Kalibration war anschließend in der Software der AAS gespeichert, sodass automatisch die Cd-Konzentrationen in den gemessenen Proben berechnet wurden. Da die Cd-Konzentrationen in den MT-Fractionen nach der Cd-Sättigung sehr hoch waren, mussten die Proben zunächst verdünnt werden. Hierzu wurde eine Verdünnung von 1:200 angesetzt. Bei den Proben aus der Elbe ergab sich eine Verdünnung von 6:1000. Von den verdünnten Proben wurden 10 µL bzw. 20 µL auf die AAS-Probe-Schiffchen pipettiert und in einer doppelten Bestimmung gemessen. Die Grenzen des praktischen Arbeitsbereichs liegen bei 40 µg bzw. 250 µg. Nach entsprechender Verdünnung wiesen alle untersuchten Proben Cadmiumwerte in diesem Bereich auf.

Ausgehend davon, dass alle Bindungsstellen des MTs mit Cadmium besetzt sind, lässt sich die theoretische MT-Konzentration nach folgender Formel berechnen:

$$MT_{theor.} = \frac{[CdMT]}{K_{Cd}}$$

[CdMT] ist dabei das in der MT-Fraktion gebundene Cadmium in nmol/mL. Bei K handelt es sich um die spezifische Kapazität des MT ein Metall zu binden. Bei Cadmium beträgt diese 7 (Campenhout, et al., 2008).

Ergebnisse

Zur Überprüfung der Cadmiumsättigung wurde für eine Leberprobe (0,282 g) die oben beschriebene Cadmiumsättigung mit 400 µL der CdCl₂-Lösung durchgeführt und im Anschluss die Cadmium-, Zink-, und Kupferkonzentrationen in den drei Fraktionen gemessen. Da Cadmium somit im Überschuss vorhanden war, wurde Zink vollständig und Kupfer zu einem sehr großen Anteil verdrängt, sodass aus der Cadmiumkonzentration näherungsweise die MT-Konzentration berechnet werden konnte. Kupfer macht in der MT-Fraktion nur noch knapp 3 gew.- % bzw. 5 mol-% aus, was bei der Berechnung der theoretischen MT-Konzentration wiederum zu einer Unterschätzung des MT-Gehalts von ca. 3 % führt (Tabelle 3).

$$MT_{theor., ges.} = \frac{[CdMT]}{KCd} + \frac{[CuMT]}{KCu}; \text{ mit } KCd = 7; KCu = 12$$

Tabelle 3: Ergebnisse der Metallbestimmung nach Cadmium-Sättigung mit berechneten Metallothionein(MT)-Gehalten; <NWG: unterhalb der Nachweisgrenze

| Metall | Molmasse [ng/nmol] | Metallgehalt in der MT-Fraktion [ng/mL] | Metallgehalt in der MT-Fraktion nmol/mL | MT [ng/mL] |
|---------|--------------------|---|---|------------|
| Zink | 65,41 | < NWG | <NWG | <NWG |
| Kupfer | 63,55 | 14,2 | 0,22 | 126,6 |
| Cadmium | 112,87 | 497 | 4,40 | 4277,5 |
| gesamt | | | | 4404,11 |

2.8 Statistik

Für die statistische Analyse wurde das Programm STATISTICA Version 6 verwendet. Zur Bestimmung von Signifikanzen wurde der t-Test mit 95%iger Signifikanz verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Proteinbestimmung

Als Bezugsgröße für die später berechneten MT-Gehalte im Lebercytosol dient der Gesamt-Proteingehalt im Cytosol. Dazu wurde in den Lebercytosolen vor der Trennung über die GPC-Anlage eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Die Proteinbestimmung nach Bradford ergab für die Leber-Cytosole Proteinkonzentrationen zwischen 1,91 mg/mL und 40,01 mg/mL (Tab. 4).

Ergebnisse

Tabelle 4: Ergebnisse aus der Proteinbestimmung nach Bradford mit entsprechendem Probengewicht, Fangort und Probennummer

| Probennummer | Fangort | Gewicht Leberprobe [g] | Proteingehalt im Cytosol [mg/mL] |
|---------------------|----------------|-------------------------------|---|
| 1387 | Eider | 0,497 | 7,16 |
| 1389 | Eider | 0,466 | 40,01 |
| 1393 | Eider | 0,838 | 20,01 |
| 1410 | Eider | 0,606 | 16,80 |
| 1734 | Eider | 0,458 | 21,33 |
| 1735 | Eider | 0,520 | 27,78 |
| 1736 | Eider | 0,840 | 12,36 |
| 1737 | Eider | 0,458 | 17,75 |
| 1738 | Eider | 0,566 | 19,36 |
| 1739 | Eider | 0,507 | 19,36 |
| 1396 | Eider | 0,390 | 12,21 |
| 1401 | Eider | 0,345 | 7,04 |
| 1402 | Eider | 0,543 | 14,02 |
| 1404 | Eider | 0,530 | 15,30 |
| 1405 | Eider | 0,272 | 6,82 |
| 1418 | Eider | 0,145 | 2,31 |
| 1419 | Eider | 0,362 | 10,59 |
| 1432 | Eider | 0,118 | 1,91 |
| 1436 | Eider | 0,168 | 2,31 |
| 1440 | Eider | 0,293 | 4,78 |
| 1466 | Rhein | 0,252 | 7,38 |
| 1468 | Rhein | 0,475 | 23,29 |
| 1469 | Rhein | 0,233 | 6,60 |
| 1473 | Rhein | 0,260 | 8,76 |
| 1476 | Rhein | 0,228 | 3,59 |
| 1477 | Rhein | 0,323 | 5,76 |
| 1478 | Rhein | 0,679 | 39,10 |
| 1485 | Rhein | 0,494 | 17,06 |
| 1486 | Rhein | 0,358 | 10,38 |
| 1491 | Rhein | 0,622 | 29,44 |
| 2013 | Elbe | 0,436 | 10,72 |
| 2015 | Elbe | 0,560 | 8,39 |
| 2025 | Elbe | 0,420 | 15,79 |
| 2031 | Elbe | 0,526 | 19,55 |
| 2039 | Elbe | 0,368 | 10,79 |
| 2040 | Elbe | 0,331 | 5,65 |
| 2042 | Elbe | 0,328 | 5,65 |
| 2044 | Elbe | 0,440 | 7,10 |

Ergebnisse

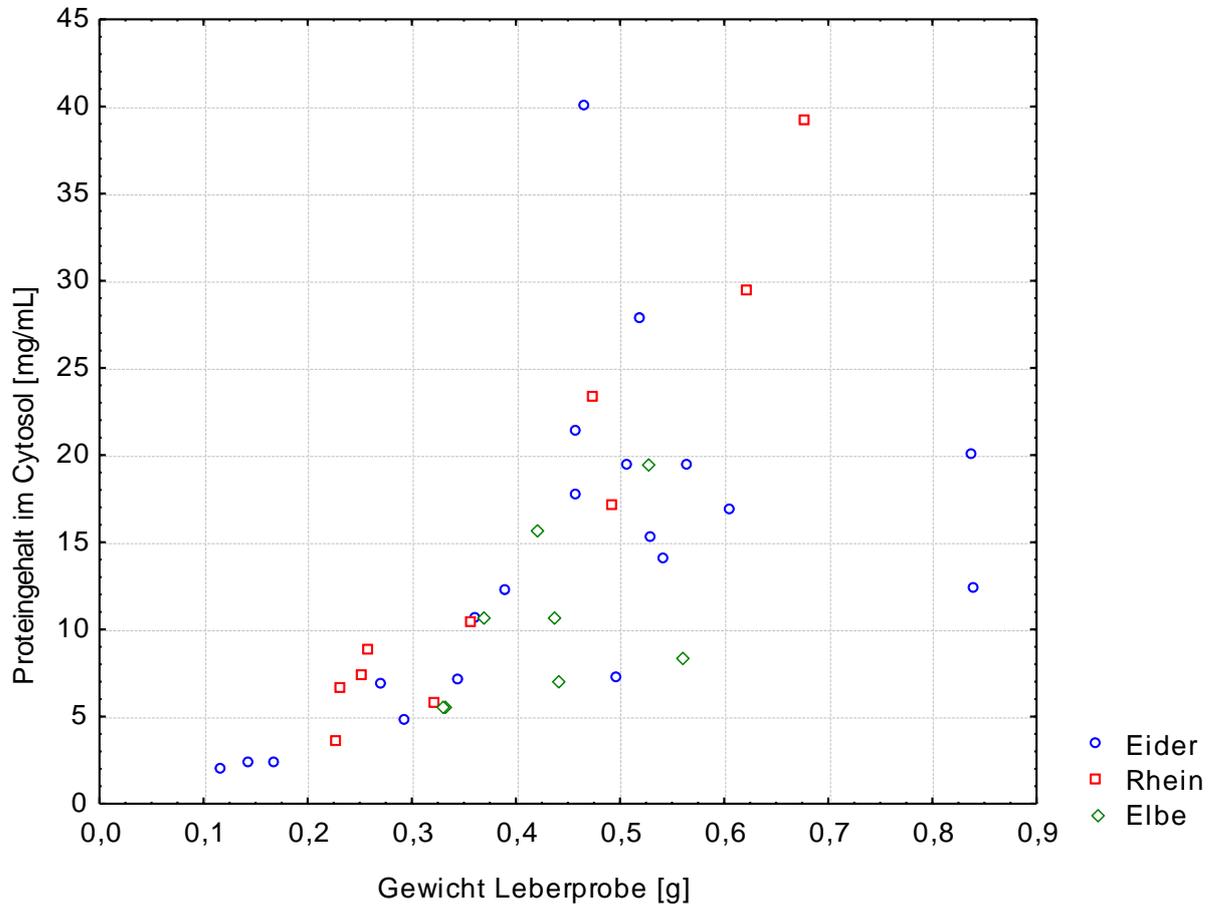


Abbildung 14: Proteingehalt im Cytosol bezogen auf das Gewicht der Leberprobe und den Fangort

Die Unterschiede in der Größenordnung der Proteingehalte lassen sich vor allem auf die verschiedenen Einwaagen zurückführen. Bei größerem Gewicht findet sich auch ein höherer Proteingehalt im Cytosol (Abbildung 14). Es ergibt sich ein linearer Zusammenhang mit einem R^2 von 0,4068.

3.2 Berechnung der MT-Gehalte nach Thiolbestimmung nach Ellman

Für die Berechnung der MT-Gehalte nach Ellman et al. (1961) wird die Kalibriergerade, die mit Cystein-Standards ermittelt wurde, zu Grunde gelegt. Aus den um den Blindwert

Ergebnisse

korrigierten Extinktionswerten lässt sich daher durch folgende Formel die Cystein-Konzentration in der MT-Fraktion berechnen:

$$c = \frac{A}{0,011012}$$

mit c = Cystein Konzentration $\left[\frac{\text{nmol}}{\text{mL}}\right]$; A = Extinktion bei 412 nm

Wenn vor der Thiolbestimmung nach Ellman eine Verdünnung von 1:2 angesetzt wurde, hat sich der Wert für die Konzentration um den Faktor 2 erhöht.

$$c = \frac{A}{0,011012} * 2$$

Aus den so berechneten Werten wurde nach zwei verschiedenen Ansätzen der MT-Gehalt im Cytosol bestimmt.

Die erste Berechnung erfolgt über die Stoffmenge des Cystein und legt das Verhältnis von 1 Mol MT bei 20 Mol Cystein zu Grunde (Lavradas, et al., 2014).

Die zweite Berechnung beruht auf der Annahme, dass MT zu 30 % aus Cystein besteht. Die Rechnung erfolgt in diesem Fall über die Masse Cystein, die in der MT-Fraktion detektiert wurde. Dabei wird davon ausgegangen, dass sich die 30 %, die sich darauf beziehen, dass Cystein etwa ein Drittel der Aminosäuren im MT ausmacht, auch auf die Masse des MTs übertragen lassen. In einer Aminosäure Sequenz-Analyse für MT aus der Leber des Rotaugen *Rutilus rutilus* (Grumiaux, Bulet, Salzet, Demuynck, & Dhainaut-Courtois, 1998) konnten neben Cystein (121 g/mol) auch noch die Aminosäuren Methionin (149 g/mol), Asparaginsäure (133 g/mol), Prolin (115 g/mol), Alanin (89 g/mol), Lysin (146 g/mol), Threonin (119 g/mol), Glycin (75 g/mol), Asparagin (132 g/mol), Glutamine (146 g/mol), Serin (105 g/mol) und Valin (117 g/mol) (Falk, 2003) ermittelt werden. Aromatische Aminosäuren fehlen typischerweise in MTs. Eine Berechnung über die Masse des Cystein ist also möglich, weil die anderen in MT enthaltenen Aminosäuren in ihrem Molekulargewicht (\varnothing 130 g/mol) nur 7,5 % über dem

Ergebnisse

von Cystein liegen. Über diese Berechnung lässt sich eine Näherung des tatsächlichen MT-Gehalts bestimmen.

