

Programm Lebensgrundlage Umwelt
und ihre Sicherung (BWPLUS)

Abschlussbericht

Entwicklung und Validierung von *in vitro* Prüfsystemen zum Nachweis von endokrin wirksamen Fremdstoffen: Chemisch-analytische Überprüfung und biologischer Nachweis von potentiell endokrin wirksamen Stoffen in Kläranlagenausläufen bzw. Vorflutern

von

P. Pfluger^{1,2}, B. Wasserrab¹, E. O'Brien^{1,2}, A. Prietz², P. Spengler³, C. Schneider³, A.
Heußner¹, T. Schmid¹, B. Knörzer², J.W. Metzger³, D.R. Dietrich^{1,2}

¹)AG Umwelttoxikologie, Universität Konstanz

²)Euregio Ökotoxikologie Service Labor, Konstanz

³)Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte und Abfallwirtschaft, Universität
Stuttgart

Förderkennzeichen: PAÖ Ö-98004

Die Arbeiten des Programms Lebensgrundlage Umwelt und ihre Sicherung werden mit
Mitteln des Landes Baden-Württemberg gefördert

Zusammenfassung

Endokrin aktive Substanzen in der aquatischen Umwelt stehen derzeit im Blickpunkt von Forschung und Öffentlichkeit. Eine hormonelle Wirkung konnte dabei bisher für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische beobachtet werden. Die beobachteten Effekte reichten hierbei von Infertilität und verminderter Fekundität bis hin zur Störung der Gonadenorganogenese bei männlichen Fischen. In all diesen Fällen konnten die Effekte auf eine Verunreinigung des Lebensraumes Wasser mit hormonell aktiven Substanzen zurückverfolgt werden. Diese Wasserverunreinigung entstand z.B. durch Chemieunfälle oder durch die Landwirtschaft, v.a. aber durch die Einleitung von Abwasser aus industriellen und kommunalen Kläranlagen.

Untersucht wurden die Bodenseezuflüsse Schussen und Seefelder Aach sowie die Kläranlage Langwiese auf das Vorhandensein östrogen aktiver Substanzen sowie Pharmaka. Dies geschah einmal durch eine chemische Analytik mittels GC-MS. Die gleichen Wasserproben wurden zum anderen durch verschiedene biologische Testsysteme auf endokrine Stoffe geprüft. Zudem wurde die östrogene Potenz verschiedener Pharmaka und Xeno-Östrogene für die Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) sowie den Karpfen (*Cyprinus carpio*) bestimmt.

Aus den *in vitro* Testsystemen ergab sich folgende östrogene Potenz: 17 β -Östradiol - 17 α -Ethinylöstradiol > Östron > Genistein - Östriol > Bisphenol A > Nonylphenol > Diclofenac. Keine östrogenen Effekte zeigten β -Sitosterol, Bezafibrat, Carbamazepin, Clofibrinsäure sowie Naproxen. Die *in vitro* Tests für die Wasserproben ergaben, dass eine erhöhte organische Matrix-Belastung der Proben zu falsch positiven Ergebnissen führen kann. Prinzipiell aber war der Nachweis östrogen aktiver Stoffe in Wasserproben möglich, hierzu war jedoch eine Absicherung des Befundes durch mehrere *in vitro* – Testsysteme oder aber durch eine chemische Analyse nötig. Die chemische Analytik mittels GC-MS zeigte, dass die Östrogene, v.a. 17 β -Östradiol sowie 17 α -Ethinylöstradiol, für die östrogenen Effekte der Wasserproben verantwortlich gemacht werden können. Aus diesen biologischen Tests kombiniert mit den GC-MS-Analysen ergab sich dadurch folgendes Bild für die untersuchten Proben: die Seefelder Aach wies nur einen sehr geringen Gehalt an östrogen aktiven Substanzen auf, dieser stellt für die Fische in diesem Fluss keine Gefahr dar. Für die Schussen kann keine Entwarnung gegeben werden. Die Ergebnisse ergaben durchgehend Östradiolgehalte, die nahe am Schwellenwert für eine endokrine Wirkung in Fischen bei chronischer Belastung lagen, in einigen Fällen sogar deutlich darüber. Verursacher der Verunreinigung der Schussen

ist möglicherweise die Kläranlage Langwiese. Hier konnten endokrin aktive Stoffe im geklärten Abwasser nachgewiesen werden.

Summary

The presence of endocrine-active substances in the aquatic environment is a current focus of interest for both researchers and the general public. To date, hormonal effects have been observed in reptiles, amphibians and fish. These effects range from infertility and reduced fecundity to disruption of normal gonadogenesis in male fish. In all of these cases, the effects could be attributed to contamination of the aquatic habitat. Such contamination may occur through chemical spills or agricultural run-off but are generally a result of effluents from industrial and communal water treatment plants. Using GC-MS, this study examined samples from two feeder-rivers of Lake Constance, namely the Schussen and the Seefelder Aach and from the water treatment plant Mariatal, for the presence of estrogenic substances and selected pharmaceuticals. The same water samples were then examined using a variety of biological testing systems. Furthermore, the estrogenic potential of several pharmaceuticals and xenoestrogens was investigated in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and in carp (*Cyprinus carpio*). From the *in vitro* assays, a potency rank order of 17 β -estradiol – 17 α -ethinylestradiol > estrone > genistein – estriol > bisphenol A > nonylphenol > diclofenac could be deduced. In contrast, β -sitosterol, bezafibrate, carbamazepine, clofibrinic acid and naproxen displayed no estrogenic effects. The *in vitro* tests showed that the presence of organic matrix components in the water samples could cause false positive results. It was possible however, to identify estrogenic influences when the results of several *in vitro* test systems and chemical analysis were combined. The chemical analysis of the water samples showed that the presence of 17 β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol could be responsible for the estrogenic effects observed *in vitro*. The combination of the GC-MS analysis and the results from biological testing systems gives rise to the following conclusions for the samples tested: contamination of the Seefelder Aach with estrogenic substances is minimal and poses no threat to fish life. In contrast, valid concerns can be raised for the situation in the Schussen, where a continual contamination with estradiol was determined. The detected concentrations were near to, or indeed in certain cases, considerably higher than those accepted as threshold levels for endocrine activity in fish following chronic exposure. One probable cause for these levels is the Mariatal water treatment plant where endocrine-active substances could still be detected in effluent following completion of the treatment process.

Inhalt

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 | Das hormonelle System | 2 |
| 1.2 | Mögliche Einwirkungen endokrin aktiver Fremdstoffe aufs Hormonsystem | 3 |
| 1.3 | Der Östrogenrezeptor und seine Funktionsweise | 4 |
| 1.4 | Substanzen mit endokriner Wirkung | 6 |
| 1.5 | <i>In Vitro</i> und <i>In Vivo</i> Testsysteme zum Nachweis endokrin aktiver Substanzen | 9 |
| 1.6 | Ziel der Arbeit | 12 |
| 2 | MATERIAL & METHODEN | 17 |
| 2.1 | Material | 17 |
| 2.1.1 | Fische | 17 |
| 2.1.2 | Substanzen | 17 |
| 2.2 | Methoden | 19 |
| 2.2.1 | Probennahme | 19 |
| 2.2.2 | Aufarbeitung | 19 |
| 2.2.2.1 | Flüssig/flüssig-Extraktion mit Dichlormethan | 19 |
| 2.2.2.2 | Flüssig/flüssig-Extraktion mit Hexan | 20 |
| 2.2.2.3 | Festphasenextraktion und Cleanup | 21 |
| 2.2.2.4 | Bestimmung der Wiederfindungsrate | 21 |
| 2.2.3 | Untersuchung von Flusswasserextrakten sowie einer Flusswasserprobe mit GC-MS | 22 |
| 2.2.3.1 | Messung von Östrogenen und endokrin aktiven Substanzen in den Flusswasserextrakten | 23 |
| 2.2.3.2 | Messung von Östrogenen in den Flusswasserproben Schussen 30.9.99 sowie 1.10. – 7.10.2000 | 26 |
| 2.2.3.3 | Messung von ausgewählten Pharmaka im Oberflächenwasser der Schussen (1.10.2000 – 7.10.2000) | 27 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 2.2.4 | <i>In vivo</i> Methoden zum Nachweis der generellen Toxizität sowie Embryotoxizität von Flusswasserproben..... | 28 |
| 2.2.4.1 | <i>Daphnia magna</i> Immobilisationstest | 28 |
| 2.2.4.2 | FETAX (Frog Embryo Teratogenicity Assay <i>Xenopus</i>)..... | 29 |
| 2.2.4.3 | DRETA (<i>Danio rerio</i> Embryo Teratogenicity Assay) | 31 |
| 2.2.5 | CERBA : Kompetitiver Östrogen-Rezeptor Bindungs Assay | 33 |
| 2.2.5.1 | Forellenleber-Zytosolpräparation | 33 |
| 2.2.5.2 | Bestimmung von K_d und B_{max} : Sättigungs-Assay | 33 |
| 2.2.5.3 | Kompetitiver Bindungs-Assay..... | 34 |
| 2.2.6 | Induktion der Vitellogenin- und Östrogenrezeptor-mRNA-Synthese in Forellen- und Karpfen-Hepatozyten, sowie der Östrogenrezeptor-mRNA-Synthese in Gonadenzellen..... | 36 |
| 2.2.6.1 | Isolierung von Forellen-Hepatozyten | 36 |
| 2.2.6.2 | Isolierung von Karpfen-Hepatozyten..... | 38 |
| 2.2.6.3 | Isolierung von Gonadenzellen | 39 |
| 2.2.6.4 | Passage von Gonadenzellen..... | 40 |
| 2.2.6.5 | Stimulation der Zellen | 41 |
| 2.2.7 | Expression und Detektion von Vitellogenin (Protein-Ebene) | 42 |
| 2.2.7.1 | Regenbogenforellen- Vitellogenin- ELISA | 42 |
| 2.2.7.2 | Karpfen- Vitellogenin- ELISA | 43 |
| 2.2.8 | Präparation der RNA aus Hepatozyten und –Gonadenzellen..... | 44 |
| 2.2.9 | RNA-Analyse mittels Northern Blot | 45 |
| 2.2.10 | RNA-Analyse mittels RT-PCR (Reverse Transkription und Polymerase Kettenreaktion) in Forellen-Hepatozyten..... | 52 |
| 2.2.11 | RNA-Analyse mittels RT-PCR (Reverse Transkription und Polymerase Kettenreaktion) in Karpfen-Hepatozyten..... | 55 |
| 2.2.12 | Überprüfung der RT-PCR-Ergebnisse mittels Southern Blot (Forelle)..... | 56 |
| 3 | ERGEBNISSE | 58 |
| 3.1 | Probennahme und Aufarbeitung | 58 |
| 3.1.1 | Probennahme | 58 |
| 3.1.2 | Aufarbeitung und Bestimmung der Wiederfindungsrate..... | 59 |
| 3.1.2.1 | Vergleich der $^3\text{H-E}_2$ -Wiederfindungsrate von Hexan-Aufarbeitung und Dichlormethan-Aufarbeitung | 60 |
| 3.2 | Nachweis von endokrin aktiven Substanzen in Flusswasser-Extrakten sowie reinem Flusswasser mittels GC-MS | 61 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 3.2.1 | Analyse der Flusswasser-Extrakte | 61 |
| 3.2.2 | Analyse der Flusswasserproben..... | 62 |
| 3.2.2.1 | Östrogene und endokrin aktive Substanzen im Schussenwasser..... | 62 |
| 3.2.2.2 | Pharmaka im Schussenwasser | 64 |
| 3.3 | <i>In vivo</i> Methoden zum Nachweis von Embryotoxizität von Flusswasserproben | 65 |
| 3.3.1 | Daphnien-Immobilisationsassay | 65 |
| 3.3.2 | FETAX (Frog Embryo Teratogenicity Assay <i>Xenopus</i>)..... | 65 |
| 3.3.3 | DRETA (<i>Danio rerio</i> Embryo Teratogenicity Assay) | 69 |
| 3.4 | Competitive Estrogen Receptor Binding Assay (CERBA) | 72 |
| 3.4.1 | Gewinnung und Charakterisierung des Rezeptors..... | 72 |
| 3.4.2 | Bindung von Einzelsubstanzen an den Östrogenrezeptor..... | 74 |
| 3.4.3 | Bindung ausgewählter Gemische an den Östrogenrezeptor | 77 |
| 3.4.4 | Östrogenrezeptor-Bindung von Flusswasser-Extrakten | 80 |
| 3.5 | Vitellogenin-ELISA | 86 |
| 3.5.1 | Forelle | 86 |
| 3.5.2 | Karpfen | 87 |
| 3.6 | Northern Blot | 88 |
| 3.7 | RT-PCR (Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion) | 91 |
| 3.7.1 | Forelle | 91 |
| 3.7.2 | Karpfen | 105 |
| 3.8 | Southern Blot | 105 |
| 4 | DISKUSSION | 108 |
| 4.1 | Probennahme und Aufarbeitung | 108 |
| 4.2 | Analytik mittels GC-MS: Östrogene und endokrin aktive Substanzen .. | 110 |
| 4.2.1 | Endokrin aktive Stoffe im Flusswasser und ihre Bedeutung für aquatische Organismen | 111 |
| 4.2.2 | Endokrin aktive Stoffe im Ablauf der Kläranlage Langwiese..... | 116 |
| 4.2.3 | Pharmaka im Flusswasser der Schussen..... | 118 |
| 4.3 | Untersuchung der akuten Toxizität sowie Embryotoxizität von Flusswasserproben | 119 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 4.4 | CERBA – Bindungsstudien | 121 |
| 4.4.1 | Bindung von Einzelsubstanzen an den Östrogenrezeptor..... | 121 |
| 4.4.2 | Bindung von Gemischen..... | 127 |
| 4.4.3 | Bindung von Wasserproben im Vergleich zu ihrem Gehalt an endokrin aktiven Substanzen | 128 |
| 4.5 | Detektion östrogenen Aktivität auf Protein-Ebene (Vg-ELISA) | 133 |
| 4.6 | Detektion östrogenen Aktivität verschiedener Reinsubstanzen auf mRNA-Ebene (Northern Blot und RT-PCR) und Abschätzung einer ökotoxikologischen Relevanz der gefundenen Effekte. | 136 |
| 4.7 | Überprüfung der ER- und Vg-cDNA-Banden aus der RT-PCR im Southern Blot | 142 |
| 4.8 | Schlußbetrachtung: Stellen endokrin aktive Stoffe eine Gefahr für die Seefelder Aach und die Schussen dar | 143 |
| 5 | ABBILDUNGSVERZEICHNIS | 147 |
| 6 | TABELLENVERZEICHNIS | 150 |
| 7 | LITERATURVERZEICHNIS | 151 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|--|
| β -Sit. | β -Sitosterol |
| $^3\text{H-E}_2$ | radioaktiv markiertes (tritiiertes) 17β -Östradiol |
| APE | Alkylphenoethoxylate |
| BBP | Benzyl-n-Butylphthalat |
| Bis A | Bisphenol A |
| B_{max} | maximale Anzahl der Rezeptor-Bindungsstellen |
| BSA | Bovine Serum Albumin (Rinderserum Albumin) |
| Carb | Carbamazepin |
| CERBA | Competitive Estrogen Receptor Binding Assay |
| DBP | Di-n-Butylphthalat |
| DCM | Dichlormethan |
| Diclo | Diclofenac |
| DRETA | <i>Danio rerio</i> Embryo Teratogenicity Assay |
| E1 | Östron |
| E2 | 17β -Östradiol |
| E3 | Östriol |
| EC_{50} | Effective Concentration (50%) |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EE | 17α -Ethinylöstradiol |
| EE2 | 17β -Ethinylöstradiol |
| ER | Östrogenrezeptor |
| ERE | Estrogen Responsive Element |
| FCS | Fetal Calf Serum (fötales Kälberserum) |
| FETAX | Frog Embryo Teratogenicity Assay <i>Xenopus</i> |
| GC-MS | Gaschromatographie – Massenspektrometrie |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography |
| Hsp | Heat shock protein |
| IC_{50} | Inhibiting Concentration (50%) |
| IP | Intraperitoneal |
| K_d | Dissoziationskonstante |
| MSTFA | n-Methyl-n-trimethylsilyltrifluoracetamid |
| n.a. | nicht auswertbar |
| n.b. | nicht bestimmt |
| NP | Nonylphenol |
| NP1EC | Nonylphenoxyessigsäure |
| PBS | Phosphate Buffered Saline |

| | |
|--------|---|
| PCB's | Polychlorierte Biphenyle |
| PCDD's | Polychlorierte Dibenzo-p-dioxine |
| pcr | polymerase chain reaction |
| PVC | Polyvinyl-chlorid |
| QSAR | Quantitative Structure Activity Relationships |
| SiOH | Siliciumhydroxid (Kieselgel) |
| TBT | Tributylzinn |
| TMCS | Trimethylchlorosilan |
| Vg | Vitellogenin |

1 EINLEITUNG

Seit einigen Jahren steht die Belastung der Umwelt mit endokrin aktiven Stoffen im Blickpunkt des Interesses von Wissenschaft und Öffentlichkeit. Berichte von einer Abnahme der Spermienzahl bei Männern sowie der Zunahme von Missbildungen im Genitalbereich, wie etwa Hypospadie und Kryptorchismus (Hodendystrophie), schreckten viele Menschen auf, ein kausaler Zusammenhang zur Belastung mit hormonwirksamen Stoffen konnte bisher jedoch nicht erbracht werden (Swan et al. 1997; Paulozzi 1999). Für einige Wildtierpopulationen ist ein solcher Zusammenhang gut belegt. Nach einem Chemieunfall am Lake Apopka in Florida, bei dem große Mengen an DDT in den See gelangten, konnte ein Zusammenbruch der dortigen Alligatorenpopulation beobachtet werden. Bei Jungtieren wurde eine Verkümmernng und Missbildung der Reproduktionsorgane beobachtet, die eindeutig auf die Einwirkung einiger hormonell wirksamer Metabolite von DDT zurückgeführt werden konnte. Dies hatte bei jungen Männchen meist Sterilität bzw. Zeugungsunfähigkeit zur Folge (Guillette et al. 1994; Guillette et al. 1996). Auch bei Möwen in Kalifornien und um die großen Seen (USA) sowie beim Weiskopfschneepfaffen an der amerikanischen Ostküste wurden Störungen der Reproduktionsfähigkeit beobachtet. Neben einer Verdünnung der Eischalen und Verhaltensänderungen wurden vermehrt Wachstumsveränderungen und z.T. Missbildungen beobachtet bis hin zur Feminisierung männlicher Vögel. Diese Effekte wurden auf die Verschmutzung der Gewässer mit DDT, PCB's sowie Dioxinen zurückgeführt, welche die Vögel über ihre Beutetiere, die Fische, aufgenommen hatten. (Fry 1995). Der am besten belegte Fall in der aquatischen Umwelt ist die Vermännlichung weiblicher Meeresschnecken durch das in Schiffsanstrichen als Bewuchsschutz verwendete Tributylzinn (TBT). Das schon in kleinsten Konzentrationen (ab 1 ng/l) wirksame TBT führte entlang von stark benutzten Schiffsrouten und in Häfen zu einem Zusammenbruch der Schneckenpopulationen (Tyler et al. 1998). Intensive Studien an freilebenden sowie in Käfigen gehaltenen Fischen in englischen Flüssen ergaben, dass viele männliche Fische Anzeichen von Intersex, also einer Verweiblichung der Geschlechtsmerkmale, zeigten. So wurde z.B. in den männlichen Testis Ovargewebe gefunden, außerdem produzierten die Männchen mit Vitellogenin ein Eidotter-Vorläuferprotein welches normalerweise nur von Weibchen gebildet wird (Purdom et al. 1994; Harries et al. 1996; Harries et al. 1997).

1.1 Das hormonelle System

Alle oben beschriebenen Beispiele haben eines gemeinsam: die Einwirkung von exogenen Chemikalien auf das Hormonsystem des Organismus. Wie die obigen Fälle außerdem zeigten, beruhte die Wirkung der Chemikalien auf einer Beeinträchtigung des Geschlechtshormonsystems. Diese Arbeit beschäftigt sich daher auch ausschließlich mit den Geschlechtshormonen (= Sexualhormone) bzw. den sexualhormon-ähnlichen Chemikalien und ihren Auswirkungen. Weibliche Sexualhormone werden als Östrogene bezeichnet, männliche als Androgene. Weiblich bzw. männlich bedeutet in diesem Fall, dass diese Hormone für die Ausbildung des Geschlechts sowohl in der Entwicklung der primären Geschlechtsmerkmale beim Embryo als auch später für die Ausbildung der sekundären Geschlechtsmerkmale (z.B. Brüste bei der Frau etc.) verantwortlich sind. Neben der Steuerung der Reproduktion beim adulten Organismus (Menstruation, Östrus, Spermienproduktion, Brunftzeit etc.) spielen Sexualhormone aber auch in anderen Gebieten wie z.B. bei Entstehung der Osteoporose oder aber Erkrankungen des Blutgefäßsystems eine Rolle. Ihre Wirkung entfalten die Hormone über die Bindung an einen nukleären Rezeptor. Dieser wird durch die Bindung aktiviert, bindet seinerseits an eine spezifische Gensequenz der DNA und löst dort die Transkription, also die Bildung der mRNA von spezifischen Proteinen, aus. Diese mRNA wird anschließend im Zytosol durch die Translation ins jeweilige Protein übersetzt, dieses wird an seinen Bestimmungsort transportiert und nimmt dort seine Funktion auf. Neben nukleären Rezeptoren existieren z.B. für das Steroidhormon 17β -Östradiol auch noch Rezeptoren an der Zelloberfläche, diese besitzen jedoch eine völlig andere Funktion, z.B. als Ionenkanäle (Watson et al. 1995; Monje und Boland 1999). Die Regulation der Hormone selbst wird von übergeordneten Zentren des Gehirns, v.a. von der Hypophyse und dem Hypothalamus, gesteuert. Diese produzieren übergeordnete Hormone die in Hormondrüsen wie etwa den Ovarien oder dem Testis die Produktion der Sexualhormone 17β -Östradiol bzw. Testosteron bewirken.

Die Wirkung eines Hormons ist stark vom Entwicklungsstand eines Organismus abhängig. Im sich entwickelnden Organismus werden viele Prozesse wie etwa die Ausbildung der Geschlechtsorgane oder spezifischer Zentren im Gehirn durch Hormone gesteuert, eine Störung würde hier also zu einer irreversiblen Schädigung führen. Im Adulttier dagegen haben Hormone meist nur noch eine regulierende Funktion, d.h. sie steuern z.B. die Spermienproduktion, den weiblichen Zyklus sowie die Funktion einiger Organe. Tritt hier eine Störung durch einen Fremdstoff auf, so ist dessen Effekt reversibel und klingt nach dem Verschwinden des Fremdstoffs wieder ab. Nur bei länger andauernder Einwirkung sind ebenfalls bleibende Defekte möglich. Organismen in der Entwicklung scheinen somit empfindlicher auf hormonell aktive Fremdstoffe zu reagieren.

1.2 Mögliche Einwirkungen endokrin aktiver Fremdstoffe aufs Hormonsystem

Eine Einwirkung hormonell aktiver Fremdstoffe ist an vielen Stellen des Hormonsystems möglich. Die eingangs erwähnte Wirkung von Tributylzinn (TBT) auf Meeresschnecken beruht beispielsweise auf einer Hemmung der Aromatase. Dieses Enzym ist zuständig für die Umwandlung von Testosteron zu 17β -Östradiol. Durch die Hemmung der Steroidbiosynthese kommt es also zu einer Anhäufung von Testosteron, die Folge ist ein androgener Effekt (Tyler et al. 1998). Dieser Effekt wurde auch für einige Phytohormone berichtet (Pelissero et al. 1996; Kao et al. 1998). Neben der Steroidbiosynthese ist auch die Einwirkung auf den Hormonabbau möglich. Dieser wird durch spezifische Cytochrom P_{450} – Monooxygenasen der Leber bewerkstelligt. Einige PCB – Kongenere und Dioxine, Nonylphenol sowie einige Phytohormone haben einen direkten Einfluss auf die Cytochrom P_{450} – Spiegel (Arukwe et al. 1997; Safe et al. 1998; Tremblay und Van der Kraak 1998). Dieser Einfluss beruht vermutlich auf der Bindung der Substanzen an den Ah - (Arylhydrocarbon-) Rezeptor (Safe et al. 1998). Durch die Zunahme an Cytochrom P_{450} – Enzymen in der Leber kommt es also zu einem verstärkten Abbau von Hormonen.

Neben dem Einfluss von Fremdstoffen auf den Hormonmetabolismus kann auch die Bioverfügbarkeit der Hormone beeinflusst werden. Hormone werden im Blut v.a. gebunden an Transportproteine wie SHBP (Sex Hormone-Bindung Globulin) oder ABP (Androgen Binding Protein) transportiert. Stört eine Substanz diese Bindung so kann dadurch die Konzentration an freiem und damit für die Zellen verfügbarem Hormon erhöht werden, die Hormonwirkung nimmt zu. Auch eine Erhöhung der Transportproteinkonzentration ist denkbar (Danzo 1997).

Der wichtigste Wirkort für die meisten hormonell aktiven Substanzen ist aber der Hormonrezeptor. Die Bindung an den jeweiligen Rezeptor ist für jedes Hormon Voraussetzung für die Induktion einer Genantwort und dadurch auch für die hormonelle Wirkung an sich. Kann ein Fremdstoff anstelle des Hormons an den Rezeptor binden und dort auch eine Genantwort auslösen, so spricht man von einem Agonisten. Kann ein Stoff aber an den Rezeptor binden ohne auch eine Genantwort auszulösen, so handelt es sich um einen Antagonisten, die Wirkung des eigentlichen Hormons wird blockiert. Die Affinität der Fremdstoffe für den Hormonrezeptor spielt hierbei eine große Rolle. Hormone kommen in kleinsten Konzentrationen im Blut vor, ihre Rezeptoren müssen deshalb sehr spezifisch für das jeweilige Hormon sein und dieses mit hoher Affinität binden können, um überhaupt eine Genantwort auszulösen. Besitzt ein Fremdstoff nun eine kleine Affinität zum Rezeptor, so ist eine Bindung und damit endokrine Wirkung auf diesem Weg unwahrscheinlich. Je höher die Affinität eines Fremdstoffes aber ist,

umso größer wird die Chance einer Bindung und damit eines agonistischen oder antagonistischen Effekts. Diese Bindung an einen Hormonrezeptor ist einer der Hauptpunkte dieses Projektes. Hierbei wurde die Untersuchung auf die Bindung von Fremdstoffen an den Östrogenrezeptor der Regenbogenforelle beschränkt. Das folgende Kapitel soll deshalb genaueren Einblick in die Funktionsweise dieses Östrogenrezeptors geben.

1.3 Der Östrogenrezeptor und seine Funktionsweise

Der Östrogenrezeptor der Regenbogenforelle (*Onchorhynchus mykiss*), ein Protein bestehend aus 574 Aminosäuren mit einer Masse von 65 kDa, wird in fast allen Geweben des Körpers exprimiert, v.a. aber in der Leber, in den Ovarien bzw. Testes sowie im Gehirn (Pakdel et al. 1990). Er gehört zur Klasse der Steroidrezeptoren, diese sind Teil einer Familie von Ligand-induzierten Transkriptionsfaktoren wie etwa auch der Thyroidhormon- oder der Retinolsäurerezeptor. Sie alle können in 6 Domänen, A – F, mit 3 Hauptaufgaben unterteilt werden: hochspezifische und hochaffine Bindung des Liganden, anschließende Bindung an ein spezifisches Element der DNA sowie Transaktivierung der Genexpression. Die Domänen A und B sind für die (Hormon-unabhängige) Transaktivierung zuständig, Domäne C mit zwei Zinkfingern für die DNA-Bindung, Domäne E ist neben der Hormon-abhängigen Transaktivierung, der Dimerisierung und der Interaktion mit Heat Shock – Proteinen (Hsp) v.a. für die Hormonbindung zuständig (Petit et al. 1995). Eine Konservierung der Gensequenz des Östrogenrezeptors wurde für alle Tierarten außer den Fischen gefunden. Hier zeigten nur die C- sowie die E-Domäne eine hohe Homologie zu „Nicht-Fischen“ (Le Dréan et al. 1995). Durch Röntgenstrukturanalysen von Brzozowski am menschlichen Östrogenrezeptor wurde die Region der E – Domäne charakterisiert, die für die Bindung der Hormone zuständig ist (LBD – Ligand-Binding-Domain) (Brzozowski et al. 1997). Hierbei zeigte sich, dass sich die Bindungshöhle in einer hydrophoben Umgebung im Inneren des Proteins befindet. Mit einem Volumen von 45 nm^3 war diese Bindungshöhle fast doppelt so groß, wie es für den natürlichen Liganden nötig wäre (17β -Östradiol : $24,5 \text{ nm}^3$). In Versuchen mit verschiedenen Liganden zeigte sich, dass neben der Bindestelle für 17β -Östradiol noch weitere Bindungen innerhalb der Bindungshöhle möglich waren, diese Bindungen verursachten auch eine andere Konformationsänderung des Rezeptors als die Bindung von Östradiol. Die Bindung von 17β -Östradiol erfolgte über Wasserstoffbrückenbindungen der Hydroxygruppen am A- und D-Ring sowie über hydrophobe Wechselwirkungen dazwischen.

Die Kombination von spezifischen polaren und unpolaren Interaktionen ermöglicht dem Östrogenrezeptor also die Erkennung und Bindung von 17β -Östradiol trotz einer großen Zahl an ähnlichen endogenen Hormonen mit subnanomolarer Affinität. Der Rezeptor

zeigte bei der Bindung aber auch eine hohe Promiskuität, z.T. sehr unterschiedliche Stoffe konnten an den Rezeptor binden. Hierfür mussten die Substanzen in jedem Fall einen aromatischen Ring besitzen, die hydrophoben Gruppen jedoch waren in mannigfaltiger Weise möglich (Brzozowski et al. 1997). Dieses Charakteristikum in Bezug auf ihre Molekülstruktur wird von vielen Substanzen erfüllt. Der folgende Abschnitt wird einige dieser Substanzen vorstellen. Zuvor jedoch soll gezeigt werden, was die Bindung von 17 β -Östradiol bewirkt.

