

Hochschule für Angewandte
Wissenschaften Hamburg
Hamburg University of Applied Sciences

Bachelorarbeit

zum Thema

**Etablierung eines sensitiven Zelltoxizitäts-Assays
zum Ausschließen zelltoxischer Effekte von
Sedimentproben im Multiplexformat mit
anschließendem Estrogenrezeptor-Reporter-
Assay**

von

Kristina Partus

im Studiengang **Biotechnologie**

Fakultät Life Science

an der

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg

vorgelegt am **23.11.2018**

Erstgutachter: Prof. Dr. Susanne Heise

Zweitgutachter: Prof. Dr. Oliver Ullrich

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
1 Einleitung	3
1.1 Estrogene in der Umwelt	5
1.2 Ecdyson-Agonisten in der Umwelt	8
2 Material und Methoden	13
2.1 Materialien	14
2.1.1 Geräte	14
2.1.2 Software	15
2.1.3 Medien und Kits	16
2.1.4 Substanzen	17
2.1.5 Herstellung des Kultur- und Assaymediums für VM7Luc4E2 Zellen	18
2.1.6 Herstellung des <i>Charcoal Stripped FBS</i>	19
2.1.7 Kulturmedium der CHO-K1 Zellen	20
2.1.8 Herstellung Lysepuffer	20
2.1.9 Herstellung Glow-Mix	20
2.2 Methoden	22
2.2.1 Probennahme	22
2.2.2 Kultivierung von Zellen	25
2.2.3 Einfrieren und Auftauen von CHO-K1 und VM7Luc4E2 Zellen .	26
2.2.4 Zellzählung	27
2.2.5 Aussäen der Zelllinien	27
2.2.6 Messung der Zellviabilität - der Vitalitätsassay	27
2.2.7 Zelltoxizitätstest	30
2.2.8 Messung Zelltoxischer Effekte von Porenwasser	31
2.2.9 Untersuchung hormoneller Aktivität der Sedimentproben mittels Estrogen- und Ecdyson-Rezeptor-Reporter Assays	32
3 Ergebnisse	35
3.1 Etablierung des Zelltoxizitätstests	35
3.1.1 Zelltoxizität mit Ethanol	35
3.1.2 Zelltoxizität mit Digitonin	36
3.1.3 Messung zelltoxischer Effekte von Porenwasser	44
3.2 Untersuchung hormoneller Aktivität der Sedimentproben mittels Estrogen- und Ecdyson-Rezeptor-Reporter Assays	46

4 Diskussion und Ausblick	55
4.1 Etablierung des Zelltoxizitätstests	55
4.2 Signifikanztest der Messwerte	57
4.3 Messergebnisse zelltoxischer Effekte von Porenwasser	59
4.4 ER-Reporter-Gen-Assay	60
4.4.1 Zelltoxizität im ER-Reporter-Gen-Assay	60
4.4.2 Erstellung der E2-Kalibriergerade	61
4.4.3 Messung estrogener Effekte im Porenwasser	62
4.4.4 Berechnung der Estradiol-Äquivalenzkonzentrationen	63
4.5 Messung der Ecdyson-Aktivität	63
Literatur	67

Abkürzungsverzeichnis

20E 20-Hydroxyecdysone

ad auffüllen auf

CHO Chinese hamster ovary

E1 Estron

E2 17 β -Estradiol

E3 Estriol

EcR Ecdysone receptor

EDCs Endocrine disrupting chemicals

EE2 17 α -Ethinylestradiol

EEQ Estradiol equivalency quantity

ER Estrogen receptor

ERE Estrogen responsive elements

EÄQ E2-Äquivalenzwerte

OECD Organisation for Economic Co-operation and Development

PW Porenwasser

RLU Relative light unit

WRRL Wasserrahmenrichtlinien

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematisch dargestellter Resuspensionszyklus von Sedimenten und Schwebstoffen	4
1.2	Exposition eines benthischen Organismus gegen Sedimentschadstoffe . .	5
1.3	Molekulare Strukturen natürlicher Hormone	7
1.4	Rezeptorvermittelter Wirkmechanismus estrogener Hormone	8
1.5	Strukturformel des Ecdyson und 20-Hydroxyecdyson	10
1.6	Mikroskopische Aufnahme der <i>Daphnia magna</i>	11
2.1	Mechanismus des ER-Reportergeren-Assays	21
2.2	Standorte Probennahmen	24
2.3	Prinzip des CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assays	29
2.4	Chemische Reaktion von Luciferin und Luciferase aus roten Glühwürmchen	34
3.1	Ergebnis des Zelltoxizitätstests mit Ethanol	36
3.2	Ergebnisse Inhibition mit Digitonin - Rangefinding	37
3.3	Messergebnis Inhibition mit Digitonin	37
3.4	Messergebnis der CHO-K1 Zellen nach Inhibition mit Digitonin	39
3.5	Messergebnis der VM7Luc4E2 Zellen nach Inhibition mit Digitonin . . .	39
3.6	KWKs der CHO-K1 und VM7Luc4E2 Zellen	41
3.7	KWKs der CHO-K1 Zellen mit und ohne Ausreißer	41
3.8	Messergebnis zelltoxischer Effekte mit PW	45
3.9	Messergebnis zelltoxischer Effekte mit PW 2	45
3.10	Zelltoxizität mit PW 1	47
3.11	KWK Test 1 bis 3 mit VM7Luc4E2 Zellen	48
3.12	Endokrine Effekte Probe 1	49
3.13	Zelltoxizität mit PW 2	50
3.14	E2-Kalibriergerade Probe 1	51
3.15	E2-Kalibriergerade Probe 2	52
3.16	E2-Kalibriergerade Probe 3	53
3.17	Endokrine Effekte Probe 1, 2 und 3	54
4.1	E2-Kalibriergerade S-förmiger Verlauf	62

Tabellenverzeichnis

2.1	Auflistung der verwendeten Geräte.	14
2.2	Auflistung der verwendeten Geräte.	15
2.3	Auflistung der verwendeten Kits, Medien und Lösungen.	16
2.4	Auflistung der verwendeten Substanzen	17
2.5	Substanzen zur Herstellung des <i>charcoal stripped FBS</i>	19
2.6	Substanzen zur Herstellung des Lysepuffers	20
2.7	Substanzen zur Herstellung des Glow-Mix	22
2.8	Daten zu Sedimentproben	23
2.9	Substanzen zur Herstellung des GF-AFC Puffers	29
2.10	Einstellungen Magellan-Software	30
2.11	Bezeichnung der Verdünnungen G0 bis G8.	32
2.12	Schema der Expositionslösung des PW im ER-Assay	32
2.13	Konzentrationen E2-Kalibriergerade	33
2.14	Finale E2-Konzentrationen in pM in Well	33
3.1	Bezeichnungsübersicht der Replikate bei Test 1, 2 und 3 zur Etablierung des Zelltoxizitätstests.	38
3.2	Einstellungen GraphPad Prism zur Kreierung einer KWK	40
3.3	Qualitätswerte der KWK	42
3.4	Einstellungen GraphPad Prism zur Kreierung einer KWK mit AIC-Methode	43
3.5	Qualitätswerte des Signifikanztests für VM7Luc4E2 Zellen	43
3.6	Zelltoxizität mit Porenwasser verdünnt mit Reinstwasser	46
4.1	Blindwertvergleich Test 2 und 3	58

Zusammenfassung

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Messung estrogen- und ecdysonaktiver Schadstoffe von aus Sedimenten der Elbe gewonnenem Porenwasser. Sedimente können als Schadstoffdepot und als „Gedächtnis vergangener Gewässerverschmutzungen“ angesehen werden (Zuellig 1956), da Schadstoffe sich in Abhängigkeit ihres chemischen Verhaltens an Sedimente und Schwebstoffe anlagern. Die Durchführung erfolgt mithilfe zweier Zelllinien, die mit dem Estrogen-Rezeptor (VM7Luc4E2) und dem Ecdyson-Rezeptor (CHO-K1) transfiziert sind. Zur Detektion estrogen- und ecdysoner Chemikalien in Umweltproben wird einer der empfindlichsten und in hohem Maße reagierenden Reporter-Gen-Expression-Assays, die heutzutage verfügbar sind, verwendet und soll in der Arbeitsgruppe AAT der HAW etabliert werden; es handelt sich um den Estrogen-Rezeptor (ER)/Ecdyson-Rezeptor (EcR) vermittelten chemisch aktivierten Luciferase Genexpressions-Assay (J. Legler et al. 1999). Dieser deckt alle Ergebnisse, die an der Rezeptor-Transaktivierung beteiligt sind, von der Aufnahme der Verbindung durch die Zelle bis zur Synthese von Proteinen, ab (Houtman 2007). Vor der Etablierung des ER/EcR-Reporter-Gen-Expression-Assays wird ein Zelltoxizitätstest etabliert, der für weitere Messungen unverzichtbar war. Es handelt sich um den „Lebendprotease“-Test, der dazu dient, eventuelle zelltoxische Effekte der Porenwasserproben und weitere Einschränkungen der Zellvitalität, die den ER/EcR-Reporter-Gen-Expression-Assay verfälschen würden, auszuschließen. Dieser Test wird aufgrund der nachfolgenden drei wichtigen Kriterien ausgewählt; Erstens wegen seiner hohen Sensitivität, zweitens der Möglichkeit der Durchführung im Multiplexformat, sowie der Tatsache, dass weder eine Zelllyse noch eine Luciferasemessung benötigt werden. Beide Vorgänge - eine Zelllyse sowie die Luciferasemessung - finden im ER/EcR-Assay Anwendung. Die Etablierung erfolgte zu Beginn mithilfe des CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assays der Firma Promega, im Verlauf der Entwicklung werden die Reagenzien selbst erstellt. Mit unterschiedlichen Digitonin-Konzentrationen als Positivkontrolle konnte die mittlere Hemmkonzentration (EC_{50}), eine 50%ige Inhibition der Zellaktivität, für eine Zelllinie (CHO-K1) bestimmt werden. Diese betrug $12,41 \mu\text{g/ml}$.

Die Etablierung dieses Assays zur Messung estrogen- und ecdysoner Aktivität konnte im Rahmen dieser Bachelorarbeit nicht erfolgreich abgeschlossen werden. Die Messung ecdysoner Aktivität wird in dieser Arbeit nur theoretisch behandelt. Es werden jedoch wesentliche Vorversuche durchgeführt, anhand derer wichtige Informationen für die Etablierung des Assays sowie Handlungsempfehlungen für eine Optimierung eingesetzter Methoden erarbeitet werden konnten.

Die Problemanalyse umfasst folgende Kriterien:

- Eine Gewährleistung der Zellvitalität der VM7Luc4E2 Zellen soll mindestens 80 % beim Ausplattieren betragen.
- Ein gleichmäßiges Ausplattieren der Zelllinie mit der Multistepper-Pipette soll durch Aufnahme eines kleineren Volumens an Zellsuspension erfolgen - somit kann auch eine regelmäßige Resuspension gewährleistet werden.
- Ein Trypsinieren der Zellen im „Assaymedium“ soll vermieden werden. Das „Assaymedium“ beinhaltet bereits eine geringere Konzentration an Glucose und Wachstumshormonen, was die Vitalität der empfindlichen VM7Luc4E2 Zellen bereits herabsetzt. Aufgrund des Einsatzes im ER-Reporter-Gen-Assay, müssen die Zellen zwangsläufig ins Assaymedium überführt werden. Das Trypsinieren beeinträchtigt die Vitalität zusätzlich.

Diese und weitere Kriterien, die in der Diskussion ausführlich behandelt werden, listen Möglichkeiten auf, die eine erfolgreiche Etablierung des ER-Reporter-Gen-Assays gewährleisten könnten. Diese Arbeit stellt die Basis der Etablierung dieser komplexen Methode dar.

1 | Einleitung

Die Wasserverschmutzung ist eines der wichtigsten Probleme dieser Epoche, das sich auf den Menschen und alle lebenden Organismen auswirkt und die natürlichen Ressourcen beeinträchtigt (Khan et al. 2000). Unter Wasserverschmutzung ist die Verunreinigung der Gewässer, einschließlich des Grundwassers, zu verstehen. Schadstoffe, die als häusliche, gewerbliche, industrielle und landwirtschaftliche Abfallstoffe anfallen, gelangen vom Bodenwasser, von Deponien oder als Abwasser ins Grundwasser und in Oberflächengewässer (Schmit & Dekkers 1984) wie Flüsse oder Seen. Darunter fallen auch Mikroschadstoffe, die in deutschen Gewässern, beispielsweise dem Rhein, nachgewiesen wurden und bereits in sehr geringen Konzentrationen nachteilige Wirkungen auf die aquatischen Ökosysteme haben können. Bei diesen Stoffen handelt es sich unter anderem um Rückstände von Pflanzenschutz- oder Arzneimitteln (IKSR o.D.). Einige dieser Schadstoffe lagern sich in Abhängigkeit ihres chemischen Verhaltens an Sedimente und Schwebstoffe an, weshalb Sedimente als Schadstoffdepot und als „Gedächtnis vergangener Gewässerverschmutzungen“ angesehen werden können (Zuellig 1956). Sedimente und Schwebstoffe sind natürliche Bestandteile von Gewässern. Sie bestehen aus anorganischen Feststoffen und organischem Material, zum Beispiel Sand oder verwittertem Gestein, sowie organischem Material wie Algen, zersetztem Pflanzenmaterial oder Bakterien. Sie sind eine Folge der Erosion von Böden oder Flussufern und gelangen direkt oder über Zuflüsse und die Luft in den Fluss, wo sie von Algen und Bakterien besiedelt und modifiziert werden. Aufgrund der natürlichen Gewässerdynamik unterliegen sie einem Sedimentations-Resuspensionszyklus: Sie setzen sich in strömungsberuhigten Zonen, wie Hafenbecken, am dessen Grund ab und werden bei höherer Strömung wieder aufgewirbelt und in der Wasserphase transportiert (HPA 2017) (s. Abb. 1.1).

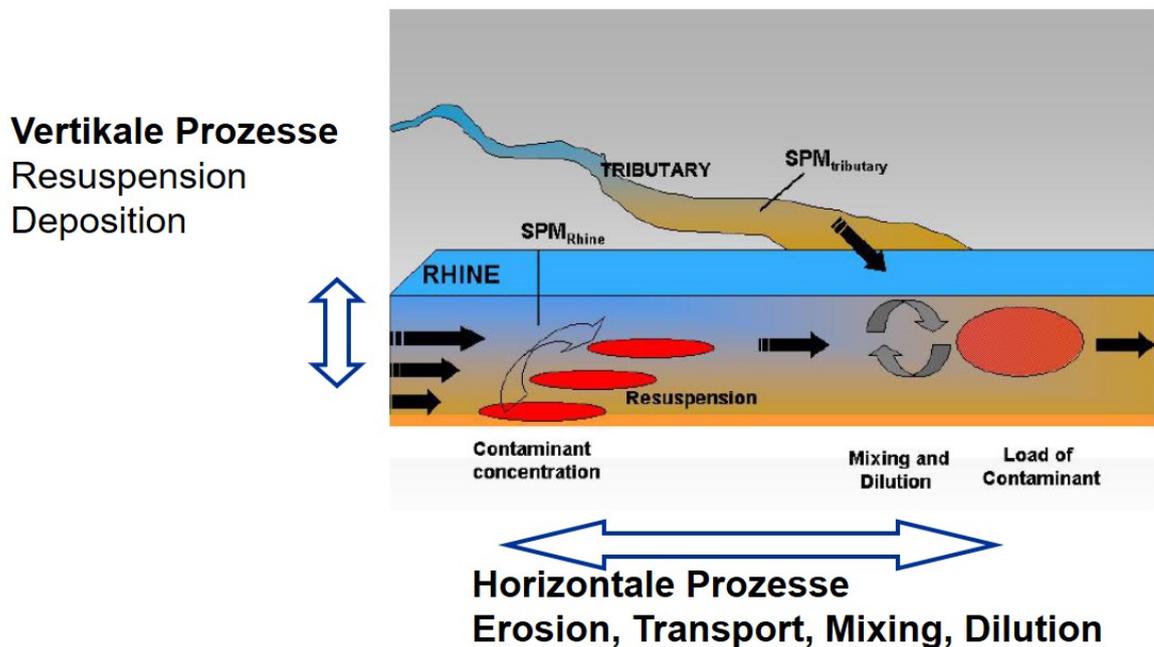


Abb. 1.1: Schematisch dargestellter Resuspensionszyklus von Sedimenten und Schwebstoffen (Heise et al. 2004)

Sedimente stellen eine Senke für über die Wasserphase eingetragenen Schadstoffe dar, bei ausreichender und anhaltender Fixierung an Sedimentpartikeln (Calmano 2001; Fiedler & Rösler 1993; Prosi & Müller 1987). Durch Hochwasserereignisse oder das Ausbaggern von Schifffahrtsrinnen kann es jederzeit zu einer Remobilisierung sedimentgebundener Schadstoffe kommen (Calmano 2001). Zu diesen Schadstoffen gehören unter anderem die sogenannten endokrinen Disruptoren (*endocrine disrupting chemicals*, EDCs). Ein endokriner Disruptor ist definiert als „ein exogener Wirkstoff oder ein Gemisch von Stoffen, der Synthese, Sekretion, Transport, Stoffwechsel, Bindungswirkung oder Eliminierung von Hormonen, die im Körper vorhanden sind und die für Homöostase, Wachstum und neurologische Signalgebung, Reproduktions- und Entwicklungsprozesse verantwortlich sind, stören oder verändern“ (Kavlock et al. 1996). Zu den häufigsten EDCs gehören unter anderem Steroidhormone, wie natürliche oder synthetische Estrogene, aber auch Insektenschutzmittel (Damstra et al. 2002).

Ein Organismus im Wasser kann über unterschiedliche Expositionspfade gelöste Schadstoffe in sich aufnehmen. Neben der Wassersäule ist das Porenwasser ein wichtiger Expositionspfad (s. Abb. 1.2) (Ahlf 1995).

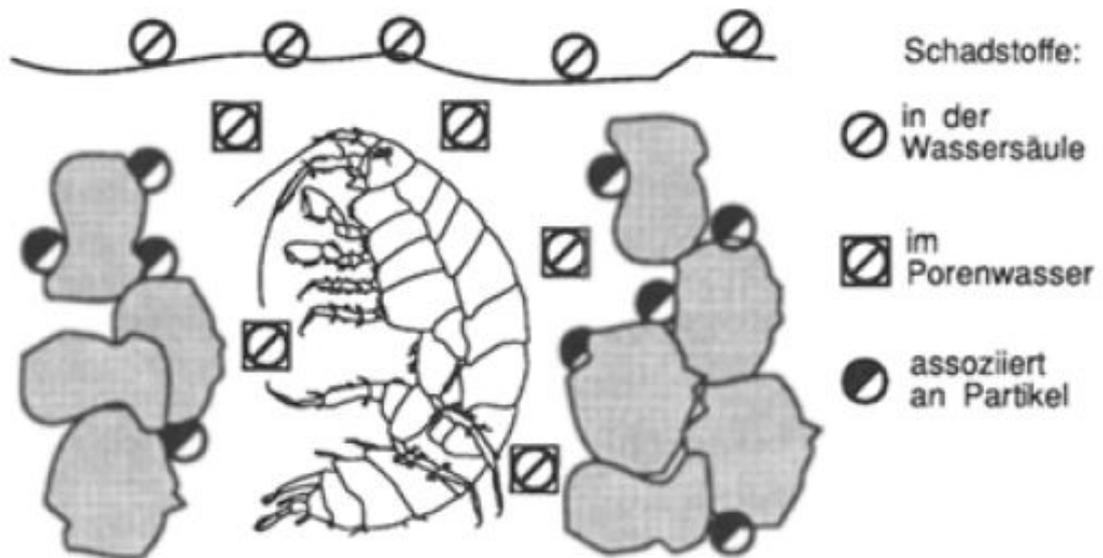


Abb. 1.2: Exposition eines benthischen Organismus gegen Sedimentschadstoffe. Expositionspfade sind Wassersäule und Porenwasser (Ahlf 1995).

Partikelgebundene Schadstoffe werden in die gelöste Phase, das Porenwasser, überführt. Das native Porenwasser, dem viele aquatische Organismen ausgesetzt sind, sollte als Expositionsphase genutzt werden, wenn untersucht werden soll, ob benthosbewohnende Organismen durch sedimentgebundene Schadstoffe geschädigt werden können (Ahlf 1995).

1.1 Estrogene in der Umwelt

Weltweit gibt es ernsthafte Bedenken hinsichtlich der Schadstoffe im Trinkwasser und Quellgewässern; Estrogenverbindungen wurden in Abwasserkläranlagen in mehreren Ländern nachgewiesen (Adeel et al. 2017). Die durchschnittliche Konzentration von Estrogensteroiden (Estron (E1), 17β -Estradiol (E2), Estriol (E3) und 17α -Ethinylestradiol EE2) in italienischen Kläranlagen betrug 3- 80 ng/l. Die Konzentrationen von E2 in Flüssen japanischer Kläranlagen lagen in der Herbst- und Sommersaison zwischen 30 und 90 ng/l bzw. 20 bis 94 ng/l (Ying et al. 2002). In Peking zeigte eine Studie, dass 40 % der natürlichen Estrogene und 60 % des EE2 im Abwasser möglicherweise in den Vorfluter gelangen. Die durchschnittlichen Konzentrationen von E1, E2, E3 und EE2 im Vorfluter lagen zwischen 2 und 320 ng/l (Zhou, Zha, Xu et al. 2011); In der größten Abwasseraufbereitungsanlage in Peking lagen die maximalen Konzentrationen von E1, E2, E3 und EE2 zwischen 1 und 74 ng/l (Zhou, Zha & Wang 2011).

Das Umweltbundesamt (UBA) hat 2015 Höchstkonzentrationen von Nonyl- und Oktylphenolen von $0,1 \mu\text{g}/\text{ml}$ gemessen. Nonyl- und Oktylphenolen wirken estrogenartig und gehören damit zu den hormonell wirksamen Stoffen (UBA 2017).

Große Beachtung fand das Aufkommen feminisierter, männlicher Fische in Flüssen in Folge von Estrogenen im Gewässer. Aufsichtsbehörden in Großbritannien, den Vereinigten Staaten, Europa und Japan stellten diese Veränderung fest (Gross-Sorokin et al. 2006).

Als dieser Befund in den 1990er Jahren zum ersten Mal in England festgestellt wurde, galt er als möglicher Zufall. Was früher eine lokalisierte, fleckenhafte Beobachtung war, wird jetzt als weit verbreitetes Phänomen erkannt (Jobling et al. 1998). Somit wächst seit Beginn der 90er-Jahre die Sorge über estrogenaktive Schadstoffe in der Umwelt, von denen viele dazu tendieren, an Sedimente zu adsorbieren (Schmitt et al. 2012).

Die Europäische Kommission hat deshalb 2015 die natürlichen Estrogene 17β -Estradiol, Estron und das synthetische Estrogen 17α -Ethinylestradiol (s. Abb. 1.3), welches hauptsächlich in oralen Kontrazeptiva vorkommt, auf die sogenannte „watch list“ der EU Wasserrahmenrichtlinie (WRRL) gesetzt (EU 2013; EUScienceHub 2018). Gemäß der WRRL ist die „watch list“ für Oberflächengewässer eine Liste potenzieller Wasserschadstoffe, die von den EU-Mitgliedstaaten sorgfältig überwacht werden sollte, um festzustellen, welches Risiko sie für die Gewässer haben und ob EU-Umweltqualitätsstandards (*Environmental Quality Standards*, EQS) für sie gestellt werden sollen (EUScienceHub 2018).

Estrogene sind steroidale Moleküle, die strukturell auf dem Phenanthrenring basieren. Sie werden aus Cholesterin hauptsächlich in den Eierstöcken von Weibchen als Reaktion auf Signale aus dem Gehirn produziert. Eine geringe Menge wird auch in den Hoden von Männchen, sowie im Fettgewebe über die Aromatase beider Geschlechter, synthetisiert.