Da die MT-Fractionen ein Volumen von 10 mL umfassten, konnte aus der Konzentration in der Fraktion die Stoffmenge Cystein in der MT-Fraktion berechnet werden, indem die Cystein Konzentration [nmol/mL] mit 10 mL multipliziert wurde.

$$n(\text{Cys}) = c * 10 \text{ mL}$$

mit $n(\text{Cys}) = \text{Stoffmenge Cystein in der MT – Fraktion [nmol]}$;

$$c = \text{Cystein Konzentration} \left[\frac{\text{nmol}}{\text{mL}} \right]$$

Aus der Stoffmenge des Cystein in der MT-Fraktion lässt sich über das Verhältnis 1 Mol MT bei 20 Mol Cystein die Stoffmengenkonzentration des MT in der MT-Fraktion bestimmen.

$$n(\text{MT}) = \frac{n(\text{Cys})}{20}$$

mit $n(\text{Cys}) = \text{Stoffmenge Cystein in der MT – Fraktion [nmol]}$;

$$n(\text{MT}) = \text{Stoffmenge MT in der MT – Fraktion [nmol]}$$

Aus der Stoffmenge MT kann anschließend über das Molekulargewicht von 6800 g/mol und dem Probenvolumen von 2 mL die MT-Konzentration im Cytosol berechnet werden:

$$c(\text{MT}) = \frac{n(\text{MT}) * 6800 \frac{\text{ng}}{\text{nmol}} * \frac{10^{-6} \text{mg}}{\text{ng}}}{2 \text{ mL}}$$

mit $c(\text{MT}) = \text{MT – Konzentration im Cytosol} \left[\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right]$;

$$n(\text{MT}) = \text{Stoffmenge MT in der MT – Fraktion [nmol]}$$

Ergebnisse

Für die Berechnung der MT-Konzentration wird zunächst aus der Stoffmenge die Konzentration des MT-Cysteins im Cytosol berechnet. Das Probenvolumen beträgt weiterhin 2 mL:

$$c(\text{Cytosol}) = \frac{n}{2 \text{ mL}}$$

mit $n = \text{Stoffmenge Cystein in der MT - Fraktion [nmol]}$;

$$c(\text{Cytosol}) = \text{Konzentration MT - Cystein im Cytosol} \left[\frac{\text{nmol}}{\text{mL}} \right]$$

Ausgehend davon, dass Cystein 30 % der Masse des MTs ausmacht wird mit Hilfe des Molargewichts von Cystein von 121,16 g/mol die MT-Konzentration im Cytosol berechnet

$$c(\text{MT}) = c(\text{Cytosol}) * 121,16 * \frac{\text{ng}}{\text{nmol}} * 10^{-3} \frac{\mu\text{g}}{\text{ng}} * \frac{100}{30}$$

$$c(\text{Cytosol}) = \text{Konzentration MT - Cystein im Cytosol} \left[\frac{\text{nmol}}{\text{mL}} \right];$$

$$c(\text{MT}) = \text{Konzentration MT im Cytosol} \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right]$$

Nun lässt sich die berechnete MT-Konzentration im Cytosol auf die gemessene Gesamt-Proteinkonzentration im Cytosol beziehen. Dabei ergeben sich für die Berechnung über die Masse des Cysteins 1,19-fach höhere Werte als die aus der Berechnung über die Stoffmengen. Insgesamt liegen die Werte aber in derselben Größenordnung (Abbildung 15).

Ergebnisse

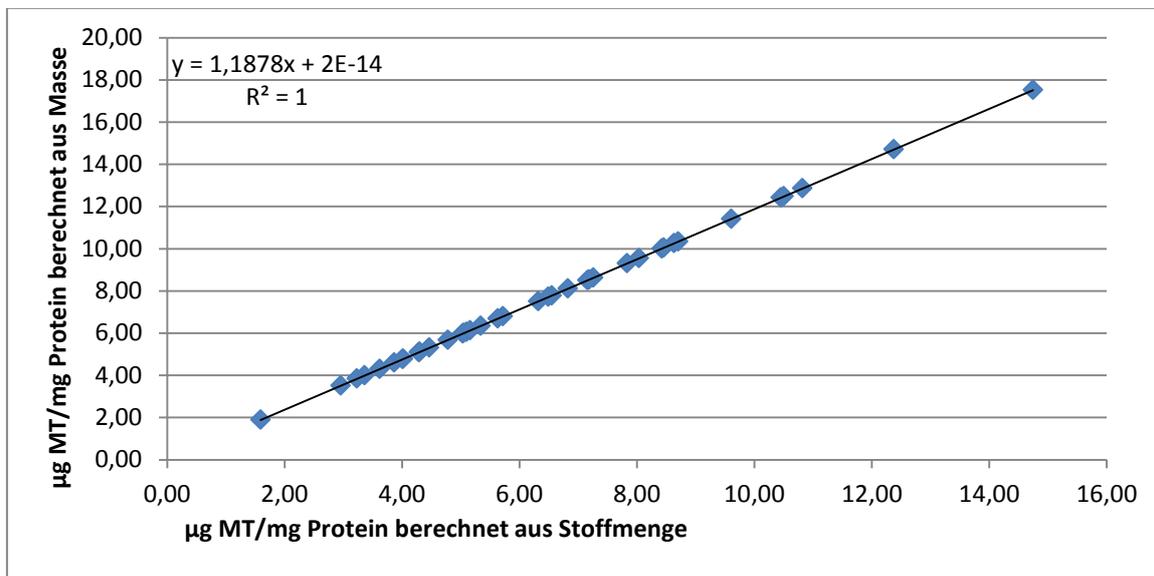


Abbildung 15: Vergleich der berechneten Metallothionein (MT)-Anteile ($\mu\text{g MT/mg Protein}$) aus Stoffmenge (x) bzw. Gewicht von Cystein (y)

In einem Vorversuch wurde die Eignung der Cystein-Messung zur Bestimmung des MT-Gehalts überprüft. Die Messung des Cystein-Gehalts zur Bestimmung der MT-Konzentration ist nur möglich, weil die MTs über die GPC von anderen Proteinen getrennt wurden. Eine charakteristische Eigenschaft der MTs ist ihre Hitzebeständigkeit (Langston, Chesman, Burt, Pope, & McEvoy, 2002). Der Vergleich zwischen Cystein-Gehalten in den einzelnen Fraktionen nach bzw. ohne Hitzebehandlung von einer Leberprobe zeigt, dass der Cysteingehalt in der Fraktion mit hohem Molekulargewicht deutlich kleiner wird, während er in der MT-Fraktion in etwa unverändert bleibt (Abbildung 16). Daraus lässt sich schließen, dass das in der MT-Fraktion messbare Cystein hauptsächlich Bestandteil von MT ist und dadurch Rückschluss auf den MT-Gehalt gibt.

Ergebnisse

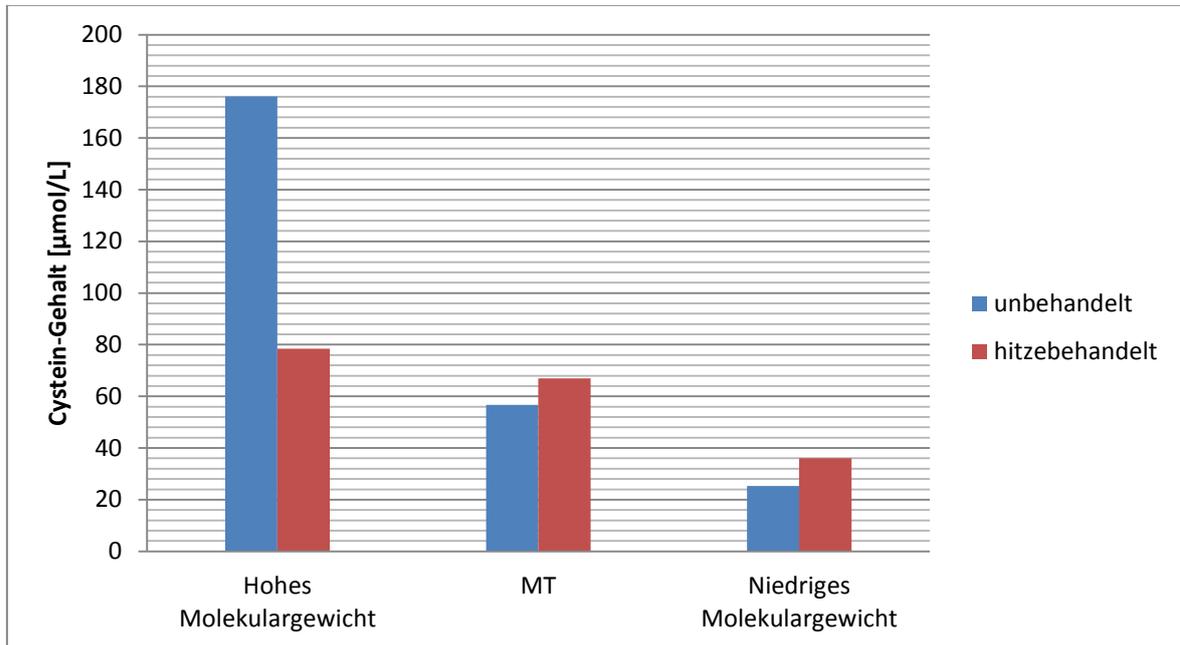


Abbildung 16: Vergleich Cystein-Gehalt mit/ohne Hitzebehandlung

3.3 Berechnung der MT-Gehalte nach Cadmium-Messung

Die MT-Gehalte wurden außerdem aus der Cadmium-Messung berechnet. Dazu wurden zunächst aus den gemessenen Werten in den verdünnten Proben die Cadmiumkonzentrationen in der MT-Fraktion berechnet. Je nach Verdünnung mussten dazu die Messwerte mit 200 bzw. 1000/6 multipliziert werden. Anschließend wurde der absolute Cadmiumgehalt in der MT-Fraktion (10 mL) bestimmt:

$$CdMT_{abs.} = c(Cd) * 10 \text{ mL}$$

mit $CdMT_{abs.}$ = Cadmium absolut in MT – Fraktion [ng];

$$c(Cd) = \text{Cadmiumkonzentration in der MT – Fraktion} \left[\frac{ng}{mL} \right]$$

Aus dem absoluten Cadmium-Gehalt in der MT-Fraktion konnte über das Molekulargewicht von Cadmium die Stoffmenge Cadmium in der MT-Fraktion berechnet werden:

$$[CdMT] = \frac{m(CdMT)}{112,41 \frac{ng}{nmol}}$$

29

Ergebnisse

mit $[CdMT]$ = Stoffmenge Cadmium in der MT – Fraktion [nmol]

$$MT_{theor.} = \frac{[CdMT]}{KCd}$$

mit $MT_{theor.}$ = Stoffmenge MT in der MT [nmol] – Fraktion; $KCd = 7$

Über das Molekülgewicht der MTs lässt sich wiederum der absolute MT-Gehalt in der MT-Fraktion berechnen:

$$MT_{abs.} = MT_{theor.} * 6800 \frac{ng}{nmol} * \frac{10^{-3} \mu g}{ng}$$

mit $MT_{abs.}$ = MT absolut in MT – Fraktion [μg]

Die MT-Konzentration im Cytosol lässt sich aufgrund des Probenvolumens von 2 mL folgendermaßen berechnen:

$$MT_{Cytosol} = \frac{MT_{abs.}}{2mL}$$

mit $MT_{Cytosol}$ = MT im Cytosol [$\frac{\mu g}{mL}$]

Die berechnete MT-Konzentration im Cytosol lässt sich analog zur Berechnung aus den Cystein-Gehalten auf die Gesamt-Proteinkonzentration im Cytosol beziehen.

Die gemessenen Extinktionswerte für die Protein-, Cystein- und Cadmiumbestimmung sind im Anhang (Kap. 7) zu finden.