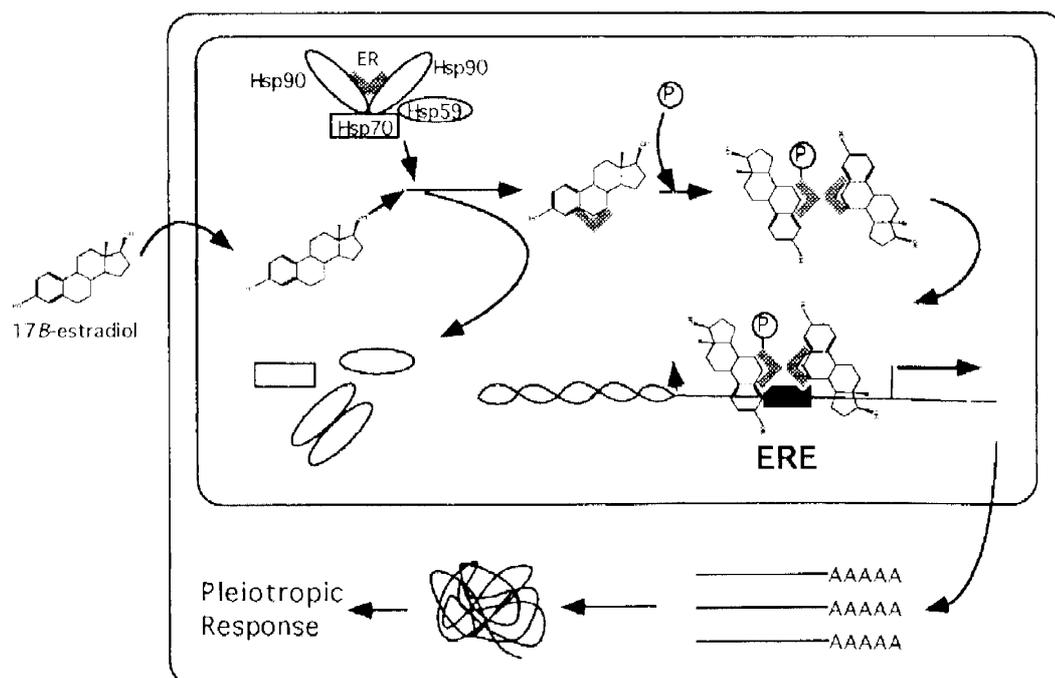


Abb. 1.1: Östrogenrezeptor-vermittelte Wirkung von 17 β -Östradiol auf die Genexpression

17 β -Östradiol wird über den Blutkreislauf zur Zielzelle transportiert. Dort gelangt es über das Zytosol in den Zellkern und bindet an den Östrogenrezeptor. Dieser wird durch Heat-Shock-Proteine in einer hochaffinen Form gehalten. Nach Bindung von 17 β -Östradiol fallen die Heat-Shock-Proteine (Hsp) ab, der Rezeptor wird anschließend nach Phosphorylierung dimerisiert und hiermit aktiviert. Das aktivierte Rezeptor-Dimer bindet an ein spezifisches Element der DNA, das Estrogen Responsive Element (ERE). Dieses fungiert als Enhancer-Element des Promotors. Nach Bindung des Dimers wird infolgedessen die Transkription des nachfolgenden Gens eingeleitet. Die gebildete mRNA wird anschließend ins Zytosol transportiert und dort in der Translation ins Protein übersetzt. Dieses Protein ist letztendlich für die östrogene Wirkung verantwortlich (Parker 1993).

1.4 Substanzen mit endokriner Wirkung

Viele Substanzen sind bis heute schon als endokrin wirksam identifiziert worden. Diese Wirkung wurde teilweise zufällig *in vivo* entdeckt, teilweise entstammt sie aber auch gezielten Versuchen an *in vitro* Testsystemen. Da in der Diskussion schon eingehend die endokrine Wirkung einiger dieser Substanzen behandelt wird, soll deshalb im folgenden Abschnitt auf die Beschreibung der endokrinen Effekte verzichtet werden. Im Vordergrund stehen soll vielmehr die Beschreibung der Substanz, ihre Herkunft bzw. ihr Verwendungszweck sowie ihr Weg in die Umwelt bzw. zum Organismus. Zur Beschreibung der endokrinen Wirkung wird auf die Primärliteratur bzw. wenn nichts angegeben auf die Diskussion verwiesen.

Das natürliche Östrogen 17 β -Östradiol wird praktisch im gesamten Tierreich als dominierendes weibliches Sexualhormon produziert. Es ist bei vielen Säugetieren schon in kleinsten Konzentrationen von 2–3 pg/ml Blut hochwirksam (Tyler et al. 1998). Auch die Metaboliten von Östradiol, Östron und Östriol, zeigen eine hohe biologische Aktivität. Die Ausscheidung der drei Östrogene erfolgt über den Urin. Frauen in der Schwangerschaft können hierbei bis zu 30 mg Östrogene pro Tag ausscheiden, Frauen im Monatszyklus zwischen 25 und 100 μ g (Stumpf et al. 1996). Durch intensive Viehwirtschaft kann auch eine große Menge an Östrogenen freigesetzt werden (Shore 1993). Die Ausscheidung der Östrogene erfolgt zu einem großen Teil über nahezu inaktive Konjugate (Glucurone bzw. Sulfate). Für diese wurde in Kläranlagen eine Dekonjugation durch mikrobielle Aktivität beschrieben, nach Passage durch die Kläranlage liegen die Östrogene also wieder in ihrer aktiven Form vor (Merz et al. 1998). Auch die nicht-konjugierten Östrogene werden in Kläranlagen nur unvollständig abgebaut und gelangen somit teilweise in die Flüsse (Stumpf et al. 1996; Ternes et al. 1999). Hier können sie z.B. von Fischen über die Kiemen oder die Nahrung aufgenommen werden und ihre endokrine Wirkung entfalten. Auch die synthetischen Östrogene 17 α -Ethinylöstradiol und Mestranol gelangen über den gleichen Weg wie die natürlichen Östrogene in die Flüsse. Sie werden in Dosen von 30–50 μ g/Tag als Kontrazeptiva (Anti-Baby-Pille) sowie in der Hormonsubstitutionstherapie eingesetzt. Da ihre biologische Wirkung denen der natürlichen Östrogene gleicht und ihr Abbau in den Kläranlagen auch nur unvollständig ist, stellen sie ebenfalls ein potentiell Risiko für aquatische Organismen dar (Merz et al. 1998).

Neben den natürlichen Östrogenen existieren noch weitere nicht künstlich erzeugte endokrin aktive Substanzen: die Phyto- und Mykohormone. Hierzu zählen die nicht-steroidalen Flavonoide wie z.B. Genistein, Daidzein, Equol und Coumestrol. Sie sind Bestandteil von Hülsenfrüchten wie Soja sowie diversen Kleearten. Ein Phytohormon mit einem Steroidgerüst ist z.B. β -Sitosterol. Dieser Stoff kommt in vielen Pflanzen,

wie etwa Hopfen und Mais vor, ist aber auch in Holz in großen Mengen zu finden und wird beispielsweise bei der Papierherstellung freigesetzt (Mellanen et al. 1996; Stumpf et al. 1996; Tremblay und Kraak 1999). Zearalenon wird von Schimmelpilzen gebildet und wird deshalb als Mykohormon bezeichnet. Phytohormone werden v.a. über die Nahrung (Soja) aufgenommen, über die Ausscheidungen ist auch eine Belastung der aquatischen Umwelt denkbar. β -Sitosterol ist in der aquatischen Umwelt bereits durch natürliche Zersetzungs Vorgänge vorhanden (Stumpf et al. 1996), diese natürliche Belastung kann durch anthropogene Vorgänge wie die erwähnte Papierherstellung massiv gesteigert werden. Die östrogene Wirkung der Phytohormone Genistein und β -Sitosterol wird intensiv in der Diskussion besprochen, weitere Daten zu Phytohormonen wurden z.B. von Safe, Santti oder Strauss zusammengefasst (Safe et al. 1998; Santti et al. 1998; Strauss et al. 1998).

Eine weitere Stoffklasse mit endokriner Wirkung sind die Alkylphenolpolyethoxylate (APE) und ihre Abbauprodukte. Diese APE finden als nichtionische Tenside v.a. in Reinigungsmitteln und in industriellen Prozessen, z.B. der Textilindustrie, eine Verwendung. Sie werden zudem als Zusatz zu Kunststoffen, Farben und Pestiziden eingesetzt. Das mit ca. 80 % am meisten eingesetzte APE stellt hierbei das Nonylphenolpolyethoxylat mit einer weltweiten Produktion von 300.000 Tonnen dar, 20 % entfallen hauptsächlich auf Octylpolyethoxylat (White et al. 1994). Ca. 60% dieser APE gelangen über das Abwasser in die aquatische Umwelt, vorher jedoch werden die APE v.a. in den Kläranlagen zu ihren stabileren Metaboliten abgebaut. Dies sind z.B. hydrophobe Metaboliten wie Nonylphenol und Octylphenol die sich v.a. im Sediment und im Klärschlamm anreichern, die hydrophileren Metaboliten wie Nonylphenoldiethoxylat oder Nonylphenoxyessigsäure sind dagegen v.a. in der Wassersäule zu finden (White et al. 1994). Die hohe Produktionsmenge gepaart mit den endokrinen Wirkungen, wie sie ausführlich in der Diskussion beschrieben werden, machen Alkylphenolpolyethoxylate und ihre Abbauprodukte damit zu wichtigen endokrin aktiven Verschmutzern der aquatischen Umwelt.

Bisphenole, allen voran Bisphenol A, sind ebenfalls endokrin aktive Substanzen mit einer breiten Verwendung. Sie werden als Monomere bei der Produktion von Polycarbonaten und Epoxidharzen sowie als Antioxidationsmittel in Kunststoffen eingesetzt. Bei unvollständiger Polymerisation kann dieses Monomer wieder aus den Materialien abgegeben werden, wie für Konservendosen und Zahnfüllungen gezeigt wurde (Brotons et al. 1995; Olea et al. 1996). Bisphenol A ist zwar gut wasserlöslich, wird jedoch schnell im Wasser abgebaut. Der breite Einsatz und die hohe Produktionsmenge machen es aber dennoch auch für die aquatische Umwelt zu einem Problemstoff. Die endokrine Wirkung von Bisphenol A in einigen *in vitro* Tests wird

ausführlich in der Diskussion beschrieben, ansonsten wird auf die Zusammenfassung von Bätcher (Bätcher et al. 1999) verwiesen.

Ein Stoffgruppe, die durch ihre hohe Persistenz und ihre ubiquitäre Verbreitung eine Rolle als globaler Verschmutzer der aquatischen Welt spielt, sind die Polychlorierten Biphenyle. Es handelt sich hierbei um eine aus 209 verschiedenen Kongeneren bestehende halogenierte aromatische Industriechemikalie mit einer ebenso großen Vielzahl an Anwendungsmöglichkeiten. Nur wenige dieser PCB-Kongeneren sind für die Kontamination der Umwelt verantwortlich, von diesen sind wiederum nur wenige toxisch. Durch ihre Persistenz konnten sich die PCBs in der ganzen Welt, v.a. aber der Nordhalbkugel, verbreiten. Durch ihre Lipophilie kommt es darüber hinaus zu einer Bioakkumulation von PCBs in den Fettgeweben vieler Organismen, durch die Biomagnifikation sind die Konzentrationen in Predatoren besonders hoch. An diesen Predatoren konnte *in vivo* eine Störung des endokrinen Systems beobachtet werden, wie das zu Beginn der Einleitung erwähnte Beispiel der Möwen Nordamerikas zeigte. Weitere Effekte wurden in den Reviews von Crews und Tyler zusammengefasst (Crews et al. 1995; Tyler et al. 1998).

Eine ähnlich weltweite Verbreitung ist für das Organochlorpestizid DDT bekannt. Dieses zeichnet sich ebenfalls durch eine hohe Persistenz und Lipophilie aus, es kommt deshalb auch zu einer Bioakkumulation und Biomagnifikation. Der Gebrauch dieses Pestizids ist heute weitgehend auf die Länder der zweiten und dritten Welt beschränkt, durch die hohe Halbwertszeit von bis zu 50 Jahren ist DDT jedoch noch immer in unserer Umwelt auffindbar, wenn auch in verschwindend geringen Konzentrationen (Bätcher et al. 1999). In den sich entwickelnden Ländern jedoch kann DDT durchaus eine Rolle als endokrin wirksamer Stoff spielen. Diese Rolle können bei uns die Ersatzpestizide für DDT, z.B. Methoxychlor, Lindan oder Kepon, wahrnehmen. Für diese Stoffe wurde ebenfalls eine endokrine Wirkung beschrieben (Bulger et al. 1978; Bulger und Kupfer 1983).

Polychlorierte Dibenzo-p-dioxine (PCDD), unerwünschte Nebenprodukte von chemischen Prozessen und Verbrennungen bei zu geringer Temperatur, gelten als extrem reproduktionstoxisch. Diese Wirkung beruht z.T. auf einer Störung des reproduktiven Systems, die Mechanismen sind jedoch vielfältig (Safe 1986; Birnbaum 1995; Safe et al. 1998). Eine Gefährdung der Umwelt ist aufgrund der geringen Konzentrationen nur für stark verschmutzte Sonderstandorte möglich (Tyler et al. 1998).

Eine weitere als endokrin aktiv identifizierte Substanzgruppe sind die Phthalate. Mit ihrem Einsatz als Weichmacher in Plastik gehören sie zu den am meisten verwendeten Chemikalien überhaupt. Sie finden außerdem in Kosmetikprodukten eine Verwendung.

Die am häufigsten verwendeten Phthalate sind hierbei DBP (Dibutylphthalat) sowie DEHP (Diethylhexylphthalat). Verschiedene *in vitro* und *in vivo* Studien zeigten z.T. eine schwache endokrine Wirkung der Phthalate, die Ergebnisse waren jedoch oft widersprüchlich (Tyler et al. 1998; Zacharewski et al. 1998; Bättscher et al. 1999).

Eine der am besten charakterisierten endokrin aktiven Chemikalien ist die Organozinnverbindung TBT (Tributylzinn). TBT wurde als Biozid in Schiffsanstrichen gegen den Bewuchs der Schiffsrümpfe eingesetzt und gelangte auf diesem Weg in die aquatische Umwelt. Ähnliche Verbindungen wurden auch als Fungizide eingesetzt sowie als Holz- und Textilschutzmittel. Die hohe Lipophilie von TBT führte zu einer Bioakkumulation in vielen aquatischen Organismen. Hier kam es schon in kleinsten Konzentrationen zu androgenen Effekten, wie das Beispiel der Meeresschnecken am Beginn der Einleitung zeigte (Matthiessen und Gibbs 1998).

Vinclozolin schließlich, ein Fungizid des Winterraps- und Obstanbaus (Apfel, Aprikose), zeigte in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Tests eine anti-androgene Wirkung (Kelce und Wilson 1997; Gray 1998). Neben all diesen Substanzen gibt es möglicherweise aber noch viele weitere bisher unbekannte Substanzen, die ebenfalls eine Wirkung aufs endokrine System vieler Organismen haben. Um diese Stoffe zu finden müsste jedoch ein intensives Screening von Tausenden von Substanzen stattfinden. Hierzu wäre ein Test nötig der schnell, kostengünstig und zuverlässig viele mögliche endokrine Wirkungen erfassen kann. Solch ein Test existiert jedoch nicht, die bisher bekannten Daten wurden vielmehr aus vielen verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Testsystemen gewonnen, die endokrine Wirkung der Substanzen musste aus diesen Daten extrapoliert werden. Einige dieser *in vitro* bzw. *in vivo* Testsysteme sind im folgenden kurz aufgeführt.

1.5 *In Vitro* und *In Vivo* Testsysteme zum Nachweis endokrin aktiver Substanzen

Die Auflistung der folgenden Testsysteme soll lediglich einen Überblick über die bestehenden Möglichkeiten zur Detektion endokrin aktiver Substanzen geben, sie erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

Viele *in vivo* Studien werden an Säugern durchgeführt. Hierbei werden den Testorganismen, meist Ratten, Mäusen oder Kaninchen, die zu testenden Substanzen entweder injiziert oder übers Futter verabreicht. Zu nennen ist hier z.B. der Uterusgewichts-Test. Messpunkt ist hier die Zu- oder Abnahme des Nassgewichts des Uterus ovariectomierter oder juveniler Mäuse nach Verabreichung der Testsubstanz (Shelby et al. 1996). Im Allen-Doisy-Test (Vaginal-Test) wird die Verhornung des

Vaginalepithels von Ratten als Endpunkt einer endokrinen Wirkung bestimmt (Odum et al. 1997). In *in vivo* Studien an aquatischen Organismen, wie z.B. der Regenbogenforelle, wurde neben der Fütterung mit endokrinen Substanzen (Tremblay und Van der Kraak 1998) auch noch die direkte Exposition über das Wasser eingesetzt (Jobling et al. 1995; Lech et al. 1996; Routledge et al. 1998). In ähnlichen Studien mit in Käfigen gehaltenen Forellen wurde Flusswasser auf endokrin aktive Stoffe untersucht (Harries et al. 1997). Als Endpunkte können beispielsweise das Nassgewicht der Gonaden sowie die Plasma-Steroidkonzentration gemessen werden. In den meisten Fällen wird jedoch die Bildung des Eidottervorläuferproteins Vitellogenin untersucht. Dieses Protein wird normalerweise nur von weiblichen Fischen gebildet, eine Bildung beim Männchen gilt daher als klares Zeichen einer endokrinen Wirkung. (Wahli et al., 1981; Wallace and Jared, 1968).

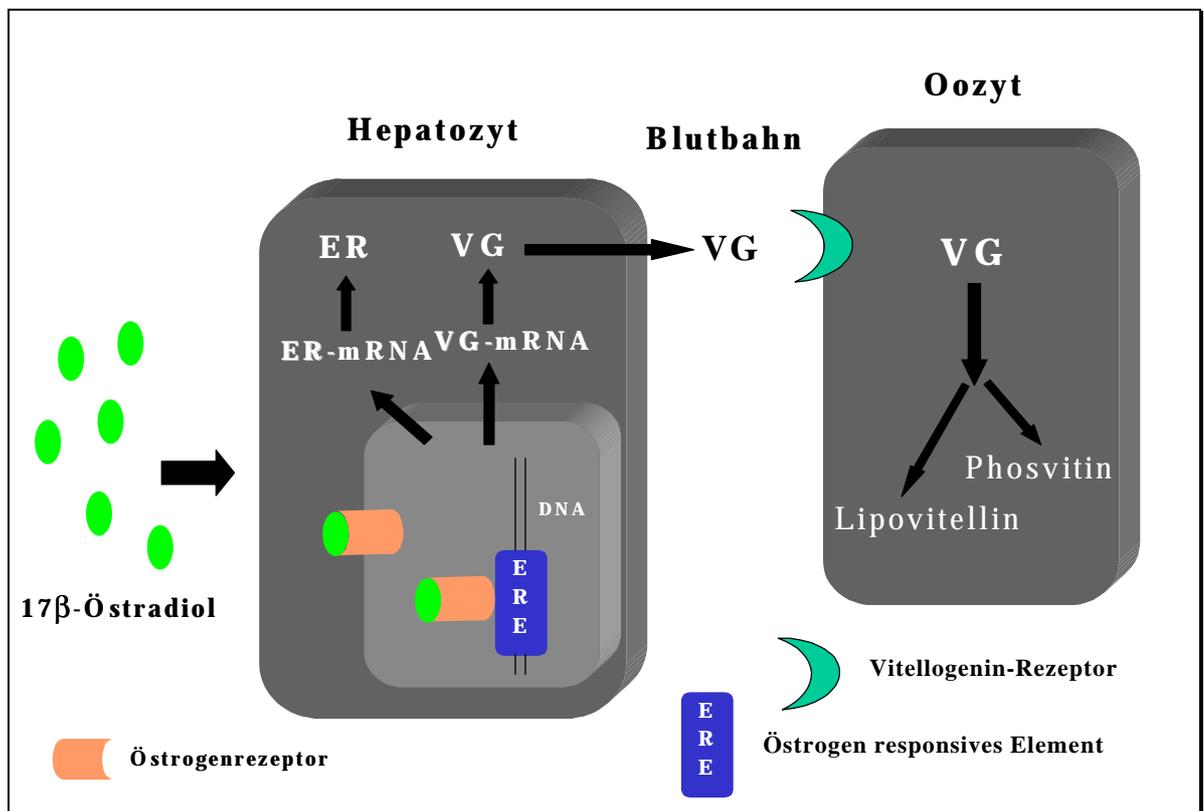


Abb. 1.2: Vitellogenin-Synthese in weiblichen Forellen: 17β-Östradiol bildet mit dem Östrogenrezeptor einen Komplex, der im Zellkern an sogenannte Östrogen responsive Elemente bindet und die Transkription östrogen-abhängiger Gene auslöst.

Als *in vitro* Tests werden häufig Proliferations-Assays verwendet. Hierbei wird die Zunahme oder Abnahme der Zellzahl einer Hormon-abhängigen Zellkultur gemessen. Am häufigsten wird hier der E-Screen Assay verwendet. Hierbei handelt es sich um eine Östrogen-sensitive, immortalisierte menschliche Brustkrebs-Zelllinie (MCF-7). Nur durch die Bindung eines Liganden an den Östrogenrezeptor können diese Zellen proliferieren, es können also nur Rezeptor-vermittelte endokrine Wirkungen erkannt werden (Soto et al. 1995).

Neben der Proliferation von Zellkulturen wird in vielen *in vitro* – Tests v.a. die Hormon-abhängige Bildung von Proteinen in Zellkulturen gemessen. Meist handelt es sich hierbei um Primärzellen aus Hormon-sensitiven Geweben wie z.B. der Fisch- oder Froschleber (Kloas et al. 1999; Smeets et al. 1999). Diese Zellen sind zusätzlich noch zur Metabolisierung fähig. In den Zellen wird nach Bindung eines Liganden an den Rezeptor die Expression eines spezifischen Gens induziert. Die dabei gebildete mRNA kann mit Methoden wie der PCR (polymerase chain reaction) sowie durch Northern Blot – Analysen nachgewiesen werden. Das gebildete Protein kann durch molekularbiologische Techniken wie ELISA oder Western Blot anhand von spezifischen Antikörpern detektiert werden, möglich ist auch die Messung einer Enzymaktivität. Als spezifische Proteine werden meist das bereits erwähnte Vitellogenin sowie der Östrogenrezeptor gemessen. Dieser Östrogenrezeptor unterliegt einer Autoregulation durch Östradiol.

Eine weitere häufig angewandte Methode stellen Reporter-gen-Assays dar. Hierbei werden Zellsystemen wie die MCF-7-Linie oder auch Hefezellen mit verschiedenen Reporter-genen transfiziert (Klotz et al. 1996). Bei den Reporter-genen handelt es sich meist um Enzyme wie die Luziferase sowie die β -Galaktosidase. Diese können durch einen Photonendetektor bzw. eine Enzym-Substrat-Reaktion einfach bestimmt werden (Zacharewski 1997). Die Enzyme sind auf einem Plasmid codiert, dem Enzym vorgelagert ist eine Rezeptorbindungsstelle als Enhancer-Element. Hierbei handelt es sich meist um das Estrogen Responsive Element (ERE). Den Hefezellen muss zusätzlich noch das Gen für den Östrogenrezeptor ins Plasmid eingebaut werden. Bindet nun ein Ligand an den Östrogenrezeptor, so kommt es über die Bindung des aktivierten Rezeptors ans ERE zur Expression des Reporter-gens. Ein positiver Befund in diesem Assay bedeutet also, dass die Substanz ihre östrogene Wirkung über den Östrogenrezeptor entfaltet.

Ob eine Substanz an den Östrogenrezeptor binden kann, wird durch Rezeptorbindungsstudien untersucht. Diese Studien werden meist an (zellfreien) Extrakten aus verschiedenen rezeptorreichen Geweben wie Leber, Uterus oder Prostata (Danzo 1997) durchgeführt, zur Bestimmung der Bindung können aber auch noch

intakte Zellen verwendet werden (Klotz et al. 1996). Bestimmt wird die Stärke der Bindung (Affinität) einer Substanz an den Rezeptor. Diese Affinität wird meist indirekt über die Verdrängung eines isotoopenmarkierten Liganden vom Rezeptor durch die Substanz bestimmt. Neben isotoopenmarkierten Liganden können auch noch fluoreszierende Liganden verwendet werden (Bolger et al. 1998). Angegeben wird die Affinität meist als IC_{50} – oder EC_{50} – Wert. Dieser Wert stellt die Konzentration dar, bei der die Substanz die Hälfte des isotoopenmarkierten Liganden vom Rezeptor verdrängen kann. Bindungsstudien können nur bestimmen, ob und mit welcher Affinität eine Substanz an den Rezeptor binden kann. Ob eine Substanz nach Bindung aber auch eine rezeptorvermittelte Genantwort auslöst, kann dieser Assay nicht beantworten. Dadurch ist es nicht möglich, einen Agonisten (Östrogene, Androgene) von einem Antagonisten (Anti-Östrogene, Anti-Androgene) zu unterscheiden.

1.6 Ziel der Arbeit

Im Rahmen des landesweiten Programmes BW – PLUS (Baden Württemberg – Programm Lebensgrundlage und ihre Sicherung) wurde unsere Arbeitsgruppe mit folgendem Projekt beauftragt: *„Entwicklung und Validierung von in vitro Prüfsystemen zum Nachweis von endokrin wirksamen Fremdstoffen – Chemisch-analytische Überprüfung und biologischer Nachweis von potentiell endokrin wirksamen Stoffen in Kläranlagenausläufen bzw. Vorflutern“*.

Beprobt wurde in einem Fall der Auslauf der Kläranlage Langwiese, hauptsächlich wurden jedoch Vorfluter beprobt. Die bevorzugte Beprobung der Vorfluter erschien sinnvoller, da eine Beprobung von Kläranlagen und ihren Ausflüssen nicht die eigentliche Belastungssituation für aquatische Organismen widerspiegelt. Vielmehr wurde mit dem Vorfluter der ständige Lebensraum der Organismen gewählt. Ein Vorhandensein endokriner Stoffe würde hier auch zwangsläufig eine Belastung der Organismen ergeben. Als Vorfluter wurden die baden-württembergischen Bodenseezuflüsse Schussen und Seefelder Aach gewählt. Abb. 1.3 zeigt eine Karte des Bodensees mit den zwei Flüssen sowie wichtigen Städten.



Abb. 1.3: Karte des Bodensees mit wichtigen Flüssen und Städten

Die Seefelder Aach fließt durch ländliches Gebiet, in ihrem Einzugsgebiet finden sich kaum industrielle Ansiedlungen. Eine Belastung ist neben den kommunalen Abwässern v.a. durch die Landwirtschaft zu erwarten. Vorherrschend in diesem Gebiet ist neben der Viehwirtschaft der Obstbau. Messungen des Instituts für Seenforschung in Langenargen ergaben für die Seefelder Aach nur eine geringe Belastung mit Phosphor- und Stickstoffverbindungen sowie Chlorid, Sulfat und Schwermetallen (Langenargen 1997). Messungen der Schussen ergaben ein anderes Bild. Hier war die Belastung mit den genannten Stoffen weit höher. Da die Abflussmenge mit $13,4 \text{ m}^3/\text{s}$ das Vierfache der Seefelder Aach ($3,6 \text{ m}^3/\text{s}$) betrug, konnte auch mit höheren Frachten in den Bodensee gerechnet werden (Langenargen 1997). Die erhöhten Werte für die Schussen sind nicht verwunderlich: zum einen ist das Einzugsgebiet der Schussen mit 791 km^2 viel größer als das der Seefelder Aach. Die Landwirtschaft in diesem Gebiet besteht hauptsächlich aus Viehwirtschaft und Obstbau, hinzu kommen Hopfenanbau und z.T. Ackerbau. In diesem Einzugsgebiet befindet sich mit Ravensburg auch eine größere Stadt. Dadurch ist sowohl für kommunale Abwässer als auch für landwirtschaftliche Einträge eine höhere Belastung zu erwarten. Zudem sind v.a. im Raum Ravensburg zahlreiche Industriebetriebe angesiedelt. Mit Betrieben der Metallverarbeitung, Abfall- und Recyclingbetrieben sowie Textilbetrieben sind hierbei Industriezweige zu finden, die als Emittenten von Schadstoffen bekannt sind (Harries et al. 1997; Tyler et al. 1998). Im Einzugsgebiet befindet sich auch eine Papierfabrik. Papierfabriken konnten in

verschiedenen Studien als Verursacher endokriner Effekte auf Fische identifiziert werden (Mellanen et al. 1996; Tremblay und Van der Kraak 1998; Tremblay und Van der Kraak 1999). Hinzu kommt, dass Ravensburg eine größere Klinik beheimatet. Die Belastungssituation der Schussen dürfte deshalb auch für endokrin aktive Stoffe höher sein als die der Seefelder Aach. Dies ist auch ein Grund, weshalb die beiden Flüsse ausgewählt wurden. Die Seefelder Aach repräsentiert einen ländlichen, weitgehend naturnahen Fluss. Die Schussen jedoch, z.T. eingezwängt in ein künstliches Flussbett und begradigt, zeigt einen für dichter besiedelte und industriell erschlossene Gebiete typischen Fluss.

Die Probennahme erfolgte für den Fluss Seefelder Aach nahe der Ortschaft Bugenseggel, ca. 100 m hinter dem Einlauf der Kläranlage Saalem, von einer Steinbrücke aus. Hier war eine vollständige Durchmischung von Flusswasser und Abwasser gewährleistet. An der Schussen befanden sich zwei Probennahmestellen. Dies war einmal die Lochbrücke in der gleichnamigen Ortschaft. Diese Brücke befand sich ca. 10 km flussabwärts der Kläranlage Langwiese. Diese Kläranlage ist für die Reinigung des gesamten Abwassers von Ravensburg zuständig und als Hauptbelaster der Schussen zumindest für einige Stoffe (z.B. Carbamazepin) bekannt (Hetzenauer 1998). Von der Kläranlage wurde eine einzelne Probe untersucht, diese entstammte dem geklärten Abwasser direkt nach dem Sandfang vor dem Auslauf in die Schussen. Die zweite Probennahmestelle der Schussen befand sich ca. 100 m oberhalb des Kläranlagenausflusses auf einer Eisenbrücke bei Oberzell.

Vorrangiges Ziel dieses Projektes war der Nachweis endokrin aktiver Substanzen in den Wasserproben mit biologischen *in vitro* Systemen sowie GC-MS. Daneben wurden von uns jedoch einige zusätzliche Parameter bestimmt. So sollte mit Hilfe des Daphnien-Immobilisationsassays die generelle, akute Toxizität der Wasserproben bestimmt werden. Daneben wurden zwei Embryotoxizitätstests durchgeführt, der DRETA sowie der FETAX. Hierdurch sollte zum Einen untersucht werden, ob sich im Wasser embryotoxische Substanzen befinden. Zum Anderen sollte die Frage geklärt werden, ob embryotoxische Effekte in irgendeiner Weise mit endokrinen Effekten verknüpft sind. Zudem wurde neben der GC-MS Analytik der endokrin aktiven Substanzen noch eine Analytik von ausgewählten Pharmaka durchgeführt. Diese (im Menschen) pharmakologisch hochwirksamen Substanzen werden in z.T. beträchtlichen Konzentrationen in deutschen Flüssen gefunden, Untersuchungen zur aquatischen Toxizität fehlen jedoch weitgehend. Einige dieser spärlich vorhandenen Untersuchungen wurden in unserem Labor durchgeführt, insofern sind Pharmaka für uns von besonderem Interesse.

Die Testsysteme zum Nachweis der endokrin aktiven Stoffe wurden so gewählt, dass mehrere mögliche östrogene Wirkmechanismen abgedeckt waren. Mit einem radioaktiven Östrogenrezeptor-Bindungsassay (CERBA) sollte hierbei die Bindung an den Rezeptor als primärer Auslöser einer östrogenen Antwort untersucht werden. Mit Versuchen an Primärzellkulturen von Karpfen- und Forellen- Hepatozyten sollte zudem ein der *in vivo* Situation möglichst nahes System angewendet werden. An diesen Zellkulturen wurde zum Einen eine östrogene Antwort auf Proteinebene gemessen. Hierzu wurde die Freisetzung des Proteins Vitellogenin in das Zellkulturmedium gemessen. Zum Anderen wurde eine Induktion der Vitellogenin- sowie Östrogenrezeptor-mRNA auf RNA-Ebene gemessen.