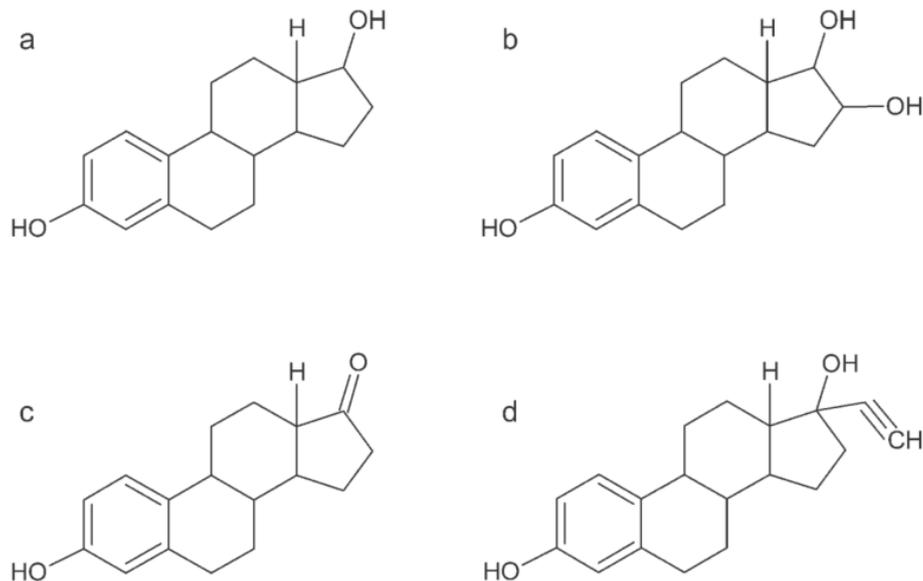


Abb. 1.3: Molekulare Strukturen natürlicher Hormone (a) 17 β -Estradiol, (b) Estriol, (c) Estron und das synthetische Hormon (d) 17 α -Ethinylestradiol (Houtman 2007).

Estrogene spielen eine entscheidende Rolle bei der sexuellen Entwicklung und sind zum Beispiel für die Entstehung weiblicher sekundärer Geschlechtsmerkmale, die Kontrolle der Fortpflanzungszyklen und Fruchtbarkeit verantwortlich (Tyler et al. 1998). Arcand-Hoy & Benson (1998) sowie Nagahama et al. (2004) erkannten bereits, dass die Exposition gegenüber Steroidhormonen in kritischen Entwicklungsstadien das Geschlecht von seiner genetischen Prädisposition zu einem anderen Phänotyp umkehren kann. Konzentrationen von weniger als 10 ng/l des E2 im Gewässer, wurden unter anderem mit Fortpflanzungsversagen von Fischen in Verbindung gebracht (Peterson 2005).

Ob ein Gewässer estrogene Stoffe enthält, wird anhand der Vitellogenin-Konzentration im Blutplasma männlicher Fische untersucht. Vitellogenin ist ein Dottervorläufer-Eiweiß, das normalerweise nur in weiblichen Fischen produziert wird. Treten jedoch estrogenartig wirkende Umweltchemikalien, wie zum Beispiel Rückstände oraler Kontrazeptiva, im Umgebungswasser auf, können auch Männchen und noch nicht geschlechtsreife Tiere Vitellogenin bilden (Mills & Chichester 2005). Diese reagieren sehr sensibel auf die Zufuhr von Estrogenen bis hin zur Geschlechtsumwandlung (Guderian & Gunkel 2000).

Nach der Bindung eines Estrogen-Liganden an den Estrogenrezeptor, wird ein Homodimer aus zwei Rezeptor-Estrogen-Komplexen gebildet und in den Zellkern transloziert. Dort bindet der Komplex an spezifische DNA-Sequenzen, *Estrogene responsive elements* (ERE), welche die regulatorischen Regionen estrogenbildender Gene anspricht. Sobald der Homodimer-Komplex an das ERE gebunden hat, rekrutiert er Transkriptionsfaktoren

zum Ziel-Gen-Promotor, was zu einer erhöhten Gentranskription in der Messenger-RNA führt. Die Produktion von Proteinen, zum Beispiel Vitellogenin, führt nach der Translation der Messenger-RNA zur estrogenen Wirkung auf die zelluläre Funktion (Houtman 2007) (s. Abb. 1.4).

Mithilfe von *in vitro* Zellbioassays kann das gesamte rezeptorvermittelte endokrine Potential aller Verbindungen in einer komplexen Umweltprobe, wie einem Sedimentextrakt oder Porenwasser, ermittelt werden (Houtman 2007).

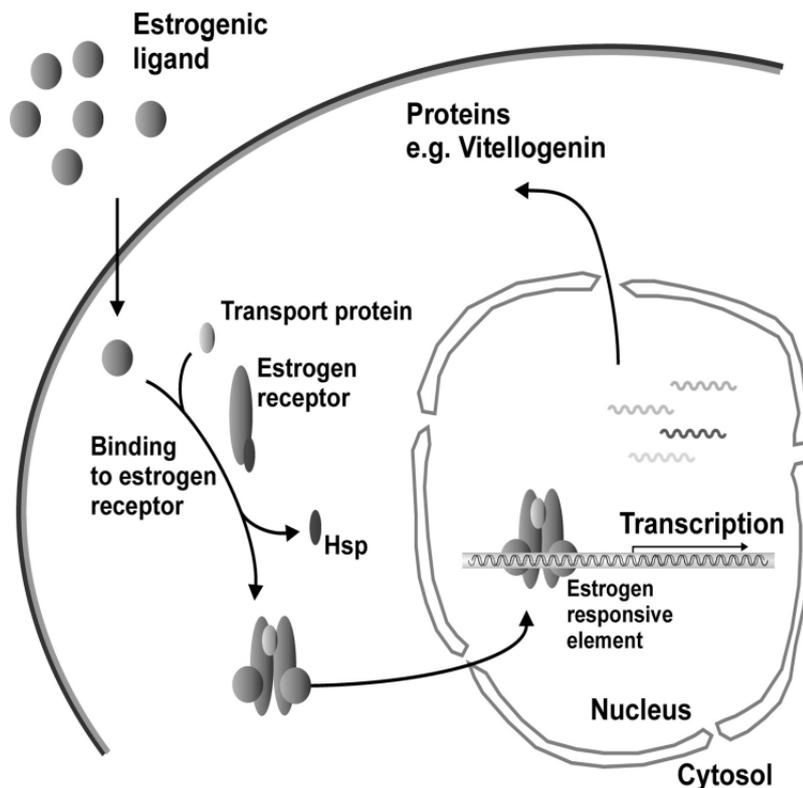


Abb. 1.4: Rezeptorvermittelter Wirkmechanismus estrogenen Hormone (Houtman 2007).

1.2 Ecdyson-Agonisten in der Umwelt

Bereits seit den 60er-Jahren gibt es Studien über die Belastung von Gewässern mit Insektiziden. In ausgedehnten Untersuchungen standen damals die chlororganischen Insektizide im Interesse der Forschung. In Untersuchungen, die im Zeitraum von 1958 - 1965 gemacht wurden, zeigte sich bereits in der genannten Zeitspanne eine eindeutige Belastung großer Flusssysteme mit Insektiziden wie DDT und Dieldrin (Koch & Strobel 1977). Heutzutage steht eine neue Generation von Insektiziden im Fokus der wissenschaftlichen

1 Einleitung

Aufmerksamkeit. Ziel ist es, die Belastung der Gewässer mit Ecdyson-Agonisten zu ermitteln.

Wissenschaftler der Universität Koblenz haben im Jahr 2015 erstmals umfangreiche globale Daten der Insektizidbelastung von Gewässern mit den für die jeweiligen Insektizide durch die Behörden definierten maximal akzeptablen Konzentrationen verglichen (Stehle & Schulz 2015). Das Ergebnis zeigte, dass in mehr als 40 % der Fälle, in denen ein Insektizid in einer Wasserprobe nachgewiesen wurde, die gefundenen Konzentrationen höher waren, als sie laut behördlichem Zulassungsverfahren hätten sein dürfen. Bei der Untersuchung von Sedimenten überschritten 80 % der Proben die Grenzwerte (Stehle & Schulz 2015).

Bei einigen dieser Insektiziden handelt es sich um Agonisten des Häutungshormons Ecdyson, wie beispielsweise Methoxyfenozid oder Tebufenozid. Sie gehören zur Klasse der Bisacylhydrazinverbindungen, einer neuen Generation von Insektiziden.

Insekten besitzen ein Exoskelett aus Chitin, welches während des Wachstums den neuen Größenverhältnissen nicht angepasst werden kann und deshalb kontinuierlich erneuert werden muss. Dies geschieht durch einen Häutungsprozess. Auf hormoneller Ebene verantwortlich für die Häutung ist das 20-Hydroxyecdysen (20E), welches ein natürliches Steroid ist. Das Ecdyson ist ein Vorläufer des 20E. Es wird aus Cholesterol, welches über die Nahrung aufgenommen wird, in der Prothoraxdrüse von Insekten synthetisiert. Im Anschluss daran wird das Ecdyson in die Hämolymphe sezerniert und im peripheren Gewebe, beispielsweise dem Fettgewebe, zu 20E oxidiert (Nakagawa & Sonobe 2016) (s. Abb. 1.5).

Die insektizide Funktion der Bisacylhydrazinverbindungen wird hauptsächlich seiner Fähigkeit zugeschrieben, die Fütterungsfähigkeit von Larven und adulten Insekten zu verringern oder zu hemmen, die Häutung zu beschleunigen und die Reproduktion zu reduzieren (Jiang et al. 2018; Retnakaran et al. 2003).

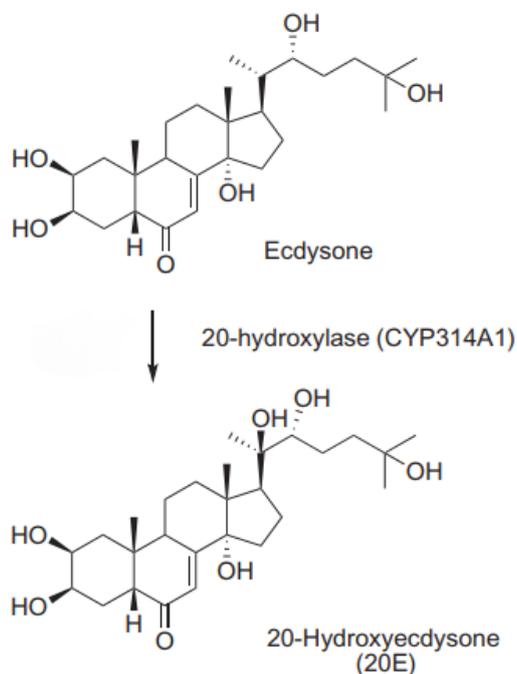


Abb. 1.5: Strukturformel des Ecdyson und 20-Hydroxyecdysone. Durch die 20-Hydroxylase wird aus Ecdyson das 20-Hydroxyecdysone synthetisiert (Nakagawa & Sonobe 2016).

Ebenso wie Insekten gehören Daphnien den Arthropoden an (Giribet & Edgecombe 2013). Auf endokriner Ebene lassen sich Parallelen erkennen. Die Wirkung von Ecdysteroiden oder ihrer Agonisten auf *Daphnia magna* verursacht eine Verzögerung und/oder einen Defekt bei der Häutung und folglich den Tod (Miyakawa, Sato et al. 2017). Die Daphnien verfügen über ein ähnliches Rezeptorsystem, was anhand des Genoms von *Daphnia pulex* belegt werden konnte (Miyakawa, Imai et al. 2010). *Daphnia pulex* verfügt über Ecdysteroid-Rezeptoren, die denen der Insekten homolog sind (Miyakawa, Sato et al. 2017), weshalb es naheliegend ist, dass Ecdysteroiden, die auf Insekten wirken, an die Rezeptoren der Daphnien binden können.

Basierend auf dieser Wirkungsweise wurden verschiedene Pestizide entwickelt, darunter Tebufenozid und Methoxyfenozid, um schädlichen Arthropodeneffekten entgegenzuwirken (Nakagawa 2005). In einigen Fällen können diese Ecdysonrezeptor-Agonisten auch Nichtzielorganismen wie Garnelen, Krabben und Hummer beeinflussen, die sowohl ökologische als auch ökonomische Werte aufweisen (Wilde et al. 2013).

Die *Daphnia magna* dient in der Ökotoxikologie als biologisches Frühwarnsystem, da sie sehr empfindlich auf Veränderungen in der Umwelt reagiert (T. Hanazato 1998; Havens 1995). Sie spielen außerdem eine wichtige Rolle in den Nahrungsnetzen von Süßwasser-Ökosystemen (Dodson & Hanazato 1995). Neben den Daphnien in der Elbe sind unter anderem auch die Nordseegarnele (*Crangon crangon*) (Verhaegen et al. 2011)

1 Einleitung

und die Nordseekrabbe (*Cancer pagurus*) (Wainwright et al. 1996), die im Flussmündungsbereich und in der Nordsee leben, potentielle Nichtzielorganismen. Dies beruht auf den phylogenetisch hoch konservierten endokrinen Systemen in Arthropoden. Gaertner et al. (2012) identifizierten in einigen Arthropoden, darunter *Daphnia magna* und die Nordseegarnele *Crangon crangon*, dieselbe Ecdysonrezeptor-Sequenz und zeigten eine ähnliche Homologie in der DNA-Bindungsdomäne des Rezeptors. Das bedeutet, dass Ecdyson-Agonisten auf molekularer Ebene in der Nordseegarnele ähnlich binden wie in *Daphnia magna*. Endokrine Disruptoren wie als Ecdyson-Agonisten wirkende bisacylhydrazinhaltige Insektizide werden über die Landwirtschaft in den Fluss eingeleitet. Sie werden stromabwärts transportiert und gelangen so auch ins Meer, wo sie dort lebende *Crustacea* schädigen können.

Der Wasserfloh *Daphnia magna* hat sich in ökotoxikologischen Studien zu einem beliebten Modellorganismus entwickelt und wird als standardisierter OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*) -Toxizitätstestorganismus eingesetzt. *Daphnia magna* bietet eine Reihe von Vorteilen, wie einen kurzen Zyklus der asexuellen Fortpflanzung, einen durchsichtigen Körper (s. Abb. 1.6) und ein gut untersuchtes Genom. Sie ist auch unter Laborbedingungen einfach zu pflegen und reagiert sehr empfindlich auf Umweltkontamination (Song et al. 2016).



Abb. 1.6: Großer Wasserfloh, *Daphnia magna*, mikroskopische Aufnahme (Watanabe 2018).

Mit der vorliegenden Bachelorarbeit wird das Ziel verfolgt, das aus Sedimenten gewonnene Porenwasser dreier Probenahmestellen im Hamburger Hafen zu ermitteln, auf hormonaktive Schadstoffe zu untersuchen und miteinander zu vergleichen. Jährlich fallen durch Unterhaltungsmaßnahmen im Hamburger Hafen, zum Beispiel zur Erhaltung der Schifffahrtstiefe in der Fahrrinne, ca. 11,7 Mio. m³ Baggertgut an (HPA 2015). Die-

ses muss vor der Umlagerung hinsichtlich seines Umweltgefährdungspotentials bewertet werden.

Die Porenwassermessungen, welche in dieser Arbeit durchgeführt werden, grenzen sich dabei auf Estrogene und spezielle Insektizide (Ecdyson-Agonisten) ein, deren Wirkpotential mittels eines Estrogen- bzw. Ecdyson-Rezeptor vermittelten chemisch aktivierten Luciferase Genexpressions-Assay gemessen wird.

2 | Material und Methoden

Die Messung der E2- und 20E-Äquivalenzwerte erfolgt mithilfe von *in vitro* Zellbioassays. Durch die Bindung an spezifische Estrogen- ($ER\alpha$ oder $ER\beta$) und Ecdysteroid-Rezeptoren wird das Luciferasereporter gen aktiviert. Nach Lyse der Zellen wird Luciferin als Substrat zugegeben. Dessen Umsatz durch die gebildete Luciferase wird als Lichtemission gemessen. Die Effekte des Assays werden als ER-Äquivalenz-Werte (Estradiol Equivalent Quantity, EEQ) (Juliette Legler et al. 2002) und 20E-Äquivalenz-Werte (Lagueux et al. 1979) ausgedrückt.

Hierfür ist der Einsatz von zwei Zelllinien notwendig. Die estrogene (E2) Aktivität wird mithilfe der humanen Brustkrebszelllinie VM7Luc-4E2 durchgeführt. Diese Zelllinie wurde stabil mit einem Estrogen-Rezeptor-sensitiven Luciferase-Plasmid transfiziert.

Die Messung ecdysoner (20E) Aktivität erfolgt mithilfe der CHO-K1-Zelllinie (*Chinese Hamster Ovary Cells*). Diese Transfektion dieser Zelllinie soll noch erfolgen.

Die Durchführung des ER-Reporter gen-Assay, sowie die Kultivierung der VM7Luc4E2 Zellen, erfolgten nach einer von der Arbeitsgruppe *Environmental Health and Toxicology* (Timo Hamers, Freie Universität Amsterdam) zur Verfügung gestellten Standardarbeitsanweisung.

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Alle in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 2.1 aufgelistet.

Tab. 2.1: Auflistung der verwendeten Geräte.

Bezeichnung	Gerät	Hersteller
Automatischer Zellzähler	Countess™	Thermo Fisher Scientific
Einmalpipetten, steril	greiner bio-one	Cellstar®
Gefrierkontainer für Kryokonservierung	Mr.Frosty™	Thermo Fisher Scientific
Inkubator	CB 53	Binder
Laborwaage	Entris	Sartorius
Mehrfachdispenser	Multipette® plus	eppendorf
Mikroplatten-Reader	Infinite M200 Pro	Tecan
Mikroplatten-Reader	Infinite F200	Tecan
Mikroskop	Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss
Pipettenspitzen für Mehrfachdispenser	Combitips advanced®	eppendorf
Pipettierhilfe	accu-jet® pro	Brand
SFCA-Einwegfilter	NG-290-3320	Nalgene
Wasserbad	L2143	Biochrom GmbH
Zellkammer	Countess™ cell counting chamber slide	Thermo Fisher Scientific
Zellkulturflasche	658 170	greiner-bio one
Zellkulturplatten, 24, 48, 96 well plates	Greiner Cellstar®	Sigma Aldrich
Zentrifuge	Multifuge 3 S-R	Heraeus
Zentrifugenröhrchen, steril, 50 ml	N463.1	Carl Roth® GmbH

2.1.2 Software

Alle in dieser Arbeit verwendeten Software sind in Tabelle 2.2 dargestellt.

Tab. 2.2: Auflistung der verwendeten Geräte.

Software	Version	Hersteller/Entwickler
GraphPad Prism	8.0.0	GraphPad Software, Inc.
i-control TM Microplate Reader Software	2.11	Tecan
Jabref	4.3.1	Oliver Kopp, Simon Har- rer, Jörg Lenhard, Ste- fan Kolb, Matthias Geiger, Oscar Gustafsson, Tobias Diez, Christoph Schwent- ker, Linus Dietz
Magellan TM	7.2	Tecan
MS Office	2017	Microsoft (Redmond, WA, USA)
Texmaker	5.0.3	Pascal Brachet, Joël Am- blard

2.1.3 Medien und Kits

Alle in dieser Arbeit verwendeten Kits, kommerziell erworbene wie eigens hergestellte Lösungen, sind in Tabelle 2.3 dargestellt.

Tab. 2.3: Auflistung der verwendeten Kits, Medien und Lösungen.

Bezeichnung	Katalognummer	Hersteller
DMEM/F-12, GlutaMAX™	10565018	Thermo Fisher Scientific
DMEM, phenol-free, low glucose	11054020	Thermo Fisher Scientific
FBS Origin: Australia	10099-141	gibco®
FBS Origin: Australia, charcoal stripped	10099-141	Eigene Herstellung
Fetal Bovine Serum Non USA Origin	F7524-100ML	Sigma Aldrich
Geneticindisulfat (G418) 50 mg/ml, CELLPURE®, steril	CP11.1	Carl Roth® GmbH
Glycerol	G5516-100ML	Sigma Aldrich
Ham's F-12 Medium w 1,176 g/l NaHCO ³ w stable glutamine, low endotoxin	FG 0815	Biochrom GmbH
Natronlauge 1 M	K021.2	Carl Roth® GmbH
PBS	BR0014G	Oxoid
Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml / 10.000 µg/ml)	P4333-20ML	Sigma Aldrich
Trypan Blue stain 0,4%	T10282	Thermo Fisher Scientific
Trypsin/EDTA Solution 0,05 % / 0,02 % (w/v) in PBS w/o Ca ²⁺	L2143	Biochrom GmbH
Vitalitäts-Assay	CellTiter-Fluor™ Cell Via- bility Assay	Promega

2.1.4 Substanzen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Substanzen sind in Tabelle 2.4 dargestellt.

Tab. 2.4: Auflistung der verwendeten Substanzen.

Bezeichnung	Katalognummer	Hersteller
17 β -Estradiol \geq 98 %	E8875-250MG	Sigma Aldrich
20-Hydroxyecdysen	ab142425	abcam
Activated Charcoal	C9157-500G	Sigma Aldrich
Adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate	A2383-1G	Sigma Aldrich
Coenzym A	CC06015	Carbolution
Cysteamin Hydrochlorid	7625.1	Carl Roth [®] GmbH
DCTA	319945-25G	Sigma Aldrich
D-Luciferin Natriumsalz \geq 99 %	4096.2	Carl Roth [®] GmbH
Dextran 500	9219.3	Carl Roth [®] GmbH
Digitonin	4005.1	Carl Roth [®] GmbH
DMSO, 99,9%, for spectroscopy	167851000	Acros Organics
DMSO \geq 99,5 %, BioScience-Grade, für die Molekularbiologie	A994.2	Carl Roth [®] GmbH
DMSO \geq 99,5 % GC, plant cell culture tested	D4540-100ML	Sigma Aldrich
DTT	10197777001	Sigma Aldrich
EDTA Dinatriumsalz-Dihydrat (Titrierkomplex III), \geq 99 %, p.a., ACS	8043.3	Carl Roth [®] GmbH
Essigsäure 100%	6755.1	Carl Roth [®] GmbH
Magnesium carbonate hydroxide pentahydrate	M5671-500G	Sigma Aldrich
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	O027.1	Carl Roth [®] GmbH

Natriumacetat	6773.1	Carl Roth® GmbH
Penicillin-Streptomycin 10.000 µg/ml	P4333-20ML	Sigma Aldrich
TRIS	A2264,0250	AppliChem
Triton-X100	X100-100ML	Sigma Aldrich
Trycin	T5816-25G	Sigma Aldrich

2.1.5 Herstellung des Kultur- und Assaymediums für VM7Luc4E2 Zellen

Die Stamm-Zellkultur wird im Medium DMEM/F-12 (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) gehältert, dem 10 % FBS (*fetal bovine serum*) sowie 1 % Penicillin/Streptomycin unter sterilen Bedingungen hinzugegeben werden. Für die im Test verwendete Kultur („Assaykultur“), die eine Woche vor dem Test aus der Stamm-Zellkultur angeimpft wird, wird das phenolfreie DMEM (s. Tab. 2.3, Inhalt: 500 ml) als Assaymedium verwendet. Diesem wird 10 % *charcoal stripped FBS* sowie 1 % Penicillin/Streptomycin unter sterilen Bedingungen zugeben. Diese Assaykultur wird nur bei der Luciferase-Messung eingesetzt, da es kein Phenolrot enthält. Da Phenolrot eine Substanz mit schwach estrogener Wirkung ist, welches in einigen estrogen-sensitiven Zellen eine Stimulation hervorrufen kann (Welshons et al. 1988), können die Messergebnisse beim ER-Reporter-Gen-Assay im „Kulturmedium“ zu falschen Annahmen führen. Da das FBS aus dem Blut von Kalberfeten gewonnen wird, ist eine geringe Menge Estradiol im Serum enthalten (Henson et al. 1996). Um den Estradiolhintergrund im FBS auf ein Minimum zu reduzieren, wird das „Charcoal Stripped FBS“ dem Medium zugesetzt. Das Entfernen von Hormonen mithilfe von Aktivkohle wird als „strippen“ bezeichnet. Aktivkohle adsorbiert unpolares Material, wie bestimmte Wachstumsfaktoren, Hormone oder Cytokine, unabhängig vom Molekulargewicht, hat aber wenig Wirkung auf Salze, Glukose oder Aminosäuren. Ziel ist es, den Estradiol-Hintergrund im Assaymedium auf ein nicht mehr messbares Potential herabzusetzen. Das *charcoal stripped FBS* wird eigens hergestellt unter Verwendung des „FBS origin: Australia“ (s. Kapitel 2.1.6).

2.1.6 Herstellung des *Charcoal Stripped FBS*

Zur Herstellung des *charcoal stripped FBS* werden die in Tabelle 2.5 aufgeführten Substanzen verwendet.

Tab. 2.5: Verwendete Substanzen zur Herstellung des *charcoal stripped FBS*. Mit diesen Mengen können 200 ml des gestrippten FBS hergestellt werden.