3.4 Ergebnisse der Berechnungen

Für die Blankaale aus der Eider ergibt sich bei der Berechnung aus der Stoffmenge des Cysteins ein Mittelwert von 7,29 μg MT/mg Protein mit einer Standardabweichung von 2,66 μg MT/mg Protein. Bei Blankaalen aus dem Rhein ist der Mittelwert mit einer Standardabweichung von 3,25 μg MT/mg Protein bei 7,77 μg MT/mg Protein. Bei den Blankaalen aus der Elbe liegt der Mittelwert bei 5,77 μg MT/mg Protein, wobei die Standardabweichung 3,14 μg MT/mg Protein beträgt. Für Gelbaale aus der Eider liegt der

Ergebnisse

Mittelwert bei 5,12 µg MT/mg Protein mit einer Standardabweichung von 1,65 µg MT/mg Protein. Bei der Berechnung über die Masse ergeben sich 1,19-mal so hohe MT-Gehalte. Bei der Berechnung aus der Cadmiummessung ergeben sich im Mittel niedrigere MT-Gehalte. Bei Blankaalen aus der Eider liegt der Mittelwert mit einer Standardabweichung von 2,96 µg MT/mg Protein bei 5,09 µg MT/mg Protein. Für Blankaale aus dem Rhein liegt der mittlere MT-Gehalt bei 6,28 µg/mg Protein mit einer Standardabweichung von 4,11 µg/mg Protein. Mit einer Standardabweichung von 2,5 µg MT/mg Protein liegt der mittlere MT-Gehalt bei Blankaalen aus der Elbe bei 4,5 µg/mg Protein. Bei Gelbaalen aus der Eider ergibt sich ein Mittelwert von 3,44 µg MT/mg Protein (Tabelle 6).

Ergebnisse

Tabelle 5: Ergebnisse der Berechnungen für Metallothionein (MT)-Gehalte, mit entsprechender Probennummer, Fangort, Reifestatus (B(lank);G(elt)) und Proteingehalt; n: Stoffmenge, m: Masse

| Probennummer | Fangort | Reifestatus G/B | Proteingehalt [mg/mL] | µg MT/mg Protein (aus n Cystein) | µg MT/mg Protein (aus m Cystein) | µg MT/mg Protein (aus Cd-Messung) |
|--------------|---------|-----------------|-----------------------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| 1387 | Eider | B | 7,16 | 7,16 | 8,50 | 12,27 |
| 1389 | Eider | B | 40,01 | 1,59 | 1,89 | 1,44 |
| 1393 | Eider | B | 20,01 | 10,45 | 12,42 | 4,19 |
| 1410 | Eider | B | 16,80 | 6,82 | 8,11 | 3,86 |
| 1734 | Eider | B | 21,33 | 5,10 | 6,06 | 4,89 |
| 1735 | Eider | B | 27,78 | 6,55 | 7,78 | 5,10 |
| 1736 | Eider | B | 12,36 | 10,82 | 12,85 | 7,37 |
| 1737 | Eider | B | 17,75 | 8,42 | 10,01 | 3,11 |
| 1738 | Eider | B | 19,36 | 7,26 | 8,62 | 3,46 |
| 1739 | Eider | B | 19,36 | 8,71 | 10,34 | 5,21 |
| 1396 | Eider | G | 12,21 | 3,87 | 4,59 | 1,11 |
| 1401 | Eider | G | 7,04 | 7,19 | 8,54 | 2,25 |
| 1402 | Eider | G | 14,02 | 5,72 | 6,80 | 5,55 |
| 1404 | Eider | G | 15,30 | 3,36 | 3,99 | 2,63 |
| 1405 | Eider | G | 6,82 | 3,23 | 3,84 | 2,00 |
| 1418 | Eider | G | 2,31 | 5,03 | 5,98 | 2,36 |
| 1419 | Eider | G | 10,59 | 4,47 | 5,30 | 1,63 |
| 1432 | Eider | G | 1,91 | 8,04 | 9,55 | 3,80 |
| 1436 | Eider | G | 2,31 | 6,32 | 7,51 | 4,60 |
| 1440 | Eider | G | 4,78 | 4,02 | 4,77 | 8,52 |
| 1466 | Rhein | B | 7,38 | 10,50 | 12,48 | 9,51 |
| 1468 | Rhein | B | 23,29 | 5,05 | 6,00 | 4,69 |
| 1469 | Rhein | B | 6,60 | 9,61 | 11,41 | 3,05 |
| 1473 | Rhein | B | 8,76 | 8,64 | 10,26 | 6,84 |
| 1476 | Rhein | B | 3,59 | 7,83 | 9,30 | 9,85 |
| 1477 | Rhein | B | 5,76 | 14,75 | 17,52 | 15,30 |
| 1478 | Rhein | B | 39,10 | 6,49 | 7,71 | 3,56 |
| 1485 | Rhein | B | 17,06 | 5,63 | 6,69 | 3,93 |
| 1486 | Rhein | B | 10,38 | 5,16 | 6,13 | 3,26 |
| 1491 | Rhein | B | 29,44 | 4,01 | 4,76 | 2,83 |
| 2013 | Elbe | B | 10,72 | 3,62 | 4,30 | 2,54 |
| 2015 | Elbe | B | 8,39 | 8,46 | 10,05 | 6,13 |
| 2025 | Elbe | B | 15,79 | 2,96 | 3,51 | 2,70 |
| 2031 | Elbe | B | 19,55 | 4,78 | 5,68 | 2,09 |
| 2039 | Elbe | B | 10,79 | 5,34 | 6,34 | 3,53 |
| 2040 | Elbe | B | 5,65 | 4,30 | 5,11 | 5,73 |
| 2042 | Elbe | B | 5,65 | 12,38 | 14,70 | 9,43 |
| 2044 | Elbe | B | 7,10 | 4,29 | 5,09 | 3,81 |

Ergebnisse

Tabelle 6: Mittelwerte und Standardabweichungen verschiedener Berechnungen für Metallothionein (MT)-Gehalte, bezogen auf Fangort und Reifestatus G(elb);B(lank)

| Fangort & Reifestatus | Berechnungsgrundlage | Mittelwert µgMT/mgProtein | Standardabweichung µgMT/mgProtein |
|----------------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|--|
| Eider B | <i>Stoffmenge Cystein</i> | 7,29 | 2,66 |
| | <i>Gewicht Cystein</i> | 8,66 | 3,16 |
| | <i>Cd-Messung</i> | 5,09 | 2,96 |
| Eider G | <i>Stoffmenge Cystein</i> | 5,12 | 1,65 |
| | <i>Gewicht Cystein</i> | 6,09 | 1,96 |
| | <i>Cd-Messung</i> | 3,44 | 2,25 |
| Rhein B | <i>Stoffmenge Cystein</i> | 7,77 | 3,25 |
| | <i>Gewicht Cystein</i> | 9,23 | 3,86 |
| | <i>Cd-Messung</i> | 6,28 | 4,11 |
| Elbe B | <i>Stoffmenge Cystein</i> | 5,77 | 3,1 |
| | <i>Gewicht Cystein</i> | 6,85 | 3,7 |
| | <i>Cd-Messung</i> | 4,50 | 2,5 |

Die aus der Cadmium-Messung berechneten MT-Gehalte zeigen keine statistisch signifikanten Unterschiede bei Blankaalen aus Eider, Rhein und Elbe ($p > 0,05$). Es ist aber die Tendenz zu erkennen, dass die MT-Gehalte in den Aalen aus dem Rhein höher sind als die der Aale aus Eider und Elbe (Abbildung 17). Ebenfalls nicht statistisch signifikant unterscheiden sich die MT-Gehalte von Blank- und Gelbaalen aus der Eider, die aus der Cadmium-Messung berechnet wurden ($p > 0,05$) (Abbildung 18). In der Tendenz scheinen aber die MT-Gehalte der Gelbaale höher zu sein als die der Blankaale.

Ergebnisse

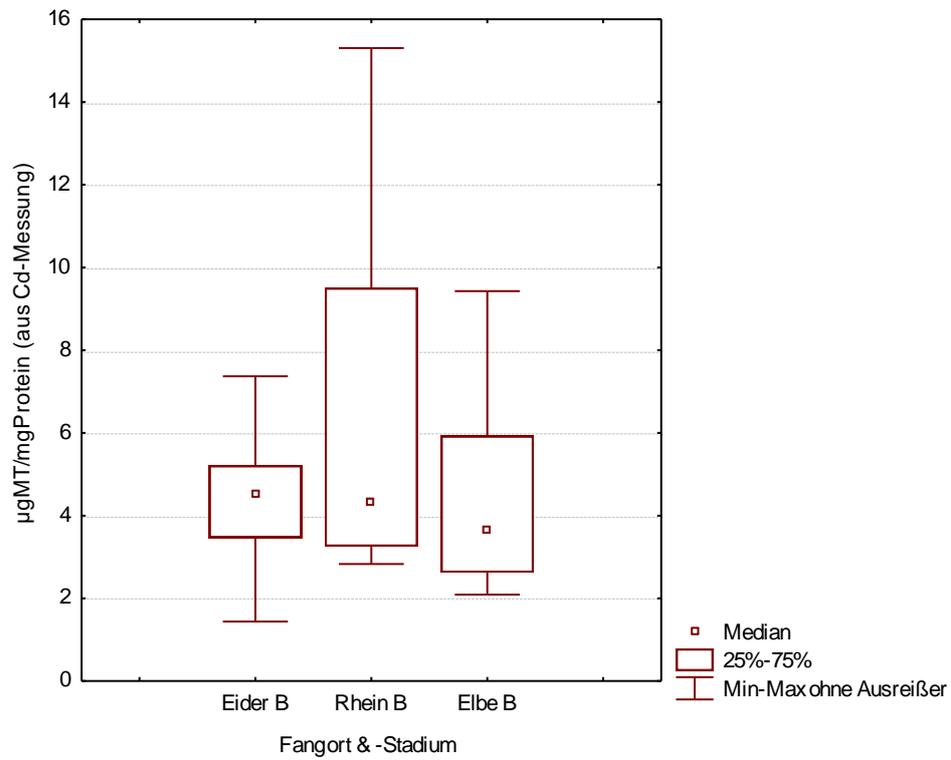


Abbildung 17: Box-Whiskers-Plot; Metallothionein (MT)-Gehalte in Blank(B)-Aalen aus Eider, Rhein und Elbe, berechnet aus Werten der Cadmium (Cd)-Messung

Ergebnisse

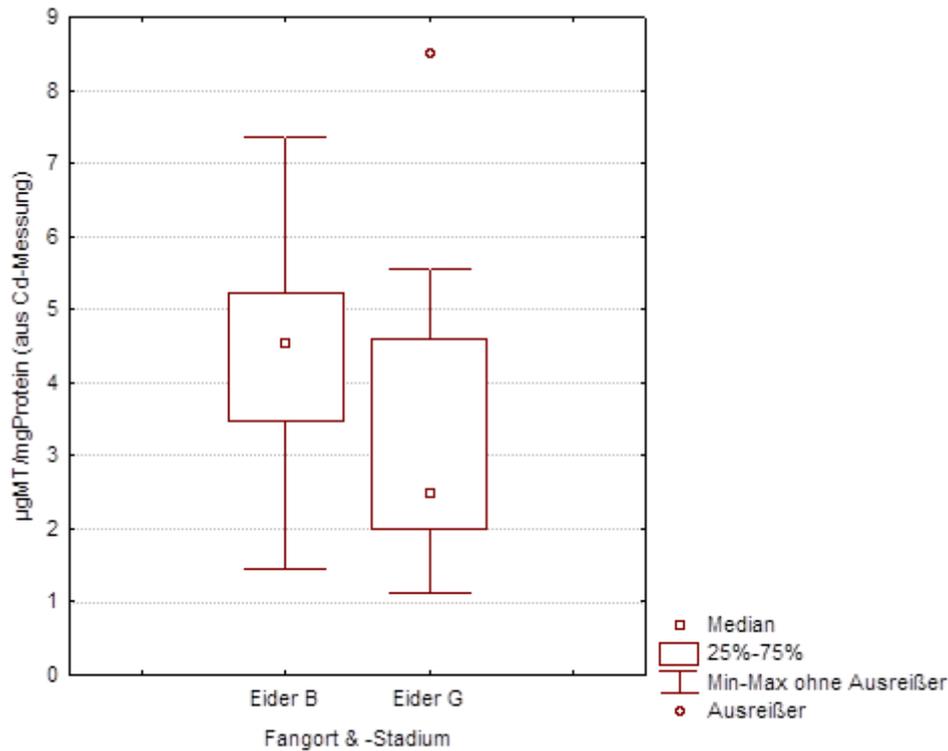


Abbildung 18: Box-Whiskers-Plot: Metallothionein (MT)-Gehalte in Blank (B)- und Gelb (G)-Aalen aus der Eider, berechnet aus Werten der Cadmium (Cd) Messung

Im Folgenden werden für die aus der Cystein-Messung berechneten MT-Gehalte, die Werte betrachtet, die über das Verhältnis 1 mol MT bei 20 mol Cystein berechnet wurden. Die Annahme dieses Verhältnisses konnte bereits zur quantitativen Bestimmung von MT genutzt werden (Hauser-Davis, et al., 2014; Tenório-Daussat, et al., 2014) und setzt weniger Annahmen voraus als die Bestimmung über die Masse des Cysteins. Bei der Berechnung der MT-Gehalte aus der Cystein-Messung ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Blankaaalen aus Eider, Rhein und Elbe ($p > 0,05$). Dennoch ist analog zu Berechnung aus der Cysteinmessung die Tendenz zu erkennen, dass die MT-Gehalte in Aalen aus dem Rhein höher sind als die der Aale aus Eider und Elbe. Die MT-Gehalte der Blank- und Gelbaale aus der Eider unterscheiden sich statistisch signifikant ($p < 0,05$).