Als Standardsubstanzen wurden Substanzen gewählt, die bereits als östrogen aktiv bekannt waren. Durch den Vergleich mit der Literatur war hierdurch gleichzeitig auch eine Validierung dieser Assays in unserem Labor möglich. Ausgewählt wurden hierbei die Substanzen 17 β -Östradiol, Östron, Östriol, 17 α -Ethinylöstradiol, Genistein, β -Sitosterol, Nonylphenol und Bisphenol A. Neben diesen als östrogen bekannten Substanzen wurde auch noch einige Pharmaka auf östrogene Effekte untersucht: Bezafibrat, Carbamazepin, Clofibrinsäure, Diclofenac und Naproxen. Diese Pharmaka waren zwar bisher nicht als östrogen aktiv bekannt, die Untersuchung auf eine endokrine Wirkung erschien aber aus zwei Gründen interessant. Zum Einen konnten alle Substanzen in der Schussen und anderen deutschen Flüssen in z.T. hohen Konzentrationen gefunden werden (Hetzenauer 1998; Ternes et al. 1999). Zum Anderen deuten Daten aus einer innerhalb der Arbeitsgruppe angefertigten Literaturrecherche auf mögliche endokrine Effekte hin (Dietrich et al. 1998) (für weiterführende Referenzen wird auf diese Literaturrecherche verwiesen). Das lipidsenkende Mittel Clofibrinsäure zeigte beispielsweise eine Bindung an den zur Steroidrezeptor-Familie gehörenden Peroxisome Proliferator Activated Receptor (PPAR). Für den zweiten Lipidsenker Bezafibrat wird eine ähnliche Wirkung vermutet. Das Anti-Epileptikum Carbamazepin führte nach dreimonatiger Behandlung bei jungen männlichen Ratten zu einer Verringerung des Prostatagewichts sowie zu einer Reduktion der Spermienzahl. Dies wurde auf anti-androgene Effekte durch Carbamazepin zurückgeführt. Das Antirheumatikum Diclofenac zeigte bei Embryotoxizitätstests schon im unteren $\mu\text{g/l}$ – Bereich Missbildungen bei Zebrafischen, weitere Daten zu diesem sogar im Trinkwasser nachgewiesenen Pharmakon fehlen jedoch gänzlich. Naproxen schließlich, ein weiteres Antirheumatikum, besitzt eine steroidähnliche räumliche Molekülstruktur, die es dieser Substanz evtl. ermöglichen könnte, an den Östrogenrezeptor zu binden.

Neben der Messung der Standardsubstanzen sollten in den *in vitro* Tests zudem organische Extrakte der Wasserproben untersucht werden. Hierdurch sollte gezeigt werden, ob sich in den Flüssen Schussen und Seefelder Aach endokrine Substanzen

befinden. Zusätzlich zu diesen biologischen Testsystemen sollten die beiden Flüsse durch eine chemische Analytik (GC-MS) auf endokrin aktive Stoffe untersucht werden. Die Ergebnisse aus diesen chemischen Analysen wurden anschließend mit den Ergebnissen aus den *in vitro* Tests verglichen. Hierdurch konnte die Tauglichkeit der Tests für den Nachweis von endokrin aktiven Stoffen in Wasserproben geprüft werden. Die in der chemischen Analyse ermittelten Stoffgehalte sollten außerdem zur Identifizierung der in den Testsystemen aktiven Substanzen dienen. Letztendlich aber war das eigentliche Ziel dieser Arbeit, eine Aussage darüber treffen zu können, ob für die Fische der untersuchten Flüsse eine Gefahr durch endokrin aktive Substanzen besteht.

2 MATERIAL & METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Fische

Die im CERBA verwendeten weiblichen zweijährigen Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) wurden von den Fischereigenossenschaften Staad und Reichenau bezogen, die männlichen dreijährigen Tiere entstammen, ebenso wie die verwendeten dreijährigen männlichen Karpfen, der Fischzucht Ernst in Utting. Die Krallenfrösche (*Xenopus laevis*) wurden von der heimischen Tierforschungsanlage Konstanz bezogen, Zebrafische (*Danio rerio*) sowie Daphnien (*Daphnia magna*) entstammen der eigenen Zucht. Die Forellen wurden vor Tötung für maximal zwei Tage in 100 l Durchflusssaquarien mit durch Aktivkohle gefiltertem Leitungswasser bei 14 ± 2 °C und einem 14/10 h Hell-Dunkelrhythmus gehalten.

2.1.2 Substanzen

Tabelle 2.1: Untersuchte Substanzen mit Molekulargewicht (MG) sowie Herkunftsfirma

| Substanz | Beschreibung | MG [g/mol] | Firma |
|--|------------------------|------------|--------------------|
| 17 β -Östradiol, 98% | Natürliches Östrogen | 272,4 | Sigma |
| Östron, 99% | Östrogen-Metabolit | 270,4 | Sigma |
| Östriol, 99% | Östrogen-Metabolit | 288,4 | Sigma |
| 17 α -Ethinylöstradiol, 98% | Synthetisches Östrogen | 296,4 | Sigma |
| Genistein, 98% | Phyto-Östrogen | 270,2 | Sigma |
| β -Sitosterol, synthetisch 96% | Phyto-Östrogen | 414,7 | Sigma |
| β -Sitosterol, gereinigt aus Sojabohnen 55-65% | Phyto-Östrogen | 414,7 | ICN Biomedicals |

| Substanz | Beschreibung | MG [g/mol] | Firma |
|--|---------------------|------------|---------|
| Bisphenol A (4,4'-Isopropylidenediphenol) | Industriechemikalie | 228,3 | Sigma |
| Nonylphenol, technisch | Industriechemikalie | 220,4 | Aldrich |
| Diclofenac, Na-Salz | Antirheumatikum | 318,1a | Sigma |
| Naproxen, Na-Salz | Antirheumatikum | 252,2 | Sigma |
| Clofibrinsäure | Lipidsenker | 214,6 | Sigma |
| Bezafibrat | Lipidsenker | 361,8 | Sigma |
| Carbamazepin | Antiepileptikum | 236,3 | Sigma |

Chemische Strukturformeln der untersuchten Substanzen

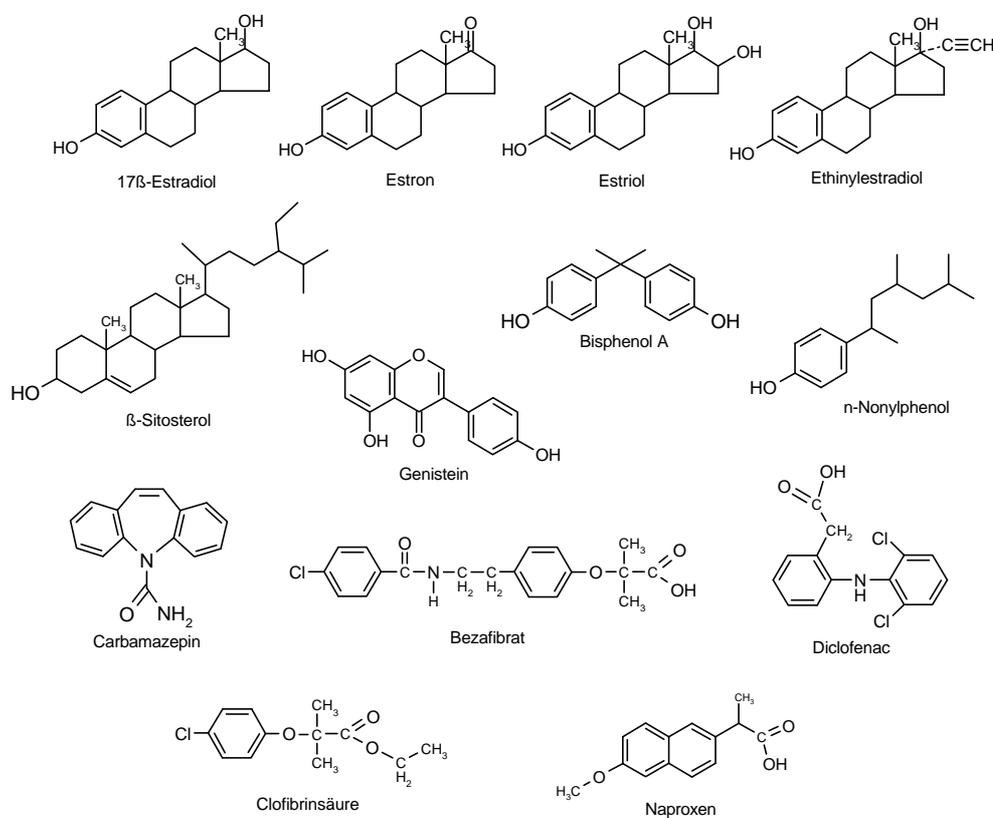


Abb. 2.1: Chemische Strukturformeln aller untersuchten Substanzen

2.2 Methoden

2.2.1 Probennahme

Vorbereitung : 2,5 l bzw. 1 l Lösungsmittelflaschen wurden in einer Reinstwasser-Spülmaschine gespült, 3fach mit n-Hexan (für die Chromatographie, Merck) ausgeschüttelt und für mehrere Stunden auf 250 °C im Trockenschrank erhitzt.

Die Entnahme erfolgte im Fall der Schussen und Seefelder Ach von der Brückenmitte, im Fall der Kläranlage Langwiese am Kläranlagenausfluss (siehe Einleitung). Das Volumen pro Probennahme betrug 6 – 10 Liter. Ein Plastikeimer wurde ins Wasser herabgelassen und einmal mit Flusswasser ausgespült, anschließend wurden alle Lösungsmittelflaschen randvoll befüllt und fest verschlossen. Bei Aufarbeitung der Flusswasserproben innerhalb von einer Woche erfolgte die Lagerung bei 4 °C im Kühlschrank, ansonsten wurden die Proben bei –20 °C tiefgefroren.

Die Probennahme der Wochenganglinie (Schussen 1.10.-7.10.2000) erfolgte mit dem automatischen Probennehmer der vom Institut für Siedlungswasserbau, Langenargen, geführten Station Lochbrücke. Bei zeitproportionaler Entnahme wurden Tagesmischproben erstellt, die unmittelbar gekühlt wurden (4 °C). Das Volumen belief sich auf jeweils ca. 25 l.

2.2.2 Aufarbeitung

Eine Aufarbeitung von Flusswasser mit organischem Lösungsmittel dient dazu, organische Stoffe aus dem Wasser in Lösungsmittel zu überführen. Im Lösungsmittel sind diese organischen Substanzen stabiler und löslicher und somit auch stärker konzentrierbar. Erst hierdurch werden sie für chemische und biologische Analysen verfügbar gemacht.

2.2.2.1 Flüssig/flüssig-Extraktion mit Dichlormethan

Extrakte dieser Aufarbeitung wurden für Messungen in GC-MS, CERBA sowie molekularbiologischen Tests verwendet.

1 Liter Wasserprobe wurde mit Schwefelsäure (H₂SO₄, 10 %) auf pH 3,0 eingestellt. Nach Filtrierung über Faltenfilter (Schleicher & Schüll, 595½) wurden zwei 0,5 l Aliquote nacheinander weiterbearbeitet.

Zu 500 ml Flusswasser im 1 l-Scheidetrichter wurde 50 ml Dichlormethan p.a. (DCM) zugegeben und ca. 1 Minute geschüttelt. Nach Phasentrennung wurde die organische (DCM-)Phase gesammelt. Die anorganische Phase wurde nochmals mit 50 ml DCM ausgeschüttelt, die organischen Phasen anschließend vereinigt. Die Intermediärphase zwischen organischer Phase und anorganischer Phase, bestehend aus hochmolekularen organischen Bestandteilen wie Huminstoffen und Huminsäuren, wurde in einem getrennten Gefäß aufgefangen, die anorganische Phase verworfen. Mit dem zweiten Aliquot wurde entsprechend verfahren, die organischen Phasen sowie die Intermediärphasen wurden jeweils vereinigt. Die gesammelte Intermediärphase wurde nach Zugabe von Dichlormethan und destilliertem Wasser wiederum ausgeschüttelt, die daraus gewonnene organische Phase mit der gesammelten organischen Phase vereinigt, der Rest verworfen. Der organischen Phase wurde durch Filtern über Glaswolle (Alltech, glaswool pesticide grade) Restwasser entzogen, anschließend wurde die organische Phase im Rotationsverdampfer (Büchi Rotavapor R-114) bis nahe zur Trockne eingengt. Nach Überführung in 1 ml-Glasvials wurde der Extrakt in 1 ml Ethanol, p.a. gelöst und bei -20 °C gelagert. Die Aufarbeitung von 1 l Flusswasser zu 1 ml Flusswasserextrakt entspricht einer 1000fachen Aufkonzentrierung.

2.2.2.2 Flüssig/flüssig-Extraktion mit Hexan

Mit dieser Aufarbeitungsmethode sollten organische Substanzen wie Östrogene oder auch Moschusstoffe aus Flusswasser für GC-MS-Analysen extrahiert werden.

1 Liter Wasserprobe wurde mit Schwefelsäure (H₂SO₄, 10%) auf pH 3,0 eingestellt und in einen 2 l Messkolben überführt. Nach Zugabe von 50 ml Hexan (n-Hexan für die Chromatographie, Merck) wurde circa 20 Stunden bei Raumtemperatur stark gerührt. Die Hexanphase wurde anschließend abgenommen und im Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Nach Überführung in 1 ml-Glasvials wurde der Extrakt in 1 ml Hexan bei -20 °C gelagert. Die Aufarbeitung mit Hexan ergibt eine 1000fache Aufkonzentrierung vom Flusswasser zum Flusswasserextrakt.

2.2.2.3 Festphasenextraktion und Cleanup

Die Festphasenextraktion wurde am Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte und Abfallwirtschaft in Stuttgart durchgeführt. Sie diente der Aufarbeitung von Flusswasser zur anschließenden Analyse mit GC-MS. Zusätzlich wurden mit dieser Methode Extrakte für biologische Tests (CERBA, RT-PCR, ELISA) hergestellt.

Die Proben (6 x 1 Liter, 4 x 0,2 Liter) wurden über einen Glasfaserfilter (Schleicher & Schüll GF6) filtriert und mit Schwefelsäure auf pH 2 eingestellt. Zu 4 x 1 Liter wurden 50 µl interne Östrogenstandards gegeben, zu 4 x 0,2 Liter wurden 50 µl interne Endokrin-Mischstandards gegeben (Standards: siehe Kapitel 2.2.3.2). Die Proben für die biologischen Tests blieben unbehandelt. Alle Proben wurden anschließend durch Festphasenextraktion mit RP-C18-Säulen (Mega Bond Elut 6 CC, 1g, Varian) angereichert. Vor der Anreicherung wurden die Festphasen mit Hexan (6 ml), Aceton (6 ml) und Reinstwasser (12 ml) konditioniert. Die Säulen wurden über Nacht gefriergetrocknet, am folgenden Tag erfolgte die Elution der angereicherten Substanzen durch Zugabe von 3 x 2 ml Aceton (LiChroSolv, Merck). Das Eluat wurde nun in der Vakuumzentrifuge bis nahe zur Trockne eingengt und anschließend, je nach weiterer Verwendung, getrennt behandelt.

Aufgrund der hohen Matrixbelastung der Extrakte (v.a. Huminsäuren) war es für die GC-MS Analyse der Östrogene sowie z.T. für den *in vitro* Test CERBA erforderlich, einen zusätzlichen Cleanup des Extraktes durchzuführen. Hierzu wurde auf ca. 500 µl eingengter Extrakt auf eine Kieselgel-Säule (Chromabond SiOH, 1 g, Fa. Macherey & Nagel) aufgetragen. Die Kieselgel-Säule wurde vorher mit 12 ml des Laufmittels Hexan / Aceton (60 / 40) konditioniert. Die Elution erfolgte mit 10 ml des gleichen Laufmittels. Das Eluat wurde in der Vakuumzentrifuge bis nahe zur Trockne eingengt.

Mit den Proben für die GC-MS-Analyse wurde weiterverfahren wie in Kapitel 2.2.4.2 beschrieben. Die Proben für die biologischen Tests wurden in Glasvials überführt, eingedampft, in 1 ml Ethanol aufgenommen und bei -20 °C gelagert. Die Konzentration der Extrakte für biologische Tests entspricht dem 1000fachen Wert im Vergleich zum Flusswasser.

2.2.2.4 Bestimmung der Wiederfindungsrate

Für die beiden Flüssig/flüssig-Extraktionen wurde die Wiederfindungsrate für 17β-Östradiol über radioaktiv markiertes Östradiol (³H-Östradiol) bestimmt. Die Messung

der Radioaktivität erfolgte jeweils nach Zugabe von Scintillations Cocktail im Scintillations Counter.

Zur ungefilterten Probe wurde eine definierte Konzentration an ^3H -Östradiol gegeben. Anschließend wurde die Extraktion durchgeführt wie oben beschrieben. Die Messung der Radioaktivität erfolgte einmal vor Extraktion durch Messung eines Aliquots von 1 ml Wasser. Hiermit konnte auch die zugegebene Menge an ^3H -Östradiol zusätzlich bestimmt werden. Nach Extraktion wurde die verbliebene Radioaktivität in der anorganischen Wasserphase bestimmt. Die organische Phase wurde bis nahe zur Trockne eingengt und anschließend vollständig im Scintillation Counter gemessen. Zusätzlich wurde die Radioaktivität der Intermediärphase gemessen sowie die verbliebene Radioaktivität im Faltenfilter (bei der Aufarbeitung mit Dichlormethan).

Die Wiederfindungsrate wurde als prozentuale Verteilung der zugegebenen Radioaktivität (100%) auf die verschiedenen Phasen angegeben.

2.2.3 Untersuchung von Flusswasserextrakten sowie einer Flusswasserprobe mit GC-MS

Die Kombination Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) wird häufig benutzt um Substanzen in sehr geringen Konzentrationen in biologischen Proben zweifelsfrei nachweisen zu können, hierzu ist jedoch ein größerer analytischer Aufwand nötig als z.B. mit der HPLC. Da die technischen Möglichkeiten sowie das Know-how in unserem Labor nicht in ausreichendem Maße vorhanden waren, wurden die Messungen am Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte und Abfallwirtschaft in Stuttgart durchgeführt.

2.2.3.1 Messung von Östrogenen und endokrin aktiven Substanzen in den Flusswasserextrakten

Schematische Darstellung der Probenvorbereitung :

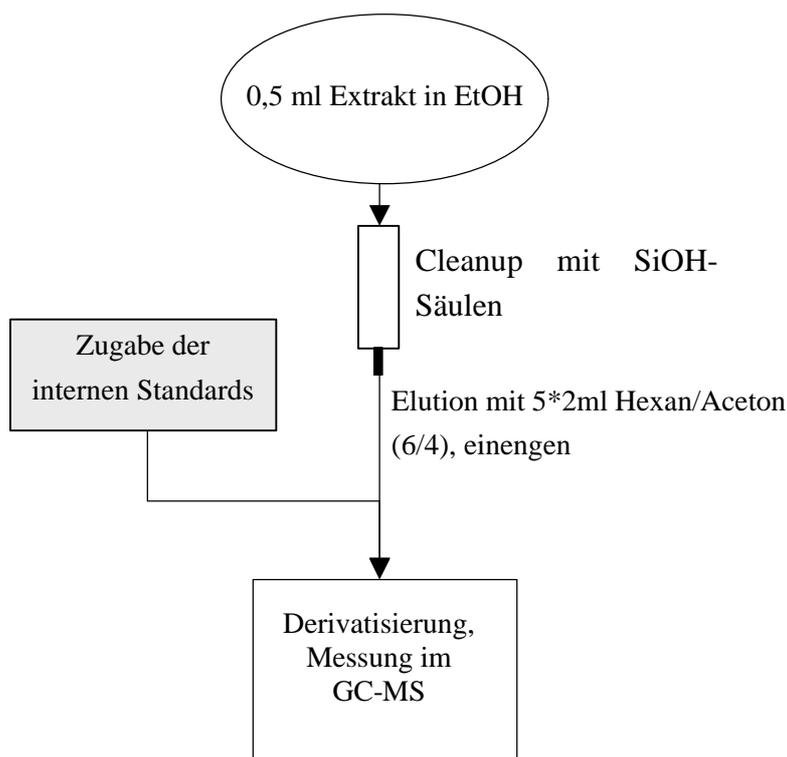


Abb. 2.2: Analysenschema zur Bestimmung endokrin aktiver Substanzen in Flusswasserextrakten

Probenvorbereitung (Cleanup, Elution, Interne Standards) :

Aufgrund der hohen Matrixbelastung der Extrakte (v.a. Huminsäuren) war es erforderlich vor Analyse einen zusätzlichen Cleanup durchzuführen. Hierzu wurden 500 µl Extrakt auf eine Kieselgel-Säule (Chromabond SiOH, 1 g, Fa. Macherey & Nagel) aufgetragen. Die Kieselgel-Säule wurde vorher mit 12 ml des Laufmittels Hexan / Aceton (60 / 40) konditioniert. Die Elution erfolgte mit 10 ml des gleichen Laufmittels. Das Eluat wurde in der Vakuumzentrifuge bis nahe zur Trockne eingengt, in 100 µl Inletts für Glasvials überführt und weiter bis zur Trockne eingengt. Nach Zugabe der internen Standards (Tabelle 2.3) wurde nochmals bis zur Trockne eingengt, dann erfolgte die Derivatisierung.

Derivatisierung :

Aufgrund thermischer Labilität sowie unzureichender Flüchtigkeit der zu untersuchenden Substanzen ist eine Derivatisierung erforderlich. Der eingetrocknete Extrakt wurde hierzu in einer Mischung aus Acetonitril (25 µl), Pyridin (5 µl), MSTFA (18 µl) und TMCS (2 µl) aufgenommen und eine Stunde auf 60 °C erwärmt. Die Reaktion wurde durch Kühlung des Extrakts abgestoppt.

Messung mittels GC-MS :

Die analytischen Messungen wurden an einem GC-MSD-Gerät 6890 / 5972 A der Firma Hewlett Packard im Single-Ion-Modus (SIM) durchgeführt. Die Identifizierung und Quantifizierung der Substanzen erfolgte über Retentionszeit, Basispeak und je nach Substanz über bis zu drei Qualifier. Die gaschromatographischen Bedingungen sind in Tabelle 2.2 aufgeführt.

Tabelle 2.2: Gaschromatographische Analysebedingungen

| | |
|----------------|---|
| Injektor : | 2 µl (splittless), 280 °C |
| Säule : | SGE BPX 5; 30 m; 0,25 µm Filmdicke; 0,22 mm ID |
| Fluss : | 1,0 ml / min (Helium, constant flow) |
| Ofenprogramm : | 120 °C (2 min), 10 °C / min (190 °C, 0 min), 5 °C / min (330 °C, 5 min) |
| Detektor : | 280 °C, Quadrupol im SIM-Modus |
| Ionisation | EI |

Tabelle 2.3 zeigt die charakteristischen Ionen für alle analysierten Substanzen sowie die zugehörigen internen Standards. Die internen Standards wurden so ausgewählt, dass sie große Ähnlichkeit mit dem Analyten besaßen, gut (kommerziell) verfügbar waren und in den Proben nicht bereits natürlich vorhanden waren.

Tabelle 2.3: Analytierte Verbindungen mit Retentionszeit, zur Quantifizierung verwendeten internen Standards sowie den gemessenen Ionen

| Analysierte Substanz | Zugehöriger interner Standard | Retentionszeit [min] | Hauptpeak- & (Qualifier)-Ion [mz] |
|--|---------------------------------------|-----------------------------|--|
| 17 β -Östradiol (Sigma) | d ₂ -17 β -Östradiol | 25,28 | 416,3 (401,3) |
| Östron (Sigma) | d ₂ -E2 | 25,2 | 342,2 |
| 17- α Ethinylöstradiol (Sigma) | d ₂ -E2 | 26,85 | 425,3 (440,3) |
| d ₂ -17 β - Östradiol (Sigma) | — | 25,27 | 418,3 |
| 4-t-Nonylphenol, techn. Mischung (Aldrich) | 4-n-Nonylphenol | 10,64 | 193,1 (249,1; 235,1) |
| 4-n-Nonylphenol (Dr. Ehrenstorfer) | — | 13,57 | 179,1 (292,1) |
| 4-t-Nonylphenoldiethoxylat (ICI Superonic [®] NP 5) | 2,4,6-Tribromophenol | 19,98 oder 20,22 | 295,2 (135,1) |
| 2,4,5-Tribromophenol (Sigma) | — | 11,81 | 388,7 (386,7; 401,7) |
| 4-Octylphenol, techn. Mischung (Fluka) | 4-n-Octylphenol | 9,71 | 207,1 (208,1; 191,1) |
| 4-n-Octylphenol (Alldrich) | — | 12,11 | 179,1 (278,2; 263,2) |
| Bisphenol A (Aldrich) | d ₁₆ -Bisphenol A | 18,10 | 357,1 (372,1) |
| d ₁₆ -Bisphenol A (Aldrich) | — | 17,97 | 368,2 (386,2) |
| Genistein (Sigma) | Flavon | 28,77 | 471,2 (472,2; 473,2) |
| Flavon (Sigma) | — | 19,42 | 222,1 (221,1; 223,0) |
| β -Sitosterol (Sigma) | 5- α -Cholestan | 33,59 | 396,4 (486,4) |
| 5- α -Cholestan (Sigma) | — | 27,82 | 217,2 (372,3) |

Auswertung :

Die Peak-Fläche des zugegebenen internen Standards diene als Grundlage zur Quantifizierung des jeweiligen Analyten. Die bekannte Masse des internen Standards wurde hierbei als Maß der Fläche des internen Standards betrachtet. Durch Vergleich mit der Peak-Fläche des Analyten konnte somit dessen Masse berechnet werden.

2.2.3.2 Messung von Östrogenen in den Flusswasserproben Schussen 30.9.99 sowie 1.10. – 7.10.2000

Grundlage der Messung ist das Standardadditionsverfahren zum Nachweis von endokrin aktiven Substanzen im Abwasser von Kläranlagenabläufen (Spengler et al. 1999). Zum genauen Ablauf der Messungen wird auf diese Veröffentlichung verwiesen. Im Folgenden sollen nur die wichtigsten Schritte der Messung anhand eines Fließschemas erklärt werden.

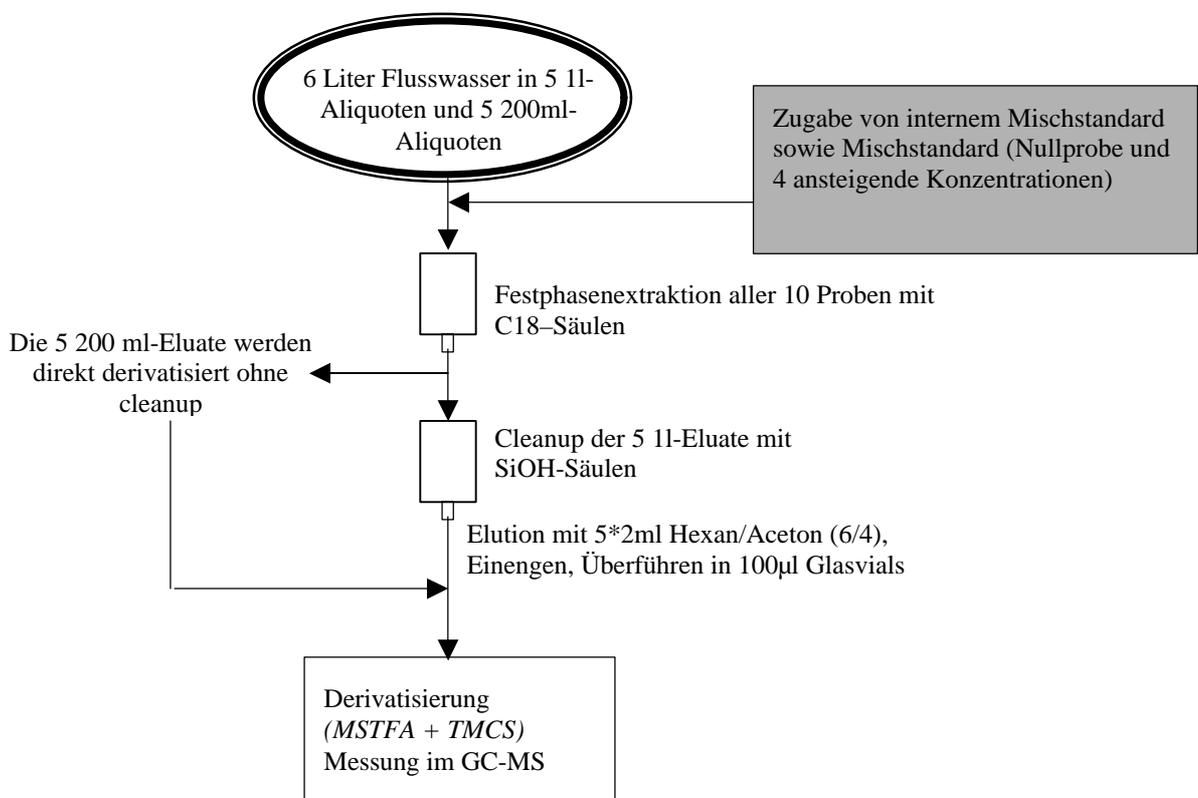
Schematischer Ablauf der Messungen

Abb. 2.3: Analysenschema zur Bestimmung endokrin aktiver Substanzen in Flusswasser

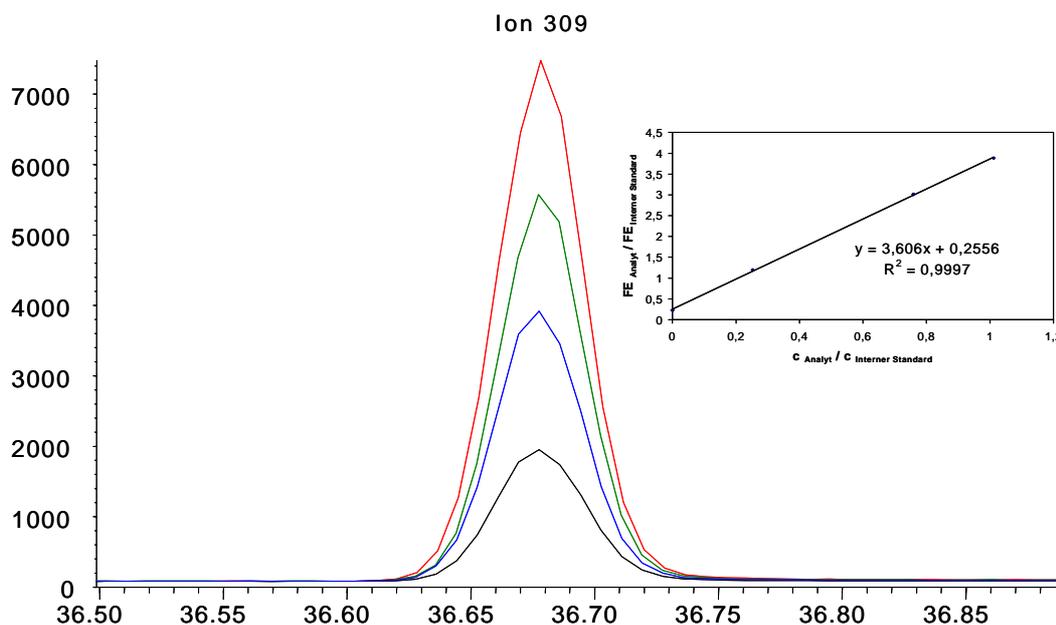
Beim Standardadditionsverfahren wird interner Mischstandard bereits vor Aufarbeitung durch Festphasenextraktion zugegeben. Somit ist eine Quantifizierung der Substanzen im Flusswasser möglich. Bei der Analyse von Flusswasserextrakten erfolgt die Zugabe des internen Mischstandards erst nach Aufarbeitung (Flüssig/flüssig-Extraktion mit Dichlormethan). Ein Verlust eines Analyten wird also nicht durch den entsprechenden Verlust an internem Standard kompensiert. Dies bedeutet, dass eine Quantifizierung von Analyten nur für den Extrakt möglich ist, nicht jedoch für das ursprüngliche Flusswasser.