Substanzen	Mengen
TRIS	0,6 g
Dextran T500	0,25 g
Activated Charcoal	2,5 g
FCS Australian	200 ml
Reinstwasser	500 ml

TRIS wird in 50 ml Reinstwasser in einer Glasflasche gelöst und mit 1 M HCL auf einen pH-Wert von 8 eingestellt. Anschließend werden 450 ml Reinstwasser zum TRIS-Puffer hinzugegeben. Dextran T500 und Aktivkohle werden in dem Puffer suspendiert und die Flasche fest verschlossen über Nacht bei einer Temperatur von $<4^{\circ}\text{C}$ gerührt. Am Tag darauf werden 200 ml FBS Origin: Australia in eine sterile Flasche pipettiert und für 30 min bei 56°C auf dem Wasserbad erwärmt. Im Anschluss daran wird das Medium zwei Mal gestrippt. Hierzu wird zunächst die Aktivkohlesuspension vorbereitet: Während der Erwärmung des FBS Australian wird die Aktivkohlesuspension auf 50 ml Zentrifugenröhrchen verteilt. Dabei darf die Massendifferenz zwischen den Zentrifugenröhrchen 0,1 g nicht überschreiten um eine gleichmäßige Adsorption der unerwünschten Substanzen in jedem Zentrifugenröhrchen zu erhalten. Die Röhrchen werden zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Anschließend wird das nun erwärmte FBS- Serum auf die Hälfte der Aktivkohlepellets gleichermaßen verteilt und resuspendiert. Das FBS-Serum mit Aktivkohle wird im Wasserbad auf 45°C für 45 min erwärmt und dabei währenddessen leicht geschwenkt. Im Anschluss daran wird das FBS-Serum zentrifugiert und der Überstand auf die andere Hälfte der Aktivkohlepellets verteilt. Obiger Vorgang des Erwärmens unter Schwenken der Lösung wird wiederholt. Das gestrippte FBS-Serum wird in saubere Zentrifugenröhrchen überführt und erneut zentrifugiert, um die restliche Aktivkohle zu entfernen. Das Serum wird aus allen Zentrifugenröhrchen vereinigt und mit SFCA Einwegfiltern (*Surfactant-Free Cellulose Acetate*) sterilfiltriert.

2.1.7 Kulturmedium der CHO-K1 Zellen

Zur Kultivierung der CHO-K1 Zellen wird Ham's F-12 Medium verwendet, dem ebenfalls 10 % FBS und 1 % Penicillin/Streptomycin hinzugegeben werden. Hier wird keine spezielle Kultur für den EcR-Reporter-Gen-Assay angesetzt. Die Zellen werden direkt aus der CHO-K1-Zellkultur entnommen und im Assay mit demselben Medium inkubiert.

2.1.8 Herstellung Lysepuffer

Zur Herstellung des Lysepuffers werden die in Tabelle 2.6 aufgeführten Substanzen verwendet. Dieser wird verwendet um die Zellen im Well zu lysieren

Tab. 2.6: Verwendete Substanzen mit Mengenangaben zur Herstellung des Lysepuffers. Dabei beziehen sich die Mengen auf ein Gesamtvolumen von 1000 ml.

Substanzen	Mengen
TRIS	3,028 g
DDT	0,31 g
DCTA	0,726 g
Glycerol	100 ml
Triton-X100	10 ml
Reinstwasser	ad 1000 ml

2.1.9 Herstellung Glow-Mix

Zur Herstellung des Glow-Mixes werden die in Tabelle 2.7 aufgeführten Substanzen verwendet. Der Glow-Mix enthält Luciferin. Wenn der Rezeptor in den Zellen durch eine estrogene Substanz aktiviert wird, resultiert das in der Bildung von Luciferase. Die vorherige Lyse der Zellen ist notwendig, um die Luciferase aus dem Zellinneren freizusetzen (s. Abb. 2.1).

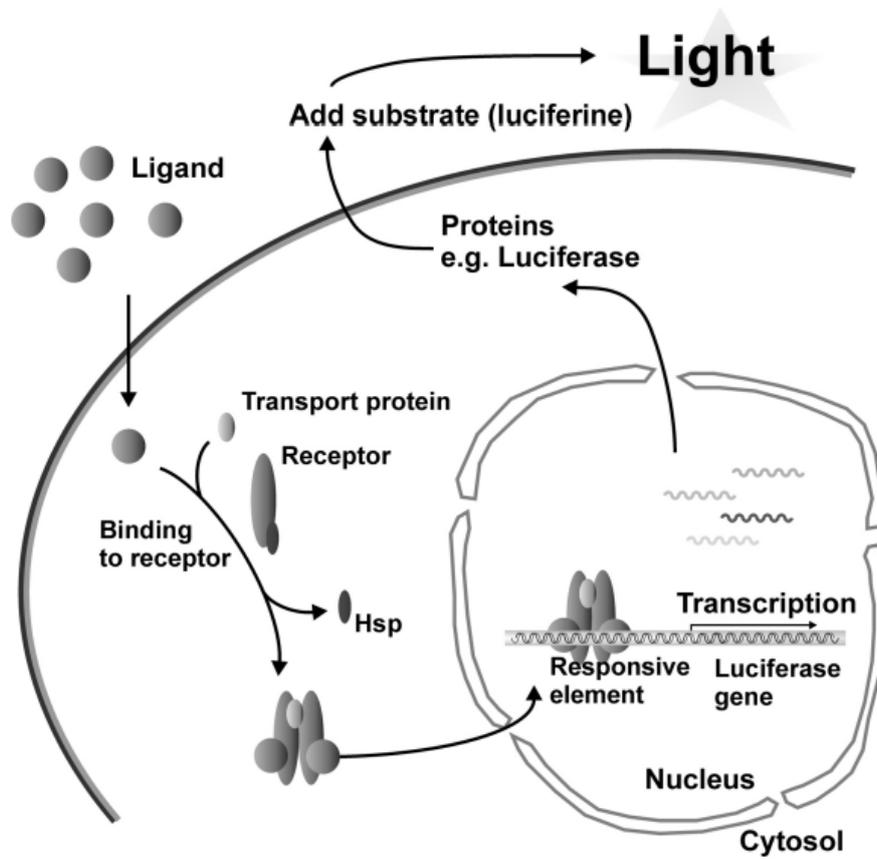


Abb. 2.1: Rezeptor-vermittelter Mechanismus des chemisch aktivierten Luciferase-Genexpressions-Assays (Houtman 2007).

Tab. 2.7: Verwendete Substanzen mit Mengenangaben zur Herstellung des Glow-Mix. Dabei beziehen sich die Mengen auf ein Gesamtvolumen von 1000 ml.

Substanzen	Mengen
Trycin	3,58 g
$C_4H_2Mg_5O_{14}$	0,52 g
$MgSO_4$	0,601 g
EDTA	0,037 g
DTT	5,135 g
Coenzym A	0,207 g
Luciferin	0,151 g
ATP	0,290 g
Reinstwasser	ad 1000 ml

Trycin und Magnesiumhydrogencarbonat-Pentahydrat werden in 500 ml Reinstwasser gelöst. Es folgt Magnesiumsulfat, EDTA and DTT zur Lösung mit anschließender Einstellung des pH-Wertes auf 7,8. Co-enzym A und Luciferin werden hinzugegeben und klar gelöst, bevor ATP hinzugefügt wird. Der pH-Wert wird gemessen und mit 0,1 M NaOH oder 0,1 M HCL Lösung auf 7,8 eingestellt. Anschließend wird Reinstwasser auf 1.00 ml aufgefüllt. Der Glow-Mix wird in dunkelbraune Schraubgefäße aliquotiert und bei $-20^{\circ}C$ gelagert.

2.2 Methoden

2.2.1 Probennahme

Drei Oberflächensedimentproben werden im Hamburger Bereich der Tideelbe genommen. Die Probenahmen an den Probenahmeorten Stover Strand (S1), Köhlbrand (S2) und Wedel (S3) erfolgten am 2.7.2018 (S2/S3) und 3.7. 2018 (S1) (s. Abb. 2.2) von einem Schiff aus mit einer Van Veen-Bodengreifer. Details zu den Probenahmestellen sind in Tabelle 2.2.1 aufgeführt. Ebenso sind dort die unmittelbar nach Probenahme gemessenen Parameter pH-Wert, Sauerstoffgehalt, Redoxpotential sowie das ermittelte Trockengewicht der Proben angegeben.

2 Material und Methoden

Tab. 2.8: Daten zu den Sedimentproben aus denen Porenwasser zur Testung zur Verfügung stand.

Probenahmestelle	Stover Strand	Köhlbrand	Wedel
Datum der Probenahme	3.7.2018	2.7.2018	2.7.2018
Abkürzung	S1	S2	S3
Beschreibung	Stromaufwärts von Hamburg, Oberstromeinfluss dominiert	Hafen Hamburg, Ausfluss der Kläranlage Köhlbrand	Stromabwärts von Hamburg. Sedimentfang Wedel (rechtselfisch). geringe Strömung, dadurch hohe Sedimentationsraten, Anfang des Obstanbaugebiets „Altes Land “ (linkselfisch) mit potenziellem Eintrag von Pestiziden
Probenbezeichnung	1	2	3
Fluss (km)	593	626	640
Koordinaten	N 53.425837°, E 10.293371°	N 53.527397°, E 9.937781°	N 53.567499°, E 9.676756°
Zeitpunkt Hochwasser (St. Pauli)	8:51 Uhr	8:23 Uhr	8:23 Uhr
Zeitpunkt der Probenahme	9:30 - 10:00 Uhr	11.45 - 12:00 Uhr	9:30 - 9:50 Uhr
Organischer Anteil der Probe in %	8,6	4,8	4
Überkornanteil (>2mm) in %	7,7	4,7	7,9

Probenparameter			
pH-Wert	7,37	7,48	7,89
Sauerstoffgehalt (mg/l) direkt über dem Sediment	8,39	8,5	6,44
Redoxpotential (mV)	-153	-128	32
Trockengewicht in %	68	44	54

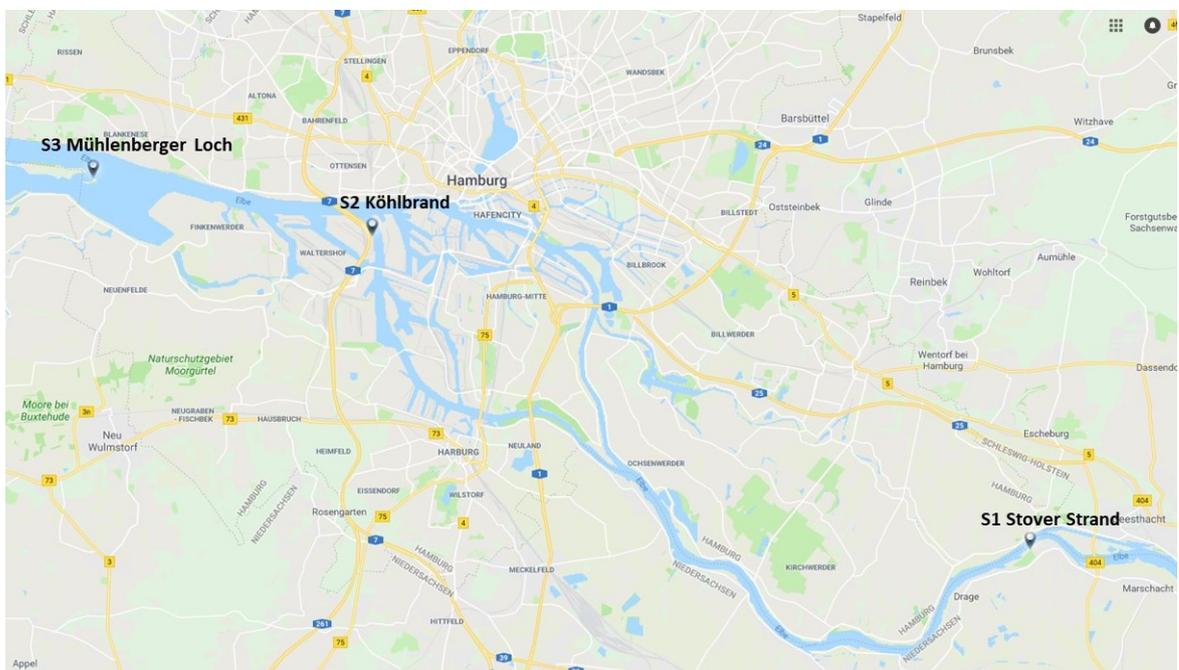


Abb. 2.2: Die Elbe im Bereich des Hamburger Hafens mit den drei Probenahmestellen Stover Strand (S1), Köhlbrand (S2) und Wedel, Mühlenberger Loch (S3). Screenshot Google Maps.

Jeweils 15 Greifer werden genommen und an Bord des Schiffs in einem großen Edelstahlbehälter vermischt. Aus diesem wird ein Aliquot in einen Glasbehälter gefüllt und im Labor innerhalb von 48 h durch 30-minütige Zentrifugation bei 10.000 g und 10°C Porenwasser hergestellt, das dekantiert und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert wird.

2.2.2 Kultivierung von Zellen

Für die Messung der estrogenen Aktivität wird die transfizierte, humane Brustkrebszelllinie VM7Luc4E2 verwendet, die stabil mit einem Estrogen-Rezeptor-sensitiven Luciferase-Plasmid transfiziert wurde. Zur Messung des ecdysonen Potentials stand die CHO-K1-Zelllinie des (*Chinese Hamster Ovary cells*). Bei beiden Zelllinien handelt es sich um adhärenzte Zellen, welche bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und einer wassergesättigten Atmosphäre mit 5 % CO₂ in einem Inkubator kultiviert werden. Die Zelllinien wird in einer T75-Zellkulturflasche kultiviert und hat währenddessen ein Mediumvolumen von 10 ml, in denen die Zellen aufbewahrt werden.

Das Medium versorgt die Zellen mit Nährstoffen. Allerdings werden mit steigender Zellzahl in der Zellkulturflasche die Nährstoffe des Mediums mit der Zeit verbraucht und toxische Stoffwechselprodukte häufen sich an. Es kommt zu einer Verschiebung des pH-Wertes ins saure Milieu, was anhand eines Farbumschlags des Mediums von rot nach gelb sichtbar wird, da das DMEM/F12- und Ham's 12-Medium Phenolrot enthalten. Eine Zellpopulation kann deshalb in Kultur nicht unendlich wachsen. Ein erfolgreiches und langfristiges Wachstum der Zelllinien kann gewährleistet werden, indem dreimal wöchentlich eine Vereinzlung (splitten) der Zellen (1:10 oder 3:10, je nach Konfluenz ¹) und ein Medienwechsel stattfinden, um eine Konfluenz von mehr als 90 % und eine damit einhergehende Zellkontakthemmung zu vermeiden. Die Vereinzlung der Zellen erfolgt unter sterilen Bedingungen mit Trypsin. Trypsin gehört zu den sogenannten Endopeptidasen, die Aminosäuren an bestimmten Stellen innerhalb der Proteine spalten. Aufgrund seiner ausgeprägten Substratspezifität, spaltet Trypsin Lysin- Arginin- und modifizierte Cysteinbindungen. Somit werden bestimmte Proteine abgebaut, die den Zellverband aufrechterhalten (Sons 2009).

Um die Zellen abzutrypsinieren, wird das Medium mit einer Pipette vollständig entfernt, um 5 ml PBS auf den Zellrasen zu pipettieren und durch mehrmaliges Schwenken die Zellen zu benetzen. Das PBS wird verworfen, um letztendlich 1 ml Trypsin über den Zellrasen zu verteilen und die Zellen 5 min lang im Inkubator bei den genannten Kulturbedingungen zu inkubieren. Solange sie nicht zu lange mit Trypsin behandelt werden, werden sie nicht geschädigt und es werden nur extrazelluläre Proteine gespalten (Sons 2009). Eine zu lange Trypsinierung der Zellen benötigt eine hohe Erholungszeit; im schlimmsten Fall sterben die Zellen sogar ab (Sons 2009). Ob die Zellen sich vom Boden der Zellkulturflasche gelöst haben, ist unter dem Mikroskop erkennbar.

Die Zellen runden sich während der Trypsinierung ab, da unter diesen Bedingungen die Zellmembran energetisch günstiger ist. Die Zellen sollten im Medium schwimmen, was unter dem Mikroskop zu erkennen ist. Unter dem Mikroskop ist ebenfalls zu erkennen, dass VM7Luc4E2 Zellen im Gegensatz zu den CHO-K1 Zellen nach dem Trypsinieren dazu neigen, sich zu Anhäufungen zusammenzufügen und nicht vereinzelt im Medium

¹größtenteils lückenlose Bedeckung der Oberfläche eines Kulturgefäßes

zu schwimmen. Wenn die Zellen in der Lösung nicht schwimmen, können sie durch vorsichtiges Anstoßen der Zellkulturflasche vom Zellboden gelöst werden.

Nun wird die Reaktion mit Trypsin inaktiviert, indem den Zellen frisches Medium, welches FBS enthält, gegeben wird, um wieder ein Volumen von 10 ml zu erreichen. So wird eine Schädigung durch weitere Proteolyse verhindert. Wenn ein Splitten der Zellen notwendig ist, werden diese nach Zugabe des neuen Mediums durch wiederholtes auf- und abpipettieren gut vermischt; dies dient ebenfalls dazu, die Zellen zu vereinzeln. Je nach Split-Verhältnis ist ein Teil der Zellen aus der Zellkulturflasche zu entnehmen und in eine neue Zellkulturflasche mit vorgewärmten Medium zu überführen, sodass wieder ein Volumen von 10 ml erreicht wird.

Die Überführung der Zellen ins Assay-Medium erfolgt folgendermaßen: Nach der Trypsinierung der Zellen, wird anstatt des DMEM/F12-Mediums das DMEM phenolfree, low glucose den Zellen gegeben (Gesamtvolumen 10 ml). Die Zellen werden mit dem Medium durch mehrfaches auf- und abpipettieren der sterilen Einmalpipette vermischt. 5 ml werden von der Zellsuspension in eine neue Flasche überführt und mit weiteren 5 ml Assay-Medium aufgefüllt. Vier Tage später erfolgt reiner Medienwechsel, ohne die Zellen zu trypsinieren. Sieben Tage nach dem ersten Überführen der Zellen in das Assay-Medium, werden die Zellen ausplattiert, um sie für den ER-Reporter-gen-Assay zu verwenden. In der Assaykultur sollen die VM7Luc4E2 Zellen eine Konfluenz von 70-90 % haben, bevor diese für den ER-Reporter-gen-Assay verwendet werden können.

2.2.3 Einfrieren und Auftauen von CHO-K1 und VM7Luc4E2 Zellen

Das Kryomedium für CHO-K1 Zellen besteht aus Ham's F-12 Medium, dem 30 % FBS und 10 % DMSO plant cell culture tested hinzugegeben werden. Für VM7Luc4E2 Zellen wird das Kryomedium aus DMEM-F12 Medium, dem 10 % DMSO der Firma Acros hinzugegeben wird, hergestellt. Konfluente Zellen beider Zelllinien einer 75 cm³ Zellkulturflasche werden trypsinieren und in 10 ml Medium aufgenommen. Anschließend werden diese 3 min bei 300 g zentrifugiert. Das Pellet wird in 2 ml Kryomedium resuspendiert und je 1 ml in ein Kryoröhrchen überführt. Die CHO-K1 Zellen werden vorerst 1,0 h bei -20°C eingefroren und anschließend in einen Gefriercontainer (Mr. Frosty) überführt und für 24 h ? 48 h bei -80°C aufbewahrt, bevor diese in flüssigen Stickstoff überführt werden. VM7Luc4E2 Zellen werden direkt nach Überführung ins Kryo-Röhrchen bei -80°C eingefroren und nach 24 h in flüssigen Stickstoff überführt. Das Auftauen beider Zelllinien findet bei 37°C im Wasserbad für 5 min statt. Die CHO-K1 Zellen werden anschließend in ein 37°C vorgewärmtes Medium, welches in einer Flasche vorgelegt wird, gegeben und bei 37°C für 4 h inkubiert. Danach wird ein Mediumwechsel vorgenommen, da das darin noch enthaltene DMSO für die Zellen toxisch ist. Die VM7Luc4E2 Zellen werden aufgetaut und befinden sich vorerst noch im Kryomedium. Sie werden bei 300 rpm in

2 Material und Methoden

dem Kryoröhrchen 3 min lang zentrifugiert, um das DMSO zu entfernen. Nach Dekantierung des Kryomediums werden die Zellen in 1 ml DMEM/F12-Medium resuspendiert und in eine T75-Zellkulturflasche mit 9 ml vorgelegten, erwärmten DMEM-F12 Medium pipettiert. Anschließend werden 40 μ l der G418-Lösung zu der Zelllösung pipettiert. Das G418-Disulfatsalz ist ein Aminoglykosid-Antibiotikum mit ähnlicher Struktur wie Gentamicin, das zur Selektion und Aufrechterhaltung von prokaryotischen und eukaryontischen Zellen (Lai et al. 2007; Wong et al. 2008) verwendet wird, das mit einer iNOS (*Inducible nitric oxide synthase*) - Promotorkonstrukt und einem Neomycin-Resistenzgen transfiziert wurde.

2.2.4 Zellzählung

Die Zellzählung erfolgt für beide Zelllinien gleichermaßen. Die Zellen werden vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und im Medium resuspendiert. Davon werden 0,5 ml der Zellsuspension entnommen und in einem Verhältnis von 1:1 mit dem Farbstoff Trypanblau vermischt. 10 μ l werden in die Zellkammer gegeben und mithilfe des automatischen Zellzählers Countess gezählt.

2.2.5 Aussäen der Zelllinien

Nach der Zellzählung wird die benötigte Zell-Menge (20.000 Zellen in 100 μ l Volumen pro Well) für eine definierte Well-Anzahl berechnet und aus der Flasche entnommen, bevor die Zellen am Boden der Zellkulturflasche wieder anwachsen können. Es ist ebenfalls notwendig, das benötigte Volumen zu berechnen, in dem die gewünschte Zellzahl enthalten ist. Weiterhin sollte vermieden werden, eine zu geringe Anzahl an Zellen zu kultivieren. Dies würde eine Zentrifugation der Zellen mit sich ziehen, um sie in einem geringen Medienvolumen wieder resuspendieren zu müssen. Da vor allem die VM7Luc4E2 Zellen sehr empfindlich sind, reagieren diese auf mechanische Eingriffe verstärkt mit Apoptose. Optimal wäre es, die Zellsuspension mit Medium aufzufüllen, um das benötigte Volumen zu erhalten. Die fertige Zellsuspension mit einer Zellzahl von 20.000 Zellen/ 100 μ l Medium wird mit einer Multistep-Pipette vermischt und jeweils 100 μ l der Zellsuspension werden auf die einzelnen Wells verteilt. Die Platte wird anschließend im Zellkulturschrank (37°C, 5 % CO₂) für 24 h inkubiert.

2.2.6 Messung der Zellviabilität - der Vitalitätsassay

Vor der Durchführung des eigentlichen Estrogen/Ecdyson-Rezeptor-Reportergenassay wird ein Vitalitäts-Assay durchgeführt und etabliert. Dieser dient dazu, eventuelle zelltoxische Effekte der Porenwasserproben und weitere Einschränkungen der Zellviabilität,

die den Rezeptor-Reporterassay verfälschen würden, auszuschließen (Zelltoxizitätstest). Die Auswahl des geeigneten Assays fand unter Beachtung vier wichtiger Kriterien statt.

1. **Messung im Multiplexformat.** Vitalitätstest und Estrogen bzw. Ecdyson-Rezeptor-Reporterassay können nacheinander im selben Well durchgeführt werden. Dies verhindert Abweichungen durch die Messung der beiden Tests auf separaten Platten und reduziert den Arbeitsaufwand.
2. **Keine Lyse:** Da für den zweiten, den ER-Reporterassay, eine Lyse der Zellen erfolgt, muss der Vitalitätstest ohne eine Lyse der Zellen durchführbar sein.
3. **Keine Luciferasemessung.** Das Messprinzip des Rezeptor-Reporterassays beruht auf einer Luciferasemessung, deshalb darf der Zelltoxizitätsassay nicht auf demselben Prinzip beruhen. In diesem Fall würden sich die Messsignale überlagern und wären den einzelnen Tests nicht mehr zuzuordnen.
4. **Hohe Sensitivität der Nachweisbarkeit:** Ein weiteres Kriterium stellt die hohe Sensitivität des Testsystems dar, um die eventuellen Effekte toxischer Substanzen in niedrigen Konzentrationen detektieren zu können.

Alle Bedingungen werden vom Lebend-Protease-Assay erfüllt.