Die Betrachtung der MT-Gehalte unter Einbezug der Reifestadien geschieht auf Grundlage der Cystein-Messung, weil bei den Werten, die aus der Cystein-Messung bestimmt wurden, ein signifikanter Unterschied zwischen Blank- und Gelbaalen aus der

Ergebnisse

Eider festgestellt wurde. Der nach Durif et al. (2005) ermittelte Silvering Index (SI) soll wie die Einordnung nach Gelb- und Blankaal eine Aussage über den Reifegrad des Aals machen. Während die Stadien 1 und 2 der stationären Phase zugeordnet werden, handelt es sich bei den Stadien 4 und 5 um die mobile, abwandernde Phase. Stadium 3 ist die Übergangsphase. Nicht immer stimmt die Einordnung des optischen Eindrucks mit dem berechneten Stadium überein. So fällt auf, dass die Aale aus der Elbe zwar optisch als Blankaal bestimmt wurden, ihr Stadium nach Durif aber 2 bzw. 3 ist. Bezogen auf den SI lassen sich die Blankaale aus der Elbe besser mit den Gelb- als den Blankaalen aus der Eider vergleichen (Abb.19). Auch bei dem Vergleich lässt sich weder nach Berechnung über Cystein- noch über Cadmium-Messung ein signifikanter Unterschied feststellen ($p > 0,05$). Dennoch ist die Tendenz zu erkennen, dass die MT-Gehalte in den Blankaalen aus der Elbe höher sind als die der Gelbaale aus der Eider.

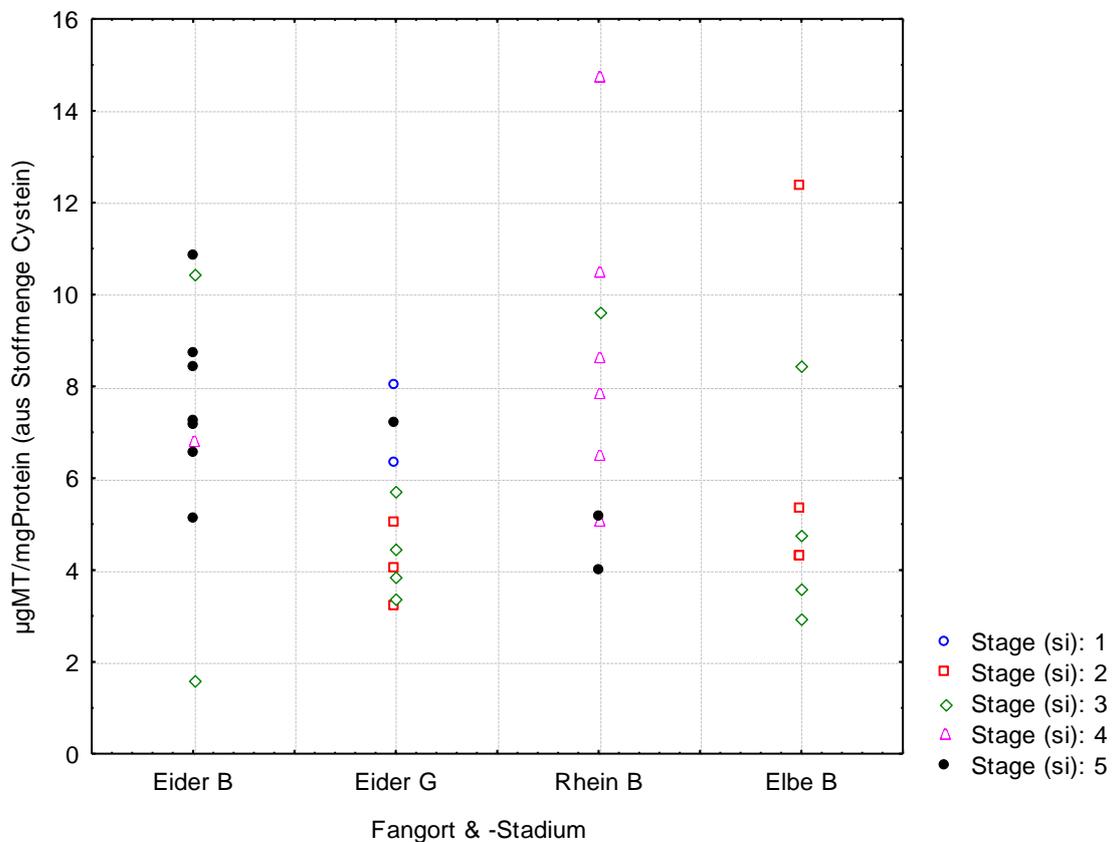


Abbildung 19: Metallothionein (MT)-Gehalte der B(lank) bzw. G(elb)-Aale aus Eider, Rhein und Elbe, berechnet aus Werten der Cystein-Messung in Bezug auf ihr Reifestadium (stage) entsprechend Silvering Index (si) nach Durif et al. (2005).

Ergebnisse

Besonders große Unterschiede ergeben sich bei der Berechnung aus der Cystein- bzw. Cadmiummessung bei Blank-, aber auch Gelbaalen aus der Eider. Die durch die Cadmium-Messung bestimmten MT-Gehalte in Blankaalen aus der Eider liegen deutlich unter den aus der Cystein-Messung berechneten, sodass nach der Berechnung aus der Cadmium-Konzentration kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Gelb- und Blankaalen vorliegt ($p > 0,05$). Auch für Blankaale aus Rhein und Elbe ergeben sich je nach Berechnung unterschiedliche MT-Gehalte, die sich aber nicht so deutlich unterscheiden (Abbildung 20).

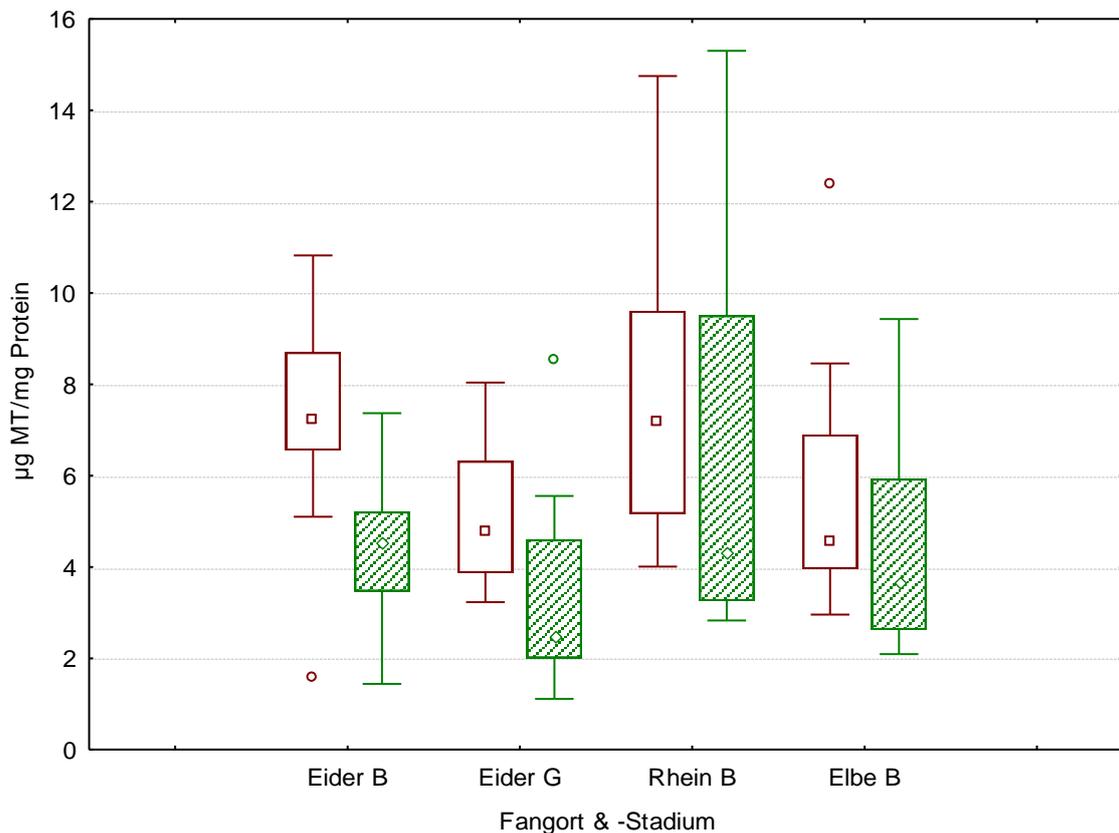


Abbildung 20: Box-Whiskers-Plot: Vergleich der Metallothionein (MT)-Gehalte in B(lank)- und G(elb)-Aalen aus Eider, Rhein und Elbe; berechnet aus Werten der Cystein-Messung (hell) bzw. der Cadmium-Messung (dunkel). Median, Box: 25%-75%, Whiskers: Minimum/Maximum ohne Ausreißer

4. Diskussion

4.1 Metallothionein zur Umweltbewertung

Der Ansatz der Arbeit lag darin MT-Gehalte im Aal als Biomarker in der Umweltbewertung zu untersuchen. Dabei sollte der Einfluss der unterschiedlichen Flüsse (Eider, Rhein und Elbe) auf den MT-Gehalt betrachtet werden um eine Bewertung der Habitate als Lebensraum für den Aal durchzuführen. Hierbei ergibt sich die grundlegende Frage, ob MT als Biomarker in Fisch geeignet sind und die Belastung des Lebensraums reflektieren. In Laborversuchen konnte bereits ein Zusammenhang von Metall-Exposition und MT-Gehalt in Fischen nachgewiesen werden. In einer Studie wurden Aale über sieben Tage einer Kupferkonzentration von 0,2 µmol/L ausgesetzt und die Induktion von MT in Kiemen und Lebern untersucht (Oliveira, Serafim, Bebianno, Pacheco, & Santos, 2008). Dabei konnte eine signifikante MT-Induktion in der Leber gegenüber den Aalen, die keiner Kupfer-Belastung ausgesetzt waren, festgestellt werden. Obwohl auch in den Kiemen eine erhöhte MT-Konzentration festgestellt werden konnte, war diese statistisch nicht signifikant erhöht gegenüber der unbelasteten Kontrollgruppe (Oliveira, Serafim, Bebianno, Pacheco, & Santos, 2008). In einer anderen Studie wurden Europäischen Wolfsbarschen Kupfer-, Quecksilber- bzw. Cadmiumlösungen injiziert, sodass sich nominelle Metallkonzentrationen von 50, 100 und 250 µg/kg Nassgewicht des Fisches ergaben. Anschließend wurde der MT-Gehalt in den Lebern bestimmt, der sich bei den belasteten Fischen signifikant von den Kontrollen unterschied (Jebali, et al., 2008). In weiteren Laborversuchen konnte eine Korrelation zwischen Metall-Exposition bzw. Aufnahme über die Nahrung und MT-Gehalt in der Leber von Fischen nachgewiesen werden (Siscar, Torreblanca, der Ramo, & Solé, 2014; Atli & Canli, 2008).

In Feldversuchen wurde MT bereits als Biomarker für Schwermetallbelastung eingesetzt. So konnte z. B. in Flussbarschen *Perca fluviatillis*, aus dem Cadmium-kontaminierten Fluss Emån in Schweden, eine Beziehung zwischen Cadmiumgehalt im Gewässer und MT-Gehalt in der Leber festgestellt werden (Olsson und Haux, 1986). Es konnte außerdem in Europäischen Aalen ein Zusammenhang zwischen Schwermetall-Kontamination und MT-Gehalt in der Leber ermittelt werden, der darauf schließen lässt, dass tatsächlich Metalle den Hauptgrund für MT-Induktion ausmachen (Campenhout, et al., 2008). Die untersuchten Aale stammten bei dieser Studie aus verschiedenen stark

Diskussion

belasteten Gewässern in Flandern. Keine statistisch signifikanten Unterschiede konnten für MT-Gehalte in Aalen aus dem Fluss Ferrerías in Nordspanien erfasst werden, die in verschiedenen belasteten Gebieten gefangen wurden. Dennoch waren die MT-Gehalte in Aalen aus den stärker belasteten Gebieten höher. An den selben Probenahmestellen wurde für die Forelle *Salmo trutta* dagegen ein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt (Linde, Sanchez-Galán, Vallés-Mota, & García-Vázquez, 2001). Langston et al. (2002) stellten bei Aalen aus dem Ästuar-Gebiet der Themse eine Beziehung zwischen Metallgehalten und MT-Gehalten in der Leber fest. Außerdem fanden sie eine Jahreszeit-abhängige Korrelation von MT-Gehalten in der Leber und Metallgehalten in Sediment bzw. Wasser.