2.2.3.3 Messung von ausgewählten Pharmaka im Oberflächenwasser der Schussen (1.10.2000 – 7.10.2000)

Der Nachweis von sauren, basischen und neutralen Pharmaka erfolgte auf der Grundlage eines GC-MS- Verfahrens von Möhle (Möhle, 1999). Dieses Verfahren wurde im Rahmen des Dissertationsprojektes „Pharmaka und Hormone in der aquatischen Umwelt“ von C. Schneider modifiziert, so dass ausgewählte Pharmaka in Flusswasser und Kläranlagenabläufen mit Hilfe des Standardadditionsverfahrens nachgewiesen werden können. Erste Ergebnisse dieser Arbeit sowie Details zur Methodik sind im 1. Zwischenbericht des vom Ministerium für Umwelt und Verkehr geförderten Projektes (U 53-00.01) verzeichnet (Schneider et al., 2001).

Die Einzelkonzentrationen in den Flusswasserproben wurden über das Standardadditionsverfahren ermittelt, um Matrixeffekte zu minimieren. Dazu wurden die Proben vor der Anreicherung mittels Festphasenextraktion mit jeweils drei Konzentrationsniveaus aufgestockt. Die Höhe der Konzentrationsniveaus ergab sich aus der zu erwartenden Konzentration der jeweiligen Substanz in der Realprobe (Doppelbestimmung), die aus einer externen Kalibrierung mit der jeweiligen Referenzsubstanz berechnet wurde. Die aufgestockten Proben wurden anschließend jeweils doppelt am GC/MS bestimmt. Die Auswertung über das Standardadditionsverfahren ist exemplarisch für den Wirkstoff Diclofenac dargestellt.

Abundance



Time-->

Abb. 2.4: Standardadditionsverfahren für die Bestimmung von Diclofenac

2.2.4 *In vivo* Methoden zum Nachweis der generellen Toxizität sowie Embryotoxizität von Flusswasserproben

2.2.4.1 *Daphnia magna* Immobilisationstest

Der Daphnientest wurde nach OECD-Richtlinie Nr. 202 (1984) mit dem akuten Immobilisationstest durchgeführt. Junge *Daphnia magna*, jünger als 24 h bei Beginn des Tests, wurden für 48 h im jeweiligen Testmedium inkubiert. Die Immobilisierung wurde nach 24 h und 48 h gemessen und die EC_{50} graphisch durch logarithmische Auftragung bestimmt.

Testdurchführung

Als Daphnien-Medium wurde künstliches Süßwasser hergestellt: $CaCl_2$ (294 mg/l), $MgSO_4$ (123,3 mg/l), KCl (5,8 mg/l) und $NaHCO_3$ (64,8 mg/l) in Reinstwasser (MQ),

pH 8,3 - 8,4. Hierin erfolgte die Anzucht der Tiere, weiterhin diente das Daphnien-Medium als Negativkontrolle. Die Bestimmung der Toxizität des Flusswassers der Schussen - Wochenganglinie erfolgte über direkte Inkubation der Daphnien in den ungefilterten Wasserproben. Für jeden Test wurden 4 Gruppen á 5 Tiere eingesetzt und 24 h bzw. 48 h nach Inkubation die Immobilisierung ermittelt. Der Test wurde bei einem 16 h / 8 h Hell-Dunkelrhythmus und 20 ± 1 °C durchgeführt.

2.2.4.2 FETAX (Frog Embryo Teratogenicity Assay *Xenopus*)

Dieser Versuch basierte auf der ASTM-Richtlinie Nr. E1439-91 (ASTM, 1991). Die verwendeten Frösche (*Xenopus laevis*) waren 2-3 Jahre alt und wurden an der Tierforschungsanlage der Universität Konstanz gehalten. Mit diesem Test wurde der Einfluss des Wassers der beiden Bodenseezuflüsse Schussen und Seefelder Aach auf die Embryonalentwicklung von Amphibien am Beispiel des Krallenfroschs untersucht.

Testvorbereitung

FETAX-Lösung

Diese Lösung wurde als Aquarien-Wasser und Testmedium eingesetzt.

Zusammensetzung pro 1 l MQ Wasser:

625 mg NaCl

96 mg NaHCO₃

30 mg KCl

15 mg CaCl₂

60 mg CaSO₄*2H₂O

75 mg MgSO₄

Der pH-Wert sollte zwischen 7,6 und 7,9 liegen.

Zum Abläichen wurden die Frösche in die Klimakammer (Temperatur: 24 ± 2 °C; Hell-Dunkelrhythmus: 14 h/10 h) des Labors gebracht und dort in 30 l Aquarien in FETAX-Lösung gehalten. Induziert wurde der Laichvorgang durch eine erste Injektion von PMSG (Pregnant Mares Serum Gonadotropin, Sigma-Aldrich, Steinheim) und eine zweite mit HCG (Human Chorionic Gonadotropin, Sigma-Aldrich, Steinheim) in den dorsalen Lymphsack der Tiere. Die Hormone werden in steriler, 0,9 % NaCl-Lösung gelöst ([C]=1000 IU/ml). Die zweite Injektion erfolgt etwa 51 h nach der ersten. Männchen erhielten 150 IU PMSG und 600 IU HCG, Weibchen 250 IU PMSG und 700 IU HCG.

Nach der zweiten Injektion wurden die Tiere paarweise in separate Aquarien gegeben. Um zu verhindern, dass die Frösche die Eier beschädigen, befand sich auf dem Boden dieser Aquarien ein 3 cm hohes Kunststoffgitter, durch das die Eier hindurch fallen konnten. Die Eiablage erfolgte etwa 9-12 h nach der zweiten Injektion.

Unbefruchtete Eier oder Laich, der in Ketten abgelegt wurde, wurden nicht benutzt. Die befruchteten Eier wurden aus den Aquarien genommen und in Bechergläsern mit einer L-Cystein-Lösung (2% (w/v)) in FETAX-Lösung, pH 8,1; Sigma-Aldrich, Deisenhofen) von der Laichgallerte befreit.

Die Cystein-Lösung ließ man unter gelegentlichem leichtem Schütteln maximal 2 Minuten einwirken, um die Eier nicht zu beschädigen. Die Eier wurden zweimal mit frischer FETAX-Lösung gespült, auf mehrere 10 cm-Petrischalen verteilt und unter dem Binokular nach den Kriterien von Nieuwkoop und Faber (Nieuwkoop and Faber, 1975) aussortiert. Beschädigte, unbefruchtete und deformierte Eier wurden verworfen. Die sortierten Eier wurden bis zum Testbeginn in 55 mm-Petrischalen in der Klimakammer aufbewahrt.

Testdurchführung

Die Eier wurden für 96 h in unbehandeltem Flusswasser inkubiert. Pro Versuch wurden zwei Petrischalen (55 mm, Testvolumen 10 ml) á 25 Eier im Stadium 8-11 (Nieuwkoop and Faber, 1975) angesetzt. Pro Ansatz wurden 4 Petrischalen mit reiner FETAX-Lösung als Negativkontrolle angesetzt. Als Positivkontrollen für die Mortalität wurden 2 Petrischalen mit 280 mg/l Koffein (Sigma-Aldrich, Steinheim) und für die Malformation 2 Petrischalen mit 60 mg/l Koffein in FETAX-Lösung angesetzt. Bei diesen Konzentrationen sollten etwa 50 % der Embryonen sterben (280 mg/l Koffein) oder die Hälfte der Embryonen Missbildungen aufweisen (60 mg/l Koffein). Mit Hilfe dieser Kontrollen wurde die Vergleichbarkeit der einzelnen Experimente miteinander verbessert. Die Exposition erfolgte bei $24 \pm 2^\circ\text{C}$ und bei einem 14/10 h Hell-Dunkel-Rhythmus. Alle 24 h wurden die Kontrollmedien und die Proben erneuert, tote Embryonen wurden entfernt und protokolliert. Nach 96 h wurden die Embryonen in 70 % Ethanol fixiert.

Testauswertung

Die fixierten Embryonen wurden unter dem Binokular auf abnormale Entwicklungen gemäß der ASTM-Richtlinie (ASTM, 1991) untersucht. Danach wurden die Embryonen

mit Hilfe einer CCD-Kamera (computer connected digital Kamera) aufgenommen und die Länge mit einem dafür entwickelten Computerprogramm gemessen.

Alle Ergebnisse wurden in Prozent angegeben und in dieser Form einem Signifikanz-Test unterworfen. Alle Proben wurden mit one-way ANOVA und Dunnett,s post test (Instat von Graphpad) mit der Kontrolle verglichen.

2.2.4.3 DRETA (*Danio rerio* Embryo Teratogenicity Assay)

Mit diesem Test wurde der Einfluss der Wasserproben der Schussen und der Seefelder Aach auf die Embryonalentwicklung von Fischen am Beispiel des Zebrafischs untersucht.

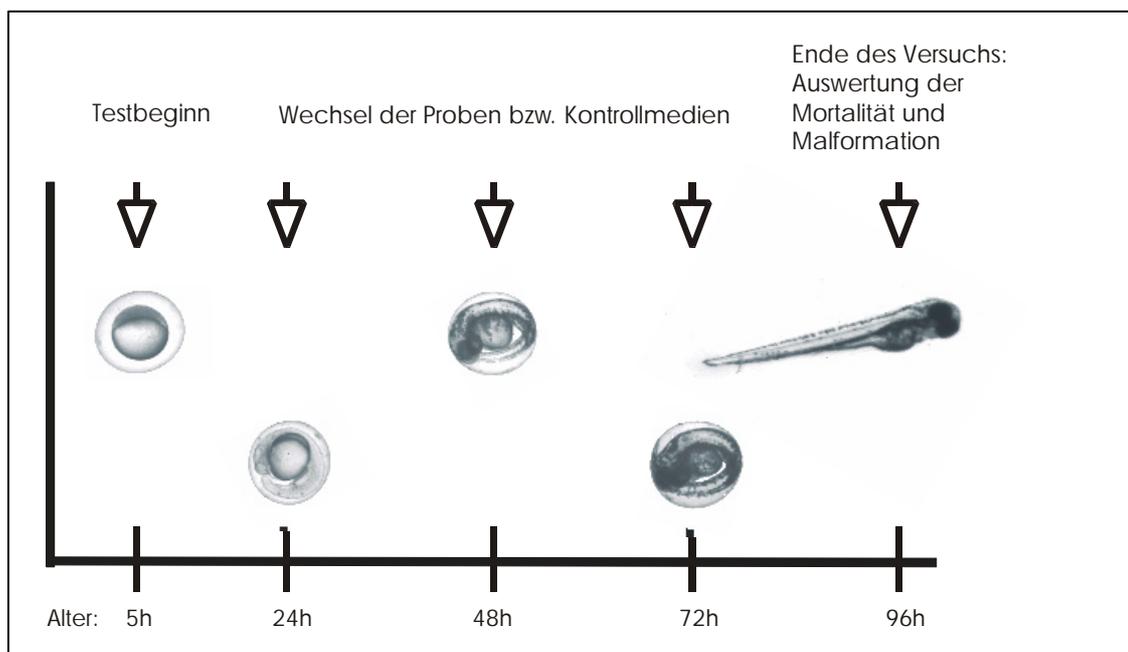


Abb. 2 .5: Entwicklung von Zebrafischembryonen und Durchführung des DRETA

Testvorbereitung

Adulte Zebrafische (*Danio rerio*) wurden in 20 l Aquarien in Aktivkohle-gefiltertem Leitungswasser bei $28 \pm 1^\circ\text{C}$ und einem 14/10 h Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Zum Ablaichen wurden je 1 laichbereites Weibchen und 1 Männchen zusammen in ein

Aquarium gesetzt. Die Eier wurden in Ablaischalen aufgefangen und in 10 cm-Petrischalen mit DRETA-Medium überführt.

DRETA-Medium (pro 1 l MQ- Wasser):

292 mg NaCl

12,7 mg KCl

0,33 mg CaCl₂

81,3 mg MgSO₄

Der pH-Wert sollte zwischen 6,8 und 7,2 liegen.

Die Eier wurden unter dem Binokular aussortiert. Beschädigte, unbefruchtete und deformierte Eier wurden verworfen. Die sortierten Eier wurden bis zum Testbeginn in 55 mm-Petrischalen in der Klimakammer aufbewahrt.

Testdurchführung

Die Eier wurden für 96 h in dem jeweiligen Flusswasser inkubiert. Pro Versuch wurden zwei Petrischalen (55 mm, Testvolumen 10 ml) á 15 Eier im Stadium 8 bis 11 (Nieuwkoop and Faber, 1975) angesetzt. 2 Petrischalen mit reiner DRETA-Lösung wurden pro Ansatz als Negativkontrolle angesetzt. Als Positivkontrolle für die Mortalität wurden 2 Petrischalen mit 600 mg/l Koffein (Sigma-Aldrich, Steinheim) und für die Malformation 2 Petrischalen mit 40 mg/l Koffein in DRETA-Lösung angesetzt. Die Exposition erfolgte bei 24±2°C und bei einem 14/10 h Hell-Dunkel-Rhythmus. Alle 24 h wurden die Kontrollmedien und die Proben erneuert und tote Embryonen entfernt und protokolliert. Nach 96 h wurden die Embryonen in 70% Ethanol fixiert.

Testauswertung

Die fixierten Embryonen wurden unter dem Binokular auf abnormale Entwicklung (Westerfield, 1995) untersucht. Zusätzlich wurden für einige Wasserproben die Embryonen mit Hilfe einer CCD-Kamera aufgenommen und die Länge mit einem dafür entwickelten Computerprogramm gemessen. Alle ermittelten Daten wurden mit one-way ANOVA und Dunnett's post test (Instat von Graphpad) auf signifikante Unterschiede zur Kontrolle getestet.

2.2.5 CERBA : Kompetitiver Östrogen-Rezeptor Bindungs Assay

Mit dieser Methode wird die Interaktion einer bzw. mehrerer Substanzen mit dem Östrogenrezeptor der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) untersucht. Gemessen wird hierbei die Verdrängung von radioaktiv markiertem Östradiol ([6,7-³H]-E₂, spezifische Aktivität 48 Ci/mmol, Amersham) vom Rezeptor durch Zugabe einer oder mehrerer nicht-radioaktiver Substanz(en). Die Bindungsexperimente wurden modifiziert nach Nimrod & Benson durchgeführt (Nimrod und Benson 1997). Alle Einzelexperimente wurden als Dreifachbestimmungen durchgeführt.

2.2.5.1 Forellenleber-Zytosolpräparation

8 Forellen wurden mit einem Schlag auf den Kopf betäubt, die Lebern entnommen und in einem Gefäß mit eiskaltem Präparationspuffer (10 mM Tris-HCl (ICN Biochemical); 1,5 mM EDTA (Sigma); 20 mM Natriummolybdat (Sigma); 10 % Glycerol, pH 7,4) gewaschen. Die Lebern wurden in Präparationspuffer von Hand kleingeschnitten und erneut mit eiskaltem Puffer gewaschen. Danach wurden die Stückchen in 4-fachem Volumen (1 / 4 w / v) Einfrierpuffer mit Hilfe eines motorgetriebenen Teflonpotters homogenisiert. Der Einfrierpuffer bestand aus Präparationspuffer, dem Monothioglycerol (1 ml/l; Aldrich) zur Rezeptorstabilisierung und Phenylmethylsulfonylfluorid (1 ml/l; Sigma) als Proteaseinhibitor zugegeben wurde. Das Homogenat wurde bei 10000 * g und 4 °C für 10 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Der Überstand wurde anschließend bei 100000 * g und 2 °C für 90 min zentrifugiert. Der Überstand dieses Schrittes stellt das fertige Leberzytosol mit dem hohen Östrogenrezeptor-Gehalt dar. Der Proteingehalt des Zytosols wurde mit Hilfe einer modifizierten Bradford-Methode (Bio-Rad Laboratories, München) bestimmt und mit Einfrierpuffer auf 1 mg/l eingestellt. Das Zytosol wurde daraufhin aliquotiert und bei -80 °C bis zur Verwendung eingefroren.

2.2.5.2 Bestimmung von K_d und B_{max} : Sättigungs-Assay

Dieser Assay dient der Bestimmung der maximalen Anzahl an Bindungsstellen B_{max} sowie der Bestimmung der Dissoziationskonstante K_D.

Zur Bestimmung der absoluten Bindung des radioaktiv markierten Östradiols (³H-E₂) wurden 150 µl Einfrierpuffer und 100 µl Zytosol zusammen mit 20 µl ³H-E₂ (1 – 20 nM

in 5 % Ethanol) bei 4 °C für 20 Stunden in 1,5 ml Eppendorf-Cups inkubiert. Zur Bestimmung der nicht-spezifischen Bindung des $^3\text{H-E}_2$ wurden die Parallelansätze zusätzlich mit 10 μl nicht radioaktiv markiertem 17β -Östradiol in jeweils 1000fachem Überschuss (1 – 20 μM in 98 % Ethanol) inkubiert. Um nicht-gebundenes $^3\text{H-E}_2$ aus der weiteren Messung auszuschließen, wurden nach Beendigung der Inkubation zu jedem Gefäß 300 μl Aktivkohlelösung (3,75 % Aktivkohle (Norit A[®], 4 – 7 μm ; Sigma) und 0,375 % Dextran T70 (Pharmacia Biotech)) zugegeben, für 15 min auf Eis inkubiert und 10 min bei 4000 * g abzentrifugiert. Vom Überstand wurden je 300 μl in 5 ml Scintillations-Vials überführt, 3 ml Scintillations-Cocktail (Liquid Safe, Beckman) zugegeben, gevortext und im β -Scintillations-Zähler (Beckman) gemessen.

2.2.5.3 Kompetitiver Bindungs-Assay

Mit diesem Assay wird die Affinität einer Substanz an den Östrogenrezeptor bestimmt.

Zu 150 μl Einfrierpuffer und 100 μl Zytosol (Proteingehalt ~ 1 mg) wurden 20 μl $^3\text{H-E}_2$ in der im Sättigungs-Assay bestimmten K_d -Konzentration zugegeben. Dieser Ansatz diente der Bestimmung der absoluten Bindung. Zur Bestimmung der nicht-spezifischen Bindung wurden zum Parallelansatz zusätzlich 10 μl nicht-radioaktiv markiertes Östradiol in 1000fachem Überschuss gegeben. Die weiteren Schritte wurden durchgeführt wie oben beschrieben. Aus der Differenz von absoluter Bindung minus nicht-spezifischer Bindung erhielt man die spezifische Bindung des $^3\text{H-E}_2$ an den Östrogenrezeptor. Diese wurde als 100 % $^3\text{H-E}_2$ -Bindung definiert.

In einem dritten Parallelansatz wurde statt des tausendfachen Überschusses an nicht-radioaktivem Östradiol eine Substanz, ein Gemisch oder ein Flusswasser-Extrakt in ansteigender Konzentration zugegeben (10 μl in 98 % Ethanol). Tabelle 2.4 führt die getesteten Substanzen und ihre Konzentrationsbereiche auf. Die so erhaltene Bindung minus der nicht-spezifischen Bindung wurde als Prozent der spezifischen Bindung gegen den Logarithmus der zugegebenen Substanzkonzentration graphisch aufgetragen.

Tabelle 2.4: Im CERBA getestete Substanzen mit Konzentrationsbereich

| Substanz | Konzentration [M] | Substanz | Konzentration [M] |
|-------------------------------|------------------------------|---------------------|------------------------------|
| Östriol | $10^{-4} - 10^{-9}$ | Nonylphenol, techn. | $10^{-3} - 10^{-8}$ |
| 17 β -Östradiol | $10^{-6} - 10^{-11}$ | Bisphenol A | $10^{-3} - 10^{-8}$ |
| Östron | $10^{-4} - 10^{-11}$ | Carbamazepin | $10^{-3} - 10^{-8}$ |
| 17 α -Ethinylöstradiol | $10^{-6} - 10^{-12}$ | Diclofenac | $10^{-3} - 10^{-8}$ |
| Genistein | $10^{-3} - 10^{-10}$ | Naproxen | $10^{-3} - 10^{-8}$ |
| β -Sitosterol, synthet. | $10^{-4} - 10^{-9}$ | Bezafibrat | $10^{-3} - 10^{-8}$ |
| β -Sitosterol, natürl. | 10^{-4} | Clofibrinsäure | $10^{-3} - 10^{-8}$ |

Die Flusswasser-Extrakte wurden in 1facher, 4facher, 18facher und 36facher Konzentrierung mit bzw. ohne Cleanup eingesetzt. Die 36fache Konzentrierung ergibt sich aus der Verdünnung des nach Aufarbeitung 1000fach konzentrierten Extrakts im Probenansatz (1 l Flusswasser wird zu 1 ml Extrakt, davon 10 μ l verdünnt in 280 μ l Endvolumen). Alle weiteren Konzentrierungen wurden aus der 36fachen Konzentrierung durch Verdünnung hergestellt.

Auswertung :

Der IC₅₀-Wert wurde als die Konzentration der zugegebenen Substanz definiert bei der die Hälfte des ³H-E₂ vom Rezeptor verdrängt wurde. Die Berechnung des IC₅₀-wertes erfolgte durch nicht-lineare Regression (Graph Pad Prism 2.00; San Diego, USA; 1995). Die statistische Auswertung der Bindungsexperimente mit Flusswasserextrakten erfolgte durch One-Way ANOVA mit nachfolgendem Dunnet's Post-Test (Graph Pad InStat 3.01; San Diego, USA; 1998).

2.2.6 Induktion der Vitellogenin- und Östrogenrezeptor-mRNA-Synthese in Forellen- und Karpfen-Hepatozyten, sowie der Östrogenrezeptor-mRNA-Synthese in Gonadenzellen

Die folgenden Methoden wurden ausgewählt, um die Wirkung von Xenoöstrogenen auf zwei heimische Fischarten auf Gen-Ebene zu untersuchen. Zumindest für die Forelle ist hierbei die Detektion der mRNA-Synthese zweier östrogenabhängiger Gene im Northern Blot mittels geeigneter cDNA-Sonden (Le Guellec et al., 1988; Pakdel et al., 1991; Pakdel et al., 1990), bzw. in der RT-PCR mittels geeigneter Primer (Mellanen et al., 1996; Ren et al., 1996) bereits möglich. Die Verwendung primärer Hepatozyten-Kulturen führt zu einer wesentlichen Vereinfachung des Versuchsaufbaus im Vergleich zu *in vivo*-Versuchen. Der Aufbau der primären Hepatozyten-Kultur wurde mit Abwandlungen gemäß den Angaben von Ostrander (Ostrander et al., 1995) durchgeführt.

Die Etablierung der primären Gonaden-Zellkultur entspricht weitgehend der Etablierung der Leber-Zellkultur.

2.2.6.1 Isolierung von Forellen-Hepatozyten

Benötigte Chemikalien und Lösungen

P/S/A: 100x Antibiotic-Antimycotic (Life Technologies, Karlsruhe) (10000 units/ml Penicillin G Sodium, 10000 µg/ml Streptomycin-Sulfat, 25 µg/ml Amphotericin B in 0,85% Saline)

HBSS (Hanks balanced salt solution, modifiziert)

5,36 mM KCl

0,34 mM NaH₂PO₄

0,44 mM KH₂PO₄

145 mM NaCl

10 mM Hepes

in MQ gelöst, auf pH 7,6 eingestellt und anschließend autoklaviert.

Vor der Präparation wurde noch 2% P/S/A zugegeben

HBSS mit EGTA

HBSS

0,2 mM EGTA

in MQ gelöst, auf pH 7,6 eingestellt und anschließend autoklaviert.

Vor der Präparation wurden 2% P/S/A zugegeben

Collagenase-Lösung

50 mg Collagenase Typ IV (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) wurden in 10 ml HBSS (P/S/A) gelöst. Es wurden 400 µl 100 mM CaCl₂ und 100 µl 100 mM MgCl₂ hinzugefügt und die Lösung durch einen 0,2 µm Filter (Celtron 30/0,2, Schleicher&Schuell, Dassel) steril filtriert.

Fötale Kälberserum (FCS) (Biochrom KG, seromed, Berlin)

Um Östrogene aus dem Serum zu entfernen, wurde FCS mit Aktivkohle/Dextran behandelt. Dazu wurden 0,5% Aktivkohle und 0,05% Dextran in MQ gelöst, 50 ml der Lösung in ein Falcon gegeben und bei 3000 rpm für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und pro Falcon 50 ml FCS zugegeben. Anschließend wurde die FCS-Aktivkohle/ Dextran-Lösung unter Schütteln (180 Zyklen/min) 3 h bei 37°C inkubiert. Nach Zentrifugation (3000 rpm, 10 min) wurde das FCS abgeschüttet und sterilfiltriert.

MEM (Minimum essential medium)

Instamed MEM-Trockenmedium mit Earle's Salzen, mit Glutamin, ohne NaHCO₃ und ohne Phenolrot. Das Trockenmedium wurde 5fach konzentriert in Millipore-Wasser angesetzt, nach 2-3 Stunden Rühren durch einen Faltenfilter filtriert und anschließend durch 0,2 µm- Filter (Sartolab-P20, Sartorius, Goettingen) steril filtriert.

Für die Zellpräparation wurde dem Medium 0,225% NaHCO₃, 4 mM Glutamin, 1x Antibiotic-Antimycotic-Lösung, 1x nicht-essentielle Aminosäuren (100x MEM nicht-essentielle Aminosäure-Lösung, Life Technologies, Karlsruhe) und 10% fötales Kälberserum (FCS) zugegeben.

Für die Herstellung von Hepatozyten-Primärkulturen wurden Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) aus der Fischereigenossenschaft in Staad, Konstanz und aus der Fischzucht Ernst in Utting am Ammersee verwendet.

Die Forellen wurden betäubt und anschließend aufgeschnitten. Mit Hilfe einer sterilen Spritze und einer sterilen Kanüle wurde die Leber mit 10-20 ml eiskalter HBSS (mit EGTA) retrograd perfundiert. Anschließend wurde die Leber herausgeschnitten und die Gallenblase entfernt. Die Leber wurde in ein Falcon-Röhrchen mit eiskalter HBSS (mit EGTA) gegeben. Die weitere Präparation der Zellen wurde unter einer Sterilbank durchgeführt. Die Leber wurde in frischer, eiskalter HBSS (mit EGTA) in einer sterilen Petrischale so klein wie möglich zerschnitten. Die Leberstückchen wurden in ein steriles 50 ml Falcon-Röhrchen überführt, mit eiskalter HBSS aufgefüllt und bei 36g für 2 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Pellet in 50 ml HBSS ohne EGTA gewaschen.

Nach erneutem Abzentrifugieren wurde das Pellet zusammen mit 10 ml Collagenase-Lösung und einem sterilen Rührfisch in einen Silikon-beschichteten (Sigmacote, Sigma) Erlenmeyer-Kolben gegeben und 30 min lang unter langsamem Rühren auf einem Magnetrührer inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension mit einem Rubber-Policeman zunächst durch 250 µm Gaze, dann durch 75 µm Gaze gestrichen und anschließend in ein 50 ml Falcon überführt und mit HBSS aufgefüllt. Nach Zentrifugation für 2 min bei 36g wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in Medium gewaschen. Nach Abzentrifugieren wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 10-20 ml Medium resuspendiert. Mit Trypan-blau dye exclusion wurde die Zellzahl und Vitalität der Zellen bestimmt. Die Hepatozyten wurden mit einer Zellzahl von 5×10^5 Zellen/cm² auf Primaria-Zellkulturschalen (Becton Dickinson Labware, Deutschland) ausgesät und im Brutschrank bei 18°C gehalten. Die Leberzellen wurden für mindestens 24 Stunden ruhig stehen gelassen, um ein Adhärenzen der Zellen an die Schalen zu ermöglichen.

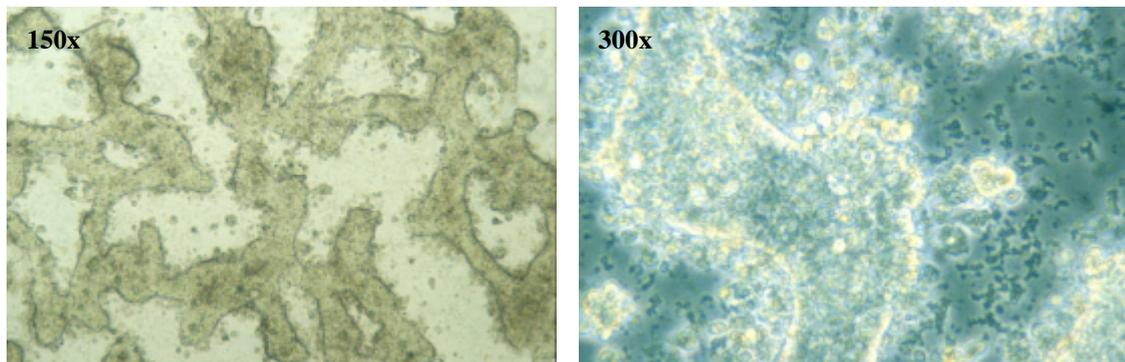


Abb. 2.6: Forellen-Hepatozyten in 150facher und 300facher Vergrößerung. Die Aufnahmen entstanden unmittelbar vor RNA-Präparation. Zuvor wurden die Hepatozyten für 72 Stunden in Kultur gehalten und anschließend für 48 Stunden inkubiert, im vorliegenden Fall mit EtOH (Negativkontrolle).

2.2.6.2 Isolierung von Karpfen-Hepatozyten

Zusätzlich zur Regenbogenforelle wurde die Kultur von Primärzellen der Karpfenleber neu in unserem Labor etabliert. Verwendet wurden dreijährige geschlechtsreife Männchen. Die Präparation erfolgte weitgehend gleich der Forellen-Präparation; aufgrund der inhomogenen Struktur der Karpfenleber konnte die Leber jedoch nicht perfundiert werden. Stattdessen wurden zusätzliche Waschschrte gemacht, um Blutzellen zu entfernen:

Vor Kollagenase-Verdau 2 Waschschritte mit EGTA/HBSS sowie zwei Waschschritte mit HBSS.

Nach Durchstrich durch Gaze 2 Waschschritte mit HBSS

Nach allen Waschschritten erfolgte die Abzentrifugation bei 700 rpm, anschließend erfolgte die Resuspension durch kräftiges Schütteln.

Ansonsten erfolgte auch die Inkubation, Stimulation und Extraktion der RNA analog zur Forelle.