Der Test ist ein nicht-lytischer Fluoreszenztest, der die relative Anzahl lebender Zellen in einer Kulturpopulation nach experimenteller Manipulation misst. Der CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay der Firma Promega misst eine konservierte und konstitutive Proteaseaktivität in lebenden Zellen und dient somit als Marker für die Lebensfähigkeit von Zellen. Die Lebendzell-Protease-Aktivität ist auf intakte lebensfähige Zellen beschränkt und wird unter Verwendung eines fluorogenen, zellpermeablen Peptidsubstrats (Glycylphenylalanyl-Aminofluorocumarin; GF-AFC) gemessen. Das Substrat tritt in intakte Zellen ein, wo es von der intrazellulären Protease gespalten wird, wodurch ein fluoreszierendes Signal erzeugt wird, das proportional zur Anzahl der lebenden Zellen ist. Diese intrazelluläre Protease wird bei Verlust der Integrität der Zellmembran und beim Austritt in das umgebende Kulturmedium inaktiv. Die Fluoreszenz des freien AFC-Fluorophors wird mit einem Mikrotiterplatten-Reader unter Verwendung einer Anregungswellenlänge von 380 nm bis 400 nm und einer Emissionswellenlänge von 505 nm gemessen (Terry et al. 2016) (s. Abb. 2.3).

Zur Durchführung des Tests wird zunächst der fertige CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay (Promega) verwendet, später werden die Reagenzien selbst erstellt. Das GF-AFC Substrat der Firma Promega liegt in einer Konzentration von 100 mM in 10 µl DMSO gelöst vor. Das GF-AFC wird dem Assaypuffer, welches im Kit ebenfalls mitgeliefert wird, in einem Verhältnis von 1 µl GF-AFC Substrat auf 1 ml Assaypuffer vermengt und gut vermischt (GF-AFC-Reagenz). In eigener Herstellung werden 10 mg GF-AFC-Substrat

2 Material und Methoden

(Firma MP Biomedicals) in 230,9 μl DMSO gelöst und liegen somit ebenfalls in einer Konzentration vor, wie im vorher benutzen Kit der Firma Promega. Das Substrat wird in einem 100 mM Natriumacetatpuffer (pH 5,5), der 10 mM 2-Mercaptoethylamin-HCl enthielt, vermischt. Die Bestandteile des selbst erstellten Puffers sind der Tabelle 2.9 zu entnehmen. Die Messung erfolgte mithilfe des Mikrotiterplatten-Readers (Infinite M200 Pro) der Firma Tecan und der Magellan™ Software. Die verwendeten Einstellungen können in Tabelle 2.10 nachgelesen werden.

Tab. 2.9: Verwendete Substanzen mit Mengenangaben zur Herstellung des Puffers für das GF-AFC Substrat. Dabei beziehen sich die Mengen auf ein Gesamtvolumen von 1.000 ml. Die Substanzen werden in Reinstwasser gelöst und mit 1 M HCl oder 1 M NaOH auf einen pH-Wert von 5,5 eingestellt.

Substanzen	Mengen
Natriumacetat (M: 82,03 g/mol)	6,96 g
Essigsäure (M: 60,05 g/mol)	0,91 g
2-Mercaptoethylamin-HCl (M: 113,61 g/mol)	1,13 g
Reinstwasser	ad 1000 ml

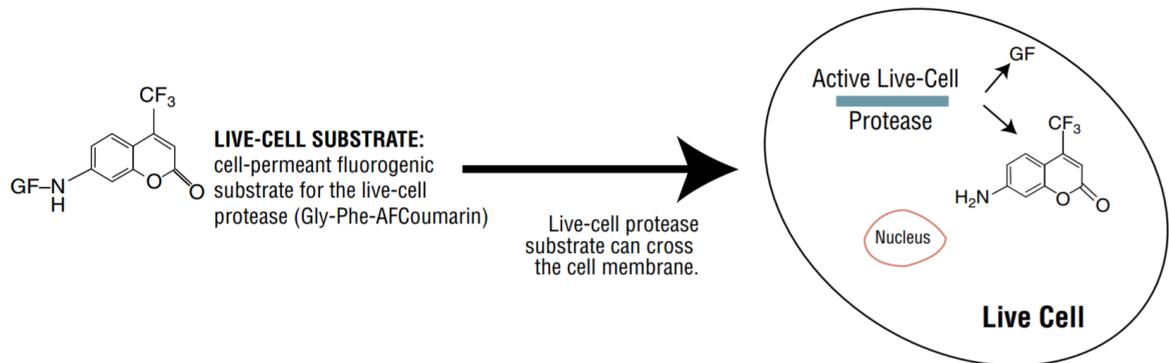


Abb. 2.3: Prinzip des CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assays. Das zelldurchlässige Substrat tritt in die Zelle ein, wo es durch die lebende Zellprotease gespalten wird, um das fluoreszierende AFC zu erzeugen. Die lebende Zellprotease ist in membranbeeinträchtigten Zellen labil und kann das Substrat nicht spalten (Terry et al. 2016).

Tab. 2.10: Verwendete Einstellungen bei der Magellan-Software zur Messung der Fluoreszenz beim Vitalitätstest.

Parameter	Wert
Excitation	390 nm
Emmision	505 nm
Z-Position	15.000 μm
Number of flashes	10
Gain	Optimal
Integration time	20 μs

Die Z-Position gibt dabei an, in welcher Höhe des Wells die Anregung und somit auch die Messung der Emission des Fluorophors erfolgt. Dies wird entsprechend des Angaben des Herstellers eingestellt.

2.2.7 Zelltoxizitätstest

Die akute Toxizität für CHO-K1 und VM7Luc4E2 Zellen wird mit den beiden Substanzen Ethanol (Le et al. 2012; Šarc & Lipnik-Štangelj 2009) und dem von der Firma Promega empfohlenem Wirkstoff Digitonin, dessen zelltoxische Wirkung bekannt ist, (Le et al. 2012; Truman & Hook 2013), experimentell bestimmt. Die Zellen werden einer Konzentrationsreihe der zelltoxischen Substanzen für einen Zeitraum von 24 h ausgesetzt. Der Endpunkt ist die Hemmung der Zellvitalität der beiden Zelllinien im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle (Negativkontrolle). Es wird eine Konzentrations-Wirkungskurve erstellt, um die mittlere Hemmkonzentration EC_{50} (effektive Konzentration) zu bestimmen. Das ist die Konzentration des Stoffes, bei der eine 50%ige Inhibition der Zellvitalität erfolgt (Niss et al. 2018). Diese Konzentrationen werden in künftigen Messungen als Positivkontrolle eingesetzt, um eventuelle zelltoxische Effekte der Porenwasserproben auszuschließen.

20.000 Zellen werden in einer 96er Well-Platte ausplattiert (100 μl Zellsuspension pro Well) und über einen Zeitraum von 24 h anwachsen gelassen. In Anlehnung an Truman & Hook (2013) werden Digitoninkonzentrationen zwischen 0,3 $\mu\text{l}/\text{ml}$ und 30 $\mu\text{l}/\text{ml}$ und Ethanolkonzentrationen zwischen 1,5 und 3,5 % (Le et al. 2012) gewählt. Diese werden in 11-facher Konzentration angesetzt, um 10 μl zu 100 μl Zellsuspension zu pipettieren, damit die gewünschte Konzentration bei einem Gesamtvolumen von 110 μl im Well entsteht. Weitere 24 h später erfolgt die Fluoreszenzmessung mithilfe des CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assays, um die Inhibition der Zellvitalität zu bestimmen. 100 μl der fertigen

Lösung werden zu den Zellen pipettiert. Die Messung im Tecan M200 Pro erfolgte zu Beginn nach 0,5 h, nach 1,0 h und schließlich nach 1,5 h nach Inkubation des Substrats, um den optimalen Zeitmesspunkt bestimmen zu können. Im Verlauf der Etablierung erfolgten die Messungen nach 1,0 h Inkubation.

2.2.8 Messung Zelltoxischer Effekte von Porenwasser

Aus Sedimentproben der Elbe wird durch 20 min Zentrifugation bei 10.000 g und 10°C Porenwasser gewonnen (s. Kapitel 2.2.1). Es erfolgen zwei unterschiedliche Messungen mit Porenwasser in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen.

Die Messungen mit niedrigen Porenwasser-Konzentrationen (G200 bis G3200, Tab. 2.12), sollte die estrogene Aktivität der Proben untersuchen (endokrine Effekte). In diesen Verdünnungsstufen der Proben liegen viele der estrogenaktiven Substanzen in den Konzentrationen vor, in dem ihr Wirkungsbereich liegt. Im ER-Reporter-gen-Assay werden diese hohen Verdünnungsstufen auch auf Zelltoxizität getestet.

Die Messungen mit hohen Porenwasser-Konzentrationen (G0 bis G8, Tab. 2.11) werden zusätzlich durchgeführt. Sie dienen der Beobachtung möglicher zelltoxischer Effekte des Porenwassers und welche Effekte es auf Zellen in hohen Konzentrationen hatte. Hierzu wird ein Vitalitätstest durchgeführt, indem hohe Porenwasser-Konzentrationen auf die Zellen pipettiert werden.

Die beiden adhären Zellen werden vor der Exposition mit dem Porenwasser 24 h lang anwachsen gelassen. Das Medium wird nach 24 h vollständig entnommen. 100 µl der G0 bis G8 Verdünnungen (vermischt mit Porenwasser) werden auf die Zellen gegeben, um anschließend die Vitalität zu messen.

Die Messung niedriger Porenwasser-Konzentrationen (G200 bis G3200) soll die estrogene Aktivität der Proben untersuchen (endokrine Effekte). Im ER-Reporter-gen-Assay werden diese hohen Verdünnungsstufen auch auf Zelltoxizität getestet. Die ausplattierten Zellen (20.000 Zellen in 100 µl Medium) werden zunächst, wie im Test zuvor, 24 h lang anwachsen gelassen. Das Zellmedium wird entnommen und verworfen und 100 µl der angesetzten Verdünnungen, die in Tabelle 2.11 aufgeführt sind, auf die Zellen pipettiert. Nach weiteren 24 h Inkubation wird die Zelltoxizität gemessen, indem 100 µl des GF-AFC-Reagenz auf das Porenwasser mit Zellen pipettiert wird, um eine Stunde später die Messungen zu vernehmen.

Tab. 2.11: Bezeichnung der Verdünnungen G0 bis G8.

Bezeichnung der Verdünnung	Verdünnungsstufe
G0	unverdünnt
G0	1:2
G4	1:4
G8	1:8

Tab. 2.12: Schema der Expositionslösung der Porenwasserproben im ER-Reporter-gen-Assay für die Beispielprobe 1. Die erste Verdünnung ist eine 1:200 Verdünnung, welche mit Medium angesetzt wird.

Aus dieser Verdünnung werden die weiteren Verdünnungen jeweils 1:2 verdünnt bis zu einer Verdünnungsstufe von 1:3200. F = Verdünnungsstufe. Bez. = Bezeichnung. V = Volumen N = Nummer auf der Probenplatte.

Probe	N	F	Bez. F	V in μl	500 μl aus	V Medi- um in μl
1	1.1	1:200	G200	5		995
1	1.2	1:400	G400		1.1	500
1	1.3	1:800	G800		1.2	500
1	1.4	1:1600	G1600		1.3	500
1	1.5	1:3200	G3200		1.4	500

Das Schema in Tabelle 2.12 wird für jede Probe vorbereitet, um im Multiplexformat zuerst die Vitalitätsmessung der Zellen zu messen und im Anschluss den ER-Reporter-gen-Assay durchzuführen.

2.2.9 Untersuchung hormoneller Aktivität der Sedimentproben mittels Estrogen- und Ecdyson-Rezeptor-Reporter-gen Assays

Zur Detektion estrogener Chemikalien wird einer der empfindlichsten und in hohem Maße reagierenden Reporter-gen-Assays, die heutzutage verfügbar sind, der Estrogen-Rezeptor vermittelte chemisch aktivierte Luciferase Genexpressions-Assay, verwendet (J. Legler et al. 1999). Dieser Test basiert auf einer humanen Brustadenokarzinom-Zelllinie (TD47), die die endogenen, intrazellulären Estrogen-Rezeptoren $ER\alpha$ und $ER\beta$ enthält, das stabil mit dem Luciferasegen des Glühwürmchens (*Photinus pyralis*) unter der Transkriptionskontrolle von drei EREs transfiziert ist.

2 Material und Methoden

Die Exposition von Zellen gegenüber endokrinen Disruptoren führt zur Rezeptoraktivierung und anschließender Synthese von Luciferase. Die Menge an produzierter Luciferase ist direkt proportional zu der Menge an estrogenem Potenzial der Verbindung(en), der die Zellen ausgesetzt werden. Die Menge an Luciferase wird durch Zugabe ihres Substrats Luciferin gemessen, das durch Luciferase in einer Reaktion, in der Licht emittiert, oxidiert wird (s. Abb. 2.4). Auf diese Weise deckt der Test alle Ereignisse ab, die an der Rezeptor-Transaktivierung beteiligt sind, von der Aufnahme der Verbindung durch die Zelle bis zur Synthese von Proteinen (Houtman 2007). Somit wird in diesem Assay der E2-Äquivalenz-Wert (J. Legler et al. 1999) ermittelt.

Vor der Messung der estrogenen Aktivität im Porenwassers wird eine E2-Kalibriergerade für die Validierung des späteren Messverfahrens mit den Porenwasser-Proben erstellt, um die Zuverlässigkeit der Messungen festzulegen. Dabei werden aus einer 1 mM E2-Stammlösung, gelöst in DMSO, unterschiedliche E2-Konzentrationen hergestellt (Tab. 2.13).

Tab. 2.13: Angesetzte E2-Kalibriergerade in aufsteigender Konzentration in nM. Aus der 1 mM E2-Stammlösung wird eine Verdünnungsreihe erstellt, welche mit DMSO verdünnt werden, um die folgenden Konzentrationen zu erhalten. P = Bezeichnung auf der Wellplatte.

P	E0	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7
E2 (nM)	0	0,03	0,1	0,3	1,0	3,0	10	30

Von den in Tabelle 2.13 angesetzten E2-Lösungen werden jeweils 5 μ l entnommen und zu 995 μ l Medium pipettiert, um ein Endvolumen von 1000 μ l zu erreichen. Davon werden 100 μ l in das entsprechende Well auf der Platte pipettiert. Im Well ergeben sich dann folgende Endkonzentrationen (Tab. 2.14):

Tab. 2.14: Finale E2-Konzentrationen in pM im Well. P = Bezeichnung auf der Wellplatte.

P	E0	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7
E2 (pM)	0	0,15	0,5	1,5	5,0	15	50	150

Nach der Vitalitätsmessung wird die Flüssigkeit aus den Wells entnommen und mit 50 μ l Lysepuffer bedeckt. Die Zellen lysieren bei $<25^{\circ}\text{C}$ und werden 10 min lang auf einem

Laborschüttler geschwenkt. In der Zwischenzeit werden die Schläuche des Multiplattenreaders Tecan F200 mit Reinstwasser gespült und anschließend mit 1500 μl Glowmix gefüllt, um nach zehnmütigen Inkubation die Proben direkt messen zu können. Die Platte wird anschließend im Tecan F200 vermessen. Der Messvorgang estrogener Komponente wird mithilfe der iControl Software vorprogrammiert. Dabei werden zu Beginn 100 μl Glow-Mix auf die Zellen pipettiert, die Lichtfreisetzung wird gemessen und anschließend wird die Reaktion mit 100 μl der 0,2 M NaOH-Lösung gestoppt, um die Ausstrahlung des Lichts in andere Wells zu verhindern.

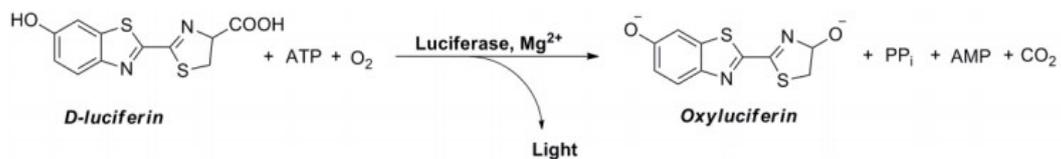


Abb. 2.4: Chemische Reaktion von Luciferin und Luciferase aus roten Glühwürmchen. Licht mit einem Emissionsmaximum von 613 nm wird aus der Oxidation von D-Luciferin durch rote Glühwürmchen-Luciferase in einer ATP-abhängigen Reaktion erzeugt (Tatsumi et al. 1989).

Für die Ermittlung des ecdysonen Potentials wird entsprechend die rezeptorvermittelte ecdysone Aktivität ermittelt. Dieser Assay beruht auf demselben Prinzip wie der ER-Reportergen-Assay. Die detektierten Effekte werden als 20E Äquivalenz-Werte ausgedrückt.

3 | Ergebnisse

Dieses Kapitel gibt eine Übersicht über die Ergebnisse, angefangen bei der Etablierung des Zelltoxizitätstests mit Ethanol und Digitonin für beide Zelllinien. Es folgen die gemessenen zytotoxischen Effekte des untersuchten Porenwassers. Im Anschluss daran wurde der ER-Reportergen-Assay mit Porenwasserproben durchgeführt. Der Assay schließt eine vorherige Zelltoxizitätsmessung des Porenwassers ein, gefolgt von der Erstellung einer E2-Kalibriergerade und anschließender Messung estrogener Effekte der Proben.

3.1 Etablierung des Zelltoxizitätstests

Ethanol und Digitonin wurden auf ihre Eignung hin getestet, die Sensitivität der Zellen reproduzierbar kontrollieren zu können (Positivkontrolle). Ziel war es, 5-6 Messwerte zu finden, die eine Inhibition der Zellen zwischen 20 und 80 % herbeiführen. Nach Zugabe der toxischen Substanz wurde 24 h später das GF-AFC-Reagenz auf die Zellen gegeben mit anschließender Fluoreszenzmessung nach unterschiedlichen Inkubationszeiträumen mit dem Reagenz. Alle Ergebnisse werden als Proteaseinhibitionswerte in % im Vergleich zur Negativkontrolle, welche aus reinem Medium besteht, angegeben.

3.1.1 Zelltoxizität mit Ethanol

Der erste Versuch zur Eignung als Positivkontrolle wurde mit Ethanol in unterschiedlichen Konzentrationen an beiden Zelllinien durchgeführt. Dabei wurden unterschiedliche Inkubationszeiträume nach Zugabe des GF-AFC-Reagenz getestet.

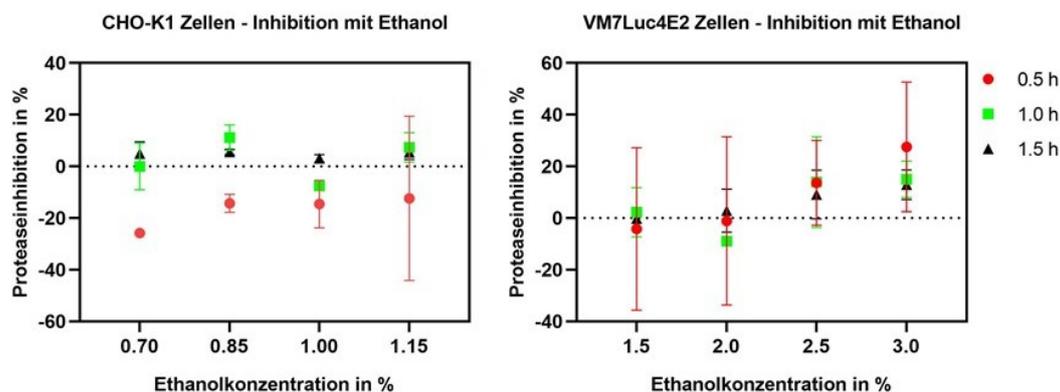


Abb. 3.1: Exposition der CHO-K1 Zellen (links) und VM7Luc4E2 Zellen (rechts) mit Ethanol nach 24-stündiger Inkubation bei Konzentrationen zwischen 0,7% und 1,15% (links) und 1,5% und 3,0% (rechts). Die Inhibition wird auf der Y-Achse in Prozent dargestellt. Nach Zugabe des GF-AFC-Reagenz wurden die Messungen nach 0,5 h, 1,0 h und 1,5 h durchgeführt.

Abbildung 3.1 zeigt die Inhibition mit Ethanol beider Zelllinien. Die Messwerte weichen bei unterschiedlich langen Inkubationszeiträumen mit dem GF-AFC-Reagenz bei den CHO-K1 Zellen stärker voneinander ab als bei den VM7Luc4E2 Zellen. Die Messergebnisse der VM7Luc4E2 Zellen weisen eine sehr hohe Standardabweichung auf, was anhand der Fehlerbalken in der rechten Abbildung graphisch ersichtlich wird.

3.1.2 Zelltoxizität mit Digitonin

Die nächste experimentelle Messung wird mit Digitonin durchgeführt. Eine gute Möglichkeit, einen geeigneten Konzentrationsbereich zu ermitteln besteht darin, Vorversuche über mehrere Konzentrations-Größenordnungen durchzuführen (Rangefinding). Truman & Hook (2013) zeigten, dass ein Zusatz von 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Digitonin eine 80-90%ige Inhibition der Zellen herbeiführte. Dieser Wert wurde als höchster Orientierungswert gesetzt. Um einen Inhibitionsbereich zwischen 20 und 80% zu erreichen, wurde eine Messung mit zwei niedrigeren Konzentrationen durchgeführt. Ausgehend vom Orientierungswert wurden die Konzentrationen hierfür jeweils um den Faktor zehn verdünnt.

3 Ergebnisse

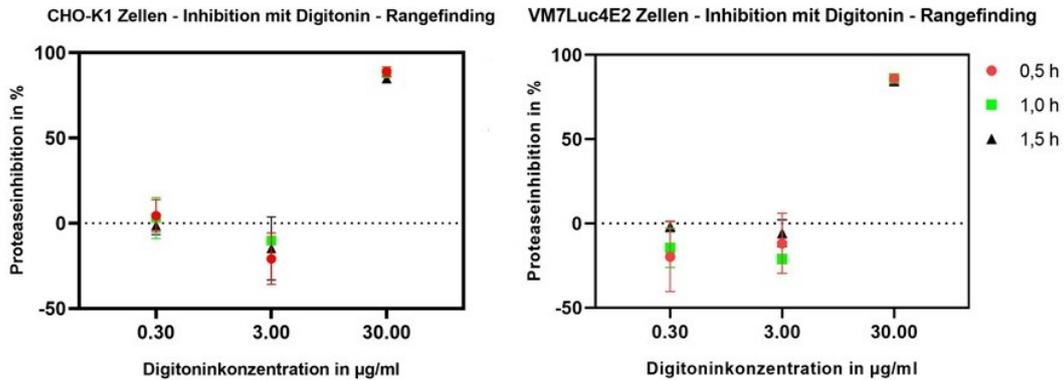


Abb. 3.2: Exposition der CHO-K1 Zellen (links) und VM7Luc4E2 Zellen (rechts) mit Digitonin nach 24-stündiger Inkubation bei Konzentrationen zwischen 0,3 µg/ml und 30 µg/ml. Die Inhibition wird auf der Y-Achse in Prozent dargestellt. Nach Zugabe des GF-AFC-Reagenz wurden die Messungen nach 0,5 h, 1,0 h und 1,5 h durchgeführt.

In Abbildung 3.2 ist zu erkennen, dass bei einer Konzentration von 0,3 µg/ml und 3 µg/ml keine Inhibition stattfindet und bei 30 µg/ml fast 90 % inhibiert werden. Die nächsten Konzentrationen wurden zwischen 5 µg/ml und 30 µg/ml in 5 µg/ml-Abstand gesetzt und gemessen. Die gemessenen Werte nach 1,0 h und 1,5 h Stunden Inkubation mit dem GF-AFC-Reagenz hatten eine Standardabweichung von 2,4 %; Bei dieser geringen Abweichung wurde im Folgenden auf die Messung nach 1,5 h Inkubationszeit mit dem GF-AFC-Reagenz verzichtet.