In der vorliegenden Studie konnten keine signifikanten Unterschiede in den MT-Gehalten in Blankaalen aus Eider, Rhein und Elbe ermittelt werden (Abb. 21). Dennoch sind Tendenzen erkennbar. So sind die höchsten MT-Gehalte in Aalen aus dem Rhein gemessen worden, was auf eine höhere Schwermetallbelastung der Tiere aus dem Rhein im Vergleich zu Eider und Elbe hindeuten kann.

Diskussion

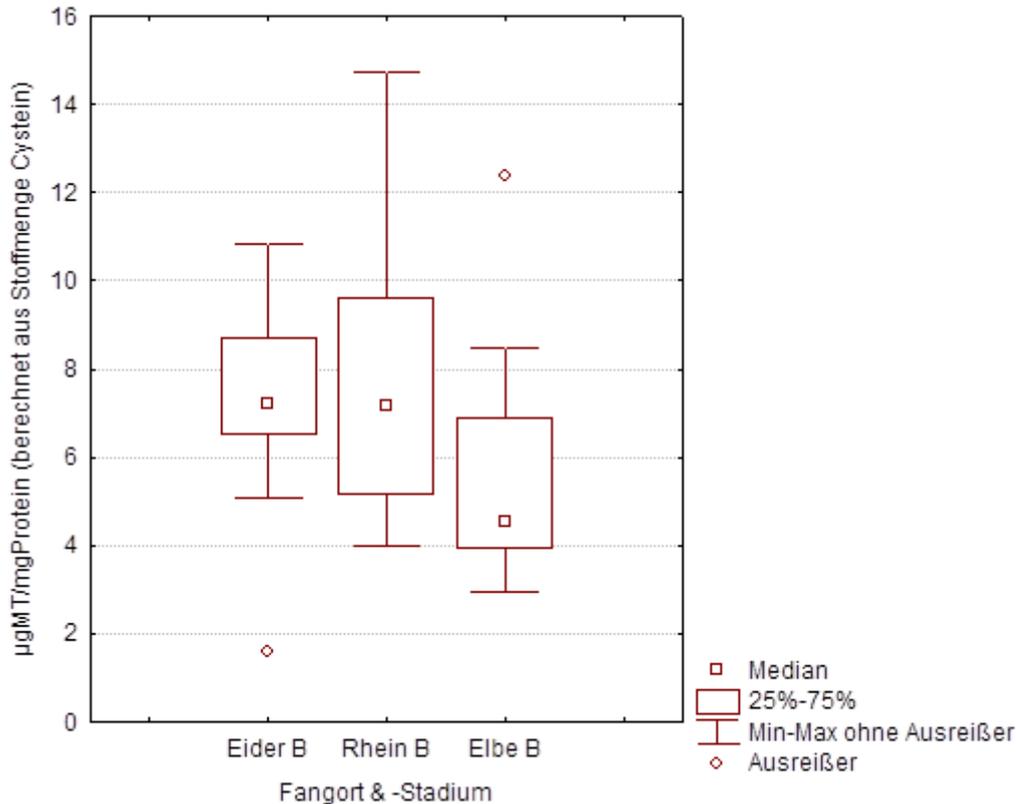


Abbildung 21: Box-Whisker-Plot von Metallothionein (MT)-Gehalten in Blank (B)-Aalen aus Eider, Rhein und Elbe, berechnet aus Werten der Cystein-Messung

Die MT-Gehalte in Blankaalen aus Eider und Elbe spiegeln vermutlich nicht die Schwermetallbelastung in den beiden Gewässern wieder. Obwohl die Eider als geringer belastet einzustufen ist als die Elbe (BfG, 2008; MLUR SH, 2009), sind die gemessenen MT-Gehalte in den Aalen aus der Elbe in der gleichen Größenordnung bzw. sogar geringer als in Fischen aus der Eider. Grund hierfür könnte der Einfluss des Entwicklungsstadiums auf die MT-Gehalte in der Leber sein. Andererseits wurden durch zwei unabhängige Methoden im Wesentlichen ähnliche Ergebnisse zur MT-Konzentration in deutschen Flüssen erzielt. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass die Effekte der Metallexposition in unterschiedlich stark belasteten Flüssen in ähnlichen MT-Gehalten resultieren. Der o. g. große Einfluss des Entwicklungsstadiums und die fehlende Signifikanz können auch darauf hindeuten, dass sich der schwermetall-induzierte Stress in den Flüssen Eider, Rhein und Elbe nicht wesentlich unterscheidet. Der nach Durif et al. (2005) ermittelte Reifestatus bei den untersuchten Blankaalen aus der Eider lag bei 3 bis

Diskussion

5. Der Großteil der Blankaale befindet sich also in seiner abwandernden, mobilen Phase. Für die Blankaale aus der Elbe hat die Berechnung die Stadien 2 und 3 ergeben. Stadium 2 wird der stationären und Stadium 3 dem Übergang zur mobilen Phase zugeordnet. Es ist daher schwierig tatsächlich einen Rückschluss auf die Schwermetallbelastung in den beiden Flüssen zu treffen, da ein Einfluss der Reifung auf den MT-Gehalt wahrscheinlich ist. Da diese Einflussgröße auf MT vor Beginn der Studie vermutet wurde, wurden für den Vergleich der Flüsse ausschließlich Blankaale ausgewählt. Diese Einteilung erfolgte optisch bei den Probenahmen. Später wurde der Reifegrad nach Durif et al. (2005) bestimmt. Diese Berechnung des Reifegrads zeigte zum Teil andere Ergebnisse als die optische Einteilung. Bezogen auf die nach Durif et al. (2005) ermittelten Reifegrade bietet sich ein Vergleich zwischen Gelbaalen aus der Eider, die hauptsächlich den Stadien 1 bis 3 zugeordnet werden, mit den Blankaalen aus der Elbe an. Dabei gibt zwar unabhängig von der Methode keinen statistisch signifikanten Unterschied, zeigt aber bei beiden Messungen die Tendenz von höheren MT-Gehalten in den Aalen aus der Elbe (Abbildung 20). Deutlicher ist diese Tendenz bei der Berechnung aus der Cadmium-Messung. Im Rahmen dieser Studie ist es schwierig, die ermittelten MT-Gehalte zur Umweltbewertung zu nutzen. Die Werte geben nicht ausreichend Rückschluss darauf, inwiefern der jeweilige Fluss bezogen auf seine Schwermetallbelastung für Besatzmaßnahmen geeignet sein kann. Die MT-Gehalte unterscheiden sich bezogen auf den Fangort nicht signifikant und es treten hohe Standardabweichungen auf. Weitere Untersuchungen sind nötig, um eine qualifizierte Aussage zur Umweltbewertung treffen zu können.

Im Rahmen der WRRL werden Schwermetallmessungen durchgeführt um den chemischen Zustand der Gewässer zu bewerten. Allerdings ist innerhalb der Europäischen Union nicht geklärt, ob Schwermetalle in der filtrierten Wasser- oder Feststoffphase zu messen sind (NLWKN). In Deutschland wird die Feststoffphase untersucht, allerdings besteht kein Einvernehmen darüber, ob Ergebnisse aus der Schwebstoff bzw. Sedimentmessung in die Monitoringprogramme zu übernehmen sind (NLWKN). Aus reinen Messungen der Schwermetallgehalte ist noch kein Rückschluss auf die Bioverfügbarkeit der Metalle für Aale möglich. Innerhalb der WRRL wird die Fischfauna lediglich zur Bewertung des ökologischen Zustandes betrachtet (TMLNU, 2008), nicht untersucht werden Auswirkungen von Schadstoffen auf die Fische. Zur Umweltbewertung bezüglich Besatzmaßnahmen des Aals ist also neben den Daten auf

Diskussion

Grundlage der WRRL auch eine Betrachtung der Auswirkungen von Schadstoffbelastung auf den Aal wichtig.

4.2 Vergleich der MT-Gehalte in Gelb- und Blankaalen

In der vorliegenden Arbeit wurden außerdem die MT-Gehalte in Blank- und Gelbaalen aus der Eider verglichen, um den Einfluss des Reifestadiums auf den MT-Gehalt in der Leber zu untersuchen. In anderen Veröffentlichungen lässt sich so ein Vergleich nicht finden. Campenhout et al. (2008) wählten für ihre Studie ausschließlich Gelbaale, während Langston et al. (2002) keinen Unterschied zwischen den verschiedenen Reifestadien machten. Bei dem Vergleich der MT-Gehalte in Gelb- und Blankaalen aus der Eider lässt sich nach Berechnung aus der Cystein-Messung ein statistisch signifikant niedriger MT-Gehalt in den Gelbaalen im Vergleich zu den Blankaalen feststellen (Abbildung 22) ($P < 0,05$). Bei der Berechnung aus der Cadmium-Messung ist der Unterschied nicht statistisch signifikant, allerdings liegen die MT-Gehalte der Gelbaale in der Tendenz unter denen der Blankaale. Der Einfluss des Reifegrades sollte daher bei der Betrachtung von MT-Gehalten in Aalen aus verschiedenen Flüssen mit betrachtet werden, ein Vergleich ist nur innerhalb der Reifestadien sinnvoll. Wenn wie bei Langston et al. (2002) kein Unterschied zwischen Blank- und Gelbaalen gemacht wird, sollte bei der Interpretation der Ergebnisse der Einfluss des Reifegrades mit betrachtet werden.

Diskussion

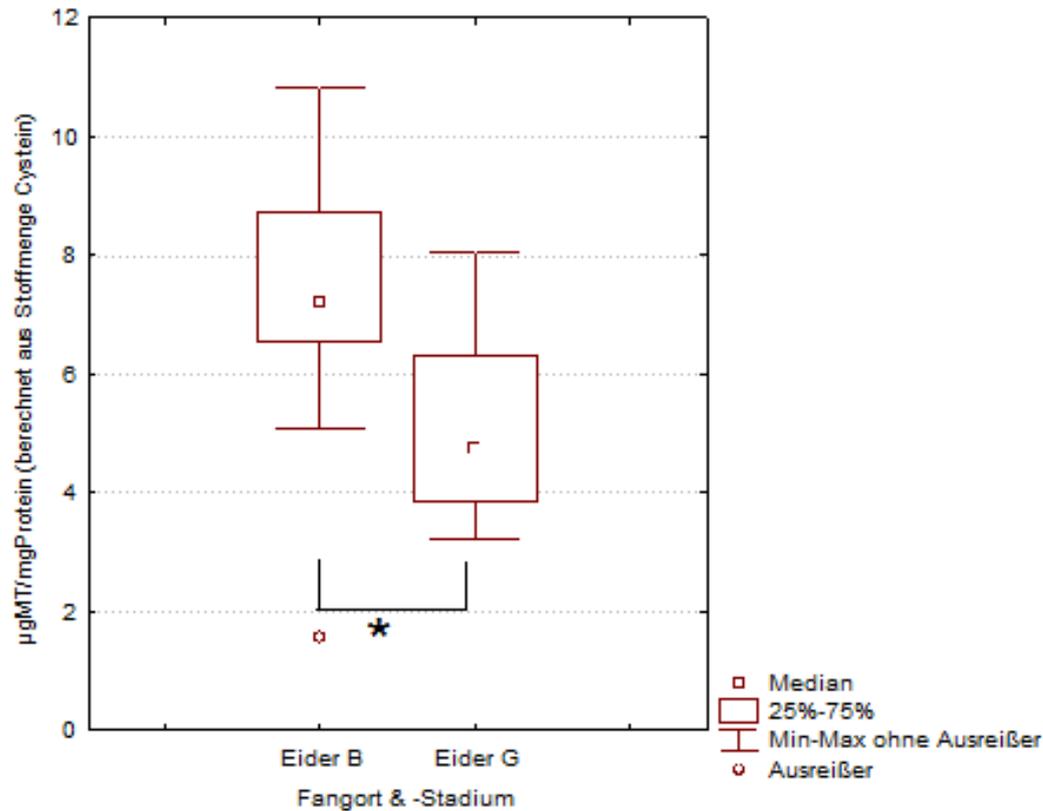


Abbildung 22: Box-Whiskers-Plot: Metallothionein (MT)-Gehalte in Blank (B)- und Gelb (G)-Aalen aus der Eider, berechnet aus Werten der Cystein-Messung; signifikanter Unterschied (*)

4.3 Methodenvergleich

Zur Berechnung der MT-Gehalte in der Leber der Aale wurden zwei unterschiedliche Methoden gewählt, deren Eignung zur Quantifizierung von MT untersucht werden sollte. Zum einen wurde aus dem Cysteingehalt, der über eine Thiolbestimmung nach Ellman et al. (1961) ermittelt wurde, die MT-Konzentration berechnet. Zum anderen wurde eine Cadmium-Sättigung durchgeführt, die Cadmium-Konzentration mittels AAS bestimmt und daraus der MT-Gehalt berechnet. Diese beiden Methoden beruhen auf unterschiedlichen Prinzipien und Charakteristika der MTs (Metallbindung bzw. Cysteingehalt). Es ist daher naheliegend, dass die Methoden keine identischen Ergebnisse liefern. Dennoch ist der ermittelte MT-Gehalt quantitativ relativ ähnlich und die Ergebnisse beider Methoden korrelieren, wenn auch mit deutlicher Streuung (Abbildung 23).