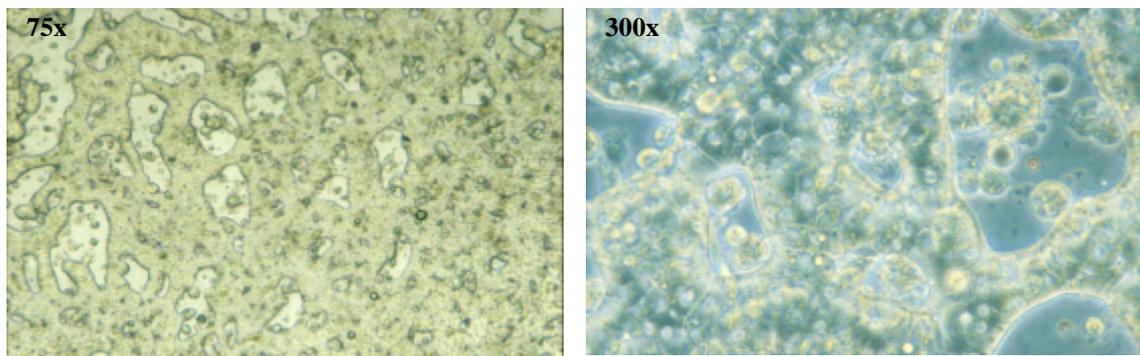


Abb. 2.7: Karpfen-Hepatozyten in 75facher und 300facher Vergrößerung. Die Aufnahmen entstanden unmittelbar vor RNA-Präparation. Zuvor wurden die Hepatozyten für 72 Stunden in Kultur gehalten und anschließend für 48 Stunden mit EtOH (Negativkontrolle) inkubiert.

2.2.6.3 Isolierung von Gonadenzellen

Die Präparation der Gonadenzellen entspricht im wesentlichen der Hepatozyten-Präparation, allerdings wurden die Gonaden nicht retrograd perfundiert und die Gonadenzellen nach allen Präparations- und Waschschritten bei 142 g abzentrifugiert. Die Gonadenzellen konnten in der Neubauer-Zählkammer nicht gezählt werden, da sie nicht von in der Zellsuspension enthaltenen Erythrozyten unterschieden werden konnten. Die erhaltene Zellsuspension wurde deshalb auf mehrere Primaria-Zellkulturschalen verteilt. Nach 24 h wurden die Erythrozyten unter leichtem Schwenken von dem Schalenboden abgelöst (Erythrozyten heften sich im Gegensatz zu Gonadenzellen nicht an den Schalenboden an) und ein hundertprozentiger Mediumwechsel durchgeführt.

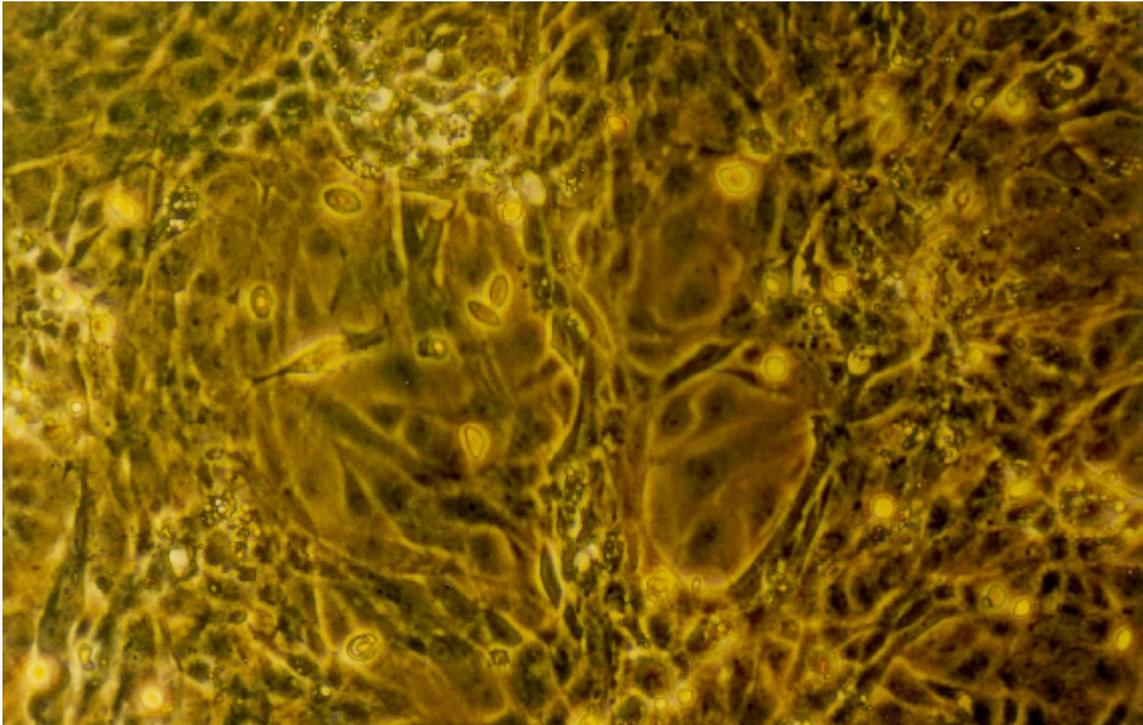


Abb. 2.8: Gonadenzellen einer weiblichen Regenbogenforelle nach 7 Tagen in Kultur bei 200facher Vergrößerung.

2.2.6.4 Passage von Gonadenzellen

Benötigte Chemikalien und Lösungen

Phosphate balanced saline (PBS)

136,9 mM NaCl

2,7 mM KCl

8,1 mM Na₂HPO₄ *2H₂O

1,5 mM KH₂PO₄

in MQ gelöst; pH 7,4; ~300 mOsM

Trypsin

Trypsin-EDTA-Lösung (10x) (Life Technologies, Karlsruhe)

1:10 in PBS verdünnt

Nach Erreichen der Konfluenz wurde das Zellkultur-Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit sterilem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen bis zur Ablösung vom Schalenboden mit Trypsin inkubiert. Die Trypsin-Reaktion wurde durch die Zugabe von Medium (Medium/Trypsin-Verhältnis mindestens 1) abgestoppt. Die

Gonadenzellen wurden nach Trypanblau-Färbung in der Neubauer-Zählkammer gezählt und zu einer Dichte von 5×10^3 Zellen/cm² auf Primaria-Zellkulturschalen ausgesät.

2.2.6.5 Stimulation der Zellen

Benötigte Chemikalien und Lösungen

In der Zellkultur wurden folgende Substanzen und Wasserproben auf östrogene Wirkung getestet:

17 β -Estradiol (1,3,5[10]-Estratriene-3, 17 β -diol), Minimum 98%

17 α -Ethinylestradiol (17 α -Ethyanyl 1,3,5[10]-Estratriene-3, 17 β -diol)

Bisphenol A (4,4'-Isopropyl-idenediphenol)

Nonylphenol / 4-Nonylphenol (tech.)

Carbamazepin (5H-Dibenz [b,f] azepine-5-carboxamide)

Naproxen ((S)-6-Methoxy- α -methyl-2-naphthaleneacetic acid), Natriumsalz

Bezafibrat (2-[4-(2-[4-Chlorobenzamido] ethyl)-phenoxy]-2-methylpropanoic acid)

Clofibrinsäure (2-(p-Chlorophenoxy)-2-methylpropionic acid)

Diclofenac (2[(2,6-Dichlorophenyl) amino] benzene-acetic acid), Natriumsalz

Die angegebenen Substanzen stammen alle von Sigma-Aldrich, Steinheim.

Organische Phasen verschiedener Wasserproben (ohne cleanup) aus der Seefelder Aach (Buggenseggel), der Schussen (Lochbrücke) sowie dem Abfluss der Kläranlage Langwiese; 1:1000 bzw. 1:10000 aufkonzentriert

Sämtliche Substanzen und Wasserproben wurden in 100% Ethanol gelöst. Stammlösungen wurden seriell in Zehner-Potenzen in 100% Ethanol verdünnt.

Die Hepatozyten wurden nach der Aussaat zunächst für 5 Tage, im späteren Verlauf dieses Projektes für 72 h stehen gelassen. Vor der Stimulation der Zellen wurde ein 50%iger Mediumwechsel durchgeführt. Die Stimulation der Zellen wurde auf zweierlei Art durchgeführt. Die Testsubstanz wurde entweder direkt in den Zellkultur-Überstand pipettiert und durch vorsichtiges Schwenken der Schalen verteilt oder vor dem Mediumwechsel in das Medium pipettiert und beim 50%igem Mediumwechsel mit auf die Zellen gegeben. Um die Ethanolkonzentration im Medium gering zu halten (sollte nicht über 0,1% liegen) wurden die Testsubstanzen dabei 1:1000 verdünnt, d.h. auf 2 ml Medium wurden 2 μ l Testsubstanz gegeben. Zwischen den zwei Stimulationswegen wurde kein Unterschied in der Effizienz der Stimulation beobachtet. Die Zellen wurden anschließend weitere 24 h (bei Versuchen zur Zeitabhängigkeit der Induktion der mRNA-Synthese auch für 48 oder maximal 72 h), im späteren Verlauf dieses Projektes für 48 h in Kultur belassen. Nach der Stimulation wurde der Medienüberstand teilweise

für die Vitellogenin-Bestimmung im ELISA eingefroren und die Zellen für die RNA-Analyse aufgearbeitet.

Die Gonadenzellen wurden auf die gleiche Weise stimuliert. Der Stimulationszeitpunkt hing von dem Wachstum der Zellen und somit vom Erreichen einer geeigneten Zelldichte (Zellen sollten noch nicht konfluent sein) ab. Die RNA wurde nach 24 bzw. 48 h präpariert.

2.2.7 Expression und Detektion von Vitellogenin (Protein-Ebene)

Die Synthese von mRNA in Zellen lässt keinen direkten Schluss auf die Synthese der entsprechenden Proteine zu, da verschiedene Regulationsmechanismen z.B. die Stabilisierung bzw. der Abbau der mRNA und somit die Protein-Synthese beeinflussen. Im Falle des Vitellogenin ist die Detektion des Proteins im ELISA möglich. Mit dieser Methode sollte von den primären Hepatozyten-Kulturen produziertes und ins Medium abgegebenes Vitellogenin nachgewiesen werden.

2.2.7.1 Regenbogenforellen- Vitellogenin- ELISA

Zur Bestimmung des Vitellogeningehaltes wurde ein quantitativer Regenbogenforellen-Vitellogenin ELISA Kit (Biosense, Bergen, Norwegen) mit einem breiten Arbeitsbereich von ca. 0,15 – 6 µg Vitellogenin/ ml eingesetzte Probe) verwendet. Dieser kompetitiver ELISA basiert auf einem monoklonalen Vitellogenin-Antikörper gegen den Atlantischen Lachs mit nachgewiesener Kreuzreaktivität mit anderen Salmoniden. Dieser ELISA wurde exakt nach Herstellerbeschreibung durchgeführt:

Kunststoffplatten mit 96 Kavitäten (NUNC, Maxisorp) wurden bei 4°C über Nacht mit 2 µg Vitellogenin/ml Puffer (50 mM Bicarbonatpuffer, pH 9,6) beschichtet. Am folgenden Morgen wurden die Platten dreimal mit Waschpuffer (0,05% Tween 20 in PBS, pH 7,3) gewaschen und 30 min bei 37°C mit 1% BSA in PBS, pH 7,3 abgeblockt. Nach Wiederholung der Waschschritte wurden die Vitellogeninstandard-Verdünnungsreihe (19,5 ng – 20 µg/ ml BSA-PBS), Systemkontrollen (unspezifische Bindung und totale Bindung) und die unverdünnten Zellkultur-Mediumproben jeweils in Triplikaten auf die Platten pipettiert. Dazu wurde unmittelbar danach der Erst-Antikörper (monoklonaler Anti-Vitellogenin aus dem Atlantischer Lachs, 1:15000

vorverdünnt) pipettiert und die Platten 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde der Zweit-Antikörper (Anti-Maus IgG aus der Ziege, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase, 1:2000 vorverdünnt) pipettiert und die Platten wieder 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach 3 Waschschritten wurde die frisch angesetzte Substratlösung (OPD in Harnstoffhydrogenperoxid) auf die Platten gegeben und diese lichtgeschützt 30 min bei RT inkubiert. Die Enzymreaktion wurde dann durch Zugabe von 2 M Schwefelsäure gestoppt und die Absorption bei 450 nm mit Hilfe eines SLT-Mikrotiterplatten-Readers bestimmt. Das gelbe bis rötliche Farbstoffprodukt der Peroxidasereaktion hat sein exaktes Absorptionsmaximum bei 492 nm, da der Absorptionspeak relativ breit ist, sind jedoch verlässliche Messungen zwischen 440 und 520 nm möglich und so an das Messgerät anpassbar.

Die Messdaten wurden unter Verwendung von MS EXCEL verarbeitet und unter Berücksichtigung der Systemkontrollen und des Bindungslimits (10 – 80 % Bindung) der Platten die jeweils besten Verdünnungsstufen zur Berechnung der Vitellogenin-Konzentration herangezogen. Die Daten werden als Vitellogenin-Gehalt [ng/ml Probe] mit Standardabweichung angegeben.

2.2.7.2 Karpfen- Vitellogenin- ELISA

Zur Bestimmung des Vitellogeningehaltes wurde ein quantitativer Karpfen-Vitellogenin ELISA Kit (Biosense, Bergen, Norwegen) mit einem breiten Arbeitsbereich von ca. 0,24 – 250 ng Vitellogenin/ ml eingesetzte Probe) verwendet. Dieser nicht-kompetitiver Sandwich-ELISA basiert auf zwei verschiedenen Vitellogenin-Antikörper gegen Karpfen mit nachgewiesener Kreuzreaktivität mit anderen Cypriniden. Dieser ELISA wurde exakt nach Herstellerbeschreibung durchgeführt:

Kunststoffplatten mit 96 Kavitäten (NUNC, Maxisorp) wurden bei 4°C über Nacht mit dem sogenannten „Capture“-Antikörper (mouse anti-carp Vtg) in 50 mM Bicarbonatpuffer, pH 9,6 beschichtet. Am folgenden Morgen wurden die Platten dreimal mit Waschpuffer (0,05% Tween 20 in PBS, pH 7,3) gewaschen und 60 min bei 37°C mit 1% BSA in PBS, pH 7,3 abgeblockt. Nach Wiederholung der Waschschritte wurden die Vitellogeninstandard-Verdünnungsreihe (0,24 ng – 250 ng/ ml BSA-PBS), die Systemkontrolle (unspezifische Bindung) und die unverdünnten Zellkultur-Mediumproben jeweils in Triplikaten auf die Platten pipettiert und diese 60 min bei 37°C inkubiert.

Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde der Detektions-Antikörper (rabbit anti-carp Vtg) pipettiert und die Platten 60 min bei 37°C inkubiert.

Nach Wiederholung der Waschschriffe wurde der Sekundär-Antikörper (Anti-Maus IgG aus der Ziege, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase) pipettiert und die Platten 60 min bei RT (20-25°C) inkubiert. Nach 3 Waschschriffen wurde die frisch angesetzte Substratlösung (OPD in Harnstoffhydrogenperoxid) auf die Platten gegeben und diese lichtgeschützt 30 min bei RT inkubiert. Die Enzymreaktion wurde dann durch Zugabe von 2 M Schwefelsäure gestoppt und die Absorption bei 450 nm mit Hilfe eines SLT-Mikrotiterplatten-Readers bestimmt. Das gelbe bis rötliche Farbstoffprodukt der Peroxidasereaktion hat sein exaktes Absorptionsmaximum bei 492 nm, da der Absorptionspeak relativ breit ist, sind jedoch verlässliche Messungen zwischen 440 und 520 nm möglich und so an das Messgerät anpassbar.

Die Meßdaten wurden unter Verwendung von MS EXCEL verarbeitet und unter Berücksichtigung der Systemkontrollen wurde die Vitellogenin-Konzentration bestimmt. Die Daten werden als Vitellogenin-Gehalt [ng/ml Probe] mit Standardabweichung angegeben.

2.2.8 Präparation der RNA aus Hepatozyten und –Gonadenzellen

Zur Gewinnung der gesamten RNA aus Hepatozyten und Gonadenzellen wurden die jeweiligen Anleitungen von Tripure bzw. TRIzol[®] herangezogen. In diesen Methoden wird die RNA mit Hilfe von Phenol und Isothiocyanat aus den Zellen extrahiert, unter Verwendung von Chloroform von anderen Zellbestandteilen (Zellbruchstücke, Proteine und DNA) abgetrennt und mit Isopropanol ausgefällt.

Benötigte Chemikalien

Dimethyl-Pyrocbonat (DMPC), Sigma-Aldrich, Steinheim

DMPC-behandeltes MQ-H₂O; MQ wird mit 0,1% DMPC versetzt, mindestens ½h gerührt und anschließend autoklaviert

Trizol (Life Technologies, Karlsruhe) oder **Tripure** (Roche, Mannheim)

Tri-chlor-methan (Chloroform) p.a.

2- Propanol p.a.

75% Ethanol p.a.

Zunächst wurde das Medium abgenommen, wobei darauf zu achten ist, dass sich Hepatozyten leicht von der Schale ablösen können. Pro Zellkulturschale bzw. Kavität einer 6 well-Platte wurde 1 ml Tripure bzw. Trizol auf die Zellen gegeben und die Zellen mit einer Pipette vom Schalenboden abgelöst. Das entstehende Zellysate wurde mit der Pipette mehrmals resuspendiert, in ein Eppendorf-Cup überführt und anschließend für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform pro 1 ml Tripure wurden die Cups 15 sec. kräftig geschüttelt und nach 2-3 min Inkubation bei Raumtemperatur für 15 min bei 4°C, 12000g abzentrifugiert. Der farblose Überstand, der die RNA enthält, wurde in ein neues Cup überführt. Um die RNA auszufällen wurden 500 µl Isopropanol hinzugegeben und vorsichtig gemischt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die RNA abzentrifugiert (10 min, 4°C, 12000g). Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen. Nach Zentrifugation (12000g, 4°C, 5 min) wurde der Überstand verworfen und das RNA-Pellet getrocknet. Dazu wurden die Eppendorf-Cups geöffnet und über Kopf auf ein Kleenex gestellt.

Nach etwa 20 min wurde das Pellet in DMPC-behandeltem MQ-Wasser durch Vortexen oder mit einer Pipette resuspendiert. Zur Denaturierung der RNA wurde die RNA-Lösung 10-15 min bei 55-60°C im Eppendorf-Inkubator erhitzt und anschließend auf Eiswasser abgekühlt. Zur Bestimmung der RNA-Menge wurde die RNA-Lösung 1:200 in DMPC-behandeltem MQ verdünnt und in einer Quarzküvette im Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Eine Absorption von 1 entspricht hierbei 40µg RNA/ml. Zusätzlich wurde die Reinheit der RNA bestimmt, wobei Proteine bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen werden. Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zur Absorption bei 280 nm ist ein Maß für die Reinheit der RNA und sollte 1,8 betragen.

Die gereinigte RNA kann bei -20°C aufbewahrt werden.

2.2.9 RNA-Analyse mittels Northern Blot

Um die Expression der östrogenabhängigen Gene Östrogenrezeptor und Vitellogenin zu detektieren, wurde die aus den Hepatozyten gewonnene RNA im Northern Blot gemäß Le Guellec (Le Guellec et al., 1988) und Pakdel (Pakdel et al., 1991; Pakdel et al., 1990) untersucht. In dieser Methode wird RNA mittels denaturierender Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine positiv-geladene Nylonmembran

übertragen. Für Vitellogenin- und Östrogenrezeptor-mRNA spezifische, mit Digoxigenin-gelabelte cDNA-Sonden binden an die entsprechenden mRNA-Banden. Die Dig-gelabelten Sonden werden von Antikörpern gegen Digoxigenin erkannt. Die Antikörper wiederum tragen eine alkaline Phosphatase, die ein Chemilumineszenz-Substrat umsetzt, welches zur Schwärzung eines Chemilumineszenz-Detektions-Films führt und somit die Detektion der gesuchten mRNA-Banden ermöglicht.

Benötigte Chemikalien und Lösungen

Alle Reagenzien p.a. und zertifiziert RNase frei, falls nicht anders erwähnt.

Dimethyl-Pyrocyanat (DMPC) (Sigma-Aldrich, Steinheim)

RNase ERASE; RNase-Dekontaminationslösung (Roche, Mannheim)

E. coli-Stamm D5 α (Life Technologies Inc., Gaithersburg, USA)

Restriktionsnucleasen EcoRI (Roche, Mannheim)

Agarose Gel DNA Extraktion Kit (Roche, Mannheim)

DNA-Quantitation Standard (Life Technologies, Karlsruhe)

Digoxigenin-labeling Kit (Roche, Mannheim)

Agarose (multi purpose) (Roche, Mannheim)

37% Formaldehyd (Fulka, Neu-Ulm)

RNA molecular weight marker II, Dig-labeled (1,6–7,4 kb) (Roche, Mannheim)

Formamid

0,5 M EDTA-Stammlösung, pH 8,0 (Fluka, Neu-Ulm)

Glycerol, ultra pure

Bromphenolblau (Natriumsalz)

Sodiumdodecylsulfat (SDS) (Fluka, Neu-Ulm)

10x Blocking Reagenz (Roche, Mannheim)

Anti-Digoxigenin-AP (Antikörper gegen Digoxigenin, konjugiert mit alkaliner Phosphatase)

CSPD; Dissodium 3-(4-methoxyspiro {1,2-dioxetane-3,2'-(5,-chloro) tricyclo [3.3.1.1^{3,7}] decan}-4-yl) phenyl phosphate (Chemilumineszenz-Farbstoff) (Roche, Mannheim)

Dig Easy Hyb (Roche, Mannheim)

DMPC-behandeltes MQ-H₂O, Wasser mit 0,1% DMPC mindestens ½h rühren und anschließend autoklavieren

Ethidiumbromid-Färbelösung (1 μ g/ml in MQ-H₂O)

Methylenblau-Färbelösung [0,3 M Na-Acetat pH 5,2; 0,03% Methylenblau (Roth)]

5% Essigsäure

10x MOPS (0,2 M MOPS; 0,05 M Na-Acetat; 0,01 M EDTA), pH 7,0; mit 0,1% DMPC behandeln und autoklavieren

1 M NaPP (1 M Na₂HPO₄; H₃PO₄ konzentriert), pH 7,2; mit 0,1% DMPC behandeln und autoklavieren

Laufpuffer (10x MOPS 1:10 in DMPC-MQ verdünnt)

10% SDS

Probenpuffer (50% Glycerol; 0,4% Bromphenolblau; 0,01 M EDTA), mit zertifiziert RNase-freien Chemikalien und DMPC-H₂O ansetzen und 2x autoklavieren

20x SSC (3 M NaCl; 0,3 M Na₃-Citrat), pH 7,0 einstellen, mit 0,1% DMPC behandeln und autoklavieren

High-SDS-Lösung (5% SDS; 50% Formamid; 5x SSC; 2% Blocking Reagenz; 50 mM NaPP; 0,1% N-Lauroylsarcosin) mit DMPC-H₂O auf Endvolumen auffüllen; muss leicht erwärmt werden, um gelöst zu werden

30x SSC (4,5 M NaCl; 0,45 M Na₃-Citrat), pH 7,0 einstellen, mit 0,1% DMPC behandeln und autoklavieren

10% N-Lauroylsarcosin-Stammlösung in DMPC-H₂O herstellen und sterilfiltrieren

Maleinsäurepuffer (0,1 M Maleinsäure; 0,15 M NaCl), pH 7,5; mit 0,1% DMPC behandeln und autoklavieren

Detektionspuffer (100 mM Tris HCl; 100 mM NaCl, mit DMPC-Wasser auffüllen), pH 9,5; autoklavieren, nicht mit DMPC behandeln!

Waschlösung I (5x SSC; 0,2% SDS)

Waschlösung II (2x SSC; 0,2% SDS)

Blockierungslösung (Maleinsäurepuffer mit 1% Blockierungsreagenz)

Benötigte Geräte

Mikrowellengerät, Hybridisierungs-ofen, vertikale Agarose-Gelkammer mit Zubehör, Turbo Blotter von Schleicher&Schuell, UV-Transilluminator 302 nm (UVP Inc., San Gabriel, USA), Automatisches Photoentwicklungs-Gerät XR 26 (Dürr Technik)

Sonstige Materialien

Handschuhe (Latex oder Vinyl) Puder-frei (bzw. Puder abwaschen), positiv geladene Nylon-Membran (Roche, Mannheim), Turbo-Blotter GB-Set (Schleicher&Schuell), Lumi-Film Chemilumineszenz Detektions Film (Roche, Mannheim)

Herstellung Dig-markierter cDNA-Sonden gegen Vitellogenin- und Östrogenrezeptor-mRNA

Die Plasmide VG 5.09.54 und P43a wurden uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Valotaire (Laboratoire de Biologie Moléculaire in Rennes

Cedex, Frankreich) zur Verfügung gestellt. Das Plasmid VG 5.09.54 enthält als Insert Regenbogenforellen-Vitellogenin-cDNA, Plasmid P43a enthält Östrogenrezeptor-cDNA der Regenbogenforelle (Le Guellec et al., 1988; Pakdel et al., 1990).

Bakterienkulturen des E. coli-Stamm D5 α (Life Technologies Inc., Gaithersburg, USA) wurden durch Elektroporation mit den Plasmiden transformiert. Nach Amplifikation der Transformanten (Übernachtskulturen von E. coli) wurden die Plasmide mit High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche, Mannheim) entsprechend der Anleitung präpariert. Nach Charakterisierung der Plasmide durch Verdau mit Restriktionsnucleasen EcoRI (Roche, Mannheim), Agarose-Gelelektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung wurden die Plasmide aus dem Gel ausgeschnitten und mit Agarose-Gel DNA Extraktions Kit (Roche, Mannheim) entsprechend der Anleitung aufgereinigt. Quantifizierung der DNA-Proben wurde unter Verwendung von DNA-Quantitation Standard (Life Technologies, Karlsruhe) im Agarose-Gel durchgeführt. Substanzen und Methode zur Markierung der cDNA-Sonden mit Digoxigenin stammten von Roche (Mannheim).

Konzentration der Dig-gelabelten Sonden:

VG-cDNA-Sonde: 50 ng/ μ l

ER-cDNA-Sonde: 100 ng/ μ l

RNA-Gelelektrophorese

Im Umgang mit RNA ist darauf zu achten, dass ein Abbau der RNA durch RNasen vermieden wird. RNasen sind quasi überall vorhanden und müssen durch den Einsatz geeigneter Dekontaminierungs-Lösungen entfernt bzw. inaktiviert werden. Um einen Abbau der RNA durch RNasen während des Versuchs zu vermeiden, wurden ständig Handschuhe getragen und alle Lösungen, soweit möglich, mit DMPC behandelt. Materialien wurden mit RNase-Dekontaminationslösung behandelt.

Um RNA in Abhängigkeit von der Länge elektrophoretisch aufzutrennen, muss sie denaturiert vorliegen. Der denaturierte Zustand der RNA wird im Agarose-Gel durch Zugabe von Formaldehyd aufrechterhalten.

RNase ERASE-Lösung wurde auf Gelschlitten, -Kammer und -Kämme verteilt, die Geräte mit einem Kleenex-Tuch abgewischt, mit DMPC-Wasser abgespült und mit einem Kleenex-Tuch abgetrocknet. Die offenen Seiten des Gelschlittens wurden mit Tesafilm abgeklebt. Anschließend wurde ein 0,8%iges Agarose-Gel hergestellt, wobei die Agarose zunächst in 10% 10x MOPS und 73% DMPC-MQ unter Erhitzen in der Mikrowelle gelöst wurde.

Nachdem die Agarose auf ca. 65°C abgekühlt war, wurden unter dem Abzug 17% Formaldehyd zugegeben, die Agarose in den Gelschlitten gegossen und der Kamm eingesetzt. Das Gel wurde zum Auspolymerisieren unter dem Abzug gelassen.

Nachdem das Gel auspolymerisiert war, wurde der Kamm vorsichtig aus dem Gel gezogen, der Tesafilm entfernt und das Gel auf dem Gelschlitten in die mit Laufpuffer gefüllte Gelkammer eingesetzt.

Die RNA-Proben wurden folgendermaßen für die Gelelektrophorese vorbereitet: Die Proben wurden in sterilen Eppendorfcups zu einer Endkonzentration von 1,1 µg/µl mit einem Endvolumen von 9 µl verdünnt (entspricht 10 µg RNA pro Gelslot). Pro Probe wurden 4 µl 10x MOPS, 20 µl deionisiertes Formamid und 7 µl 37% Formaldehyd zugegeben. Als Standard wurden 5µl RNA-Längenstandard II (Roche, Mannheim) mit 4 µl DMPC-MQ verdünnt. Anschließend wurden die Proben im Eppendorf-Thermomixer bei 65°C für 15 min denaturiert und danach für 5 min in Eiswasser abgekühlt. Pro Probe wurden dann 4 µl Probenpuffer (50% Glycerol, 0,4% Bromphenolblau, 0,01 M EDTA) zugegeben. Die Proben wurden kurz abzentrifugiert und in die Gelslots pipettiert. Das Gel wurde bei konstanter Spannung von 100 V laufen gelassen.

Northern Transfer (Rapid downward blotting)

Nach dem Elektrophorese-Lauf wurde das Gel in eine mit DMPC-MQ gefüllte Glaspetrischale gegeben. Das Gel wurde 3x für 7 min in DMPC-MQ gewaschen und anschließend für 10 min in 20x SSC equilibriert.

Ein Stück der positiv-geladenen Nylonmembran wurde auf die Größe des Gels zugeschnitten und in eine mit DMPC-MQ gefüllte, sterile Glaspetrischale gelegt. Nach kurzem Anfeuchten der Membran wurde sie 10 min in 20x SSC equilibriert.

Das Turbo-Blot Sandwich wurde nach Anleitung des Herstellers von unten nach oben folgendermaßen aufgebaut:

- 14x GB004 trocken
- 4x GB002 trocken
- 1x GB002 in 20x SSC angefeuchtet
- Membran
- Gel (die Gelränder wurden mit Parafilm ausgelegt)
- 3x GB002 in 20x SSC angefeuchtet

1x Transferfilter in 20x SSC angefeuchtet
Deckplatte (mit der Schrift nach oben)

Die Wanne des Turbo-Blotters wurde mit 20x SSC als Blotting Puffer gefüllt.

Nach 4 h Blotten wurde die Membran auf Alufolie gelegt (die Alufolie wurde so verschlossen, dass sie die Oberseite der Membran nicht berührt) und im Hybridisierungsöfen für 2 h bei 80°C gebacken. Der Blot konnte anschließend im Kühlschrank aufbewahrt werden. Um die Blotting-Effizienz zu überprüfen wurde das Gel für 5 min in Ethidiumbromid-Lösung angefärbt und über Nacht in DMPC-MQ entfärbt. Am nächsten Tag wurde das Gel auf dem UV-Transilluminator betrachtet. Es sollten fast keine Banden mehr zu erkennen sein.