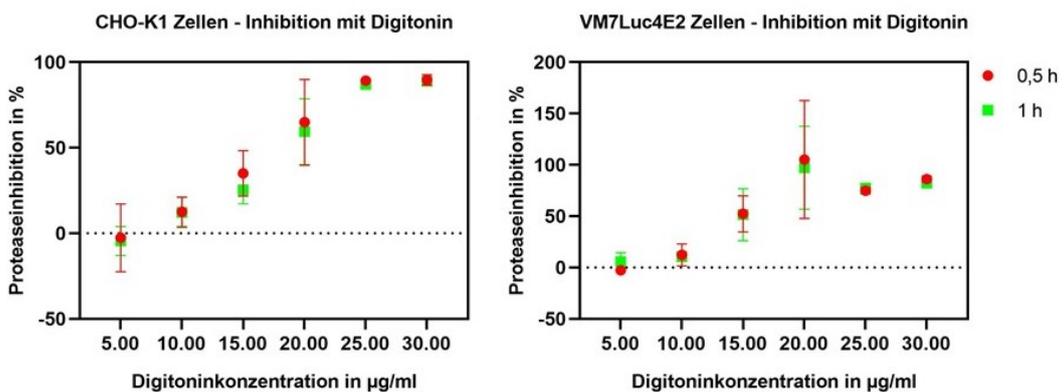


Abb. 3.3: Exposition der CHO-K1 Zellen (links) und VM7Luc4E2 Zellen (rechts) mit Digitonin nach 24 stündiger Inkubation bei Konzentrationen zwischen 5 µg/ml und 30 µg/ml. Die Inhibition wird auf der Y-Achse in Prozent dargestellt. Nach Zugabe des GF-AFC-reagenz wurden die Messungen nach 0,5 h, und 1,0 h durchgeführt.

Die Inhibition der letzten beiden Konzentrationen von 25 µ/ml und 30 µ/ml in Abbildung 3.3 wiesen bei CHO-K1 Zellen und VM7Luc4E2 Zellen im Diagramm einen geringen

Inhibitionsunterschied auf. Es wurde ein Signifikanztest mit GraphPad Prism durchgeführt. Dieser berechnet die Wahrscheinlichkeit, mit welcher die gemessenen Ergebnisse als Replikate angesehen werden können (S-Test). Der S-Test zeigte eine Wahrscheinlichkeit von 97,8 % bei VM7Luc4E2 und eine Wahrscheinlichkeit > 99,9 % bei CHO-K1 Zellen, dass die Werte als Replikate angesehen werden können. Aufgrund des geringen Unterschieds konnte die Digitoninkonzentration von 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in künftigen Messungen entfallen. Bei einer Konzentration von 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ wurden keine Inhibition festgestellt.

Somit wurde die Konzentrationsreihen nochmals angepasst und zwischen 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -Stufen vermessen (s. Abb. 3.4 und 3.5). Diese Messungen wurden bei beiden Zelllinien jeweils in dreifacher Ausführung in drei Tests an unterschiedlichen Tagen durchgeführt, um die Ergebnisse als Replikate ansehen zu können (siehe Übersicht in Tab. 3.1). Die Messung erfolgte jeweils nach 1,0 h Inkubationszeit mit dem GF-AFC-Reagenz. Die Entscheidung fiel auf 1,0 h, da im technischen Bulletin der Firma Promega für den CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay eine Mindestinkubation des Substrats von 0,5 h angegeben wurde und eine ausreichend lange Inkubationszeit gewährleistet werden sollte. Der S-Wert zeigte außerdem, dass die Werte zwischen 0,5 h und 1,0 h bei VM7Luc4E2 bei 92,84 % und bei CHO-K1 Zellen bei 87,53 % lagen.

Tab. 3.1: Bezeichnungsübersicht der Replikate bei Test 1, 2 und 3 zur Etablierung des Zelltoxizitätstests.

Test	Replikat 1	Replikat 2	Replikat 3
1	1-1	1-2	1-3
2	2-1	2-2	2-3
3	3-1	3-2	3-3

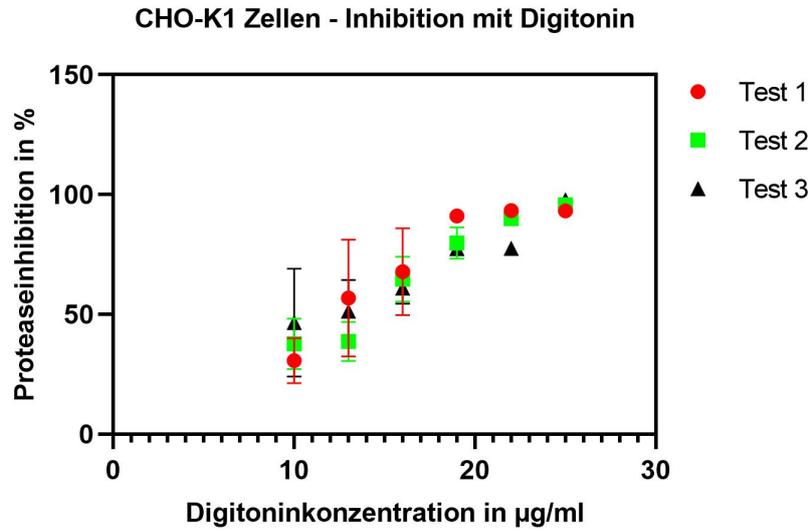


Abb. 3.4: Drei Messungen wurden mit CHO-K1 Zellen bei Digitonin-Konzentrationen zwischen 10 µg/ml und 25 µg/ml durchgeführt. Der Abstand der Messwerte beträgt jeweils 3 µg/ml. Die Inhibition wird auf der Y-Achse in Prozent dargestellt. Nach Zugabe des GF-AFC-Reagenz wurde die Messungen 1,0 h durchgeführt.

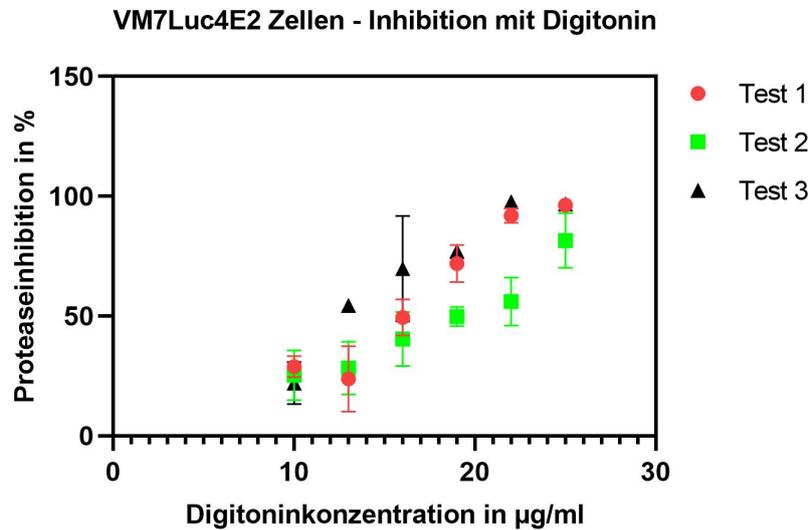


Abb. 3.5: Drei Messungen wurden mit VM7Luc4E2 Zellen bei Digitonin-Konzentrationen zwischen 10 µg/ml und 25 µg/ml durchgeführt. Der Abstand der Messwerte beträgt jeweils 3 µg/ml. Die Inhibition wird auf der Y-Achse in Prozent dargestellt. Nach Zugabe des GF-AFC-Reagenz wurde die Messungen 1,0 h durchgeführt.

Anhand der gemessenen Inhibitionen kann die Konzentrations-Wirkungs-Kurve (KWK), und somit der EC_{50} -Wert, mithilfe der Software GraphPad Prism erstellt werden. Ver-

wendet wurde die Gleichung in den Einstellungen „log(agonist) vs. response – variable slope“. Diese Gleichung wird dann angewendet, wenn X Werte Logarithmen von Konzentrationen sind. Viele logarithmische Dosis-Wirkungs-Kurven folgen der bekannten symmetrischen Sigmoidfunktion. Das Ziel ist es, die EC_{50} des Agonisten zu bestimmen – die Konzentration, die eine Antwort auf halbem Weg zwischen der basalen (Bottom) und der maximalen (Top) Antwort hervorruft. In der Regel haben Dosis-Wirkungs-Kurven eine Standardneigung von 1,0. Dieses Modell geht nicht von einer Standardneigung aus, sondern passt die Daten eher an die Steigung an und wird daher als variables Neigungsmodell bezeichnet. Dies ist vorzuziehen, wenn viele Datenpunkte vorhanden sind (GraphPadPrism 2018).

Nach der Erstellung der KWK wurde im Anschluss ein Signifikanztest durchgeführt, um die Wahrscheinlichkeit zu berechnen, mit welcher die gemessenen Ergebnisse als Replikat angesehen werden können. Zuerst wurde von jedem einzelnen Test bei CHO-K1 und VM7Luc4E2 Zellen die KWK erstellt und in Abbildung 3.6 graphisch dargestellt. Danach werden die Triplikate (Ergebnisse dreier nebeneinander liegender Wells) jedes Tests als ein Test mit neun Replikaten angesehen (Abb. 3.6). Die Einstellungen, welche in GraphPad Prism für die Berechnungen gewählt wurden, sind der Tabelle 3.2 zu entnehmen:

Tab. 3.2: Verwendete Einstellungen in GraphPad Prism zur Kreierung einer KWK und Ermittlung des EC_{50} -Wertes.

Dateiformat	XY
Y-Achse	9 Replikate
Analyse	Transform Concentrations (X) transform to logaithms (log10), Nonlinear regression (curve fit)
Equation	Dose-response - Stimulation: log(agonist) vs. Response - variable slope (four parameters)

3 Ergebnisse

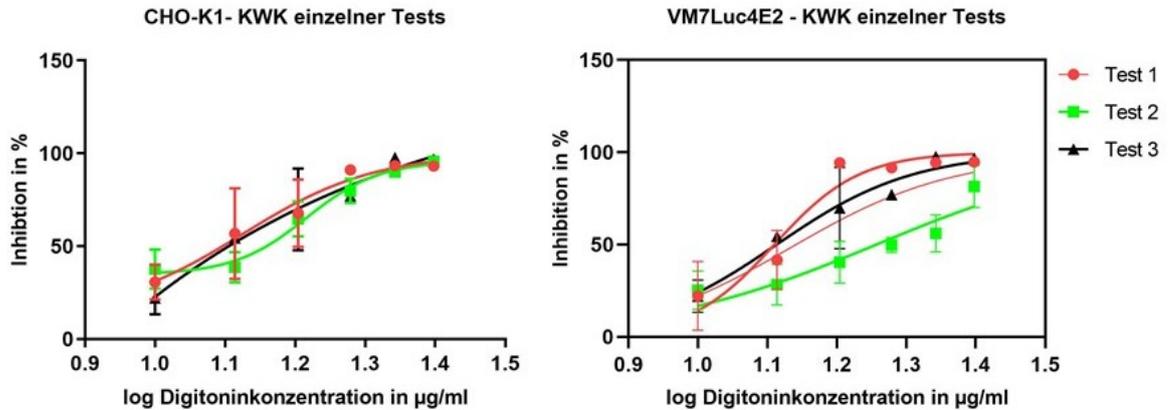


Abb. 3.6: Aus den Messungen in Abbildung 3.4 und 3.5 wurde mithilfe der Software GraphPad Prism die Konzentrations-Wirkungs-Kurve (KWK) von Test 1, 2 und 3 bestimmt. Jeder Punkt in der Kurve wurde als Mittelwert von Triplikaten bestimmt.

Bei den Tests handelt es sich um an verschiedenen Tagen durchgeführte Experimente. Die CHO-K1 Zellen (links) hatten teilweise stark abweichende Werte, die mithilfe von GraphPad Prism als Ausreißer identifiziert werden konnten. Die Abbildung 3.7 zeigt das Ergebnis mit Ausreißer (links) und ohne (rechts). Dabei handelt es sich bei den beiden Ausreißern um die Replikate 1-3 und 3-2. Beim Replikat 1-3 konnte der Steigungsfaktor nicht berechnet werden und beim Replikat 3-2 kein EC_{50} -Wert.

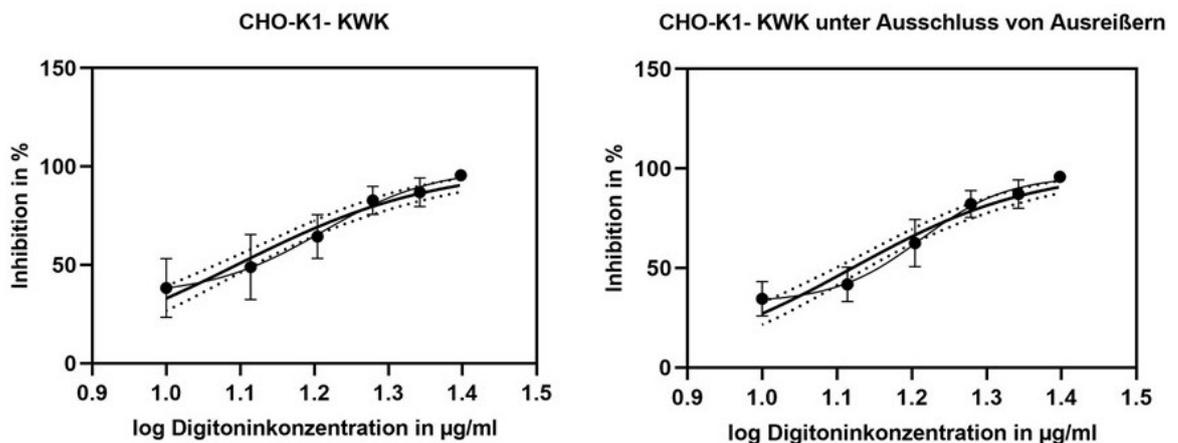


Abb. 3.7: Die linke Abbildung zeigt eine KWK, bei der alle Messwerte mit in die Bewertung eingebracht wurden. Die rechte Abbildung zeigt eine KWK, bei der Ausreißer 1-3 und 3-2 aus der Bewertung herausgenommen wurden. Zu erkennen ist, dass die Werte in der linken Abbildung eine größere Standardabweichung bei den ersten beiden Werten aufweisen. Die gepunkteten Linien zeigen den Mittelwert und Fehlerbereich der nichtlinearen Regression an.

Die Qualitätswerte der KWK in Abbildung 3.7 werden zusammengefasst als Übersicht in Tabelle 3.3 dargestellt.

Tab. 3.3: Vergleich der Qualitätswerte der KWK mit und ohne Ausreißer für CHO-K1 Zellen mit der toxischen Substanz Digitonin zur Auswertung des Signifikanztests.

Qualitätswerte	CHO-K1 KWK mit Ausreißer	CHO-K1 KWK ohne Ausreißer 1-3 und 3-2
R ²	0,7949	0,9002
Sum of squares	5969	2450
S-Test	> 99,99 %	> 99,99 %

Tabelle 3.3 zeigt die Unterschiede des Signifikanztests bei CHO-K1 Zellen mit und ohne der Ausreißern 1-3 und 3-2. Das Bestimmtheitsmaß R² der KWK mit Ausreißern ist niedriger, als ohne. Auch die Summe der Quadrate (sum of squares) mit Ausreißern zeigt einen mehr als doppelt so hohen Wert im Vergleich zu den Werten ohne Ausreißer. In beiden Fällen liegt die Wahrscheinlichkeit, dass die Werte als Replikate angesehen werden können, bei > 99,99 %.

Die Schwankungen der Digitoninkonzentrationen bei VM7Luc4E2 Zellen waren zu groß, um eine KWK zu erstellen (Abb. 3.6 rechts). Es fand ein Vergleich der drei Wells pro Test statt, um zu überprüfen, ob die drei Wells Replikate darstellen. Es folgte ein Vergleich zwischen Test 2 und 3 und im Anschluss der Vergleich aller Tests miteinander, ob die Signifikanz gegeben ist, die Werte als Replikate anzusehen. Die Ergebnisse sind Tabelle 3.5 zu entnehmen. Die verwendete Methode zur Feststellung der Signifikanz ist Akaikes Information Criteria (AIC).

3 Ergebnisse

Tab. 3.4: Verwendete Einstellungen in GraphPad Prism zur Kreierung einer KWK und Ermittlung des EC50-Wertes.

Dateiformat	XY
Y-Achse	3 Replikate
Analyse	Transform Concentrations (X) transform to logaithms (log10), Nonlinear regression (curve fit)
Model	log(agonist) vs. Response - Variable slope (four parameters)
Compare	Does one curve adequately fit all the data sets?
Comparison method	<i>Akaike's Information Criteria (AIC)</i>

Tab. 3.5: Errechnete Qualitätswerte des Signifikanztests mithilfe der Software GraphPad Prism für die jeweiligen Tests. Es wurde zunächst die Wahrscheinlichkeit ermittelt, mit der die gemessenen Triplikate der Tests als Replikate betrachtet werden können. Danach wurde Test 2 und 3 und im Anschluss Test 1, 2 und 3 miteinander verglichen.

Test	p-value in %	S-Test in %
1	0,4	11,92
2	7,11	95,84
3	20,01	98,98
2 und 3	< 0,01	< 0,01
1, 2 und 3	< 0,01	< 0,01

AIC basiert auf einer Informationstheorie. Findet ein statistisches Modell zur Darstellung eines Prozesses Anwendung, welches der Generierung von Daten dient, so wird die Darstellung mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht genau sein. In Folge dessen gehen stets einige Informationen verloren. AIC schätzt die relativen Informationen, die durch ein bestimmtes Modell verloren gehen, folgendermaßen ein: Je weniger Informationen ein Modell verliert, desto höher ist die Qualität dieses Modells. Bei der Abschätzung der verlorenen Informationen geht die AIC auf den Kompromiss zwischen der Anpassungsgüte des Modells und der Einfachheit des Modells ein (Akaike 2011).

Für die Berechnung des p-values wurde die Vergleichsmethode „Extra sum-of-square F test“ angewendet.

Das Ergebnis zeigt, dass im ersten Test alle drei Messwerte sehr stark voneinander abweichen und nicht durch eine Kurve ausgedrückt werden können; sie sind somit keine Replikate. Beim zweiten und dritten Test können die drei Messwerte als Replikate angesehen werden. Die Erstellung einer Kurve beider Tests ist möglich und ist im zweiten Test mit einer 95,84 % und im dritten Test einer 98,98 %igen Wahrscheinlichkeit richtig. Dies sagt aus, dass eine Kurve erstellt werden kann, die alle drei Datenreihen für Test 2 und 3 ausdrückt. Es können jedoch nicht alle drei Tests miteinander verglichen werden, da der erste Test zu stark von den anderen beiden abweicht. Der Vergleich zwischen Test 2 und 3 zeigt, dass die Kurven bezüglich der Steigung und Form des Anstiegs zwar sehr ähnlich aussehen, von der Höhe der Messwerte jedoch sehr verschieden sind.

Die Schwankungsbreite des ermittelten EC_{50} -Werts der Digitoninkonzentration liegt für CHO-K1 Zellen liegt im Bereich zwischen $11,65 \mu\text{g/ml}$ und $13,17 \mu\text{g/ml}$. Im Test wurde ein Mittelwert der Bereiche gebildet und eine Digitoninlösung mit einer Konzentration von $12,41 \mu\text{g/ml}$ angesetzt. Der EC_{50} -Bereich für VM7Luc4E2 Zellen war schwer zu berechnen, da die Intervalle der einzelnen Werte sehr stark voneinander abwichen. Der errechnete EC_{50} -Wert lag in einem Intervall zwischen $13,04 \mu\text{g/ml}$ und $15,36 \mu\text{g/ml}$. Im Test wurde die mittlere Konzentration von $14 \mu\text{g/ml}$ angesetzt, jedoch ist diese sehr kritisch zu betrachten, da der Signifikanztest ausgesagt hat, dass die gemessenen Werte nicht als Replikate angesehen werden können.

3.1.3 Messung zelltoxischer Effekte von Porenwasser

Nachdem die Zellen 24 h lang in der 96er Well-Platte anwachsen, wurde das Medium mit einer Pipette entfernt. In jedes Well werden $100 \mu\text{l}$ eines Porenwasser-Medium-Gemisches in vier Verdünnungsstufen (G0 bis G8) pipettiert. So enthält das erste Well reines Porenwasser. Die Konzentrationen in jedem weiteren Well werden im Verhältnis 1:2 mit Medium verdünnt. Die Ergebnisse sind Abbildung 3.8 zu entnehmen.

3 Ergebnisse

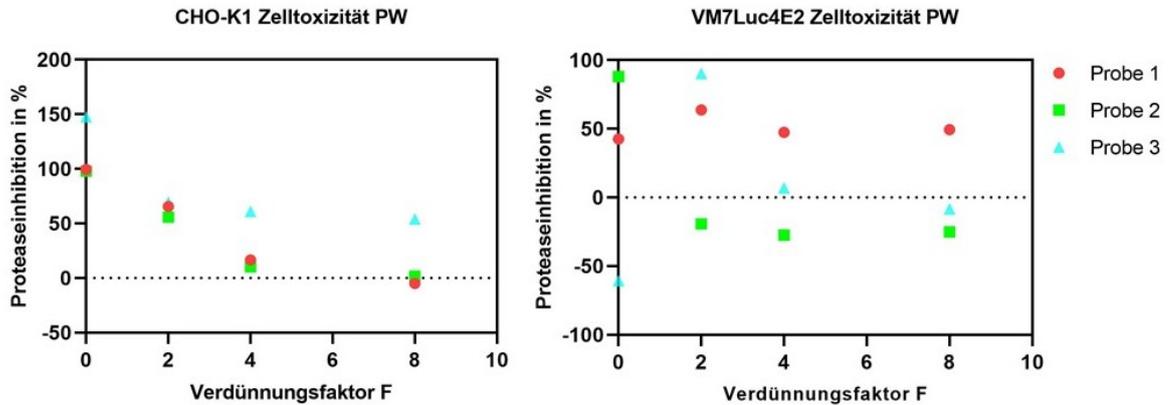


Abb. 3.8: Messung der Zelltoxizität der Proben 1, 2 und 3. Dabei wurde das Porenwasser mit Medium in vier unterschiedlichen Konzentrationen angesetzt. Die unverdünnte Probe enthält reines Porenwasser, die nächsten drei Proben werden jeweils in einem Verhältnis von 1:2 mit entsprechendem Medium verdünnt bis zur höchsten Verdünnungsstufe 1:8. Die unterschiedlichen Verdünnungsstufen werden gegen die Proteaseinhibition in % aufgetragen.

Die Inhibition der CHO-K1 Zellen mit Porenwasser sinkt mit kleiner werdenden Porenwasserverdünnungen. Für die Porenwassermessung der VM7Luc4E2 Zellen standen mehr Porenwasserproben zur Verfügung. Auch bei dieser Messung ist bei fast allen Proben eine Abnahme der Inhibition zu sehen, obwohl die Probe 1 und 3 zuerst einen starken Anstieg erfahren und dann wieder absinken. Beim nächsten Test wurde das Porenwasser mit Reinstwasser verdünnt, anstatt mit Medium. Das Ergebnis in Abbildung 3.9 zu betrachten.

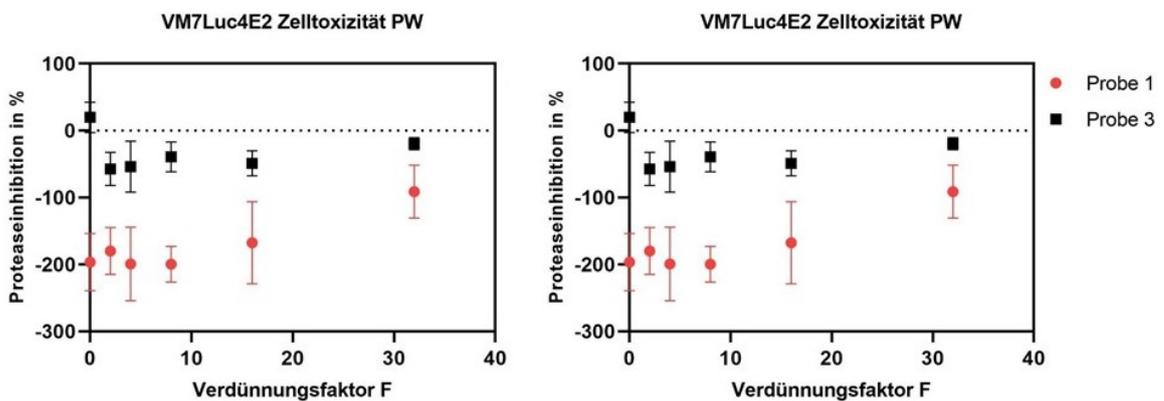


Abb. 3.9: CHO-K1 Zellen (links) und VM7Luc4E2 Zellen (rechts) werden mit 2 Porenwasserproben auf Toxizität gemessen. Dabei wurde das Porenwasser mit sterilem Reinstwasser in sechs unterschiedlichen Konzentrationen angesetzt. Die unverdünnte Probe enthält reines Porenwasser, die nächsten drei Proben werden jeweils in einem Verhältnis von 1:2 mit Reinstwasser verdünnt bis zur höchsten Verdünnungsstufe 1:32. Die unterschiedlichen Verdünnungsstufen werden gegen die Proteaseinhibition in % aufgetragen.