Diskussion

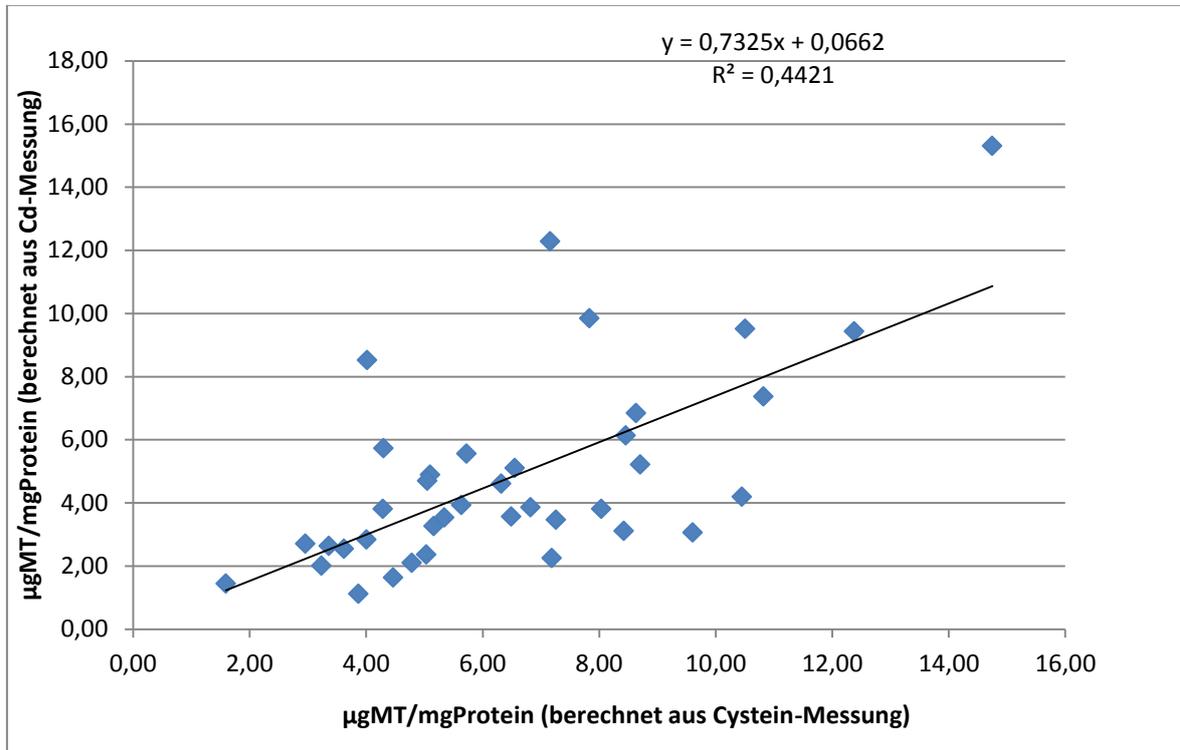


Abbildung 23: Vergleich von Metallothionein (MT)-Gehalten, berechnet aus Cadmium (Cd)- bzw. Cystein-Messung

Aufgrund der erhöhten Bindungsaffinität von Kupfer im Vergleich zu Cadmium (Langston, Chesman, Burt, Pope, & McEvoy, 2002) an MT muss Cadmium im Überschuss vorhanden sein, um möglichst alle Bindungsstellen zu besetzen. Bei Proben, in denen sehr hohe MT-Gehalte zu finden sind, sind eventuell nicht alle Bindungsstellen durch Cadmium besetzt, sodass es zu einem Unterbefund kommt. Bei Nicht-Berücksichtigung der MT-Gehalte, bei denen über die Cysteinmessung Werte von mehr als 110 µg/mL Cytosol berechnet wurden, verbessert sich die Korrelation von MT-Gehalten aus den verschiedenen Berechnungen (Abbildung 24).

Diskussion

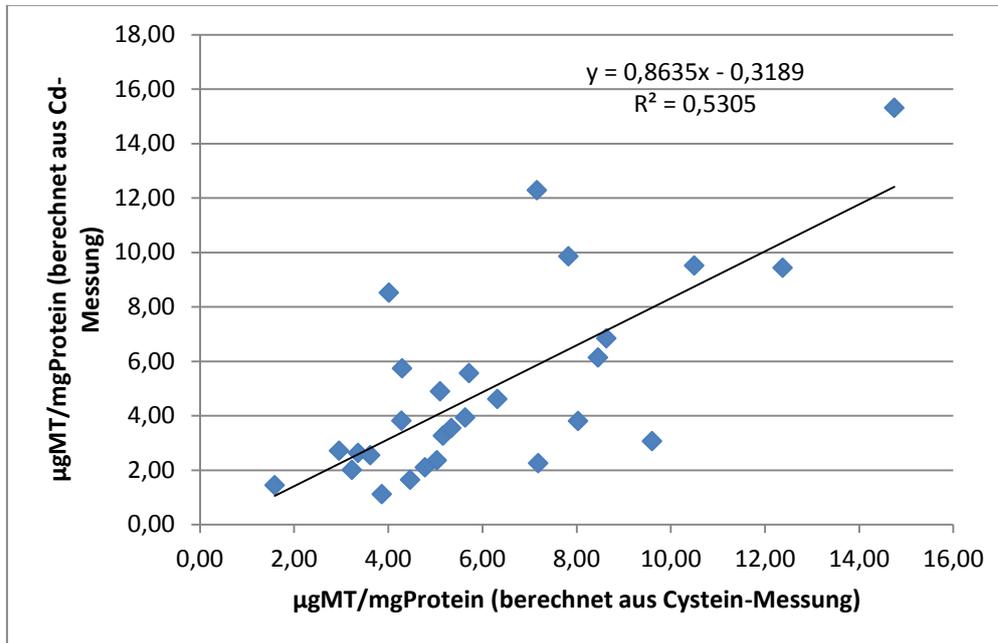


Abbildung 24: Vergleich von Metallothionein (MT)-Gehalten, berechnet aus Cadmium (Cd)- bzw. Cystein-Messung unter Ausschluss besonders hoher MT-Gehalte (>110 µg/mL im Cytosol, berechnet aus Cystein-Messung)

Im niedrigeren Konzentrationsbereich ist die Berechnung über die Cystein-Konzentration weniger sensitiv. Bei Gelbaalen aus der Eider liegen die gemessenen Extinktionswerte teilweise unter dem niedrigsten Standard der Kalibration, in diesem Bereich ist der lineare Zusammenhang zwischen Extinktion und Cystein-Gehalt nicht sicher gegeben. Es war aus technischen Gründen nicht möglich, die Proben in höheren Konzentrationen einzusetzen, sodass die Messwerte in den Bereich der Kalibrierung fielen. Zur Ermittlung von MT-Konzentrationen von weniger als 1,5 µmol/L, erscheint daher die Cadmiumsättigung besser geeignet.

Besonders auffällig sind die Abweichungen zwischen beiden Methoden bei der Berechnung der MT-Gehalte in Blankaalen aus der Eider. Bei diesen Proben waren die Einwaagen relativ groß (0,458 g – 0,840 g), während die Zugabe von CdCl₂-Lösung nicht auf mehr als 800 µL erhöht wurde. Die Cadmiumkonzentration war in diesen Proben möglicherweise zu gering um die gesamten MT-gebundenen Metalle zu verdrängen und es kommt zu einer Unterschätzung des MT-Gehalts aufgrund einer unvollständigen Cadmiumsättigung.

Diskussion

Bei Blankaalen aus Elbe und Rhein waren die MT-Gehalte in einer Größenordnung, in der sie sowohl durch die Cadmiumsättigung als auch über die Cystein-Konzentration berechnet werden konnten (Abbildung 25).

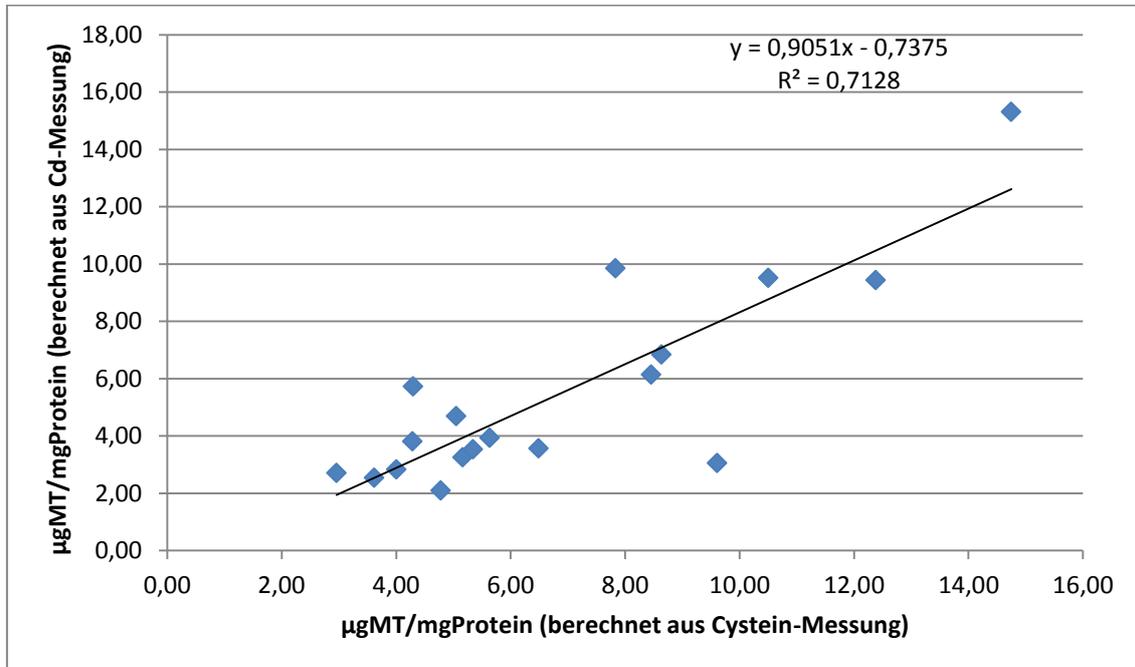


Abbildung 25: Metallothionein (MT)-Gehalte in Blankaalen in Elbe und Rhein, berechnet aus Cystein- bzw. Cadmium (Cd)-Messung

Beide Methoden sind also zur Bestimmung von MT-Gehalten geeignet, allerdings ist die Thiolbestimmung nach Ellman et al. (1961) in niedrigen Konzentrationsbereichen wenig sensitiv und daher schwer anwendbar. Denkbar wäre der Ansatz eines größeren Probenvolumens, sodass die MT-Konzentration erhöht wird.

In den Bereichen, in denen die Cystein-Messung verlässliche Werte liefert, kann diese bevorzugt werden. Bei der Thiolbestimmung nach Ellman et al. (1961) handelt es sich um eine relativ leicht durchzuführende und günstige Methode, für die ein Photometer zur Analyse ausreicht. Die MT-Bestimmung über die Cystein-Messung ist also im Vergleich zur Methode der Cadmiumsättigung deutlich einfacher durchzuführen als die über Cadmiumsättigung. Außerdem muss für die Cystein-Messung nicht die Metall-Komposition im MT verändert werden, sodass bei Bedarf (z. B. sehr hohe MT-Gehalte) die verschiedenen MT-gebundenen Metalle analysiert werden können.