Northern Hybridisierung

Für die Hybridisierung war die Verwendung zweier verschiedener Hybridisierungs-Lösungen möglich. Bei der Verwendung der High-SDS-Lösung wurden Prähybridisierung und Hybridisierung bei 42°C durchgeführt, mit Dig Easy Hyb bei 50°C. High-SDS musste vor Gebrauch erhitzt werden, um in Lösung zu gehen. Die Membran wurde kurz in 5x SSC, in einer sterilen Glaspetrischale rehydriert. Lässt man die Membran in die SSC-Lösung gleiten, ist die rRNA kurz als 'Schatten' sichtbar. Anschließend wurde die Membran in eine Hybridisierungs-Röhre gelegt. Nach Zugabe von 10 ml High-SDS bzw. Dig Easy Hyb wurde für 1 h bei 42 bzw. 50°C prähybridisiert. Während der Prähybridisierung wurde die Dig-markierte cDNA-Sonde (Vitellogenin-cDNA oder Östrogenrezeptor-cDNA) vorbereitet. Dafür wurde die cDNA-Sonde aufgetaut und 1,75 µl (=175 ng) der ER-Sonde bzw. 2,5 µl (=125 ng) der Vg-Sonde in 20 µl DMPC-MQ gegeben und gemischt. Anschließend wurde ein Eppendorf-Cup mit der Sonde in einem mit Wasser gefülltem Becherglas 10 min lang gekocht. Das gesamte Volumen wurde dann in 5-10 ml High-SDS-Lösung oder Dig Easy Hyb gegeben. Die Sonden konnten mehrmals verwendet werden (Aufbewahrung der Sonden bei -20°C). Wurde für eine Hybridisierung eine bereits fertige Sonde verwendet, musste diese nur aufgetaut und im Wasserbad für 10 min bei 68°C denaturiert werden. Für die Hybridisierung wurde die Prähybridisierungs-Lösung dekantiert und die vorbereitete Sonde in die Hybridisierungs-Röhre gegeben. Hybridisiert wurde für 16 Stunden.

Nach der Hybridisierung wurde die Membran bei Raumtemperatur 10 min in Waschlösung I und anschließend 2x 15 min bei 68°C in Waschlösung II gewaschen. Die Membran konnte nach dem Waschen getrocknet und bei 4°C gelagert werden.

Detektion

Die Membran wurde kurz in Waschpuffer (Maleinsäurepuffer mit 0,3% Tween 20) equilibriert und für 1h bei RT in 30 ml Blockierungslösung geblockt. Der Digoxigenin-Antikörper wurde 1:10000 in Blockierungslösung verdünnt und die Membran 30 min lang bei Raumtemperatur in der Antikörper-Lösung inkubiert. Daran schlossen sich zwei Waschschrte à 15 min in dem oben genannten Waschpuffer an. Bis hier erfolgten alle Schritte in der Hybridisierungs-Röhre. Die Membran wurde dann aus der Hybridisierungs-Röhre genommen und in einer sterilen Glaspetrischale bei Raumtemperatur für 2 min in Detektionspuffer gegeben. Die Membran wurde auf ein Stück PE-Folie gelegt und die CSPD-Detektionslösung auf die Membran aufgetropft. Die Membran wurde mit Folie abgedeckt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die überschüssige CSPD-Lösung sorgfältig mit einem Kleenex-Tuch abgetupft (die Membran sollte dabei allerdings nicht zu trocken werden). Die Membran wurde mit PE-Folie abgedeckt und die Oberfläche der Folie mit 70% Ethanol abgewischt. Zur Entwicklung der Chemilumineszenz wurde 15 min lang bei 37°C inkubiert. In der Dunkelkammer wurde dann ein Stück Chemilumineszenz-Detektions-Film aufgelegt und anschließend für etwa 15 min bei RT in einer licht-dichten Box belassen. Der Film wurde in einem automatischen Photoentwicklungs-Gerät (XR 26, Dürr Technik) entwickelt. Zur Überprüfung der rRNA-Banden konnte die Membran mit Methylenblau angefärbt werden. Dafür musste die Membran zunächst 5 min in 5% Essigsäure und dann 10-15 min in Methylenblau-Färbelösung belassen und anschließend in Wasser entfärbt werden. Die Membran kann dann luftgetrocknet werden.

Die Verwendung des Northern Blot zur Detektion von mRNA-Synthese ist zum einen sehr zeit- und arbeitsaufwendig, zum anderen treten häufig Probleme auf. Unsicherheitsfaktoren stellen das Blotten der RNA aus dem Gel auf die Membran, die Bindung der cDNA-Sonden an die mRNA-Banden, die Bindung des Antikörpers gegen Digoxigenin an die Dig-gelabelten Sonden sowie die Umsetzung und Detektion des Chemilumineszenz-Substrats dar. Eine Fehlersuche nach Auftreten von Problemen wird durch die Vielzahl der möglichen Fehlerquellen bzw. durch das Fehlen geeigneter Tests erschwert. Das Vorhandensein von Primern für Östrogenrezeptor- und Vitellogenin-cDNA der Regenbogenforelle machte ein Ersetzen des Northern Blot durch die weniger zeitaufwendige und unproblematischere Methode der RT-PCR möglich.

2.2.10 RNA-Analyse mittels RT-PCR (Reverse Transkription und Polymerase Kettenreaktion) in Forellen-Hepatocyten

Die Untersuchung der Östrogenrezeptor- und Vitellogenin-mRNA-Expression mittels RT-PCR stellt eine wesentliche Vereinfachung gegenüber der Detektion im Northern Blot dar. Die Primer für die Detektion von ER- und Vg-mRNA der Regenbogenforelle wurden den Arbeiten von Ren (Ren et al., 1996) und Mellanen (Mellanen et al., 1996) entnommen. Die Durchführung der RT-PCR richtet sich zum einen an genannten Veröffentlichungen und zum anderen an Anleitungen von Roche, Mannheim und Perkin Elmer, Weiterstadt.

Benötigte Chemikalien und Lösungen

Von Perkin Elmer (Weiterstadt):

10x PCR-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,3; 500 mM KCl; 15 mM MgCl₂; 0,01% (w/v) Gelatine)

10 mM dNTP Mix

RNase Inhibitor (20 U/μl)

MuLV (50 U/μl)

50μm Random Hexamers

AmpliTaq DNA-Polymerase (5 U/μl)

10 mM Primer-Stammlösungen von folgenden Primern (Life Technologies, Karlsruhe):

Primersequenzen nach Ren (Ren et al., 1996)

RT-VG-up (5'-GGTTGCCACATCTGAAAGGAC-3'),

RT-VG-down (5'-AGGCAGACAACGCAGCACAG-3'),

ER-up (5'-TGCCTCTGGGTACCACTACG-3'),

RT ER-down (5'-AGGTGCTCCATGCCTTTGTTG-3'),

β-Actin-up (5'-CCTGACCCTGAAGTACCCCA-3'),

β-Actin-down (5'-CGTCATGCAGCTCATAGCTC-3')

Primersequenzen nach Mellanen (Mellanen et al., 1996)

VG-starting (5'-GATTGCACCACAGAGCTCAAA-3')

VG-ending (5'-AAAGCTGACTGAGCTCTTGGT-3')

25 mM MgCl₂ (Fluka, Neu-Ulm)

Multi purpose Agarose (Roche, Mannheim) oder **PeqGold Universal Agarose** (PeqLab, Erlangen)

0,5 M EDTA, pH 8,0 (Fluka, Neu-Ulm)

5x TBE-Puffer (445 mM Tris-Base; 445 mM Borsäure; 5 mM EDTA)

Ethidiumbromid-Färbelösung (1 μg/ml Ethidiumbromid in sterilem MQ)

10x DNA-Probenpuffer (0,25% Bromphenolblau; 0,25% Xylencyanol F.F. (ICN, Aurora); 15% Ficoll Typ 400)

DNA-Längenstandard XIV, 100 Basenpaarleiter (Roche, Mannheim)

Reverse Transkription

Für die Reverse Transkription wurden die mRNA-Proben zu einer Konzentration von 0,5 µg/µl in DMPC-MQ verdünnt. Pro Probe wurde folgender Ansatz pipettiert:

| | |
|-------------------|---------------|
| DMPC-MQ | 1,1 µl |
| 10x PCR-Puffer | 1 µl |
| MgCl ₂ | 1,4 µl |
| dNTP-Mix | 4 µl |
| RNase-Inhibitor | 0,5 µl |
| MuLV | 0,5 µl |
| Random Hexamers | 0,5 µl |
| RNA | 1 µl = 0,5 µg |
| Gesamtvolumen | 10 µl |

Um das Pipettieren mit kleinen Volumina zu vermeiden, wurde zunächst ein Master Mix aus allen Substanzen außer der RNA hergestellt. Die RNA wurde in den PCR-Reaktionsgefäßen vorgelegt und 9 µl des hergestellten Master Mix zu der jeweiligen Probe gegeben. Bei Herstellung des Master Mix ist zu beachten, dass die Reihenfolge der Substanzen eingehalten und nach Zugabe des Enzyms und der Random Hexamers möglichst schnell weitergearbeitet wird. Die Reverse Transkription (RT) wurde im Thermocycler (Primus 96, MWG-Biotech, Ebersberg) mit folgenden Programmschritten durchgeführt:

10 min bei 25°C, 1 h bei 42°C und 5 min bei 99°C.

Anschließend Abkühlung auf 4°C.

Polymerase Ketten-Reaktion (PCR)

Für die PCR wurde die aus der RT erhaltene cDNA zunächst 1:10 verdünnt.

Pro Probe wurde folgender Ansatz pipettiert:

| | |
|----------------|-----------|
| steriles MQ | 10,875 µl |
| 10x PCR-Puffer | 2,5 µl |
| dNTP-Mix | 2 µl |

| | | |
|-------------------|--------------|----------|
| Primer: | VG-up | 1,25 µl |
| | VG-down | 1,25 µl |
| | ER-up | 1,25 µl |
| | ER-down | 1,25 µl |
| | β-Actin-up | 1,25 µl |
| | β-Actin-down | 1,25 µl |
| MgCl ₂ | | 1 µl |
| Taq | | 0,125 µl |
| cDNA (1:10) | | 1 µl |
| Gesamtvolumen | | 25 µl |

Wie auch bei der Reversen Transkription wurde zunächst ein Master Mix aus allen Substanzen hergestellt und jeweils 24 µl Master Mix zu den vorgelegten cDNA-Proben pipettiert. Wiederum ist das Einhalten der Reihenfolge der Substanzen bei der Herstellung des Master Mix und das schnelle Weiterarbeiten nach Zugabe von MgCl₂ und Taq wichtig, da damit die PCR-Reaktion gestartet wird und beim Fehlen der Probe die Entstehung von Primer-Dimeren begünstigt ist. Die PCR wurde im Thermocycler mit 25 Zyklen durchgeführt, wobei pro Zyklus 30 sec bei 95°C (Denaturierung), 30 sec bei 59°C (Annealing) und 1 min bei 72°C (Elongation) inkubiert wurde. Anschließend wurden die cDNA-Proben über eine Ramp auf 4°C abgekühlt. cDNA kann bei -20°C aufbewahrt werden.

Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse der cDNA-Proben wurde ein 1,2%iges Agarose-Gel hergestellt, wobei die Agarose durch Erhitzen in der Mikrowelle in 0,5x TBE- Puffer gelöst wurde. 4 µl DNA-Längenstandard wurden mit 21 µl sterilem MQ gemischt. Anschließend wurden zu den cDNA-Proben und zu dem DNA-Marker jeweils 2,8 µl 10x Probenpuffer gegeben. Nachdem das Agarose-Gel auspolymerisiert war, wurde der Gelschlitten mit dem Gel in die mit 0,5x TBE-Puffer gefüllte Gelkammer eingesetzt. Das gesamte Volumen der vorbereiteten Proben wurde auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 100 V in ca. 90 min durchgeführt. Anschließend wurde das Gel 10 min in Ethidiumbromid-Lösung gefärbt, 30 min in sterilem MQ entfärbt und auf einem UV-Transilluminator mit einer Polaroid-Kamera photographiert .

2.2.11 RNA-Analyse mittels RT-PCR (Reverse Transkription und Polymerase Kettenreaktion) in Karpfen-Hepatozyten

Zur Detektion von Vitellogenin- bzw. Östrogenrezeptor mRNA in Karpfen-Hepatozyten konnte in weiten Teilen auf das Protokoll für die Forelle zurückgegriffen werden. Im folgenden sollen deshalb nur die Unterschiede aufgeführt werden. Zuerst mussten Karpfen-spezifische Primer gesucht werden. Hierbei musste, außer im Fall von α -Aktin, auf Sequenzen anderer Cypriniden zurückgegriffen werden, da die entsprechenden Karpfen-Sequenzen bisher noch nicht verfügbar sind.

Verwendete Primer

α -Aktin forward (5'-gga ctt cga gaa cga gat gg-3'): Karpfen, CYISAA1 von Watabe et al. (1995).

α -Aktin reverse (5'-aca tct gct gga agg tgg ac-3'): Karpfen, CYISAA1 von Watabe et al. (1995).

Vitellogenin forward (5'-ggt gct ctc cag acc ttt gc-3'): Fettkopfbrasse (*Pimephales promelas*), AF130354 von Korte et al. (2000).

Vitellogenin reverse (5'-cct cag ttt cag cag gaa gg-3'): Fettkopfbrasse (*Pimephales promelas*), AF130354 von Korte et al. (2000).

Östrogenrezeptor forward (5'-cca acc tgg cgg aca aag agc ttg ttc-3'): Goldfisch (*Carassius auratus*), AF061269, M.Zerulla (2000).

Östrogenrezeptor reverse (5'-gat gag tat gat ggc ttt gag aca cac-3'): Zebrafisch, DRE275910, M.Zerulla (2000).

Mastermix für die PCR

| | |
|----------------------|---------------|
| steriles MQ | 12,25 μ l |
| 10x PCR-Puffer | 2,5 μ l |
| dNTP-Mix | 2 μ l |
| Primer: | |
| VG-up/ ER-up | 1,25 μ l |
| VG-down/ ER-down | 1,25 μ l |
| α -Actin-up | 1,25 μ l |
| α -Actin-down | 1,25 μ l |
| MgCl ₂ | 2 μ l |
| Taq | 0,125 μ l |
| cDNA (1:10) | 1 μ l |
| Gesamtvolumen | 25 μ l |

Temperaturprogramm

Die Amplifizierung von ER- sowie Vg-mRNA musste getrennt durchgeführt werden. In beiden Programmen wurden 25 Zyklen durchgeführt, danach erfolgte die Abkühlung der cDNA-Proben über eine Rampe auf 4°C.

ER: Denaturierung (30 sec bei 95°C), Annealing (30 sec bei 50°C), Elongation (1 min bei 72°C).

Vg: Denaturierung (30 sec bei 95°C), Annealing (30 sec bei 60°C), Elongation (1 min bei 72°C).

Die Präparation der RNA, die Reverse Transkription sowie die Gelelektrophorese erfolgten analog zur Forelle.

2.2.12 Überprüfung der RT-PCR-Ergebnisse mittels Southern Blot (Forelle)

Mit Hilfe des Southern Blot sollte nachgewiesen werden, ob es sich bei den mittels RT-PCR erhaltenen Banden tatsächlich um Vitellogenin- bzw. Östrogenrezeptor-mRNA handelt. Die bereits im Northern Blot verwendeten cDNA-Sonden gegen VG- bzw. ER-mRNA (Le Guellec et al., 1988; Pakdel et al., 1990) sollten die entsprechenden cDNA-Banden der RT-PCR erkennen und somit eine Detektion analog zum Northern Blot möglich machen.

Benötigte Chemikalien und Lösungen

1 M HCl

Neutralisationslösung (1,5 M NaCl; 0,5 M Tris-Cl, pH 7,0)

Denaturierungslösung (1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH)

NBT/BCIP-Farbstoff (Roche, Mannheim)

Alle weiteren Chemikalien und Lösungen siehe 2.4. Northern Blot bzw. für Gelelektrophorese siehe 2.5.3.

RT-PCR und Agarose-Gelelektrophorese wurden wie **unter 2.5.** beschrieben durchgeführt. Nachdem das Gel gefärbt und fotografiert und kurz in destilliertem Wasser gewaschen wurde, schlossen sich folgende Waschschrte an:

30 min in 0,25 M HCl

kurz in destilliertem Wasser

2x 20 min in Denaturierungslösung

kurz in destilliertem Wasser

2x 20 min in Neutralisierungslösung

10 min in 20x SSC

Die positiv geladene Nylon-Membran wurde kurz in MQ-H₂O angefeuchtet und 10 min in 20x SSC equilibriert. Das Blotten wurde wie für den Northern Blot beschrieben im Turbo Blotter mit 20x SSC als Blotpuffer durchgeführt. Hybridisierung und Detektion wurde wie unter 2.4. (Northern Transfer und Hybridisierung) beschrieben durchgeführt. Allerdings wurde auch eine Detektion mit NBT/BCIP-Farbstoff durchgeführt. In diesem Fall wurde die Membran nach der Antikörperkopplung und den folgenden Waschschritten 2 min in Detektionspuffer und anschließend in 10 ml Detektionspuffer mit 45 µl NBT und 35 µl BCIP gelegt, bis die Färbung der Banden ausreichend war. Die Farbreaktion konnte mit MQ-H₂O abgestoppt werden.

3 ERGEBNISSE

3.1 Probennahme und Aufarbeitung

3.1.1 Probennahme

Zwischen Februar 1999 und Mai 2000 fanden insgesamt 12 Probennahmen statt. Hierbei handelte es sich um die Entnahme von Stichproben. Im Oktober 2000 erfolgte zudem die Erstellung einer Wochenganglinie. Hierbei wurden an 7 aufeinanderfolgenden Tagen (1.10. – 7.10.2000) Tagesmischproben genommen. Parallel erfolgte die Aufzeichnung von Wasserstand und Nierschlagsmenge. Die Daten hierzu, die Probennahmedaten, die weitere Bezeichnung im Text sowie pH-Wert und Temperatur sind in Tabelle 3.1. aufgezeichnet.

Tabelle 3.1: Probennahmestelle, Datum, weitere Bezeichnung im Text, pH-Wert und Temperatur der Wasserprobe sowie Verwendungszweck der Extrakte

| Probennahmestelle & Datum | Bezeichnung | Temperatur, pH | Niederschlag, Wasserstand ¹ |
|---------------------------|-------------|----------------|--|
| Schussen 2.3.99 | Schussen 1 | 5 °C; - | - |
| Schussen 19.4.99 | Schussen 2 | - ; 8,2 | - |
| Schussen 18.6.99 | Schussen 3 | - | - |
| Schussen 24.8.99 | Schussen 4 | 17 °C; 8,3 | - |
| Schussen 30.9.99 | Schussen 5 | 15 °C; 8,3 | - |
| Schussen 3.5.2000 | - | - | - |
| Schussen 1.10.2000 | - | - | 9 L/m ³ / 23 cm |
| Schussen 2.10.2000 | - | - | 4,3 L/m ³ / 30 cm |
| Schussen 3.10.2000 | - | - | 0 L/m ³ / 27 cm |
| Schussen 4.10.2000 | - | - | 0,2 L/m ³ / 24 cm |
| Schussen 5.10.2000 | - | - | 11 L/m ³ / 25 cm |

| | | | |
|------------------------------|------------|------------|------------------------------|
| Schussen 6.10.2000 | - | - | 0 L/m ³ / 45 cm |
| Schussen 7.10.2000 | - | - | 4,5 L/m ³ / 36 cm |
| Schussen Oberzell 24.8.99 | Oberzell | 17 °C; 8,4 | - |
| Kläranlage Langwiese 24.8.99 | Kläranlage | 20 °C; 7,8 | - |
| Seefelder Aach 25.2.99 | SeeAach 1 | 4 °C; - | - |
| Seefelder Aach 3.5.99 | SeeAach 2 | - | - |
| Seefelder Aach 18.6.99 | SeeAach 3 | - | - |
| Seefelder Aach 24.8.99 | SeeAach 4 | 15 °C; 8,2 | - |
| Seefelder Aach 3.5.2000 | - | - | - |

¹: Klimadaten aufgezeichnet durch Kläranlage Langwiese

Die Probennahme erfolgte wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben. Zum Zeitpunkt der Probennahme von Schussen 1 sowie SeeAach 1 herrschte starkes Hochwasser, beide Flüsse waren weit über ihre Ufer getreten und führten viel organisches Material mit sich. Die Probennahmen zu Schussen 2 und SeeAach 2 fanden während des Jahrhunderthochwassers am Bodensee im April und Mai 1999 statt, der Wasserstand beider Flüsse war allerdings nur (noch) leicht erhöht. Alle anderen Probennahmen fanden unter konstanten Bedingungen (Wasserstand, Fließgeschwindigkeit, Sedimentgehalt) statt.

3.1.2 Aufarbeitung und Bestimmung der Wiederfindungsrate

Für die Wasserproben Schussen 2, Schussen 4, Schussen 5 und Kläranlage wurde die Wiederfindungsrate für radioaktiv markiertes Östradiol (³H-E2) nach Aufarbeitung mit Dichlormethan bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.2. abgebildet.

Tabelle 3.2: Wiederfindungsrate ausgewählter Wasserproben für radioaktiv markiertes Östradiol nach Dichlormethanaufarbeitung

| Wasserprobe | Anorganische Phase | Intermediärphase | Organische Phase |
|-------------|--------------------|------------------|------------------|
| Schussen 2 | 19,0 ± 2,9 % | 1,4 ± 1,0 % | 76,5 ± 3,2 % |
| Schussen 4 | 17,2 ± 1,7 % | 0,6 ± 0,4 % | 75,4 ± 3,5 % |
| Schussen 5 | 17,6 ± 1,5 % | 1,6 ± 1,3 % | 71,4 ± 6,8 % |
| Kläranlage | 17,6 ± 1,2 % | 1,0 ± 0,5 % | 74,8 ± 1,6 % |

Alle 4 Proben zeigten untereinander vergleichbare Werte: ca. 75 % des $^3\text{H-E}_2$ wurden in die organische Phase extrahiert, ca. 18 % verblieben in der anorganischen (Wasser-) Phase. In der Intermediärphase befand sich ca. 1 % des zugefügten $^3\text{H-E}_2$. Die verbliebene Radioaktivität im Filter wurde nicht bestimmt.

3.1.2.1 Vergleich der $^3\text{H-E}_2$ -Wiederfindungsrate von Hexan-Aufarbeitung und Dichlormethan-Aufarbeitung

Um die Wiederfindungsrate der beiden Flüssig/flüssig-Extraktionen zu vergleichen, wurde eine nicht in Tabelle 3.1. aufgeführte Wasserprobe der Seefelder Aach vom 30.8.99 verwendet. Nach Aufarbeitung mit Dichlormethan ergab sich für die organische Phase eine $^3\text{H-E}_2$ -Wiederfindungsrate von $72 \pm 7,5$ %. Die anorganische Phase enthielt $17,8 \pm 0,8$ %, die Intermediärphase 0,1 %, im Filter fanden sich $2 \pm 0,5$ % $^3\text{H-E}_2$. Die Aufarbeitung mit Hexan ergab ein völlig anderes Ergebnis. Nur $4,4 \pm 0,1$ % des zugegebenen $^3\text{H-E}_2$ fanden sich in der organischen Phase. Die Intermediärphase enthielt $0,3 \pm 0,1$ %. Der weitaus größte Teil jedoch fand sich in der anorganischen Phase mit $96,6 \pm 1,8$ %.

Zusammenfassung

Die Flüssig/flüssig-Extraktion mit Hexan ist für die Aufarbeitung von Flusswasser im Falle des $^3\text{H-Östradiols}$ nicht geeignet, nur ein kleiner Teil (4,4 %) konnte in die organische Phase überführt werden.

Die Extraktion mit Dichlormethan ist weit besser geeignet. $\frac{3}{4}$ des zugegebenen $^3\text{H-E}_2$ finden sich in der organischen Phase wieder. Diese Wiederfindungsrate ist unabhängig von der Matrix des Flusswassers, sowohl für die Seefelder Aach, die Schussen als auch die Kläranlagenprobe wurde ein Wert von ca. 75 % bestimmt.

3.2 Nachweis von endokrin aktiven Substanzen in Flusswasser-Extrakten sowie reinem Flusswasser mittels GC-MS

3.2.1 Analyse der Flusswasser-Extrakte

Eine GC-MS-Analyse wurde für 5 Flusswasserextrakte durchgeführt: Kläranlage, SeeAach 2, Schussen 1, Schussen 2 und Schussen 4 (siehe Tabelle 3.1.). Alle Extrakte wurden durch Flüssig/flüssig-Extraktion mit Dichlormethan aufgearbeitet. Für diese Extrakte (außer SeeAach 2) wurde außerdem die Wiederfindung von 17β -Östradiol über $^3\text{H-Östradiol}$ bestimmt (Tabelle 3.2.). Die gleichen Extrakte wurden zusätzlich in verschiedenen Testsystemen eingesetzt. Dies sollte erstens einen Vergleich zwischen den biologischen Testsystemen und der Analytik möglich machen. Zweitens sollten Substanzen identifiziert werden, die für eine Wirkung im biologischen Assay verantwortlich sein könnten. Hierüber können der Effekt eines charakterisierten komplexen Gemisches auf die biologischen Systeme getestet, Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen aufgestellt sowie die beiden Testsysteme auf ihre Selektivität und Sensitivität verglichen werden.

Ergebnis :

Den geringsten Gehalt an endokrin aktiven Substanzen wies der Extrakt SeeAach 2 auf. Auffallend hoch war der Gehalt an 17β -Östradiol im Extrakt Schussen 2. Probe Schussen 1 hatte eine vergleichsweise hohe Konzentration von Östron sowie Bisphenol A, Probe Kläranlage zeigte einen hohen Gehalt an 4-t-Octylphenol. 17α -

Ethinylöstradiol konnte in keinem der untersuchten Extrakte nachgewiesen werden. Tabelle 3.3. zeigt das Ergebnis dieser GC-MS – Analyse.

Tabelle 3.3: GC-MS-Analyse der Flusswasser-Extrakte. Alle Konzentrationen sind in ng / l angegeben

| Substanz | Schussen 1 | Schussen 2 | Schussen 4 | Kläranlage | SeeAach 2 |
|------------------------------------|------------|------------|------------|------------|-----------|
| 17 β -Östradiol | 4,0 | 31,8 | 1,5 | 0,9 | 0,7 |
| Östron | 9,1 | 1,0 | 0,6 | n.a. | < NG |
| 17 α -Ethinyl- Östradiol | < NG | < NG | < NG | < NG | < NG |
| 4-Nonylphenol | 5,4 | 11,8 | 10,6 | 25,1 | 2,9 |
| 4-Octylphenol | 27,1 | 98,4 | 38,8 | 397,0 | 4,0 |
| 4-Nonylphenol- diethoxylat | 65,8 | 24,6 | 24,8 | 41,9 | 6,0 |
| Bisphenol A | 189,9 | 124,7 | 80,1 | 66,2 | 2,8 |
| Genistein | < BG | 2,9 | 6,3 | 0,7 | < BG |
| β -Sitosterol | 231,2 | 160,7 | 219,8 | 122,4 | 71,4 |

(n.a. Messung nicht auswertbar; < BG: kleiner Bestimmungsgrenze < NG: kleiner Nachweisgrenze)

3.2.2 Analyse der Flusswasserproben

3.2.2.1 Östrogene und endokrin aktive Substanzen im Schussenwasser

Im Gegensatz zur Analyse von Flusswasserextrakten wurde mit dieser Methode der Gehalt an endokrin aktiven Substanzen direkt im Flusswasser analysiert. Hierzu war ein anderes Extraktionsverfahren notwendig (Festphasenextraktion, Kapitel 2.2.2.3).

Tabelle 3.4: Östrogene und endokrin aktive Substanzen im Flusswasser der Schussen. Die Genauigkeit der Konzentrationsangaben beträgt $\pm 10\%$.

| | 1.10. 2000 | 2.10. 2000 | 3.10. 2000 | 4.10. 2000 | 5.10. 2000 | 6.10. 2000 | 7.10. 2000 | 30.9.¹ 1999 |
|--|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------------|
| 17β-Östradiol | 1,1 ng/l | 0,6 ng/l | 1,1 ng/l | 1,4 ng/l | 0,9 ng/l | 1,2 ng/l | 1 ng/l | 0,6 ng/l |
| Östron | 1,6 ng/l | 2,8 ng/l | n.a. | 1,4 ng/l | n.a. | n.a. | 1,3 ng/l | 1,6 ng/l |
| 17α- Ethinylöstradiol | 5 ng/l | 2,2 ng/l | 2,3 ng/l | < BG | 1,3 ng/l | 2,2 ng/l | 1,2 ng/l | < BG |
| Bisphenol A | 0,41 μ g/l | n.a. | n.a. | 0,04 μ g/l | 0,07 μ g/l | 0,12 μ g/l | 0,03 μ g/l | 0,04 μ g/l |
| β-Sitosterol | 1,76 μ g/l | 0,49 μ g/l | 0,96 μ g/l | 0,78 μ g/l | 0,88 μ g/l | n.a. | 0,68 μ g/l | 1,63 μ g/l |
| 4-Nonylphenoxy- essigsäure | 1,32 μ g/l | n.a. | 0,27 μ g/l | 0,23 μ g/l | n.a. | 0,16 μ g/l | 1,57 μ g/l | 0,60 μ g/l |

n.a.: nicht auswertbar; < BG: kleiner Bestimmungsgrenze; < NG: kleiner Nachweisgrenze

¹: Im weiteren Verlauf als Probe `Schussen 5` bezeichnet

Als Nachweisgrenze wurde ein Signal / Rausch - Verhältnis von 3 / 1 definiert, als Bestimmungsgrenze ein Verhältnis von 6 / 1.

Das synthetische Östrogen Mestranol wurde ebenfalls gemessen, in keiner der Proben gelang jedoch der Nachweis (< NG). Genistein wurde in 2 Proben nachgewiesen, die Werte lagen allerdings unter der Bestimmungsgrenze (< BG). In Probe Schussen 5 wurden darüber hinaus noch weitere endokrin aktive Substanzen bestimmt. Hierbei handelt es sich um 4-t-Nonylphenol (9,0 ng/l), 4-t-Oktylphenol (8,5 ng/l), sowie Di-n-butylphthalat (0,25 μ g/l).

3.2.2.2 Pharmaka im Schussenwasser

Tabelle 3.5: Neutrale, saure und basische Arzneimittel in der Schussen. (Konzentrationen in ng/l)

| | 1.10.00 | 2.10.00 | 3.10.00 | 4.10.00 | 5.10.00 | 6.10.00 | 7.10.00 |
|------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Bezafibrat | 44 | 45 | 56 | 27 | 42 | 42 | 42 |
| Ketoprofen | < BG |
| Naproxen | < BG | 16 | < BG |
| Ibuprofen | < BG | 18 | < BG |
| Indometacin | < BG | 19 | < BG |
| Piroxicam | < NG |
| Diclofenac | 85 | 104 | 81 | 41 | 104 | 137 | 49 |
| Clofibrinsäure | < BG | 24 | < BG |
| Cyclophosphamid | < NG |
| Carbamazepin | 272 | 180 | 198 | 101 | 153 | 149 | 134 |
| Diazepam | < BG |
| Dimethylaminophenazon | < BG |
| Phenazon | 27 | < BG |
| Diethyltoluolamid | 30 | 24 | < BG | 38 | 37 | 45 | 48 |
| Dihydrocodein | < NG |
| Propiphenazon | 23 | 26 | 24 | 21 | 24 | 27 | 21 |
| Ifosfamid | < NG |
| Primidon | < BG |
| Pentoxifyllin | < BG | < BG | < BG | 35 | 35 | < BG | < BG |

< BG: kleiner Bestimmungsgrenze; < NG: kleiner Nachweisgrenze

Die Proben Seefelder Aach 3.5.2000 sowie Schussen 3.5.2000 wurden nicht analysiert. Die Probe Schussen 30.9.1999 wurde lediglich auf Östrogene und endokrin aktive Substanzen untersucht.