Die Werte in Abbildung 3.9 zeigen in der linken Abbildung den Verlauf der Zelltoxizität der Probe 1 und 3 bei CHO-K1 Zellen und in der rechten Abbildung die Zelltoxizität der gleichen Proben bei VM7Luc4E2 Zellen. Die gemessenen Proteaseinhibitionen im Vergleich zur Negativkontrolle werden in Tabelle 3.6 in % dargestellt. Die Negativkontrolle wurde mit Reinstwasser inkubiert.

Es ist eine große Schwankung der Werte bei jeder Probe und Zelllinie in Abbildung 3.9 zu erkennen.

Tab. 3.6: Berechnete Zelltoxizität der Zellen CHO-K1 und VM7Luc4E2 der Probe 1 und 3 nachdem das Porenwasser mit Reinstwasser verdünnt wurde. Die Werte werden als Proteaseinhibition in % angegeben. Eine Negativkontrolle, die mit Reinstwasser behandelt wurde, diente als Referenz

CHO-K1		VM7Luc4E2	
Probe 1	Probe 3	Probe 1	Probe 3
-429,37	-1618,41	-196,51	19,77
-1302,8	1302,79	-179,87	-57,06
230,07	14,01	-199,11	-53,71
-5153,15	698,71	-199,53	-39,14
-739,16	377,08	-167,49	-48,91
-755,94	352,98	-91,31	-19,56

Abbildung 3.6 zeigt sehr stark schwankende Werte bei jeder Probe und Zelllinie.

3.2 Untersuchung hormoneller Aktivität der Sedimentproben mittels Estrogen- und Ecdyson-Rezeptor-Reportergergen Assays

Vor dem Ausplattieren der Zellen lag die gemessene Vitalität von VM7Luc4E2 Zellen bei 54 %. Nach der Vorbereitung der E2- und Porenwasser-Lösungen wurde zuerst die Vitalität gemessen und anschließend der ER-Reportergergen-Assay durchgeführt.

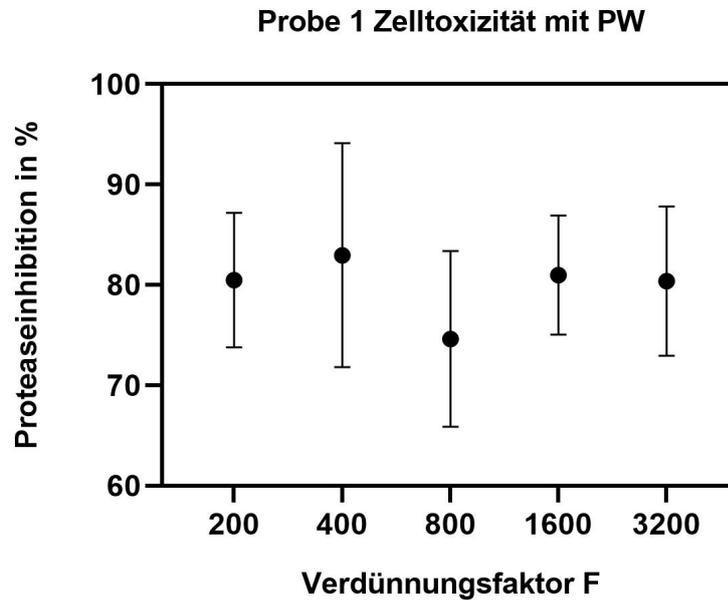


Abb. 3.10: Inhibition der VM7Luc4E2 Zellen mit Porenwasser in unterschiedlichen Verdünnungsstufen (1:200 bis 1:3200).

Abbildung 3.10 zeigt die Vitalitätsmessung der VM7Luc4E2 Zellen vor der ersten Luciferasemessung. Die Porenwasserkonzentration im Medium hat die geringste Verdünnung bei 1:200 und die höchste bei 1:3200. In den ersten beiden Verdünnungen steigt die Inhibition, bei der Verdünnung von 1:800 sinkt sie wieder, um bei der nächsten Verdünnung wieder anzusteigen. Im Anschluss wurde die E2-Kalibriergerade vermessen. Die Werte werden in RLU (*relative light unit*) angegeben:

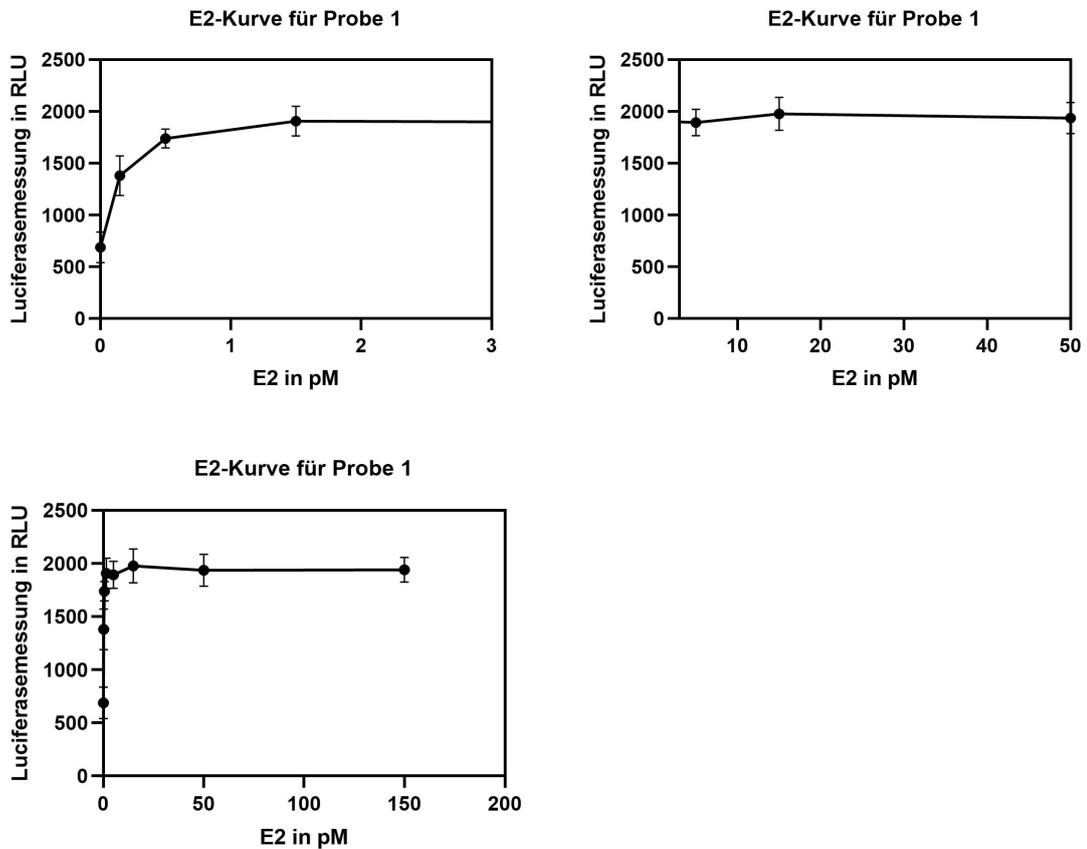


Abb. 3.11: E2-Kalibriergerade für die Probe 1. Links oben sind die Konzentrationen zwischen 0 pM und 3 pM aufgezeichnet, wobei die Luciferasemessung bis 0,5 pM ansteigt und dann konstant bleibt. Zwischen 1,5 pM und 50 pM (rechts oben) ändern sich die Messwerte kaum. Rechts unten ist die komplette Kalibriergerade aufgezeichnet. Zwischen 15 pM und 150 pM bleibt die Luciferasemessung konstant. Die separaten Diagramme in unterschiedlichen Intervallen dienen der besseren Übersicht.

Abbildung 3.11 zeigt die erste E2-Kalibrierung für die Probe 1. Ab einer Konzentration von 15 pM wurde keine höhere Lichtemission gemessen. Im Anschluss wurden die Porenwasserproben vermessen. Das Ergebnis zeigt Abbildung 3.12.

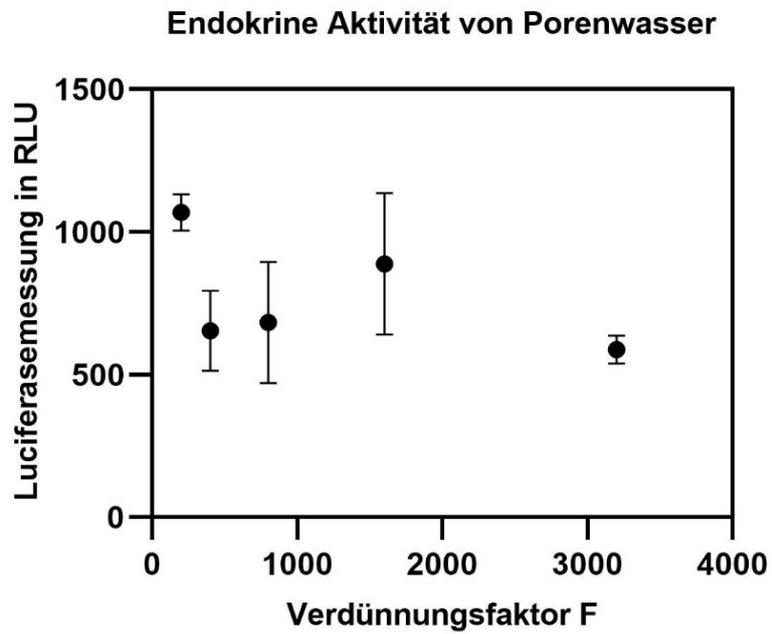


Abb. 3.12: Estrogene Wirkung der Probe 1 in den Verdünnungen 1:200 bis 1:3200 auf VM7Luc4E2 Zellen. Die Messwerte sinken zuerst von über 1000 RLU auf etwa 600 RLU ab, steigen dann wieder bis fast 900 RLU, um dann wieder auf etwa 600 RLU zu sinken.

Die nächsten Messungen wurden mit den Proben 1, 2 und 3 im Multiplexformat mit vorangegangenem Vitalitätstest der VM7Luc4E2 Zellen durchgeführt.

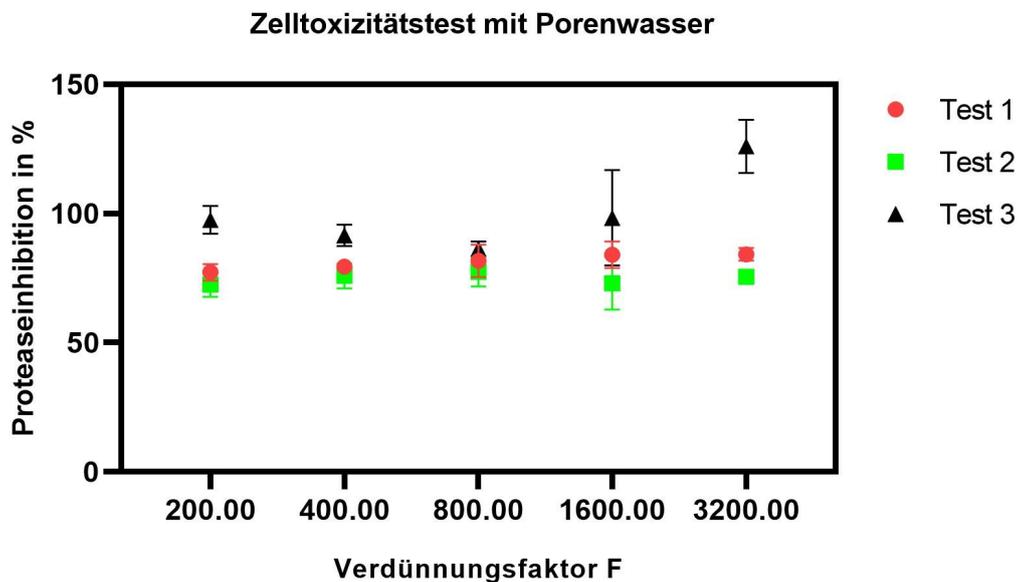


Abb. 3.13: Inhibition der VM7Luc4E2 Zellen mit PW der Proben 1, 2 und 3 in unterschiedlichen Verdünnungsstufen (1:200 bis 1:3200).

Abbildung 3.17 zeigt eine Inhibition von über 70% bei allen Verdünnungsstufen mit PW der VM7Luc4E2 Zellen mit den vermessenen Proben 1, 2 und 3. Es folgt der ER-Reportgen-Assay, wobei die Kalibriergerade zuerst gemessen wurde und zum Schluss die estrogenen Aktivität der Porenwasserproben.

3 Ergebnisse

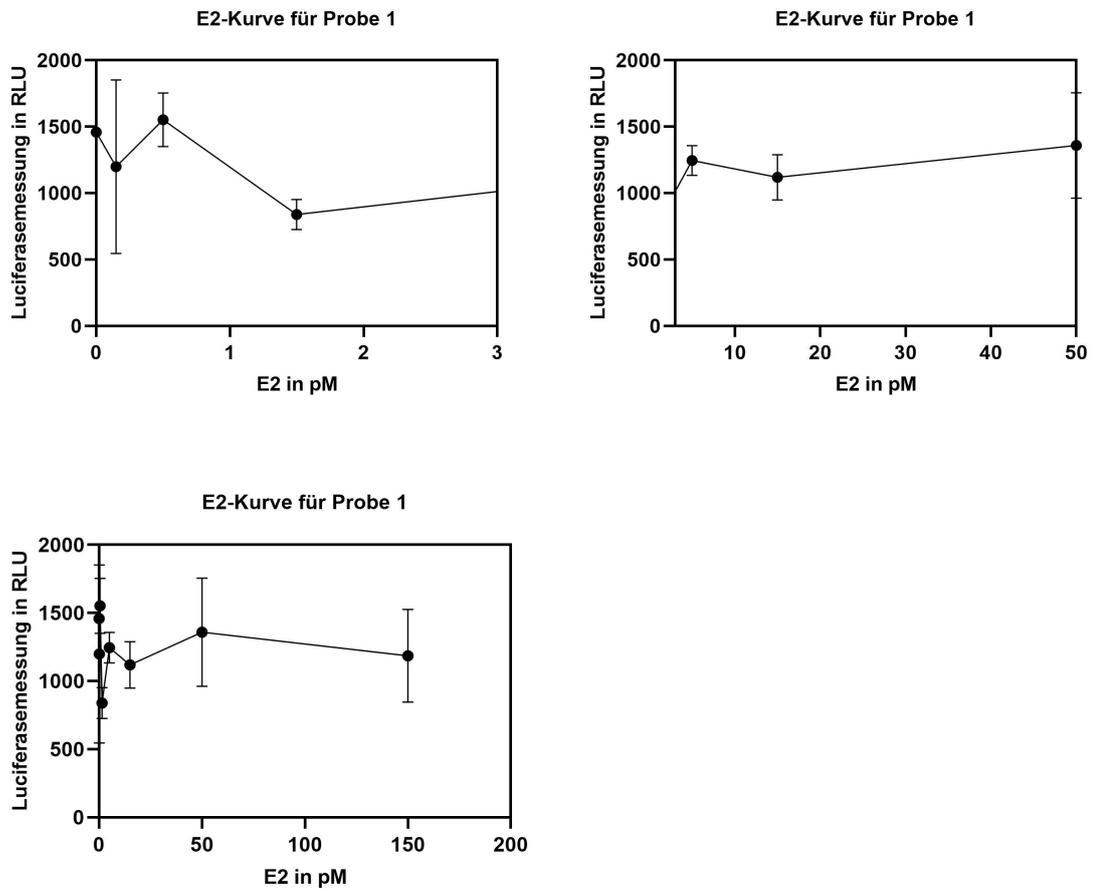


Abb. 3.14: E2-Kalibriergerade für die Probe 1. Links oben sind die Konzentrationen zwischen 0 pM und 3 pM aufgezeichnet, rechts oben zwischen 3 pM und 50 pM und links unten zwischen 0 pM und 150 pM. Die Werte sind sehr inkonstant. Die separaten Diagramme in unterschiedlichen Intervallen dienen der besseren Übersicht.

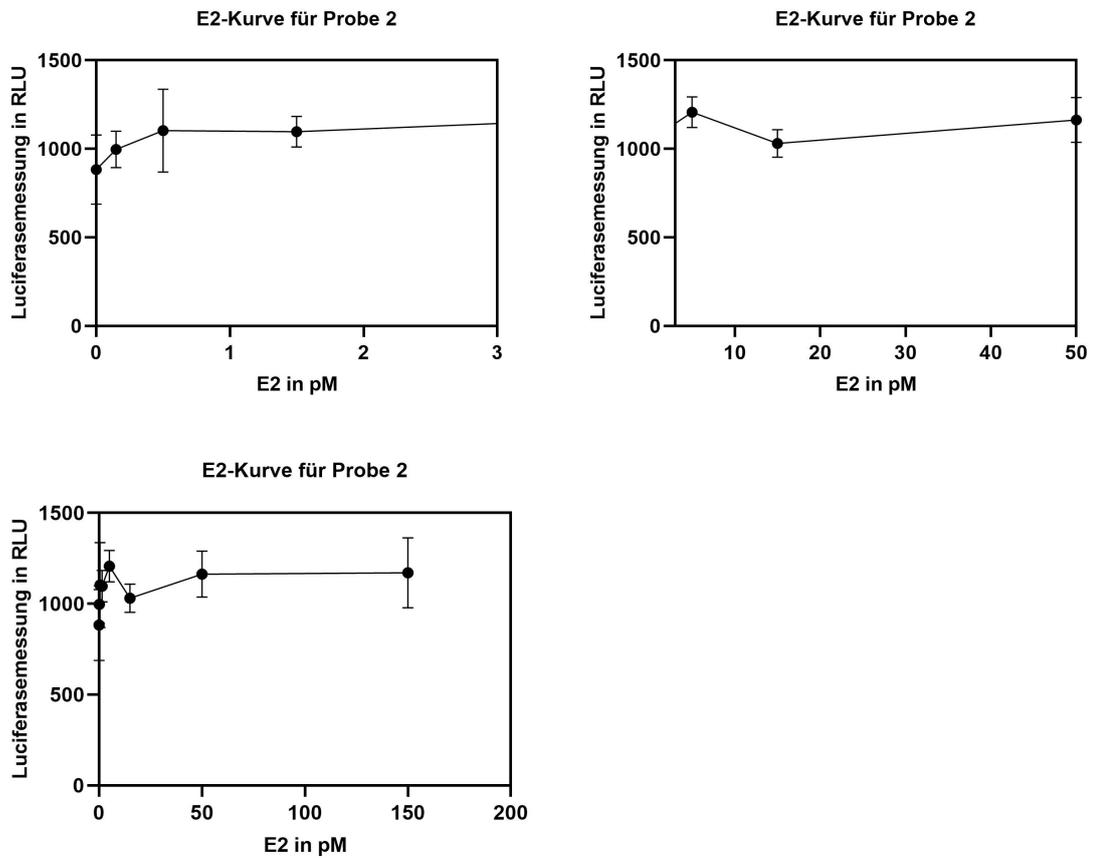


Abb. 3.15: E2-Kalibriergerade für die Probe 2. Links oben sind die Konzentrationen zwischen 0 pM und 3 pM, rechts oben zwischen 3 pM und 50 pM und links unten zwischen 0 pM und 150 pM. Es ist ein leichter Anstieg zu erkennen bis 5 pM der Luciferaseaktivität, danach sinkt der Wert und erfährt ab 15 pM wieder einen leichten Anstieg. Die separaten Diagramme in unterschiedlichen Intervallen dienen der besseren Übersicht.

3 Ergebnisse

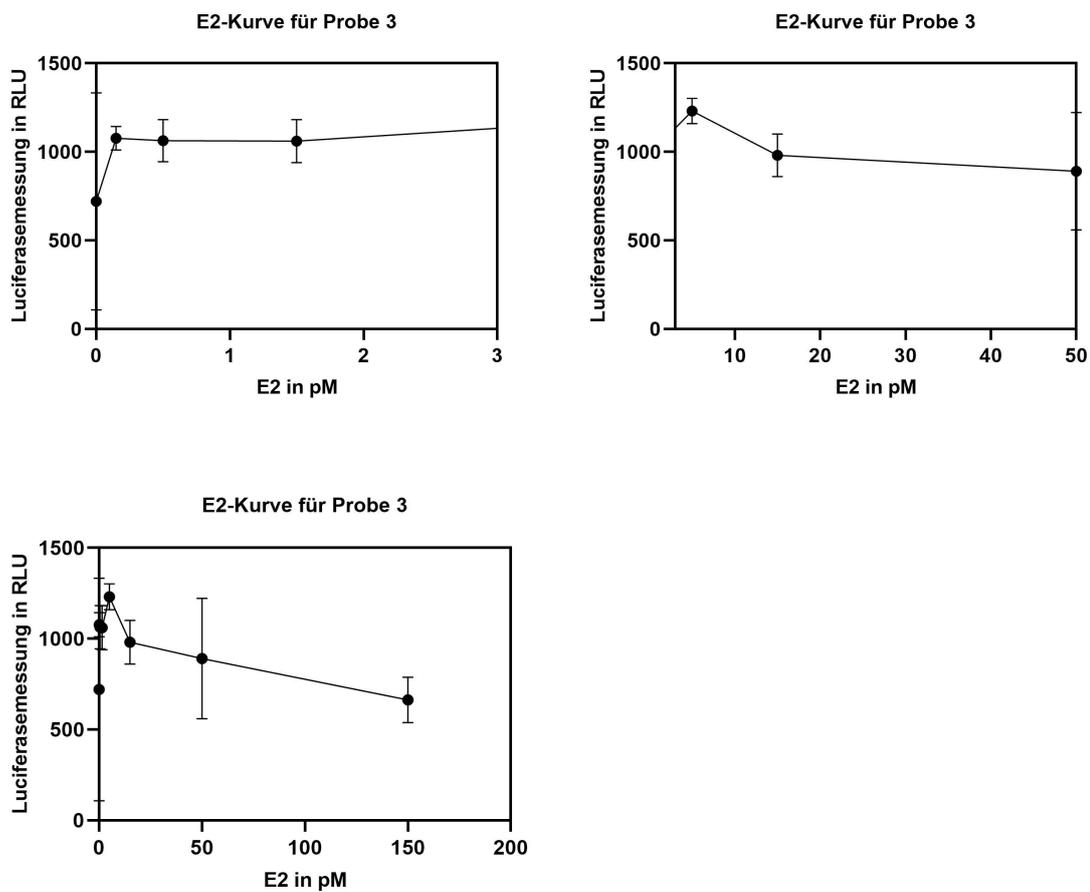


Abb. 3.16: E2-Kalibriergerade für die Probe 2. Links oben sind die Konzentrationen zwischen 0 pM und 3 pM, rechts oben zwischen 3 pM und 50 pM und links unten zwischen 0 pM und 150 pM. Es ist ein leichter Anstieg zu erkennen bis 5 pM der Luciferaseaktivität, danach sinkt der Wert kontinuierlich. Die separaten Diagramme in unterschiedlichen Intervallen dienen der besseren Übersicht.

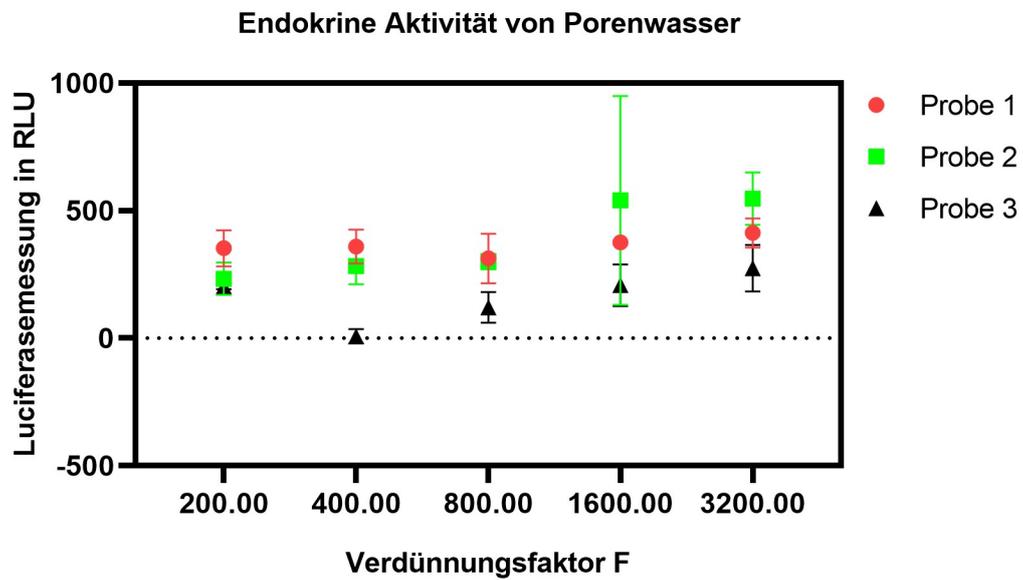


Abb. 3.17: Ergebnis der Porenwassermessung mit VM7Luc4E2 Zellen in den Verdünnungen 1:200 bis 1:3200 aller Proben. Die Messwerte bleiben bei Probe 1 konstant, bei Probe 3 sinkt der Wert bei der Verdünnung von 1:400 und steigt dann leicht, aber kontinuierlich an. Probe 2 erfährt ebenfalls einen leichten Anstieg.