4.4 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Bachelor-Arbeit wurden erste Daten zur Umweltbewertung der Flüsse Eider, Rhein und Elbe auf Basis des Biomarkers MT im Aal ermittelt. Um die sich andeutenden Tendenzen zu bekräftigen oder zu widerlegen sind weitere Untersuchungen nötig.

Bei der Auswahl der Aale für weitere Untersuchungen des MT-Gehalts sollte darauf geachtet werden, dass sie neben der Einteilung in Blank- und Gelbaal auch den gleichen Reifestatus nach Durif et al. (2005) aufweisen, bzw. entweder den stationären (1;2) oder den abwandernden (4;5) Phasen zuzuordnen sind. Dadurch werden entwicklungsbedingte Schwankungen im MT-Gehalt minimiert. Außerdem sollte eine größere Anzahl an Aalen (>15) aus allen Flüssen untersucht werden, da die biologischen Schwankungen des MT-Gehalts hoch sind.

Neben der Messung der MT-Gehalte, z. B. mit Cystein-Bestimmung nach Ellman et al. (1961), sollten auch die Metallgehalte in den Lebern und in der MT-Fraktion gemessen werden. Langston et al. (2002) detektierten MT-gebundenes Zink, Kupfer, Cadmium und Silber, deren Gehalte mit MT-Gehalten korrelierten. Eine Untersuchung der Metallgehalte kann außerdem Hinweise auf das Induktionspotential der einzelnen Metalle auf MT-Produktion geben.

Des Weiteren wäre eine parallele Untersuchung von Sedimenten und Wasserphase in den betreffenden Flussgebieten sinnvoll. Besonders bei der Betrachtung von stationären Gelbaalen kann die Untersuchung der Sedimente und Wasserphase auf ihren Schwermetallgehalt in Verbindung mit MT-Gehalten einen Rückschluss auf die Bioverfügbarkeit der Metalle für den Aal geben.

Wenn bei weiteren Untersuchungen der Zusammenhang zwischen MT-Gehalt und Schwermetallbelastung in Flüssen nachgewiesen werden kann, wäre es in einem weiteren Schritt sinnvoll den Einfluss von erhöhten MT- bzw. Metallgehalten auf den allgemeinen Zustand und besonders auf Fitness und Reproduktion der Tiere zu untersuchen.

5. Zusammenfassung

In dieser Bachelorarbeit wurde der Metallothionein (MT)-Gehalt in der Leber des Europäischen Aals *Anguilla anguilla* untersucht. Dafür wurden MT-Gehalte in den Lebern von Blankaalen aus Rhein, Elbe und Eider, sowie Gelbaalen aus der Eider bestimmt. Ziel der Arbeit war die Untersuchung der MT-Gehalte als Biomarker zur Umweltbewertung. Die Trennung der MTs von anderen Proteinen wurde mit Gel-Permeations-Chromatographie durchgeführt. Die Messung der MT-Gehalte erfolgte zum einen über eine photometrische Cystein-Bestimmung, zum anderen durch Cadmium-Messung über Atom-Absorptions-Spektrometrie nach vorangegangener Cadmium-Sättigung. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede bei MT-Gehalten der Blankaale aus Eider, Rhein und Elbe festgestellt werden ($p > 0,05$). In der Tendenz lagen die MT-Gehalte der Aale aus dem Rhein über denen aus Eider und Elbe. Der Vergleich zwischen Gelb- und Blankaalen aus der Eider zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied ($p < 0,05$), der einen bedeutenden Einfluss des Reifestatus auf den MT-Gehalt nahe legt.

Der Methodenvergleich von Cystein- und Cadmiummessung hat ergeben, dass die photometrische Cystein-Bestimmung eine geeignete Methode ist, um MT-Gehalte zu ermitteln. Es handelt sich um eine günstige und leicht umsetzbare Bestimmung, die bei MT-Konzentrationen von mehr als $1,5 \mu\text{mol/L}$ verlässliche Werte liefert. Die Untersuchung von MT-Gehalten könnte, in einem größeren Rahmen durchgeführt, einen Beitrag zur Bewertung von Bioverfügbarkeit und Einfluss von Schwermetallen auf den Aal leisten und damit dem Vergleich seiner Habitate in deutschen Flüssen dienen.

6. Literaturverzeichnis

- Arndt-Dietrich, D. I. (2002). *Gewässergütebericht 2001 Nordrhein-Westfalen Berichtszeitraum 1995-2000*. Landesumweltamt Nordrhein-Westfalen, Essen.
- Atli, G., & Canli, M. (Januar 2008). Responses of metallothionein and reduced glutathione in a freshwater fish *Oreochromis niloticus* following metal exposures. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 25(1), S. 33-38.
- Bundesanstalt für Gewässerkunde (BfG). (2008). *WSV-Sedimentmanagement Tideelbe - Strategien und Potentiale - eine Systemstudie. Ökologische Auswirkungen der Umlagerung von Wedeler Baggergut. Untersuchung im Auftrag des Wasser- und Schifffahrtsamtes Cuxhafen. Bundesanstalt für Gewässerkunde*.
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*(72), S. 248-254.
- Campenhout, K. V., Infante, H. G., Goemans, G., Belpaire, C., Adams, F., Blust, R., & Bervoets, L. (15. Mai 2008). A field survey of metal binding to metallothionein and other cytosolic ligands in liver of eels using an on-line isotope dilution method in combination with size exclusion (SE) high pressure liquid chromatography (HPLC). *Science of The Total Environment*(2-3), S. 379-389.
- Costa, P., Repolho, T., Caeiro, S., Diniz, M., Moura, I., & Costa, M. (September 2008). Modelling metallothionein induction in the liver of *Sparus aurata* exposed to metal-contaminated sediments. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71(1), S. 117-124.
- Durif, C., Dufour, S., & Elie, P. (2005). The silvering process of *Anguilla anguilla*: a new classification from the yellow resident to the silver migrating stage. *Journal of Fish Biology*(66), S. 1025-1043.
- Ellman, G. L., Courdney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*(7), S. 88-95.
- Esteve, C., Alcaide, E., & Urena, R. (2012). The Effect of metals on condition and pathologies of European eel (*Anguilla anguilla*): In situ and laboratory experiments. *Aquatic Toxicology*(109), S. 176-184.
- Falk, J. (2003). D-Aminosäuren-substituierte Peptidepitope induzieren T-Zell-Toleranz in vivo. Berlin.
- Freese, M. (2012). Unser Aal - ein Sorgenkind. *Rute & Rolle*, S. 89-91.

Literaturverzeichnis

- Grumiaux, F., Bulet, P., Salzet, M., Demuynck, S., & Dhainaut-Courtois, N. (1998). Isolation and structural characterization of hepatic metallothionein from the roach (*Rutilus rutilus* L.). (K. A. Publishers, Hrsg.) *Fish Physiology and Biochemistry*(19), S. 279-286.
- Hauser-Davis, R. A., Bastos, F. F., Tuton, B., Chávez Rocha, R., Saint' Pierre, T., Ziolli, R. L., & Arruda, M. A. (2014). Bile and liver metallothionein behavior in copper-exposed fish. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*(28), S. 70-74.
- International Union für Conservation of Nature (IUCN) Freyhof, Jörg; Brooks, Emma. (2011). *European Red List of Freshwater Fishes*.
- Jebali, J., Banni, M., Gerbej, H., Boussetta, H., López-Barea, J., & Alhama, J. (2008). Metallothionein induction by Cu, Cd, and Hg in *Dicentrarchus labrax* liver: Assessment by RP-HPLC with fluorescence detection and spectrophotometry. *Marine Environmental Research*(65), S. 358-363.
- Kammann, U., Brinkmann, M., Freese, M., Pohlmann, J.-D., Stoffels, S., Hollert, H., & Hanel, R. (2013). PAH metabolites, GST and EROD in European eel (*Anguilla anguilla*) as possible indicators for eel habitat quality in German rivers. *Environ Sci Pollut Res*.
- Lacorn, M. (1999). Einfluß natürlicher und anthropogener Stressoren auf die Induktion von Metallothionein-Isoformen der Kliesche (*Limanda limanda* L.). Hamburg.
- Langston, W., Chesman, B., Burt, C., Pope, N., & McEvoy, J. (2002). Metallothionein in liver of eels *Anguilla anguilla* from the Thames Estuary: an indicator of environmental quality? *Marine Environmental Research*(53), S. 263-293.
- Lavradas, R. T., Hauser-Davis, R. A., Lavandier, R. C., Rocha, R. C., Saint' Pierre, T., Seixas, T., . . . Moreira, I. (September 2014). Metal, metallothionein and glutathione levels in blue crab (*Callinectes* sp.) specimens from southeastern Brazil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 107, S. 55-60.
- Linde, A. R., Sanchez-Galán, S., Vallés-Mota, P., & García-Vázquez, E. (2001). Metallothionein as Bioindicator of Freshwater Metal Pollution: European Eel and Brown Trout. *Ecotoxicology and Environmental Safety*(49), S. 60-63.
- Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume, Schleswig-Holstein (MLUR SH). (2009). *Bewirtschaftungsplan nach Artikel 13 der Richtlinie 2000/60/EG für die Flussgebietseinheit Eider*.
- Ministerium für Umwelt und Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen (MUNLV NRW). (2003). *Leitlinie zum Fischbesatz in Nordrhein-Westfalen Bestandsbewertung - Besatz - Erfolgskontrolle*.

Literaturverzeichnis

- Nagel, F., Wagner, C., Hanel, R., & Kammann, U. (März 2012). The silvering process of European eel (*Anguilla anguilla*) influences PAH metabolite concentrations in bile fluid: Consequences for monitoring. *Chemosphere*, 87(1), S. 91-96.
- Niedersächsischer Landesbetrieb für Wasserwirtschaft, Küsten- und Naturschutz (NLWKN). (kein Datum). *Methodik zur EG-WRRL*. Abgerufen am 03. August 2014 von http://www.nlwkn.niedersachsen.de/wasserwirtschaft/egwasserrahmenrichtlinie/oberflaechengewaesser/methodik_chemie/45588.html
- Oliveira, M., Serafim, A., Bebianno, M., Pacheco, M., & Santos, M. (2008). European Eel (*Anguilla anguilla* L.) metallothionein, endocrine, metabolic and genotoxic responses to copper exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*(70), S. 20-26.
- Olsson, P.-E., & Haux, C. (1985). Rainbow Trout Metallothionein. *Inorganica Chimica Acta*(107), S. 67-71.
- Olsson, P.-E., & Haux, C. (1986). Increased hepatic metallothionein content correlates to cadmium accumulation in environmentally exposed perch (*Perca fluviatilis*). *Aquatic Toxicology*(9), S. 231-242.
- Riener, C., Kada, G., & Gruber, H. (2002). Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*(53), S. 266-276.
- Siscar, R., Torreblanca, A., der Ramo, J., & Solé, M. (Juli 2014). Modulation of metallothionein and metal partitioning in liver and kidney of *Solea senegalensis* after long-term acclimation to two environmental temperatures. *Environmental Research*(132), S. 197-205.
- Sühring, R., Byer, J., Freese, M., Pohlmann, J.-D., Wolschke, H., Möller, A., . . . Ebinghaus, R. (2013b). Brominated flame retardants and Dechloranes in European and American eels from glass to silver life stages. *Chemosphere*.
- Sühring, R., Möller, A., Freese, M., Pohlmann, J.-D., Wolschke, H., Sturm, R., . . . Ebinghaus, R. (Januar 2013a). Brominated flame retardants and dechloranes in eels from German Rivers. *Chemosphere*, 90(1), S. 118-124.
- Tenório-Daussat, C. L., Resende, M. C., Ziollo, R., Hauser-Davis, R., Schaumloffel, D., & Saint'Pierre, T. (2014). Evaluation and standardization of different purification procedures for fish bile and liver metallothionein quantification by spectrophotometry and SDS-PAGE analyses. *Talanta*(120), S. 491-497.
- Tesch, F.-W. (1999). *Der Aal 3., neubearbeitete Auflage*. Berlin (u.a.): Parey.
- Thüringer Ministerium für Landwirtschaft, Naturschutz und Umwelt (TMLNU). (2008). *Fischfauna - Erfassung, Bewertung und Maßnahmenableitung nach Wasserrahmenrichtlinie*.