3.3 *In vivo* Methoden zum Nachweis von Embryotoxizität von Flusswasserproben

Die folgenden Embryo-Toxizitäts-Assays FETAX und DRETA sollten eine Aussage über die teratogene Wirkung der Flusswasserproben auf die Embryonen einer Fisch- und einer Amphibien-Spezies möglich machen. Mit Hilfe der Ergebnisse sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen östrogenen Aktivität und toxischer Wirkung während der Embryonalentwicklung aufgezeigt bzw. beide Effekte voneinander abgegrenzt werden.

3.3.1 Daphnien-Immobilisationsassay

In diesem Test wird die akute Toxizität von Wasserproben auf die Mobilität von Daphnien bestimmt. Getestet wurden ausschließlich die 7 Wasserproben der Wochenganglinie (Schussen 1.10. – 7.10.2000). Wie sich herausstellte, hatte keine dieser Wasserproben einen Effekt auf die Schwimffähigkeit der Daphnien. Da also für keine der Proben eine Immobilisierung auftrat, wurde auf eine Abbildung verzichtet.

3.3.2 FETAX (Frog Embryo Teratogenicity Assay *Xenopus*)

Im FETAX wurden verschiedene Flusswasserproben aus der Schussen und der Seefelder Aach getestet. Für alle Proben wurde die Sterbe- und Malformationsrate bestimmt. Die Länge der Embryonen wurde ermittelt, um eine mögliche Wachstums-Inhibition durch die Wasserproben erkennen zu können. Als Ergebnisse angegeben sind die Mittelwerte aus drei Versuchen, sowie der Standardfehler des Mittelwertes der drei Versuche (standard error of means).

Tabelle 3.6: Mortalität, Malformationen und Längenwachstum bei *Xenopus*-Embryonen nach Exposition mit Wasserproben im 96 h-Akuttest.

| | Mortalität [%] | Malformationen [%] | Länge [%] |
|------------------|----------------|--------------------|--------------|
| Kontrolle | 5,33 ± 2,31 | 10,39 ± 5,94 | 100 ± 0 |
| Seefelder Aach 1 | 7,33 ± 8,08 | 12,30 ± 9,17 | 96,20 ± 1,67 |
| Seefelder Aach 2 | 4,00 ± 4,00 | 13,83 ± 4,29 | 94,79 ± 0,70 |
| Schussen 2 | 6,00 ± 8,72 | 15,92 ± 10,25 | 92,58 ± 4,16 |
| Schussen 3 | 6,00 ± 10,39 | 4,86 ± 4,26 | 98,08 ± 1,21 |

n.b.: nicht bestimmt

Tabelle 3.7: Mortalität, Malformationen und Längenwachstum bei *Xenopus*-Embryonen nach Exposition mit Wasserproben im 96 h-Akuttest.

| | Mortalität [%] | Malformationen [%] | Länge [%] |
|----------------------|----------------|--------------------|--------------|
| Kontrolle | 6,67 ± 4,51 | 17,78 ± 5,87 | 100 ± 0 |
| Seefelder Aach 1 | 4 ± 5,29 | 14,75 ± 5,62 | 96,72 ± 2,54 |
| Seefelder Aach 4 | 6,67 ± 11,55 | 13,21 ± 4,69 | 95,54 ± 1,45 |
| Schussen 2 | 8 ± 4 | 20,72 ± 10,93 | 94,06 ± 1,54 |
| Schussen 3 | 4 ± 2 | 16,18 ± 5,35 | 97,09 ± 2,23 |
| Schussen 4 | 5,33 ± 3,06 | 18,20 ± 8,27 | 97,34 ± 2,08 |
| Schussen 5 | 2 ± 2 | 19,28 ± 7,91 | 96,95 ± 1,32 |
| Kläranlage Langwiese | 7,5 ± 7,26 | 15,48 ± 7,43 | 97,43 ± 0,69 |

n.b.: nicht bestimmt

Für keine der Proben wurde ein signifikanter Effekt auf Mortalität der Embryonen, auf die Malformationsrate oder auf das Längenwachstum gefunden.

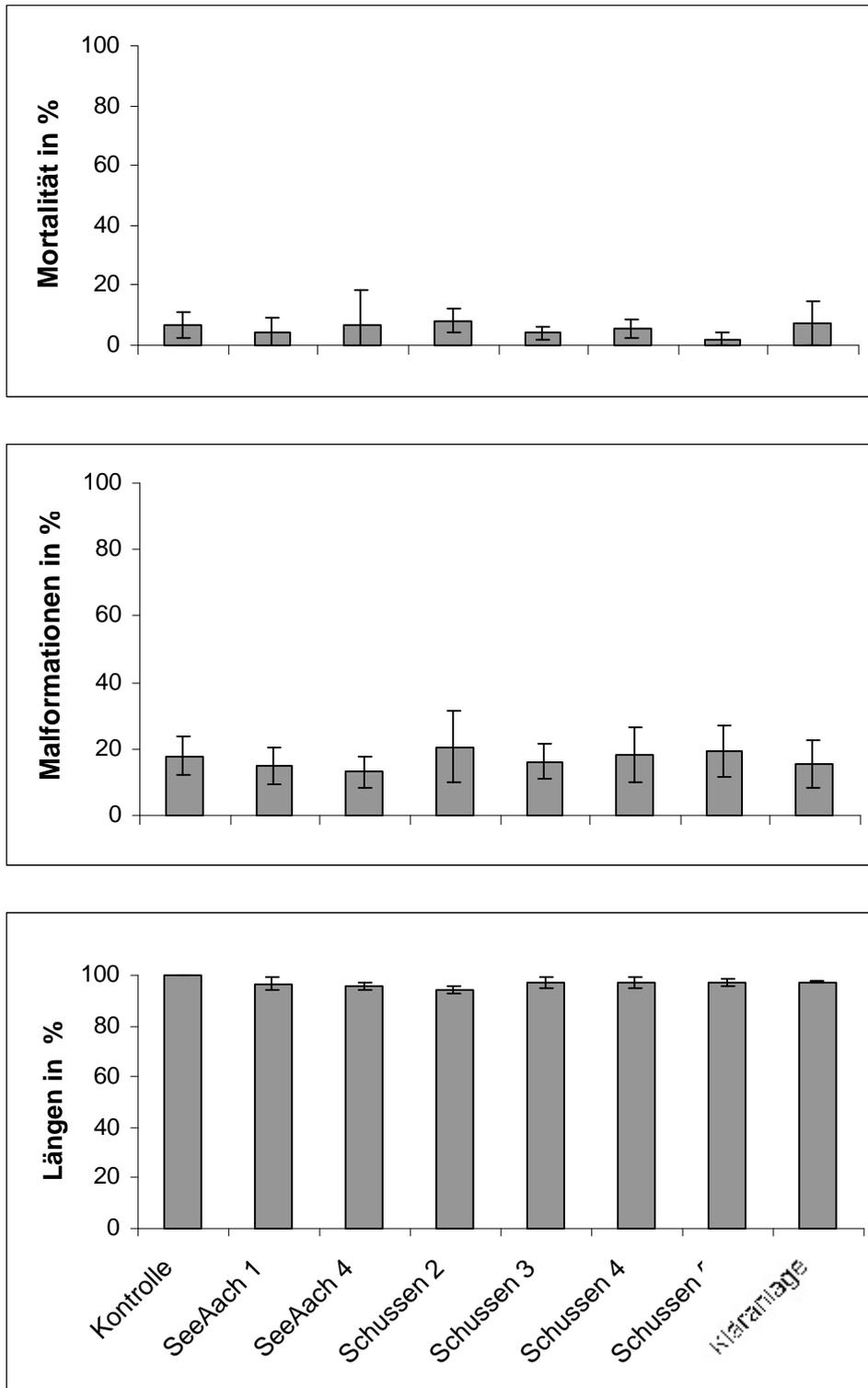


Abb. 3.1: Mortalität, Malformationen und Längenwachstum bei *Xenopus*-Embryonen nach Exposition mit Wasserproben im 96 h-Akutttest.

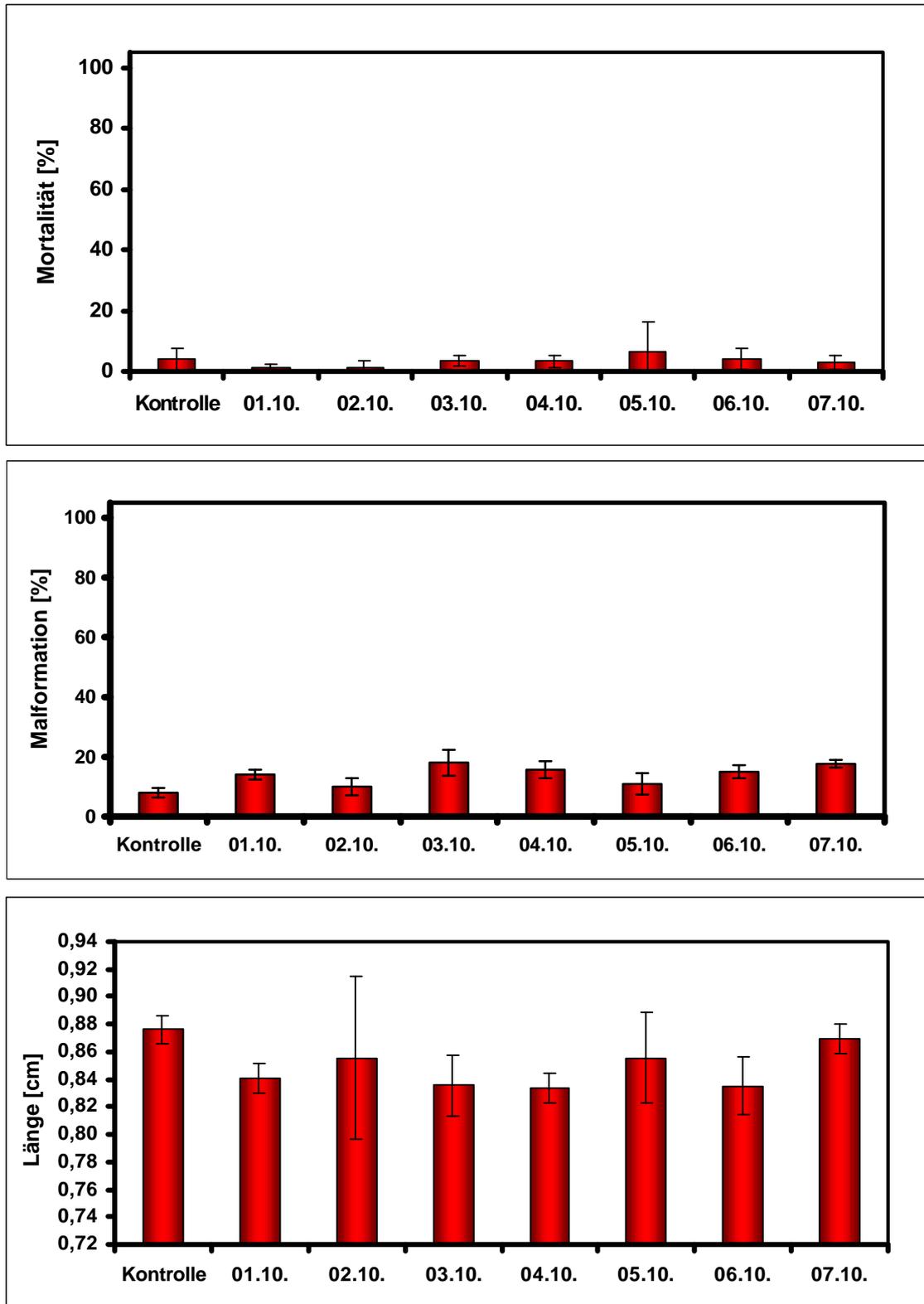


Abb. 3.2 Mortalität, Malformationen und Längenwachstum bei Xenopus-Embryonen nach Exposition mit Wasserproben der Wochenganglinie im 96 h-Akuttest.

Auch die Wasserproben der Schussen-Wochenganglinie zeigten keine embryotoxischen Effekte auf die Entwicklung der Frosch-Embryonen.

3.3.3 DRETA (*Danio rerio* Embryo Teratogenicity Assay)

Im DRETA wurden die Mortalität und Malformationen bestimmt. Um eine mögliche Wachstums-Inhibition durch die Wasserproben erkennen zu können, wurde die Länge der Embryonen ermittelt. Als Ergebnisse angegeben sind die Mittelwerte aus drei Versuchen sowie der Standardfehler des Mittelwertes der drei Versuche (standard error of means).

Tabelle 3.8: Mortalität, Malformationen und Längenwachstum bei Zebrafisch-Embryonen nach Exposition mit Wasserproben im 96 h- Akuttest.

| | Mortalität [%] | Malformationen [%] | Länge [%] |
|------------------|----------------|--------------------|---------------|
| Kontrolle | 2,22 ± 1,923 | 2,22 ± 1,923 | 100 ± 0 |
| Seefelder Aach 1 | 2,3 ± 1,995 | 5,61 ± 1,98 | 99,22 ± 0,19 |
| Seefelder Aach 2 | 2,22 ± 1,92 | 4,44 ± 1,93 | 97,84 ± 0,38 |
| Schussen 2 | 3,33 ± 3,33 | 0,00 ± 0,00 | 100,31 ± 1,07 |
| Schussen 3 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 101,32 ± 0,45 |

Für keine der Proben wurde ein signifikanter Effekt auf Mortalität der Embryonen, auf die Malformationsrate oder auf das Längenwachstum gefunden.

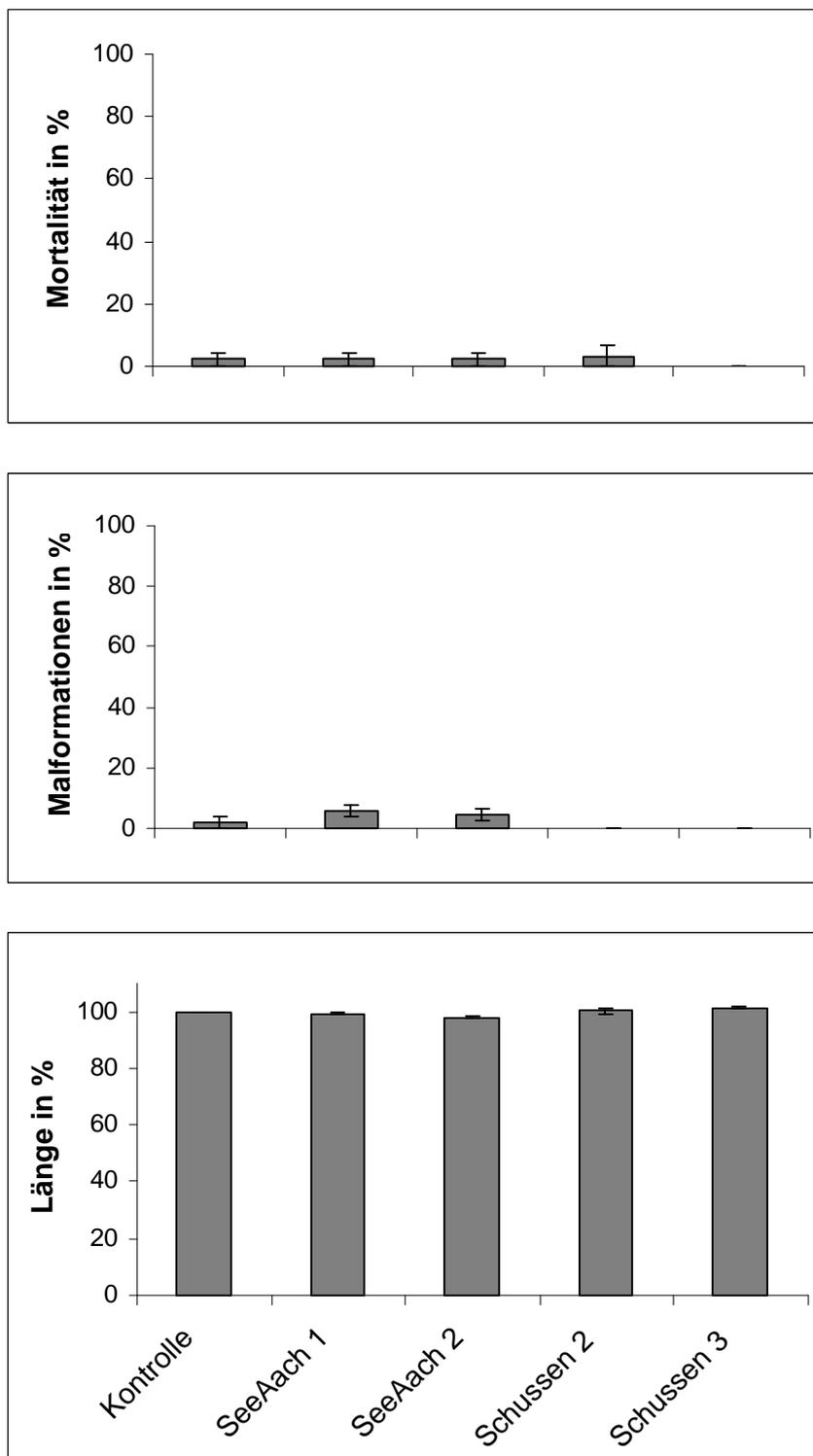


Abb. 3.3: Mortalität, Malformationen und Längenwachstum bei Zebrafisch-Embryonen nach Exposition mit Wasserproben im 96 h-Akutttest.

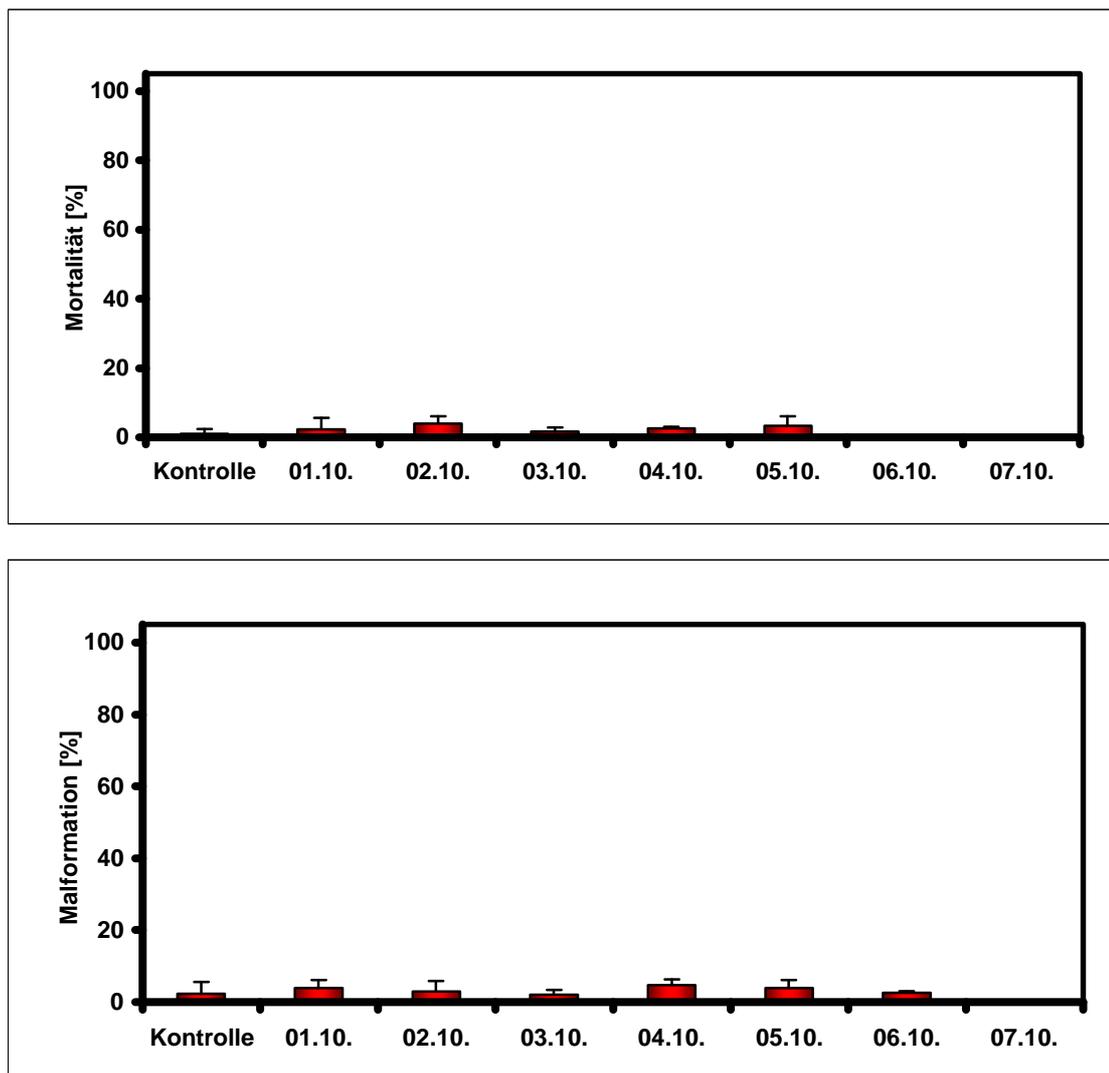


Abb. 3.4: Mortalität, Malformationen und Längenwachstum bei Zebrafisch-Embryonen nach Exposition mit Wasserproben der Wochenganglinie Schussen im 96 h-Akuttest.

Die Wasserproben der Schussen-Wochenganglinie zeigten keine embryotoxischen Effekte in Bezug auf Mortalitäts- und Malformationsrate der Fisch-Embryonen.

3.4 Competitive Estrogen Receptor Binding Assay (CERBA)

3.4.1 Gewinnung und Charakterisierung des Rezeptors

Für alle Östrogenrezeptor-Bindungsexperimente waren insgesamt drei Zytosolpräparationen nötig. Das gewonnene Zytosol wurde nach spätestens zwei Monaten aufgebraucht, bis dahin war kein Verlust an ^3H -Östradiol-Bindung zu erkennen. Jeweils nach der Zytosolpräparation wurden die Dissoziationskonstante K_d sowie die maximale Zahl an Bindungsstellen B_{max} für den Östrogenrezeptor mittels eines Sättigungs-Assays bestimmt.

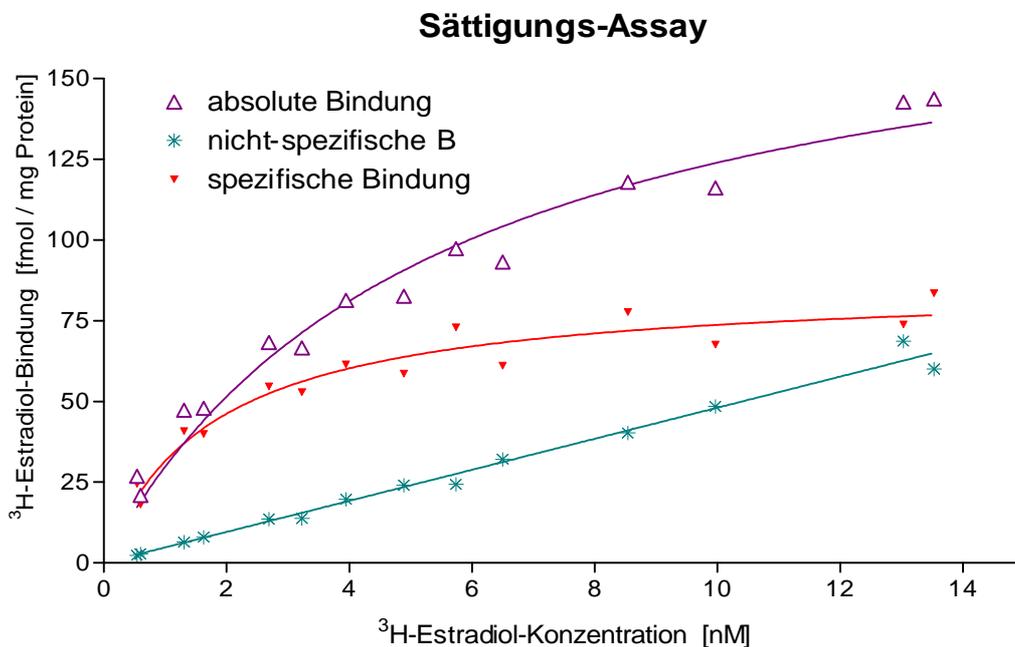


Abb. 3.5: Sättigungs-Assay der ersten Zytosol-Präparation; die Bindungskurven wurden durch nicht-lineare Regression ermittelt

Scatchard Plot

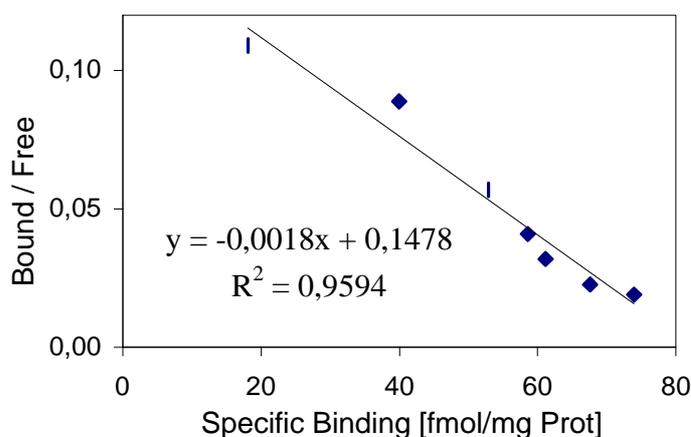


Abb. 3.6: Scatchard Plot der ersten Zytosol-Präparation. Das Ergebnis zeigt eine der drei Einzelmessungen

Tabelle 3.9: Dissoziationskonstante K_d und Anzahl der Bindungsstellen B_{max} .

| | | 1. Präparation | 2. Präparation | 3. Präparation |
|---------------------------------|------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Nicht-lineare Regression | Kd | $1,75 \pm 0,30$ nM | $2,57 \pm 0,47$ nM | $2,96 \pm 0,35$ nM |
| | Bmax | $86,7 \pm 4,1$ fmol/mg | $71,3 \pm 4,3$ fmol/mg | $65,4 \pm 2,9$ fmol/mg |
| Lineare Regression | Kd | $0,85 \pm 0,15$ nM | $0,83 \pm 0,16$ nM | $1,37 \pm 0,05$ nM |
| | Bmax | $86,5 \pm 3,4$ fmol / mg | $65,8 \pm 5,8$ fmol / mg | $65,9 \pm 10,5$ fmol/mg |

Die maximale Anzahl der Bindungsstellen unterscheidet sich kaum zwischen den beiden Auswertungsmöglichkeiten. Der K_d -Wert hingegen ist für die nicht-lineare Regression durchgehend um einen Faktor 2 – 3 höher als der K_d -Wert für die lineare Regression.

Da in der Literatur (z.B. Campbell et al. 1994; Nimrod und Benson 1997) K_d und B_{max} traditionell meist durch Scatchard-Plot ermittelt werden, wurde für alle weiteren Messungen K_d - und B_{max} -Wert der linearen Regression als Grundlage verwendet.

3.4.2 Bindung von Einzelsubstanzen an den Östrogenrezeptor

Das Ziel dieser Messungen war es, die Interaktion von Einzelsubstanzen an den Östrogenrezeptor zu charakterisieren. Hierbei sollten die Fragen geklärt werden, ob Substanzen an den Rezeptor binden können und mit welcher Affinität sie dies tun.

Untersucht wurde die Bindung der Östrogene 17β -Östradiol, Östron, Östriol und 17α -Ethinylöstradiol, der Phytohormone β -Sitosterol und Genistein, der Industriechemikalien Nonylphenol und Bisphenol A sowie der Pharmaka Diclofenac, Naproxen, Carbamazepin, Clofibrinsäure und Bezafibrat. Für alle Substanzen außer den Pharmaka wurde eine Bindung an den Östrogenrezeptor schon vorher beschrieben (siehe Diskussion). Lediglich die Pharmaka wurden vorher nicht auf Rezeptorbindung untersucht, Ergebnisse aus einer an dieser Arbeitsgruppe durchgeführten Literaturrecherche (Dietrich et al. 1998) deuten jedoch auf mögliche endokrine Effekte hin.