4 | Diskussion und Ausblick

Ziel war es, das Porenwasser von Sedimenten dreier Probenahmestellen der Tideelbe auf die Wirkung hormonaktiver Schadstoffe hin zu untersuchen und miteinander zu vergleichen. Dies geschah mithilfe eines Estrogen-Rezeptor vermittelten chemisch aktivierten Luciferase Genexpressions-Assays (ER-Reporter-gen-Assay). Vor der Durchführung des ER-Reporter-gen-Assays wurden einige notwendige Etablierungen durchgeführt. Zunächst wurde ein Zelltoxizitätstest mit zwei Substanzen durchgeführt, bei denen eine zelltoxische Wirkung bekannt war. Bei diesen Substanzen handelte es sich um Ethanol und Digitonin. Im Rangefinding wurde ein Wirkungsbereich dieser Substanzen angenähert, indem über mehrere Größenordnungen getestet wurde, um Inhibitionen der Zellvitalität zwischen 20 und 80 % zu erreichen. Daraus wurde eine Konzentrations-Wirkungs-Beziehung erstellt, um eine mittlere Hemmkonzentration (EC_{50}) zu berechnen. Diese Konzentration wurde in späteren Messungen als Positivkontrolle eingesetzt, um eventuelle zelltoxische Effekte der Porenwasserproben auszuschließen. Als nächstes folgten Messungen zelltoxischer Effekte des Porenwassers in hohen Konzentrationen mit dem CellTiter™ Fluor-Viability-Assay. Dieses Ergebnis sollte Erkenntnisse darüber liefern, inwiefern die Inhaltsstoffe im Porenwasser die Zellvitalität beeinflusst. Zum Schluss wurden die Ergebnisse des ER-Reporter-gen-Assays zusammengefasst. Dieser misst die endokrine Wirkung des Porenwassers unter Erstellung einer E2-Kalibriergerade.

4.1 Etablierung des Zelltoxizitätstests

Mit der Substanz Ethanol zur Verwendung der Positivkontrolle konnte keine Konzentrations-Wirkungs-Beziehung erstellt werden. Zu erwarten war ein konstanter Anstieg der Proteaseinhibition mit Erhöhung der Ethanol-Konzentration. Hierbei wurden Ethanolkonzentrationen von 0,7 %, 0,85 %, 1,0 % und 1,15 % mit den CHO-K1 Zellen inkubiert und die Zellvitalität nach 24 h gemessen. Die verwendeten Ethanol-Konzentrationen in dieser Arbeit, gehen zurück auf (Šarc & Lipnik-Štangelj 2009); die Konzentrationen wurden für diesen Versuch von Molarität in % umgerechnet. Šarc & Lipnik-Štangelj (2009) haben jedoch mit Primärkulturen eine Konzentrations-Wirkungsbeziehung mit Ethanol erstellen können. In dieser Arbeit wurden die Konzentrationen jedoch mit etablierten Zelllinien durchgeführt; dies führte zu keinem vergleichbaren Ergebnis, was aufgrund unterschiedlicher Zelltypen zu erwarten gewesen war. Jedoch wäre zumindest ein gleichmäßiger An-

stieg der Inhibition mit Anstieg der Ethanolkonzentration zu erwarten gewesen, was im durchgeführten Test nicht der Fall war. Eine eventuelle Anpassung der Ethanolkonzentrationen war somit nicht sinnvoll gewesen, da die Werte inkonsequent waren (Abbildung 3.1).

Bei den VM7Luc4E2 Zellen lässt sich mit steigender Ethanolkonzentration eine steigende Inhibition als Trend erkennen. Der Signifikanztest hat jedoch gezeigt, dass die Wahrscheinlichkeit die Werte als Triplikate ansehen zu können bei $<0,01\%$ liegt und für eine KWK nicht genutzt werden konnten. Diese Ethanolkonzentrationen, die zwischen $1,5\%$ und $3,0\%$ lagen, beriefen sich auf (Le et al. 2012), die mit MCF-7 Zellen (nicht transformierten VM7Luc4E2 Zellen) eine KWK mit diesen Konzentrationen erstellen konnten. Ein Anstieg der Inhibition lässt sich zwar erkennen, jedoch konnten die gleiche KWK nicht erstellt werden.

Für beide Zelllinien konnte eine Konzentrations-Wirkungsbeziehung für Digitonin erstellt werden (siehe Abb. 3.4 und 3.5). Truman & Hook (2013) führten Messungen mit Digitoninkonzentrationen von $30\ \mu\text{g/ml}$ durch und erreichten Inhibitionen, die zwischen 80% - 90% lagen. Dieser Wert diente der Orientierung, um eine Konzentrations-Größenordnung zu finden, die eine Inhibition der Zellen zwischen 20% und 80% erreichte. Im durchgeführten Test wurden somit neben der eingesetzten Konzentration von $30\ \mu\text{g/ml}$ Niedrigere Konzentrationen von $0,3\ \mu\text{g/ml}$ und $3\ \mu\text{g/ml}$ gewählt, um zu messen in welcher Größenordnung die Zellen in diesen Konzentrationen inhibiert werden.

Keine der Zelllinien zeigen eine Inhibition bei $0,3\ \mu\text{g/ml}$ und $3\ \mu\text{g/ml}$ mit Digitonin; beide wiesen eine gleichermaßen starke Inhibition von fast 90% bei $30\ \mu\text{g/ml}$ auf, unabhängig von der Inkubationszeit des GF-AFC-Reagenz. Höher eingesetzten Konzentrationen ($5\ \mu\text{g/ml}$ bis $30\ \mu\text{g/ml}$, Abb. 3.1) zeigten einen kontinuierlichen Inhibitionsanstieg, wobei der Schwankungsbereich der VM7Luc4E2 Zellen größer war, als der CHO-K1 Zellen. Die Brustkrebszelllinie reagierte sehr empfindlich in allen kommenden Messungen und wies größere Standardabweichungen auf als die CHO-K1 Zellen.

Eine Konzentrations-Wirkungs-Beziehung konnte mit den CHO-K1 Zellen erstellt werden. Nachdem zwei Ausreißer in der Messung aus der Bewertung herausgenommen wurden, stieg das Bestimmtheitsmaß und die Summe der Quadrate konnte gesenkt werden. Die Summe der Quadrate stellt ein Maß der Streuung oder der Abweichung vom Mittelwert dar. In der Regression kann mit der Gesamtsumme der Quadrate die Gesamtstreuung der Y-Werte ausgedrückt werden. So zeigt eine kleine Summe der Quadrate eine kleinere Streuung der Werte an. Daher ist das Ergebnis der CHO-K1 Zellen mit Ausschluss der Ausreißer als zuverlässiger zu betrachten.

4.2 Signifikanztest der Messwerte

Der Signifikanztest hat gezeigt, dass alle drei Tests bei den CHO-K1 Zellen als Replikate angesehen werden können.

Die Messdaten für VM7Luc4E2 Zellen wurden in einer anderen Darstellung erfasst, denn bei der KWK war bereits zu erkennen, dass die drei Tests nicht als Replikate angesehen werden können. Um überhaupt eine statistische Aussage treffen zu können, wurden die Triplikate jedes der Tests miteinander verglichen. Ziel war es, mithilfe von GraphPad zu berechnen, ob die Triplikate eines Tests als Replikate betrachtet werden können. Der errechnete EC_{50} -Wert für VM7Luc4E2 Zellen wurde für den ER-Assay zwar unter Vorbehalt verwendet, die Messdaten wurden jedoch nicht als zuverlässig betrachtet. Die Ursache für die starken Unterschiede in der Messung kann folgende Gründe haben.

Während der Zellaussaat lag die Vitalität der VM7Luc4E2 Zellen bei 54 % (s. Kapitel 2.2.9). Bei der Ausplattierung ist es schwieriger, eine gleich große Anzahl lebender Zellen pro Well auszuplattieren, wenn die Vitalität nicht mindestens 90 % beträgt; im Falle der sehr empfindlichen VM7Luc4E2 Zellen wäre auch eine Vitalität von mindestens 80 % akzeptabel gewesen. Des Weiteren wurde das Ausplattieren der Zellen mithilfe der Multistepper-Pipette durchgeführt und die Pipette auf 5 ml aufgezogen, um im Anschluss 50 Wells á 100 μ l in einem Durchgang zu pipettieren. Dadurch kann es gegebenenfalls zum Sedimentieren der Zellen gekommen sein und somit war kein gleichmäßiges Ausplattieren der Zellen pro Well mehr möglich gewesen. Eine Beobachtung im Mikroskop hatte gezeigt, dass die VM7Luc4E2 Zellen im Gegensatz zu den CHO-K1 Zellen nach dem Trypsinieren dazu neigen, sich zu Anhäufungen zusammen zu fügen und nicht einzeln im Medium zu schwimmen (s. Kapitel 2.2.2), weshalb es möglich sein kann, dass es bei der Brustkrebszelllinie zu einer ungleichmäßigen Verteilung der Zellen in den Wells kam.

Der nächste Schritt wäre somit beim Ausplattieren eine hohe Vitalität ($\geq 80\%$) zu gewährleisten. Dies geschieht, indem die Zellen beim Wechsel ins Assaymedium so ausplattiert werden, dass die Konfluenz nicht mehr als 30 % beträgt. Nach insgesamt sieben Tagen (s. Kapitel 2.2.2) sollte eine Konfluenz zwischen 70 % und 90 % erreicht werden, ohne, dass die Zellen in dieser Zeit Trypsin ausgesetzt werden müssen. Bei zu langem Trypsinieren werden die Zellen geschädigt (Sons 2009). Es muss auch beachtet werden, dass die Glucosekonzentration im Assaymedium geringer ist als im Kulturmedium und den Zellen somit eine geringere Energiequelle zur Verfügung steht. Außerdem fehlen den Zellen Wachstumshormone, die aufgrund des gestrippten FBS auf eine nicht messbare Konzentration gesenkt wurden; diese brauchen die Zellen, um eine höhere Vitalität zu erreichen. Trotzdem müssen die Zellen im Assaymedium kultiviert werden. Das Kulturmedium enthält Phenolrot als Indikator, welches nachweislich eine schwach estrogenere Wirkung zeigt (Welshons et al. 1988). Dies kann in einigen estrogen-sensitiven Zellen

eine Stimulation hervorrufen und somit das Ergebnis verfälschen. Um den Zellen weniger Stress auszusetzen, sollte zumindest auf das Trypsinieren verzichtet werden.

Weiterhin sollte ein geringeres Volumen in die Multistepper-Pipette aufgezogen werden. Dies ermöglicht eine geringere Anzahl an Wells zu pipettieren und ein regelmäßigeres Resuspendieren der Zellen zu gewährleisten. Im Hinblick auf die stark schwankenden Messungen der Zelltoxizitätstests der VM7Luc4E2 Zellen wurde es nicht als sinnvoll erachtet diese zusammenfassend in einer Kurve darzustellen, da die Tests nicht als Replikate angesehen werden können. Hinzu kommt, dass die Triplikate bei Test 1 nicht als Replikate angesehen werden können. Abbildung 3.6 (rechts) zeigt, dass die Kurven zwischen Test 2 und 3 bezüglich der Steigung und Form des Anstiegs zwar sehr ähnlich aussehen, von der Höhe der Daten jedoch sehr verschieden sind. Bei der Betrachtung der Blindwerte des zweiten und dritten Tests ist ein großer Messabstand zu vermerken (Tab. 4.1).

Tab. 4.1: Vergleich der gemessenen Blindwerte (BW) in RFU von Test 2 und 3.

Digitoninkonzentration in $\mu\text{g}/\text{ml}$	Test 2 BW in RFU	Test 3 BW in RFU
10	4506	11402
13	4581	11414
16	4417	11198
19	4415	11241
22	4338	10985
25	4390	10783

Es könnte sich hierbei um einen Messfehler handeln; die Höhe der Daten in Abbildung 3.6 (rechts) würden bei Test 2 und 3 sehr viel ähnlicher sein, wenn die Blindwerte ähnlich wären.

Der EC_{50} -Wert kann bei CHO-K1 Zellen im Bereich zwischen $11,65 \mu\text{g}/\text{ml}$ und $13,17 \mu\text{g}/\text{ml}$ verwendet, bei VM7Luc4E2 Zellen wurde der errechnete EC_{50} -Wert, der im Bereich zwischen $13,04 \mu\text{g}/\text{ml}$ und $15,36 \mu\text{g}/\text{ml}$ liegt, nur unter Vorbehalt genommen, da es sich bei den Messwerten statistisch gesehen nicht um Replikate handelt.

4.3 Messergebnisse zelltoxischer Effekte von Porenwasser

Die Porenwasserproben wurden an drei unterschiedlichen Standorten entnommen. Am Standort Köhlbrand befindet sich die Kläranlage Köhlbrand/Dradenau. Bei einem erfolgreich etablierten Test, wäre das vermutlich eine stärker belastete Probe (Probe 2) gewesen, mit höherer estrogenen Aktivität, als die der anderen beiden Proben. Die Kläranlage kann Arzneimittelrückstände, wie orale Kontrazeptiva, nicht herausfiltern. So gelangen Rückstände über Ausscheidungen in den Wasserkreislauf. Die Kläranlage am Standort Köhlbrand hat keine nachgeschaltete Abwasserbehandlungstechnik (Einsatz von Pulveraktivkohle) (UBA 2015). Die Filtration von Mikroschadstoffen war somit weniger gegeben. Damit stieg die Erwartung höhere endokrine Effekte im Porenwasser zu messen. Die Probennahme am Standort Stover Strand (Probe 1) wurde aufgrund des Einflusses von stromaufwärts untersucht. Südlich der Probennahmestelle Wedel (Probe 3) liegt das Alte Land, in dem intensiver Obstanbau unter Einsatz von Pestiziden stattfindet. Diese können in die Elbe eingetragen werden wodurch es zu einer Insektizidbelastung des Wassers kommen könnte. Mit erfolgreich transplantierten CHO-K1 Zellen bestünde die Möglichkeit Ecdysonaktivitäten dieser Probe zu messen.

Abbildung 3.8 zeigt die zelltoxischen Effekte mit Porenwasserproben in den Verdünnungsstufen G0 bis G8. Bei Betrachtung der unverdünnten Probe (reines Porenwasser) wurde die höchste Zelltoxizität für VM7Luc4E2 Zellen bei Probe 2 gemessen; CHO-K1 Zellen zeigten die höchste Toxizität bei Probe 3. Diese Messung wurde jedoch nur einmal für jede Zelllinie durchgeführt. Würden bei wiederholten Messungen ähnlichen Messergebnissen bei Inkubation mit reinem Porenwasser herauskommen, könnte eine Aussage darüber getroffen werden, ob in Probe 2 und 3 aufgrund ihrer Standorte eine höhere Belastung mit toxischen Schadstoffen vorliegt. Jedoch ist das Ergebnis aufgrund einer durchgeführten Messung nicht aussagekräftig.

Der erste Test in Abbildung 3.8 zeigt zwar, dass die Proteaseinhibition, und damit die Zelltoxizität, der CHO-K1 Zellen mit Abnahme der Porenwasserkonzentration sinkt, jedoch kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Toxizität aufgrund der immer geringer werdenden Porenwasserkonzentration sinkt, oder aufgrund der ansteigenden Mediumkonzentration, da in jedem Well ein unterschiedlich großes Mediumvolumen vorhanden war.

Im zweiten Test wurde das Porenwasser anstatt mit Medium mit Reinstwasser verdünnt, um eine identische Konzentration an Wasser pro Well zu haben. Jedoch wurde nicht beachtet, dass im Reinstwasser keine Ionen vorhanden sind. Die Zellen befanden sich somit in einem hypotonen Milieu. Die Folge ist ein Einströmen von Wasser aus der Umgebung in die Zelle und letztendlich der Zelltod durch Platzen der Zelle. Das Reinstwasser hat ihnen somit mehr geschadet als das Porenwasser. Dies erklärt die unrealistisch hohen

Inhibitionswerte in %, die teils mit hohen Werten ins Negative, teils ins Positive gegangen sind. Die stark schwankenden Werte in Abhängigkeit der immer kleiner werdenden Verdünnung mit dem Reinstwasser können damit argumentiert werden, dass nicht gesagt werden kann, welche toxischen Substanzen, wie beispielsweise Schwefel, der sehr reaktiv ist oder Schwermetalle, im Porenwasser noch vorhanden sind und gegebenenfalls zur Apoptose der Zellen geführt haben könnten; denkbar wäre auch ein unkontrolliertes Absterben der Zellen aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit. Hieraus ergibt sich, dass eine Verdünnung mit Reinstwasser keine Möglichkeit darstellt und der Test nicht in die Auswertung einbezogen werden kann. Der nächste Schritt wird darin liegen, in jedes Well 50 % Medium und 50 % eines Gemisches aus Porenwasser und physiologische Kochsalzlösung zu pipettieren. Die Überlegung besteht darin, dass überall eine gleich große Menge an Medium in den Zellen vorhanden ist und ausgeschlossen werden kann, dass die Zelltoxizität mit Zunahme der Mediumkonzentration sinkt. Die physiologische Kochsalzlösung hält den osmotischen Druck konstant und gewährleistet eine Isotonie. Eine weitere Möglichkeit wäre der Einsatz eines DMEM-Pulvers, um ein 10x konzentriertes Medium anzusetzen. Im Zelltoxizitätstest wird dieses Medium in unterschiedlichen Konzentrationen mit Porenwasser verdünnt; die Ausgangskonzentration des Mediums würde somit in jedem Well gleich bleiben.

4.4 ER-Reporter-Gen-Assay

Der ER-Reporter-Gen-Assay war in keinem Test erfolgreich gewesen und hat keine aussagekräftigen Ergebnisse zur Messung der E2-Äquivalenzwerte hervorgebracht.

4.4.1 Zelltoxizität im ER-Reporter-Gen-Assay

Es wurden zwei Messungen mit Porenwasser in unterschiedlichen Verdünnungsstufen durchgeführt.

Die Messung mit niedriger Porenwasser-Konzentrationen (G200 bis G3200), sollte die estrogenen Aktivität der Proben untersuchen (endokrine Effekte). In diesen Verdünnungsstufen der Proben liegen viele der estrogenaktiven Substanzen in den Konzentrationen vor in dem ihr Wirkungsbereich liegt. Im ER-Reporter-Gen-Assay wurden diese hohen Verdünnungsstufen auch auf Zelltoxizität getestet.

Die Messungen mit hohen Porenwasser-Konzentrationen (G0 bis G8) wurden zusätzlich durchgeführt. Sie dienen dazu zu beobachten, welche zelltoxischen Effekte das Porenwasser in hohen Konzentrationen auf die Zellen hatten.

Vor der Messung endokriner Effekte des Porenwassers, zeigte der vorherige Zelltoxizitätstest mit sehr viel geringeren Porenwasserkonzentrationen (G200 bis G3200) eine Inhibition der Zellen von $> 70\%$ an. Vor dem Hintergrund, dass bei einer Verdünnung von 1:4 (Medium mit Porenwasser) im Zelltoxizitätstest eine Inhibition von weniger als 20% gemessen wurde, erschien das Ergebnis der hohen Inhibition von $> 70\%$ unrealistisch. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um einen Messwertfehler der Blindwerte. Grund dafür könnte der selbst hergestellte Vitalitätsassay sein; Die Messungen wurden vor dem ER-Reporter-Gen-Assay mit dem selbst erstellten durchgeführt. Die Messwerte, die mit dem Assay-Kit der Firma Promega gemessen wurden, fielen sehr viel geringer aus, als diejenigen Werte, die mit dem selbsterstellten GF-AFC-Reagenz gemessen wurden. Die gemessenen Blindwerte mit dem Promega-Assay lagen alle in einem RFU Bereich von ± 10.000 und beim selbsterstellten Assay in einem RFU Bereich von ± 35.000 . Die Blindwerte waren damit alle fast so hoch wie die der mit Porenwasser behandelten Zellen. Um die Blindwerte wieder auf den ursprünglichen Wert zu bringen, müsste als folgender Schritt ein anderer Puffer getestet werden, der gegebenenfalls mit dem GF-AFC-Reagenz kompatibel ist. Des Weiteren wäre ein Vergleich der pH-Werte des kommerziellen und des hergestellten Puffers denkbar. Wenn die pH-Werte zu stark voneinander abweichen, könnte eine Anpassung des pH-Wertes gegebenenfalls die Messergebnisse verändern. Das selbst hergestellte GF-AFC-Reagenz wird mit dem Puffer der Firma Promega vermischt, um einen Zelltoxizitätstest damit durchzuführen. Wenn die Werte wieder in ihrem ursprünglichen Bereich liegen, kann ausgeschlossen werden, dass das selbst hergestellte GF-AFC-Reagenz nicht funktionstüchtig ist.

4.4.2 Erstellung der E2-Kalibriergerade

Die Erstellung der E2-Kalibriergerade soll einen sigmoidalen Verlauf erfahren, was in keinem einzigen durchgeführten Test erreicht wurde. Erwartungsgemäß hätte die Kurve so verlaufen müssen, wie in Abbildung 4.1 zu sehen ist.

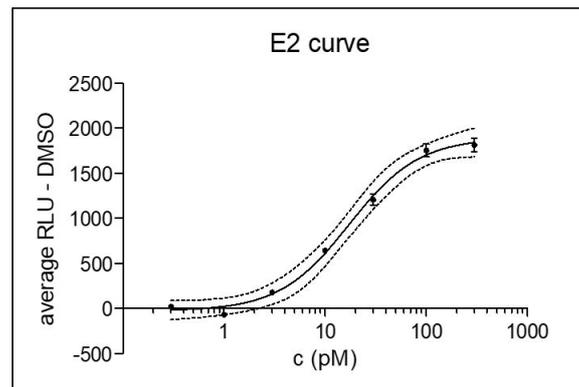


Abb. 4.1: Diese Abbildung zeigt ein Beispiel einer E2-Kalibriergerade, wie diese eigentlich verlaufen sollte. Die Kurve verläuft sigmoidal

Um einen Verlauf der E2-Kalibriergerade, wie in Abbildung 4.1 gezeigt, zu erreichen, muss der nächste Schritt darin bestehen, eine neue 1 mM E2-Stammlösung herzustellen. Ein erneutes Ansetzen der E2-Verdünnungen zur Erstellung der Kalibriergeraden trägt dazu bei, potentielle Fehler, welche in der ersten Herstellung erfolgt sein können, auszuschließen. Des Weiteren muss bei weiteren Arbeiten mit den Zellen darauf geachtet werden, diese nur bei einer Vitalität von mehr als 80 % auszuplattieren. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass pro Well eine gleiche Anzahl lebender Zellen ausgesät werden. Eine weitere Möglichkeit einer ungleichen Anzahl lebender Zellen pro Well besteht in der Sedimentation derselben während des Ausplattierens. Um diesem Vorgang möglichst zu unterbinden muss beim Arbeiten mit der Multistep-Pipette darauf Acht gegeben werden, maximal 10 Wells á 100 μ l zu pipettieren. Gleichzeitig muss ein regelmäßiges Resuspendieren der Zellen erfolgen. Desweiteren wird eine Messung mit schwarzen oder weißen Mikrotiterplatten durchgeführt, um gegebenenfalls bessere Messergebnisse zu erhalten. Die E2-Kalibriergerade wurde vom Forschungsteam der Universität Amsterdam bereits in diesen Konzentrationen angesetzt. Die RLU-Werte lagen bei einer E2-Konzentration von 0 pM bei 300-400. Die höchsten Konzentrationen bei 150 pM lagen zwischen 2000 und 2200. Die gemessenen RLU-Werte dieser Arbeit lagen im Mittelwert in den Tests zwischen 600 und 2000 RLU, bezogen auf die niedrigste und höchste E2-Konzentration. Somit lagen die gemessenen Werte zumindest im gleichen Bereich, wenn auch die Verläufe der Kurven nicht erwartungsgemäß verliefen.