7. Anhang

7.1 Herstellung der Pufferlösungen

1) Tris-HCl Puffer (pH 9,0; 0,1 mol) für den Homogenisierungspuffer

0,4 mol/L Tris-Stammlösung

48,46 g Tris mit destilliertem (dest.) Wasser ad 1 L

0,2 mol/L HCl-Stammlösung

16,5 mL HCl (37 %) mit dest. Wasser ad 1 L

25 mL Tris-Stammlösung (0,4 mol/L) + 5 mL HCl-Stammlösung mit dest. Wasser ad 100 mL

2) Homogenisierungspuffer

| Substanz | Stoffmenge [g/mol] | Stammkonzentration | Menge |
|------------------------------|--------------------|--------------------|-------------|
| Tris-HCl Puffer (pH 9,0) | (-) | 0,1 mol | ad 50 mL |
| Phenylmethansulfonylfluoride | 174,19 | 50 mmol | 50 µL |
| Leupeptin | 426,55 | 0,6 mmol | 500 µL |
| Dithiorthreitol | 154,25 | fest | ca. 0,008 g |

3) Phosphat-Puffer

KH₂PO₄ (1/15 mol/L)

1,8146 g mit dest. Wasser ad 200 mL

Na₂HPO₄ · 2H₂O (1/15 mol/L)

11,87 g mit dest. Wasser ad 1 L

pH 8,0 für die GPC:

3,7 mL KH₂PO₄ (1/15 mol/L) + 96,3 mL Na₂HPO₄ · 2H₂O (1/15 mol/L)

pH 7,4 für die Thiolbestimmung nach Ellman et al. (1961):

19,7 mL KH₂PO₄ (1/15 mol/L) + 80,3 mL Na₂HPO₄ · 2H₂O (1/15 mol/L)

7.2 Geräteliste

- Potter S Homogenisator von B. Braun Biotech International
- Optima™ Max-XP Ultracentrifuge von Beckman Coulter
- Gel-Permeations-Chromatographie-Anlage bestehend aus
 - Stepdos 03 S Pumpe von KnF Lab
 - Sechs-Wege-Ventil mit 2 mL Probenschleife
 - Glastrennsäule von Omnifit zum selber packen
 - CHF 122SB Fraction Collector Advantec
- Mikrotiterplatten-Photometer FLUOstar OPTIMA von BMG Labtech
- Küvetten-Photometer 50 Scan UV Spectrophotometer Cary von Varian
- Atom-Absorptions-Spektrometer ContraAA 600 von Jena Analytik

7.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Tabelle 7: Messergebnisse aus der Proteinbestimmung nach Bradford

| Proben nummer | Extinktion [-] | Standardabweichung der Extinktion | Verdünnung | Proteingehalt [mg/mL] |
|---------------|----------------|-----------------------------------|------------|-----------------------|
| 1387 | 0,204 | 13,53 % | 1:100 | 7,16 |
| 1389 | 0,364 | 5,88 % | 1:100 | 40,01 |
| 1393 | 0,555 | 4,64 % | 1:100 | 20,01 |
| 1410 | 0,376 | 6,72 % | 1:100 | 16,80 |
| 1734 | 0,340 | 4,51 % | 1:100 | 21,33 |
| 1735 | 0,390 | 5,86 % | 1:100 | 27,78 |
| 1736 | 0,453 | 6,12 % | 1:100 | 12,36 |
| 1737 | 0,284 | 8,33 % | 1:100 | 17,75 |
| 1738 | 0,351 | 5,82 % | 1:100 | 19,36 |
| 1739 | 0,369 | 5,50 % | 1:100 | 19,36 |
| 1396 | 0,282 | 7,45 % | 1:100 | 12,21 |
| 1401 | 0,202 | 12,48 % | 1:100 | 7,04 |
| 1402 | 0,306 | 13,68 % | 1:100 | 14,02 |
| 1404 | 0,322 | 7,51 % | 1:100 | 15,30 |
| 1405 | 0,198 | 15,53 % | 1:100 | 6,82 |
| 1418 | 0,097 | 27,66 % | 1:100 | 2,31 |
| 1419 | 0,259 | 8,11 % | 1:100 | 10,59 |
| 1432 | 0,085 | 30,42 % | 1:100 | 1,91 |
| 1436 | 0,097 | 10,71 % | 1:100 | 2,31 |
| 1440 | 0,158 | 13,54 % | 1:100 | 4,78 |
| 1466 | 0,208 | 7,30 % | 1:100 | 7,38 |
| 1468 | 0,410 | 4,81 % | 1:100 | 23,29 |
| 1469 | 0,194 | 14,04 % | 1:100 | 6,60 |
| 1473 | 0,231 | 11,77 % | 1:100 | 8,76 |
| 1476 | 0,131 | 33,14 % | 1:100 | 3,59 |
| 1477 | 0,178 | 11,87 % | 1:100 | 5,76 |
| 1478 | 0,548 | 3,93 % | 1:100 | 39,10 |
| 1485 | 0,343 | 8,00 % | 1:100 | 17,06 |
| 1486 | 0,256 | 7,01 % | 1:100 | 10,38 |
| 1491 | 0,468 | 5,90 % | 1:100 | 29,44 |
| 2013 | 0,261 | 5,30 % | 1:100 | 10,72 |
| 2015 | 0,225 | 9,53 % | 1:100 | 8,39 |
| 2025 | 0,328 | 5,69 % | 1:100 | 15,79 |
| 2031 | 0,371 | 6,61 % | 1:100 | 19,55 |
| 2039 | 0,262 | 10,35 % | 1:100 | 10,79 |
| 2040 | 0,176 | 10,01 % | 1:100 | 5,65 |
| 2042 | 0,176 | 9,90 % | 1:100 | 5,65 |
| 2044 | 0,203 | 11,33 % | 1:100 | 7,10 |

Anhang

7.4 Cadmiummessung an der AAS

Tabelle 8: Ergebnisse aus der Cadmium-Messung mit Atom-Absorptions-Spektrometrie (AAS)

| Probennummer | Zugabe CdCl ₂ bei Sättigung [µL] | Probenvolumen AAS | Extinktion [-] | Standard-Abweichung der Extinktion | Verdünnung | Cadmium-Konzentration [pg/µL] |
|--------------|---|-------------------|----------------|------------------------------------|------------|-------------------------------|
| 1387 | 800 | 10 | 6,71 | 5,4 % | 1:200 | 2034 |
| 1389 | 800 | 10 | 8,21 | 6,1 % | 1:200 | 1332 |
| 1393 | 800 | 10 | 9,70 | 5,6 % | 1:200 | 1940 |
| 1410 | 800 | 10 | 7,50 | 5,7 % | 1:200 | 1500 |
| 1734 | 800 | 10 | 12,07 | 8,0 % | 1:200 | 2414 |
| 1735 | 800 | 10 | 16,40 | 11,7 % | 1:200 | 3280 |
| 1736 | 800 | 10 | 10,54 | 4,7 % | 1:200 | 2108 |
| 1737 | 800 | 10 | 6,38 | 6,1 % | 1:200 | 1276 |
| 1738 | 800 | 10 | 22,06 | 5,9 % | 1:200 | 1552 |
| 1739 | 800 | 10 | 11,68 | 5,0 % | 1:200 | 2336 |
| 1396 | 400 | 10 | 1,57 | 14,6 % | 1:200 | 314 |
| 1401 | 400 | 20 | 1,83 | 3,5 % | 1:200 | 366 |
| 1402 | 800 | 10 | 9,01 | 6,6 % | 1:200 | 1802 |
| 1404 | 800 | 10 | 4,65 | 6,4 % | 1:200 | 930 |
| 1405 | 400 | 20 | 1,58 | 12,6 % | 1:200 | 316 |
| 1418 | 400 | 20 | 0,63 | 15,4 % | 1:200 | 126 |
| 1419 | 400 | 20 | 2,0 | 7,9 % | 1:200 | 400 |
| 1432 | 400 | 20 | 0,84 | 16,8 % | 1:200 | 168 |
| 1436 | 400 | 20 | 1,23 | 12,3 % | 1:200 | 246 |
| 1440 | 800 | 20 | 4,71 | 8,4 % | 1:200 | 942 |
| 1466 | 800 | 10 | 8,12 | 3,6 % | 1:200 | 1624 |
| 1468 | 800 | 10 | 12,64 | 12,1 % | 1:200 | 2528 |
| 1469 | 400 | 10 | 2,33 | 10,0 % | 1:200 | 466 |
| 1473 | 800 | 10 | 6,93 | 4,9 % | 1:200 | 1386 |
| 1476 | 800 | 10 | 4,09 | 6,8 % | 1:200 | 818 |
| 1477 | 800 | 10 | 10,20 | 7,2 % | 1:200 | 2040 |
| 1478 | 800 | 10 | 16,10 | 4,1 % | 1:200 | 3220 |
| 1485 | 800 | 10 | 7,75 | 10,9 % | 1:200 | 1550 |
| 1486 | 800 | 10 | 3,91 | 4,0 % | 1:200 | 782 |
| 1491 | 800 | 10 | 9,64 | 1,1 % | 1:200 | 1928 |
| 2013 | 800 | 10 | 3,78 | 12,9 % | 6:1000 | 631 |
| 2015 | 800 | 10 | 7,14 | 4,1 % | 6:1000 | 1191 |
| 2025 | 800 | 10 | 5,92 | 0,6 % | 6:1000 | 988 |
| 2031 | 800 | 10 | 5,67 | 2,4 % | 6:1000 | 946 |
| 2039 | 800 | 10 | 5,29 | 11,7 % | 6:1000 | 883 |
| 2040 | 800 | 10 | 4,49 | 0,6 % | 6:1000 | 749 |
| 2042 | 800 | 10 | 7,39 | 4,2 % | 6:1000 | 1233 |
| 2044 | 800 | 10 | 3,75 | 8,1 % | 6:1000 | 626 |

7.5 Thiolbestimmung nach Ellman et al. (1961)

Tabelle 9: Ergebnisse der Cystein (Cys)-Bestimmung in der Metallothionein (MT)-Fraktion

| Probennummer | Verdünnung 1:2 Ja/Nein | Mittelwert der Extinktion | Standardabweichung der Extinktion | Cys-Gehalt in MT-Fraktion [$\mu\text{mol/L}$] |
|--------------|------------------------|---------------------------|-----------------------------------|---|
| 1387 | Nein | 0,332 | 3,02% | 30,15 |
| 1389 | Nein | 0,412 | 2,36% | 37,44 |
| 1393 | Ja | 0,677 | 10,39% | 123,04 |
| 1410 | Ja | 0,371 | 13,57% | 67,44 |
| 1734 | Ja | 0,352 | 6,29% | 63,99 |
| 1735 | Nein | 1,178 | 4,28% | 107,02 |
| 1736 | Ja | 0,433 | 6,60% | 78,68 |
| 1737 | Ja | 0,484 | 4,93% | 87,96 |
| 1738 | Nein | 0,911 | 3,96% | 82,69 |
| 1739 | Nein | 1,092 | 4,37% | 99,14 |
| 1396 | Nein | 0,306 | 0,82% | 27,77 |
| 1401 | Nein | 0,328 | 1,53% | 29,76 |
| 1402 | Nein | 0,520 | 1,96% | 47,18 |
| 1404 | Nein | 0,333 | 1,31% | 30,26 |
| 1405 | Nein | 0,143 | 4,01% | 12,96 |
| 1418 | Nein | 0,075 | 2,80% | 6,84 |
| 1419 | Nein | 0,306 | 4,00% | 27,82 |
| 1432 | Nein | 0,099 | 1,66% | 9,03 |
| 1436 | Nein | 0,095 | 7,59% | 8,59 |
| 1440 | Nein | 0,124 | 3,22% | 11,30 |
| 1466 | Nein | 0,502 | 5,38% | 45,60 |
| 1468 | Nein | 0,762 | 4,42% | 69,20 |
| 1469 | Nein | 0,411 | 6,77% | 37,30 |
| 1473 | Nein | 0,490 | 2,59% | 44,50 |
| 1476 | Nein | 0,182 | 4,63% | 16,54 |
| 1477 | Nein | 0,550 | 3,83% | 49,97 |
| 1478 | Ja | 0,822 | 1,65% | 149,30 |
| 1485 | Ja | 0,311 | 6,30% | 56,53 |
| 1486 | Nein | 0,347 | 10,00% | 31,52 |
| 1491 | Nein | 0,764 | 4,04% | 69,39 |
| 2013 | Ja | 0,126 | 10,38% | 22,82 |
| 2015 | Nein | 0,460 | 4,49% | 41,74 |
| 2025 | Nein | 0,303 | 6,61% | 27,47 |
| 2031 | Nein | 0,606 | 4,33% | 55,00 |
| 2039 | Nein | 0,373 | 8,26% | 33,90 |
| 2040 | Nein | 0,157 | 0,66% | 14,29 |
| 2042 | Nein | 0,453 | 5,56% | 41,14 |
| 2044 | Nein | 0,197 | 4,52% | 17,90 |