4.4.3 Messung estrogenen Effekte im Porenwasser

Über die anschließende Luciferasemessung im Porenwasser kann ebenfalls keine verlässliche Aussage getroffen werden. Es konnte nicht gewährleistet werden, dass in jedem Well eine gleich große Menge lebender Zellen vorhanden war. Zu erwarten war ein absteigender Graph der Messwerte aufgrund der sinkenden Porenwasserkonzentration und

damit der Senkung eventueller estrogenaktiver Substanzen. Jedoch zeigen die Messwerte in Abbildung 3.17 einen leichten Anstieg der Lichtemission bei Test 2 und 3. Die Wahrscheinlichkeit eines Pipettierfehlers ist hoch. Weitere Ursachen könnten bestimmte Makromoleküle in der Porenwasserprobe sein, die sich mit der Verdünnung anders verhalten könnten.

4.4.4 Berechnung der Estradiol-Äquivalenzkonzentrationen

Die Berechnung der Estradiol-Äquivalenzkonzentrationen (EEQ) konnte nicht erfolgen. Da sowohl die E2-Kurven keinen sigmoidalen Verlauf aufwiesen, als auch die Messwerte der Porenwasserproben unzusammenhängende Ergebnisse hervorbrachten, wird dieser Part nur theoretisch erklärt.

Ziel dieser Arbeit war es, die endokrine Aktivität der Porenwasserproben zu untersuchen und die gemessenen Werte als EEQ auszudrücken. Derartige Äquivalenzkonzentrationen werden definiert als diejenige Konzentration einer Referenzsubstanz, die den gleichen Effekt hervorbringt, wie die Umweltprobe (Escher et al. 2008; Kienle et al. 2012). Die EEQ-Berechnung erfolgt über Extrapolation des Induktionswertes der RLU (*relative light unit*) der Proben auf die Standardkurve. Die Induktion des Luciferasegens wird durch die Bindung an den Rezeptor, die über die RLU gemessen wird, dargestellt.

Die Berechnung der EEQ beruht auf (Kienle et al. 2012). Zunächst werden die EEQ-Werte mithilfe der E2-Standardkurve bestimmt. Hierzu wird die Standardkurve mittels nichtlinearer Regression angepasst, um die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) zu erhalten. Im nächsten Schritt werden die Messergebnisse der Porenwasserproben in ein Verhältnis zur E2-Kalibriergerade gesetzt und die RLU-Wert miteinander verglichen.

4.5 Messung der Ecdyson-Aktivität

Aufgrund von Zeitmangel konnte die Messung der ecdysonen Aktivität des Porenwassers mit CHO-K1 Zellen nicht erfolgen. Deshalb erfolgt die Aufarbeitung dieses Teils nur theoretisch. Einer Messung mit CHO-K1 Zellen vorangestellt ist das Transfizieren der Zellen. Dies geschieht via Lipofektion. Bei der Lipofektion verschmelzen die Lipide entweder mit der Plasmamembran der Zelle oder gelangen ins Zellinnere über Endozytose. Die Lipide sind positiv geladen und interagieren elektrostatisch mit negativ geladenen Nukleinsäuren, wie DNA (Jacobsen 2004). Auf diesem Wege gelangen die gewünschten Vektor-Sequenzen (Luciferase, EcR, Penicillin- und Streptomycinresistenz) in die Zellen und werden stabil in das Genom der Zelllinie integriert. Eine mittlere Hemmkonzentration mit Digitonin konnte für diese Zelllinie bereits bestimmt werden. Diese Digitoninkonzentration von 12,41 $\mu\text{g}/\text{ml}$ wird in künftigen Messungen als Positivkontrolle verwendet; so

werden die nächsten Schritte darin bestehen, mit einem EcR-Reporter-gen-Assay die ecdy-sone Aktivität im Porenwasser mit CHO-K1 Zellen zu ermitteln. Das Prinzip ist gleich dem des ER-Reporter-gen-Assays, welcher bereits ausführlich für die VM7Luc4E2 Zellen beschrieben wurde. Die in der Problemanalyse der VM7Luc4E2 diskutierten Schwierigkeiten werden für die kommende Assay-Etablierung berücksichtigt.

Danksagung

Meine persönliche Danksagung geht an Prof. Dr. Susanne Heise und Sonja Faetsch, die mir die Bearbeitung dieses interessanten Themas ermöglicht haben. Vielen Dank für konstruktive Unterstützung während der Bearbeitungszeit dieser Bachelorarbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei allen weiteren Personen bedanken, die diese Arbeit Korrektur gelesen haben und mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Meinen besten Dank!

Literatur

- Adeel, Muhammad, Xiaoming Song, Yuanyuan Wang, Dennis Francis & Yuesuo Yang (2017). „Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: A critical review“. *Environment International* 99, S. 107–119. DOI: 10.1016/j.envint.2016.12.010.
- Ahlf, Wolfgang (1995). „Ökotoxikologische Sedimentbewertung“. *Diskussionsbeiträge*.
- Akaike, Hirotugu (2011). „Akaike’s Information Criterion“. In: *International Encyclopedia of Statistical Science*. Springer Berlin Heidelberg, S. 25–25. DOI: 10.1007/978-3-642-04898-2_110.
- Arcand-Hoy, Lisa D. & William H. Benson (1998). „Fish reproduction: An ecologically relevant indicator of endocrine disruption“. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17.1, S. 49–57. DOI: 10.1002/etc.5620170108.
- Calmano, Wolfgang, Hrsg. (2001). *Untersuchung und Bewertung von Sedimenten*. Springer Berlin Heidelberg.
- Damstra, Terri, Sue Barlow, Aake Bergman, Robert Kavlock & Glen Van Der Kraak (2002). „Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors“. *World Health Organization*. URL: <http://www.who.int/ipcs/publications/en/toc.pdf?ua=1>.
- Dodson, S I & T Hanazato (1995). „Commentary on effects of anthropogenic and natural organic chemicals on development, swimming behavior, and reproduction of Daphnia, a key member of aquatic ecosystems.“ *Environmental Health Perspectives* 103.suppl 4, S. 7–11. DOI: 10.1289/ehp.95103s47.
- Escher, Beate I., Nadine Bramaz, Jochen F. Mueller, Pamela Quayle, Sibylle Rutishauser & Étienne L. M. Vermeirssen (2008). „Toxic equivalent concentrations (TEQs) for baseline toxicity and specific modes of action as a tool to improve interpretation of ecotoxicity testing of environmental samples“. *Journal of Environmental Monitoring* 10.5, S. 612. DOI: 10.1039/b800949j.

- EU, Off.J. Eur. Union L 226 56 (2013). *Union L 78, Commission Implementing Decision (EU) 2015/495 of 20 March 2015 Establishing a Watch list of Substances for Union-wide Monitoring in the Field of Water Policy Pursuant to Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council*. pp. 1e17. n.d. (Kase).
- EUScienceHub (2018). „Updated surface water Watch List adopted by the Commission“. *The European Commission's science and knowledge service*. URL: http://data.europa.eu/eli/dec_impl/2018/840/oj.
- Fiedler & Rösler (1993). *Spurenelemente in der Umwelt*. 385 pp. Jena, Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.
- Gaertner, Karin, G. Thomas Chandler, Joseph Quattro, P. Lee Ferguson & Tara Sabo-Attwood (2012). „Identification and expression of the ecdysone receptor in the harpacticoid copepod, *Amphiascus tenuiremis*, in response to fipronil“. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 76, S. 39–45. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2011.09.008.
- Giribet, Gonzalo & Gregory D. Edgecombe (2013). „The Arthropoda: A Phylogenetic Framework“. In: *Arthropod Biology and Evolution*. Springer Berlin Heidelberg, S. 17–40. DOI: 10.1007/978-3-662-45798-6_2.
- GraphPadPrism (2018). *Equation: log(agonist) vs. response – Variable slope*. Zugriff: 13.11.18. URL: https://www.graphpad.com/guides/prism/7/curve-fitting/index.htm?REG_DR_stim_variable.htmhttps://www.graphpad.com/guides/prism/7/curve-fitting/index.htm?REG_DR_stim_variable.htm.
- Gross-Sorokin, Melanie Y., Stephen D. Roast & Geoffrey C. Brighty (2006). „Assessment of Feminization of Male Fish in English Rivers by the Environment Agency of England and Wales“. *Environmental Health Perspectives* 114.Suppl 1, S. 147–151. DOI: 10.1289/ehp.8068.
- Guderian, Robert & Günter Gunkel (2000). *Handbuch der Umweltveränderungen und Ökotoxikologie*. Springer Berlin Heidelberg.
- Hanazato, T. (1998). „Response of a zooplankton community to insecticide application in experimental ponds: a review and the implications of the effects of chemicals on the structure and functioning of freshwater communities“. *Environmental Pollution* 101.3, S. 361–373. DOI: 10.1016/s0269-7491(98)00053-0.
- Havens, K. E. (1995). „Insecticide (Carbaryl, 1-naphthyl-N-methylcarbamate) effects on a freshwater plankton community: Zooplankton size, biomass, and algal abundance“. *Water, Air, & Soil Pollution* 84.1-2, S. 1–10. DOI: 10.1007/bf00479585.

- Heise, S., U. Förstner, B. Westrich, T. Jancke, J. Karnahl, W. Salomons & H. Schönberger (2004). „Inventory of Historical Contaminated Sediment in Rhine Basin and its Tributaries. Report on behalf of the Port of Rotterdam“. *Technical University Hamburg Harburg in Cooperation with the University Stuttgart. Final report.*
- Henson, M C, W Shi, S J Greene & B C Reggio (1996). „Effects of pregnant human, nonpregnant human, and fetal bovine sera on human chorionic gonadotropin, estradiol, and progesterone release by cultured human trophoblast cells.“ *Endocrinology* 137.5, S. 2067–2074. DOI: 10.1210/endo.137.5.8612549.
- Houtman, Corine J. (2007). „Tracing endocrine disruptors. Identification and effects of endocrine disrupting compounds in the aquatic environment“. *PhD-Thesis.*
- HPA (2015). „Umlagerung von Baggergut nach Neßsand“. *Umgang mit Baggergut aus dem Hamburger Hafen.* Zugriff: 08.11.18. URL: https://www.hamburg-port-authority.de/fileadmin/user_upload/Jahresbericht_2015_Nesssand.pdf.
- HPA (2017). „Hafen und Tideelbe - Sedimente in der Elbe. Ständig im Fluss“. *Hamburg Port Authority Informationsbroschüre.* Zugriff: 08.11.2018. URL: https://www.hamburg-port-authority.de/fileadmin/user_upload/Wassertiefen_und_Sedimente_FI_Sedimente-in-der-Elbe_WEB.pdf.
- IKSR (o.D.). *Mikroverunreinigungen aus diffusen Quellen (2010).* Zugriff: 10.11.18. URL: <https://www.iksr.org/veranstaltungen/2-workshop-mikroverunreinigungen/>.
- Jacobsen, L (2004). „FuGENE 6 Transfection Reagent: the gentle power“. *Methods* 33.2, S. 104–112. DOI: 10.1016/j.ymeth.2003.11.002.
- Jiang, Jinlin, Zhengjun Shan, Xiaorong Wang, Yuxuan Zhu & Junying Zhou (2018). „Ecotoxicity of the nonsteroidal ecdysone mimic RH-5849 to *Daphnia magna*“. *Environmental Science and Pollution Research* 25.11, S. 10730–10739. DOI: 10.1007/s11356-018-1275-0.
- Jobling, Susan, Monique Nolan, Charles R. Tyler, Geoff Brighty & John P. Sumpter (1998). „Widespread Sexual Disruption in Wild Fish“. *Environmental Science & Technology* 32.17, S. 2498–2506. DOI: 10.1021/es9710870.
- Kavlock, R J, G P Daston, C DeRosa, P Fenner-Crisp, L E Gray, S Kaattari, G Lucier, M Luster, M J Mac, C Maczka, R Miller, J Moore, R Rolland, G Scott, D M Sheehan, T Sinks & H A Tilson (1996). „Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-

- sponsored workshop." *Environmental Health Perspectives* 104.suppl 4, S. 715–740. DOI: 10.1289/ehp.96104s4715.
- Khan, A.G, C Kuek, T.M Chaudhry, C.S Khoo & W.J Hayes (2000). „Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation“. *Chemosphere* 41.1-2, S. 197–207. DOI: 10.1016/s0045-6535(99)00412-9.
- Kienle, Cornelia, Andrea Schifferli & Inge Werner (2012). *Östrogene Aktivität in Kärnanlagenabläufen und Fließgewässern des Kantons St. Gallen*. Hrsg. von 8600 Dübendorf Oekotoxzentrum Schweizerisches Zentrum für angewandte Ökotoxikologie Eawag-EPFL.
- Koch, R. & K. Strobel (1977). „Gewässerkontamination mit chlororganischen Insektiziden“. *Hygiene-Institut des Bezirkes Gera; Forschungsinstitut für Hygiene und Mikrobiologie*. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/ahch.19770050304>.
- Lagueux, M., C. Hetru, F. Goltzene, C. Kappler & J.A. Hoffmann (1979). „Ecdysone titre and metabolism in relation to cuticulogenesis in embryos of *Locusta migratoria*“. *Journal of Insect Physiology* 25.9, S. 709–723. DOI: 10.1016/0022-1910(79)90123-9.
- Lai, Serene R, Lucy G Andrews & Trygve O Tollefsbol (2007). „RNA Interference Using a Plasmid Construct Expressing Short-Hairpin RNA“. In: *Telomerase Inhibition*. Humana Press, S. 31–37. DOI: 10.1007/978-1-60327-070-0_4.
- Le, Thanh-Do, Thi Anh Thu Do, Rina Yu & Hoon Yoo (2012). „Ethanol Elicits Inhibitory Effect on the Growth and Proliferation of Tongue Carcinoma Cells by Inducing Cell Cycle Arrest“. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology* 16.3, S. 153. DOI: 10.4196/kjpp.2012.16.3.153.
- Legler, J., C. E. van den Brink, A. Brouwer, A. J. Murk, P. T. van der Saag, A. D. Vethaak & B. van der Burg (1999). „Development of a stably transfected estrogen receptor-mediated luciferase reporter gene assay in the human T47D breast cancer cell line“. *Toxicological Sciences* 48.1, S. 55–66. DOI: 10.1093/toxsci/48.1.55.
- Legler, Juliette, Laura M. Zeinstra, Femke Schuitemaker, Peter H. Lanser, Jan Bogerd, Abraham Brouwer, A. Dick Vethaak, Pim de Voogt, Albertinka J. Murk & Bart van der Burg (2002). „Comparison of in Vivo and in Vitro Reporter Gene Assays for Short-Term Screening of Estrogenic Activity“. *Environmental Science & Technology* 36.20, S. 4410–4415. DOI: 10.1021/es010323a.

- Mills, Lesley J. & Clinton Chichester (2005). „Review of evidence: Are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations?“ *Science of The Total Environment* 343.1-3, S. 1–34. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2004.12.070.
- Miyakawa, Hitoshi, Maki Imai, Naoki Sugimoto, Yuki Ishikawa, Asano Ishikawa, Hidehiko Ishigaki, Yasukazu Okada, Satoshi Miyazaki, Shigeyuki Koshikawa, Richard Cornette & Toru Miura (2010). „Gene up-regulation in response to predator kairomones in the water flea, *Daphnia pulex*“. *BMC Developmental Biology* 10.1, S. 45. DOI: 10.1186/1471-213x-10-45.
- Miyakawa, Hitoshi, Tomomi Sato, You Song, Knut Erik Tollefsen & Taisen Iguchi (2017). „Ecdysteroid and juvenile hormone biosynthesis, receptors and their signaling in the freshwater microcrustacean *Daphnia*“. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2017.12.006.
- Nagahama, Yoshitaka, Masaru Nakamura, Takeshi Kitano & Toshinobu Tokumoto (2004). „Sexual plasticity in fish: a possible target of endocrine disruptor action“. *Environmental sciences : an international journal of environmental physiology and toxicology* 11.1, S. 73–82. URL: <http://europepmc.org/abstract/MED/15746890>.
- Nakagawa, Yoshiaki (2005). „Nonsteroidal Ecdysone Agonists“. In: *Vitamins & Hormones*. Elsevier, S. 131–173. DOI: 10.1016/s0083-6729(05)73005-3.
- Nakagawa, Yoshiaki & Haruyuki Sonobe (2016). „20-Hydroxyecdysone“. *Handbook of Hormones. Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research* e98A-2, S. 560–563. DOI: 10.1016/b978-0-12-801028-0.00238-5.
- Niss, Frida, Anna Kjerstine Rosenmai, Geeta Mandava, Stefan Örn, Agneta Oskarsson & Johan Lundqvist (2018). „Toxicity bioassays with concentrated cell culture media—a methodology to overcome the chemical loss by conventional preparation of water samples“. *Environmental Science and Pollution Research* 25.12, S. 12183–12188. DOI: 10.1007/s11356-018-1656-4.
- Peterson, E. W. (2005). „Persistence of 17 β -Estradiol in Water and Sediment-Pore Water from Cave Streams in Central Missouri“. *Environmental and Engineering Geoscience* 11.3, S. 221–228. DOI: 10.2113/11.3.221.
- Prosi & Müller (1987). „Bedeutung der Sedimente als Schwermetallfalle; Bioverfügbarkeit und Mobilität von Metallen in Sedimenten in Bezug auf den Biotransfer in limnischen Organismen.“ In: Lillelund, K. u. a. Kap. Bioakkumulation in Nahrungsketten - Zur Problematik der Akkumulation von Umweltchemikalien in aquatischen Systemen.

- Retnakaran, Arthur, Peter Krell, Qili Feng & Basil Arif (2003). „Ecdysone agonists: Mechanism and importance in controlling insect pests of agriculture and forestry“. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 54.4, S. 187–199. DOI: 10.1002/arch.10116.
- Šarc, Lucija & Metoda Lipnik-Štangelj (2009). „Comparison of Ethanol and Acetaldehyde Toxicity in Rat Astrocytes in Primary Culture“. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* 60.3. DOI: 10.2478/10004-1254-60-2009-1927.
- Schmit, Hans & Midas Dekkers (1984). *Schmutzige Wasser. Unsere Flüsse und Seen klagen an*. Reinbek bei Hamburg: Rowohlt Verlag GmbH.
- Schmitt, Sebastian, Georg Reifferscheid, Evelyn Claus, Michael Schlüsener & Sebastian Buchinger (2012). „Effect directed analysis and mixture effects of estrogenic compounds in a sediment of the river Elbe“. *Environmental Science and Pollution Research* 19.8, S. 3350–3361. DOI: 10.1007/s11356-012-0852-x. URL: <https://doi.org/10.1007/s11356-012-0852-x>.
- Song, You, Jan Thomas Rundberget, Linn Mari Evenseth, Li Xie, Tânia Gomes, Tore Høgåsen, Taisen Iguchi & Knut Erik Tollefsen (2016). „Whole-Organism Transcriptomic Analysis Provides Mechanistic Insight into the Acute Toxicity of Emamectin Benzoate in *Daphnia magna*“. *Environmental Science & Technology* 50.21, S. 11994–12003. DOI: 10.1021/acs.est.6b03456.
- Sons, John Wiley & (2009). „Trypsinierung von Zellkulturzellen“. *Biologie in unserer Zeit* 39.4, S. 234–234. DOI: 10.1002/biuz.200990056.
- Stehle, Sebastian & Ralf Schulz (2015). „Agricultural insecticides threaten surface waters at the global scale“. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112.18, S. 5750–5755. DOI: 10.1073/pnas.1500232112.
- Tatsumi, Hiroki, Tsutomu Masuda, Naoki Kajiyama & Eiichi Nakano (1989). „Luciferase cDNA from Japanese firefly, *Luciola cruciata*: Cloning, structure and expression in *Escherichia coli*“. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence* 3.2, S. 75–78. DOI: 10.1002/bio.1170030208.
- Terry, L Riss, A Moravec Richard, Niles Andrew, Benink Helene, Worzella Tracy, Minor Lisa, Storts Douglas & Reid Yvonne (2016). „Cell Viability Assays“. *Promega Corporation*.
- Truman, A. & B. Hook (2013). „Differentiating Changes in Glutathione Levels from Cytotoxic Events Using Multiplexed Assays“. *Promega Corporation*. URL: [http:](http://)

[//www.promega.de/resources/pubhub/differentiating-changes-in-glutathione-levels-from-cytotoxic-events/](http://www.promega.de/resources/pubhub/differentiating-changes-in-glutathione-levels-from-cytotoxic-events/).

Tyler, C. R., S. Jobling & J. P. Sumpter (1998). „Endocrine Disruption in Wildlife: A Critical Review of the Evidence“. *Critical Reviews in Toxicology* 28.4, S. 319–361. DOI: 10.1080/10408449891344236.

UBA (2015). *Organische Mikroverunreinigungen in Gewässern. Vierte Reinigungsstufe für weniger Einträge*. Hrsg. von Umweltbundesamt. Redaktion: Dr. Bettina Rechenberg. URL: https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/378/publikationen/organische_mikroverunreinigungen_in_gewaessern_vierte_reinigungsstufe_0.pdf.

UBA (2017). „Vorkommen von Chemikalien in der Umwelt“. *Umweltbundesamt*. URL: <https://www.umweltbundesamt.de/daten/chemikalien/vorkommen-von-chemikalien-in-der-umwelt>.

Verhaegen, Yves, Koen Parmentier, Luc Swevers, Ellen Renders, Pierre Rougé, Wim De Coen, Kris Cooreman & Guy Smagghe (2011). „The heterodimeric ecdysteroid receptor complex in the brown shrimp *Crangon crangon*: EcR and RXR isoform characteristics and sensitivity towards the marine pollutant tributyltin“. *General and Comparative Endocrinology* 172.1, S. 158–169. DOI: 10.1016/j.ygcen.2011.02.019.

Wainwright, Geoffrey, Simon G. Webster, Mark C. Wilkinson, J. Sook Chung & Huw H. Rees (1996). „Structure and Significance of Mandibular Organ-inhibiting Hormone in the Crab, *Cancer pagurus*“. *Journal of Biological Chemistry* 271.22, S. 12749–12754. DOI: 10.1074/jbc.271.22.12749.

Watanabe, Hajime (2018). *Der Große Wasserfloh - Daphnia magna*. Zugriff: 11.11.2018. URL: <http://www.wirbellosen-aquarium.de/krebse/daphnia-magna.html>.

Welshons, Wade V., Michael F. Wolf, Catherine S. Murphy & V. Craig Jordan (1988). „Estrogenic activity of phenol red“. *Molecular and Cellular Endocrinology* 57.3, S. 169–178. DOI: 10.1016/0303-7207(88)90072-x.

Wilde, R. De, L. Swevers, T. Soin, O. Christiaens, P. Rougé, K. Cooreman, C.R. Janssen & G. Smagghe (2013). „Cloning and functional analysis of the ecdysteroid receptor complex in the opossum shrimp *Neomysis integer* (Leach, 1814)“. *Aquatic Toxicology* 130-131, S. 31–40. DOI: 10.1016/j.aquatox.2012.12.011.

Wong, Agnes W, Melanie Willingham, Junhua Xiao, Trevor J Kilpatrick & Simon S Murray (2008). „The Neurotrophin Receptor Homolog-2 regulates Nerve Growth

-
- Factor signaling." *Journal of Neurochemistry*. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2008.05539.x.
- Ying, Guang-Guo, Rai S Kookana & Ying-Jun Ru (2002). „Occurrence and fate of hormone steroids in the environment“. *Environment International* 28.6, S. 545–551. DOI: 10.1016/s0160-4120(02)00075-2.
- Zhou, Yiqi, Jinmiao Zha & Zijian Wang (2011). „Occurrence and fate of steroid estrogens in the largest wastewater treatment plant in Beijing, China“. *Environmental Monitoring and Assessment* 184.11, S. 6799–6813. DOI: 10.1007/s10661-011-2459-y.
- Zhou, Yiqi, Jinmiao Zha, Yiping Xu, Bingli Lei & Zijian Wang (2011). „Occurrences of six steroid estrogens from different effluents in Beijing, China“. *Environmental Monitoring and Assessment* 184.3, S. 1719–1729. DOI: 10.1007/s10661-011-2073-z.
- Zuellig, Hans (1956). „Sedimente als Ausdruck des Zustandes eines Gewässers“. de. *PhD-Thesis*. DOI: 10.3929/ethz-a-000223039.