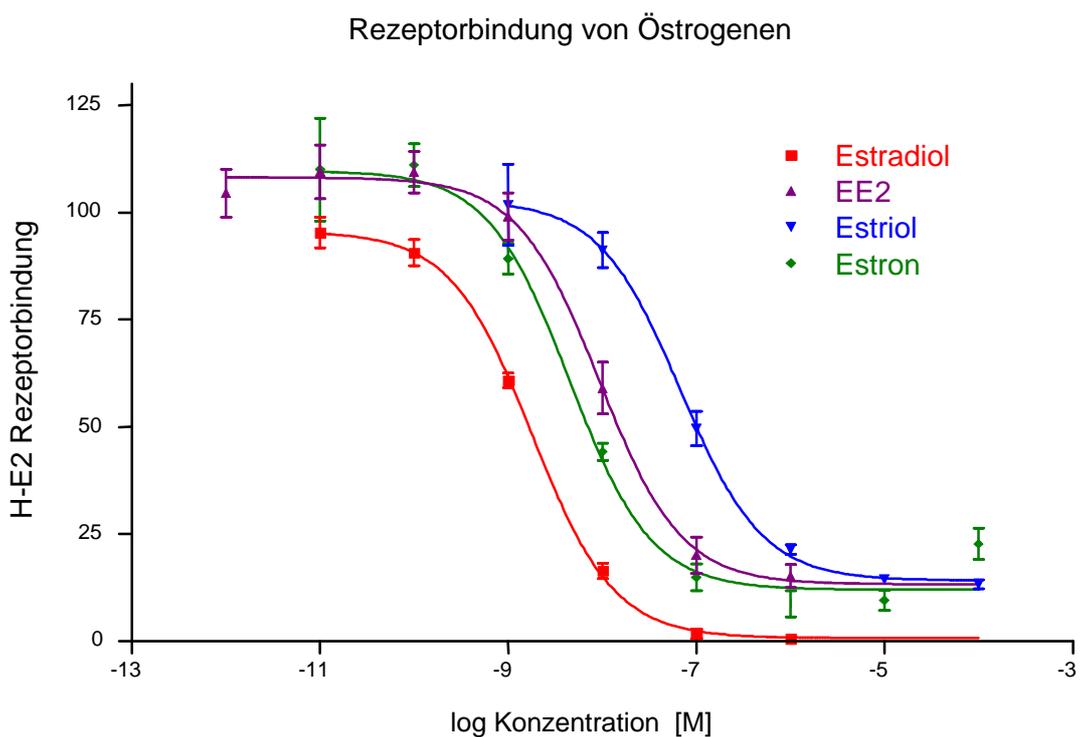


Abb. 3.7: Östrogenrezeptor-Bindung von Östrogenen. (EE2 : 17α -Ethinylöstradiol)

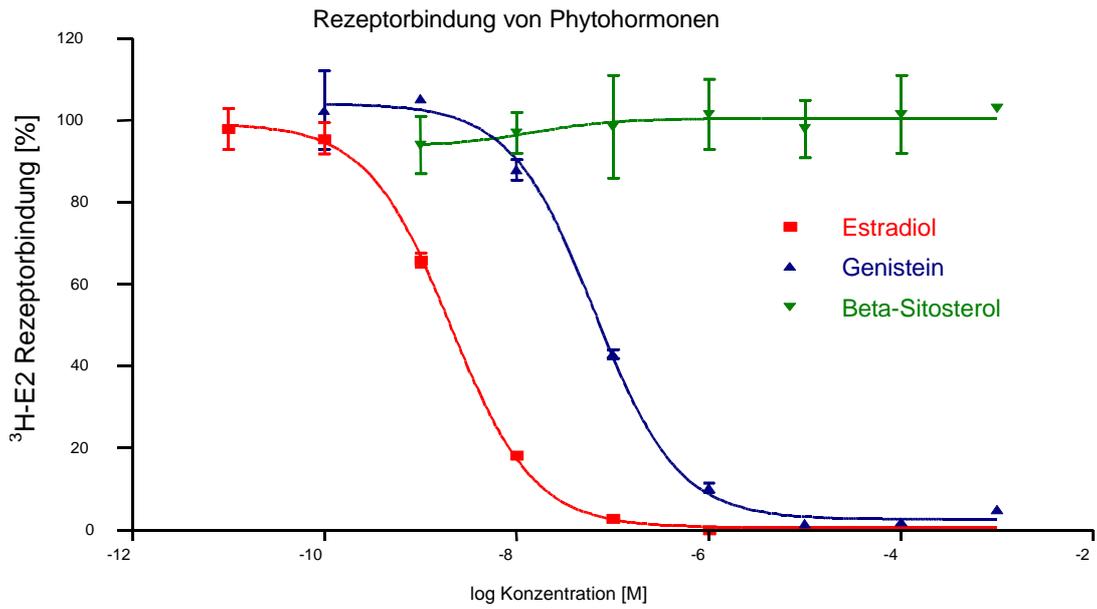


Abb. 3.8: Östrogenrezeptor-Bindung von Phytohormonen. Die Abbildung zeigt das Ergebnis für synthetisch hergestelltes β -Sitosterol

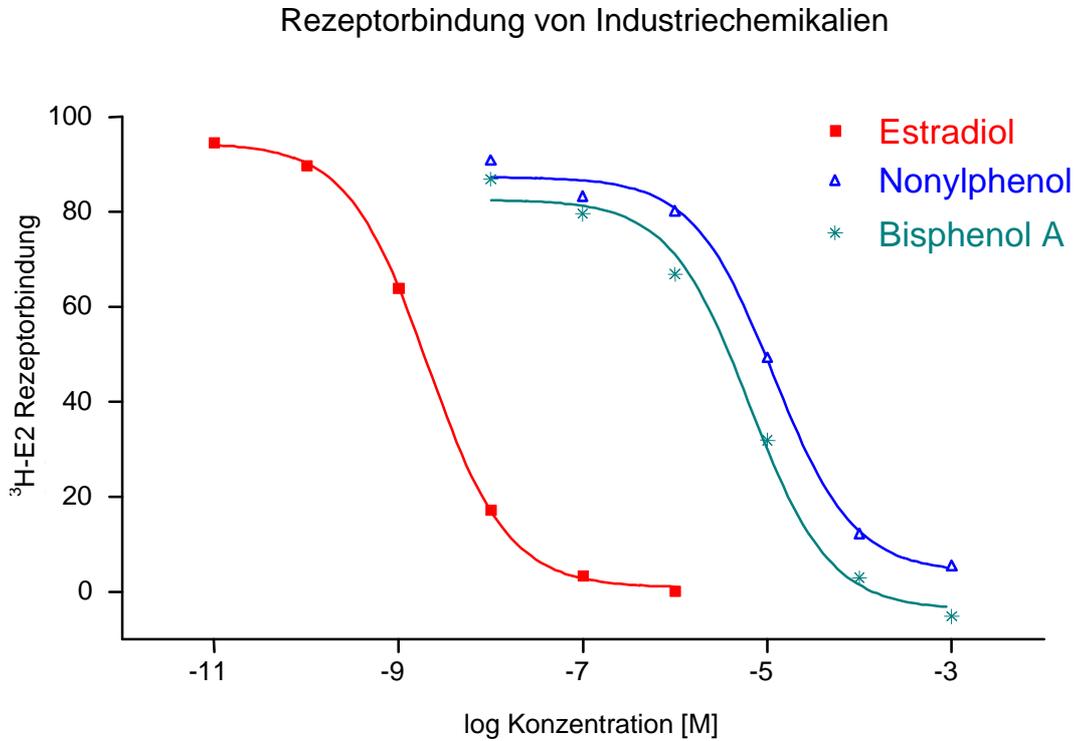


Abb. 3.9: Östrogenrezeptor-Bindung von Bisphenol A und Nonylphenol. Es wurde nur eine Messung durchgeführt, frühere Messungen innerhalb des Labors ergaben jedoch gleiche Werte

Rezeptorbindung ausgewählter Pharmaka

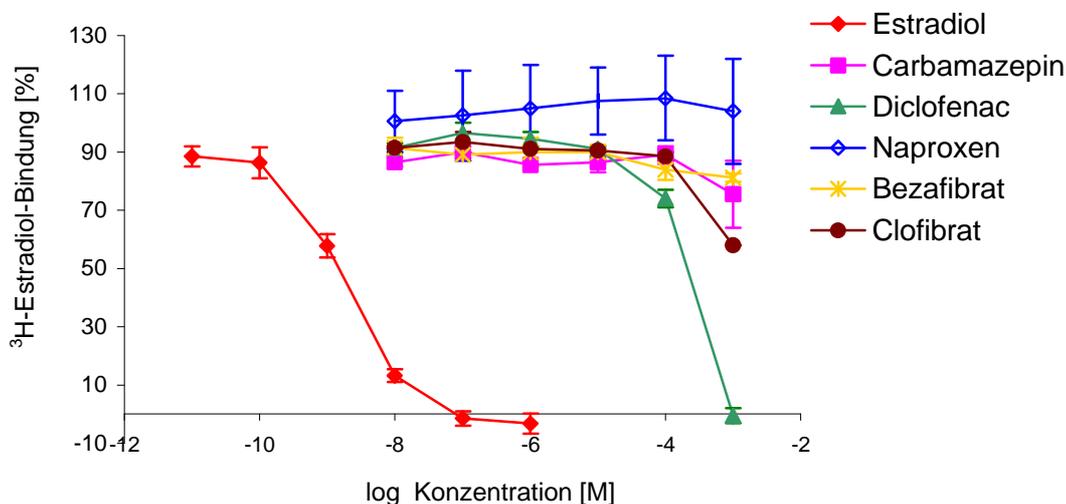


Abb. 3.10: Östrogenrezeptor-Bindung ausgewählter Pharmaka

Zusammenfassung :

Die untersuchten Östrogene besitzen die höchste Affinität für den Östrogenrezeptor. Östradiol als physiologischer Ligand bindet hierbei am Besten, die Affinität von Östriol ist etwa 100-fach kleiner. Das Phytohormon Genistein bindet mit etwa der gleichen Affinität wie das Östrogen Östriol. Das zweite Phytohormon β -Sitosterol (synthetisch) bindet nicht an den Östrogenrezeptor. In einem nicht abgebildeten Experiment wurde außerdem natürliches aus Sojabohnen gewonnenes β -Sitosterol in einer Konzentration von 10^{-4} M eingesetzt, es zeigte sich aber ebenfalls keine Bindung an den Rezeptor.

Die Industriechemikalien Nonylphenol und Bisphenol A binden mit ca. 10.000-fach geringerer Affinität als 17β -Östradiol an den Östrogenrezeptor. Bisphenol A ist hierbei der etwas stärkere Ligand als Nonylphenol. Von den untersuchten Pharmaka zeigt nur Diclofenac eine Bindung an den Rezeptor. Diese tritt allerdings erst ab der hohen Konzentration von 10^{-5} M auf. Bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 10^{-3} M kann Diclofenac das radioaktiv markierte 17β -Östradiol vollständig vom Rezeptor verdrängen. In nicht abgebildeten Versuchen konnte mit zusätzlichen Diclofenac-Konzentrationen von $5 \cdot 10^{-4}$ M und $2 \cdot 10^{-4}$ M eine klare Konzentrations-Wirkungsbeziehung gezeigt werden, die Bindung an den Rezeptor nahm mit steigender Konzentration Diclofenac zu. Hiermit konnten mögliche unspezifische Salzeffekte durch die hohen Konzentrationen ausgeschlossen werden. Die Pharmaka Carbamazepin, Clofibrinsäure und Bezafibrat zeigen bei der höchsten eingesetzten Konzentration von

10^{-3} M eine leichte Bindung an den Rezeptor. Diese ist mit maximal 40 % Verdrängung von ^3H -Östradiol allerdings nur schwach ausgeprägt und evtl. auf unspezifische Effekte durch zu hohe Konzentrationen zurückzuführen.

Tabelle 3 .10: Östrogenrezeptor-Bindung der Einzelsubstanzen : IC_{50} - Werte mit 95 % Konfidenzintervall

| Substanz | IC_{50} -Wert | 95 % Konfidenzintervall |
|-------------------------------|------------------------|---|
| 17 β -Östradiol | 1,79 nM | 1,42 nM – 2,26 nM |
| Östron | 4,46 nM | 3,05 nM – 6,53 nM |
| 17 α -Ethinylöstradiol | 9,26 nM | 5,55 nM – 15,4 nM |
| Östriol | 67,5 nM | 41,4 nM – 110,1 nM |
| Genistein | 64,1 nM | 50,8 nM – 80,8 nM |
| Bisphenol A | 6,45 μM | 3,12 μM – 13,3 μM |
| Nonylphenol | 11,6 μM | 6,81 μM – 19,9 μM |
| Diclofenac | 1,22 mM | 0,61 mM – 2,42 mM |

3.4.3 Bindung ausgewählter Gemische an den Östrogenrezeptor

Kapitel 3.4.2 beschäftigt sich mit der Bindung einiger ausgewählter Einzelsubstanzen an den Östrogenrezeptor. Das nun folgende Kapitel soll die Frage klären, wie diese Substanzen sich im Gemisch verhalten. Denkbar wäre z.B. eine additive Verstärkung der jeweiligen Einzelbindungen oder eine gegenseitige Hemmung der Einzelbindungen. Möglich wären aber auch synergistische Effekte, d.h. eine um ein Vielfaches der Einzelbindungen gesteigerte Bindung. Um diese Frage zu klären, wurden in einem Fall verschiedene Östrogene in ansteigender Konzentration auf ihre Rezeptorbindung untersucht, im zweiten Fall wurde zu einem bzw. zwei Östrogenen in ansteigender Konzentration eine Substanz (Diclofenac bzw. Nonylphenol) in fester Konzentration von 10^{-6} M zugegeben.

Diclofenac wurde gewählt, da in Zellkultur-Versuchen mit Forellen-Hepatocyten nach Zugabe von 10 bzw. 100 nM 17 β -Östradiol zusammen mit 100 μ M Diclofenac eine stärkere Induktion von Östrogenrezeptor-mRNA und Vitellogenin-mRNA auftrat als mit 17 β -Östradiol allein. Diclofenac allein zeigte bei 100 μ M keinen Effekt in der Zellkultur. Die in den Bindungs-Experimenten eingesetzte Konzentration von 10⁻⁶ M würde als Einzelsubstanz ebenfalls keine Bindung zeigen, diese beginnt erst ab 10⁻⁵ M. Mit den folgenden Experimenten sollte deshalb geklärt werden, ob die verstärkte Induktion der mRNA durch eine verstärkte Bindung am Rezeptor ausgelöst wurde. Nonylphenol zeigt im CERBA bei einer Konzentration von 10⁻⁶ M bereits eine schwache Bindung. Im Gemisch mit 17 β -Östradiol soll geklärt werden, ob die Bindung des Östradiols durch das zugegebene Nonylphenol beeinflusst wird.

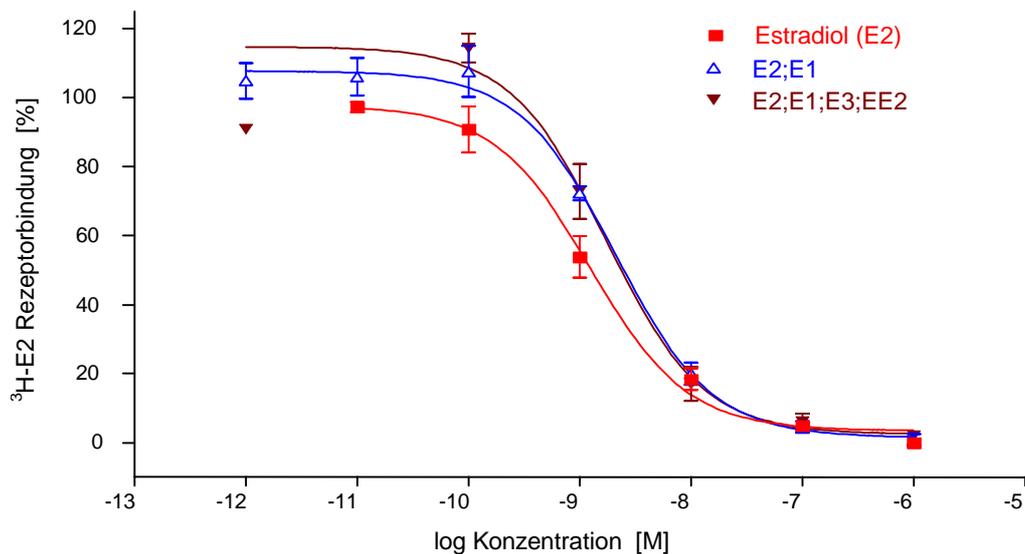


Abb. 3.11: Östrogenrezeptor-Bindung von Östrogen-Gemischen : Östradiol (E2), Östron (E1), Östriol (E3) und Ethinylöstradiol (EE2) werden in jeweils gleicher Konzentration von 10⁻¹² M – 10⁻⁶ M eingesetzt. Die Konzentration entspricht der Endkonzentration im Reaktionsgefäß.

Ausgehend von den jeweiligen Einzelbindungen müsste zumindest Östron bei additiver Wirkung die Bindung des Liganden mit höchster Affinität, 17 β -Östradiol, noch um ca. 20 – 30 % bei jeder Konzentration verstärken. Im zweiten Gemisch sind neben Östron noch Östriol und 17 α -Ethinylöstradiol zum 17 β -Östradiol zugegeben. Diese beiden Substanzen besitzen eine geringere Affinität als Östradiol bzw. Östron, würden also erst ab Konzentrationen von 10⁻⁸ M die Rezeptorbindung leicht erhöhen.

Die beiden untersuchten Gemische zeigen keine synergistischen und keine additiven Effekte. Die Bindung des Gemischs ist niemals höher als die Bindung des zugegebenen Stoffes mit höchster Affinität, 17β -Östradiol. Im Gegenteil ist die Bindung der beiden Gemische leicht gegenüber der Bindung von 17β -Östradiol vermindert. Diese maximal um 10 % kleinere Bindung ließe sich zwar durch hemmende Effekte der übrigen Östrogene auf nicht radioaktive Östradiol erklären, wahrscheinlicher sind aber messbedingte Schwankungen der Bindung.

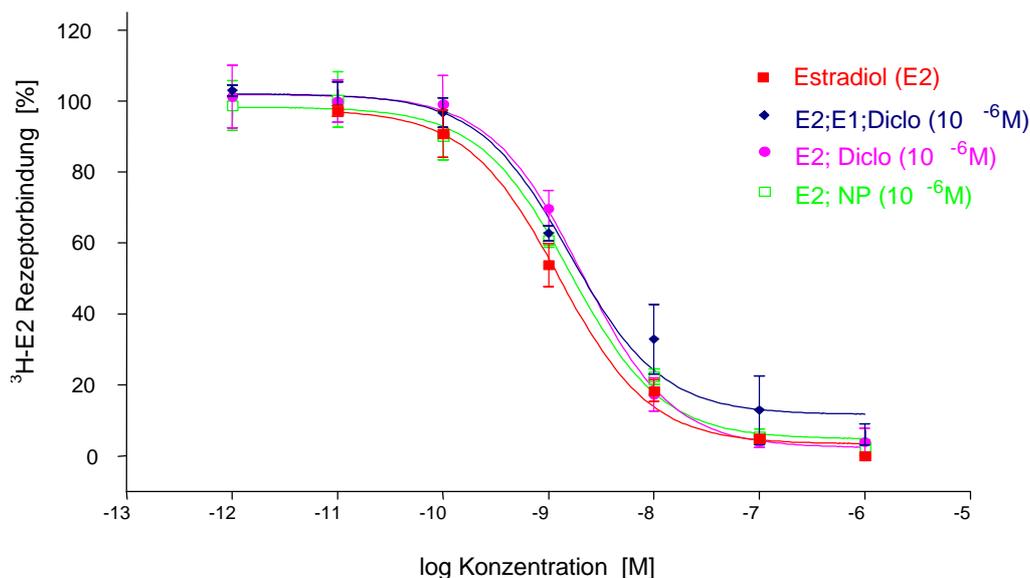


Abb. 3.12: Östrogenrezeptor-Bindung von Gemischen. Diclofenac bzw. Nonylphenol wurden in fester Konzentration von jeweils 10^{-6} M zugegeben. Die Konzentration der zugegebenen Östrogene stieg von 10^{-12} M bis 10^{-6} M

Ebenso wie die reinen Östrogen-Gemische zeigen auch diese Gemische weder eine synergistische noch eine additive Verstärkung der Rezeptorbindung. Wiederum wird die Bindung durch die Substanz mit der höchsten Affinität, 17β -Östradiol, vorgegeben. Keinen Effekt haben die zugegebenen Substanzen Nonylphenol bzw. Diclofenac. Zwar hat auch hier 17β -Östradiol als Einzelsubstanz eingesetzt eine leicht höhere Affinität für den Rezeptor, diese erhöhte Affinität ist aber weit geringer als im vorigen Beispiel der Östrogen-Gemische und deshalb ebenfalls wahrscheinlich auf Messschwankungen zurückzuführen

3.4.4 Östrogenrezeptor-Bindung von Flusswasser-Extrakten

Extrakte aus Flusswasser stellen komplexe chemische Gemische dar. Neben natürlich im Flusswasser vorhandenen Substanzen finden sich auch viele anthropogen ins Wasser eingebrachte Chemikalien. Von einigen dieser Chemikalien wird vermutet, dass sie Effekte aufs endokrine System von aquatischen Organismen haben. Ein möglicher Effekt ist die Bindung von Substanzen an den Östrogenrezeptor der Regenbogenforelle. Die hierzu durchgeführten Rezeptorbindungs-Tests sollten zeigen, ob in Flusswasser-Extrakten (siehe Tabelle mit Extrakten) solche Substanzen vorhanden sind. Einige dieser Extrakte wurden zusätzlich mittels GC-MS auf endokrin aktive Substanzen untersucht (siehe Kapitel 3.2.1 bzw 3.2.2). Durch einen Vergleich von GC-MS-Analyse und Bindungsstudien sollten mögliche für die Bindung des Extrakts verantwortliche Substanzen ausfindig gemacht werden.

Im Folgenden sind die Ergebnisse aus diesen Bindungsstudien zu sehen. Die Extrakte sind hierbei in chronologischer Reihenfolge aufgeführt. Die Kontrolle gibt die spezifische Bindung von ^3H -Östradiol ohne Zugabe von Extrakt an. Zu jeder Messung wurde zusätzlich eine Positivkontrolle mit 17β -Östradiol durchgeführt (10^{-11} M – 10^{-7} M). Der 36fach konzentrierte Extrakt ist die höchste eingesetzte Konzentration, der 1fach konzentrierte Extrakt die kleinste. Für alle statistischen Auswertungen gilt : ($p < 0,05$: *) ; ($p < 0,01$: **).

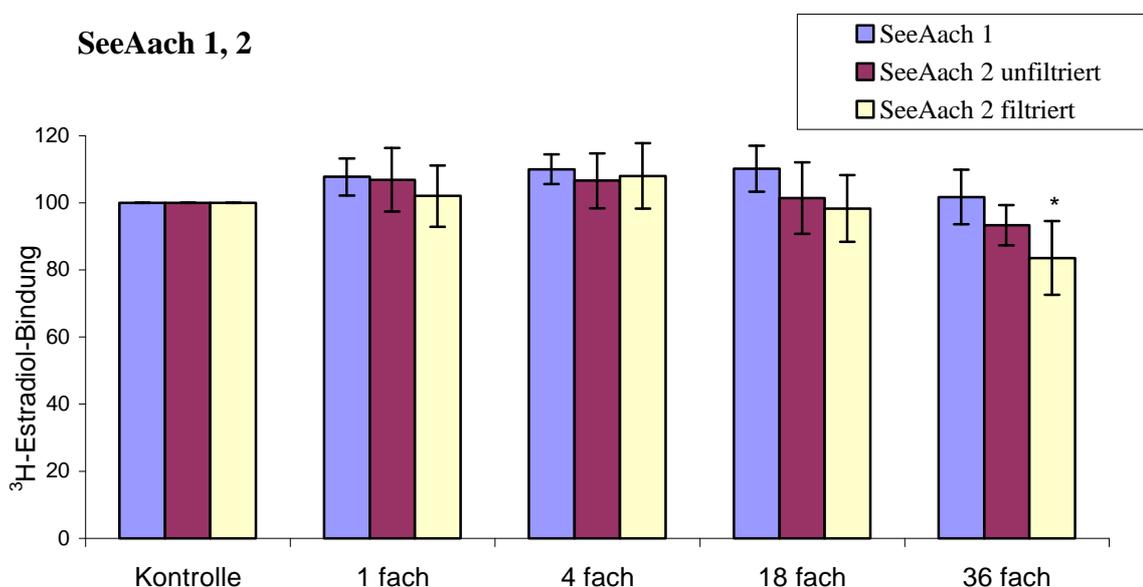


Abb. 3.13: Östrogenrezeptor-Bindung der Flusswasserextrakte SeeAach 1 und 2. Probe SeeAach 2 wurde einmal vor Aufarbeitung (DCM) filtriert, einmal direkt ohne Filtern aufgearbeitet Die Extrakte wurden ohne Cleanup eingesetzt.

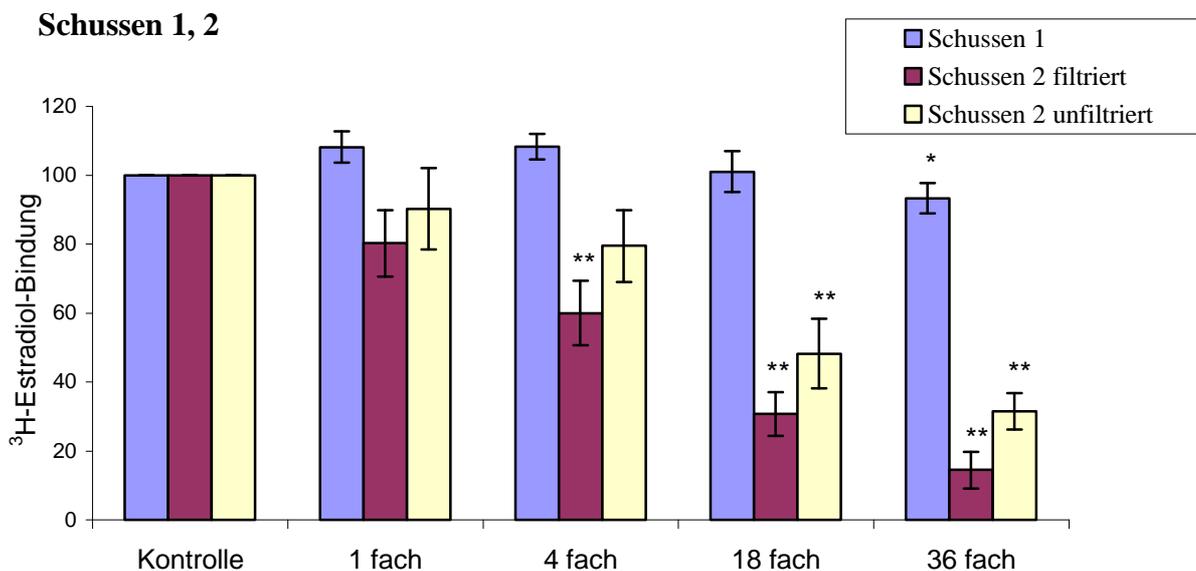


Abb. 3.14: Östrogenrezeptor-Bindung der Flusswasserextrakte Schussen 1 und 2. Probe SeeAach 2 wurde einmal vor Aufarbeitung (DCM) filtriert, einmal direkt ohne Filtern aufgearbeitet. Die Extrakte wurden ohne Cleanup eingesetzt.

Die im Februar bei Hochwasser genommenen Proben SeeAach 1 und Schussen 1 zeigten bis auf eine leichte Bindung des 36fach konzentrierten Schussen 1-Extrakts keine Effekte. Die im Frühjahr genommene Probe SeeAach 2 zeigte ebenfalls nur bei 36facher Konzentrierung eine Bindung von ca. 15% (= Verdrängung von ^3H -Östradiol). Dies traf jedoch nur für den vor Aufarbeitung gefilterten Extrakt zu, nicht für den ohne Filtern aufgearbeiteten Extrakt. Den gleichen Effekt zeigte die ebenfalls im Frühjahr genommene Probe Schussen 2. Der filtrierte Extrakt wies schon bei 1facher Konzentrierung eine Bindung auf, wenn auch statistisch nicht signifikant. Bei 4facher Konzentrierung wuchs die Bindung auf 40% an, bei 18facher Konzentrierung auf 70%. 36fache Konzentrierung führte zu einer Bindung von fast 90%. Der unfiltrierte Extrakt zeigte zwar auch eine hohe Bindung an den Rezeptor, diese war jedoch immer um ca. 20% kleiner als die Bindung des filtrierten Extrakts.

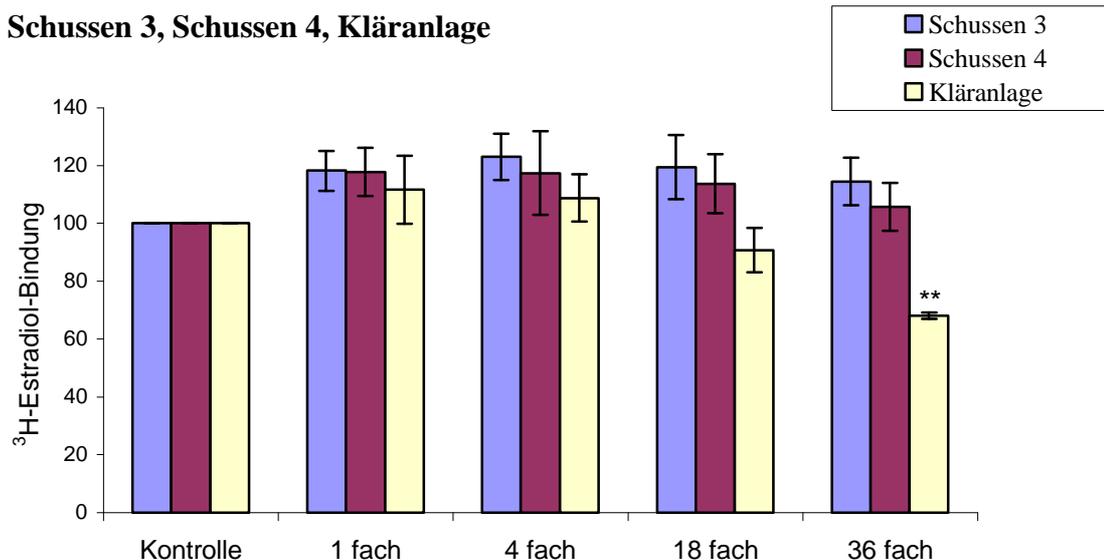


Abb. 3.15: Östrogenrezeptor-Bindung der Extrakte Kläranlage, Schussen 3 und Schussen 4. Die Extrakte (DCM) wurden ohne Cleanup eingesetzt.

Die Sommerproben Schussen 3 und Schussen 4 zeigten keine Bindung an den Östrogenrezeptor. Die leichte Erhöhung der Bindung von ^3H -Östradiol gegenüber dem Kontrollwert konnte auf Schwankungen speziell dieser drei Messungen zurückgeführt werden, kann also als nichtspezifischer Effekt betrachtet werden. Dies ergab auch eine nicht abgebildete für alle drei Messungen durchgeführte Positivkontrolle mit Östradiol im Konzentrationsbereich von 10^{-11} M bis 10^{-6} M. Diese Positivkontrolle zeigte für den Bereich kleiner Konzentrationen (10^{-11} M und 10^{-10} M) ebenfalls eine erhöhte Bindung von ^3H -Östradiol an. Der IC_{50} -Wert sowie die höheren Konzentrationen dieser Positivkontrolle deckten sich jedoch mit den Werten aller vorangegangenen Messungen von Östradiol.

Lediglich der Extrakt der Kläranlage zeigte bei 36facher Konzentrierung eine Bindung von 30% auf. Schon bei niedrigerer Konzentrierung wies dieser Extrakt eine kleinere Bindung auf als die beiden Schussen-Extrakte, wenn auch statistisch nicht signifikant.

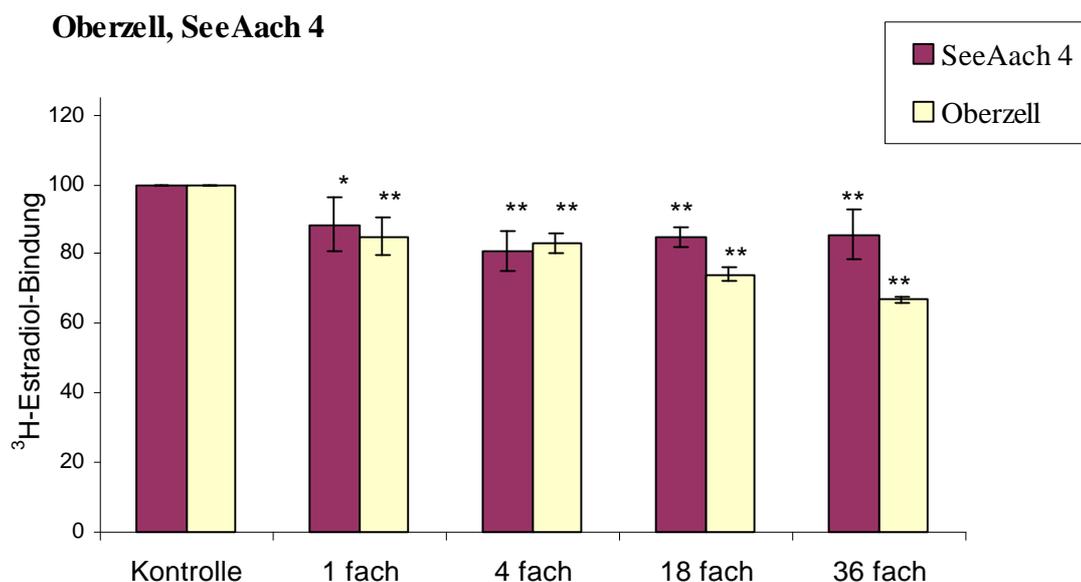


Abb. 3.16: Östrogenrezeptor-Bindung der Extrakte Oberzell und SeeAach 4. Die Extrakte (DCM) wurden ohne Cleanup eingesetzt.

Die Extrakte Oberzell und SeeAach 4 zeigten schon bei 1facher Konzentrierung eine Bindung von 10 bzw. 15%. Dies wiederum steht im Gegensatz zu den vorherigen Proben Kläranlage und Schussen 3 bzw. 4. Diese Proben hatten einen messbedingten Basiswert von 110% ^3H -Östradiol-Bindung, die Extrakte SeeAach 4 und Oberzell besaßen jedoch einen erniedrigten Basiswert von 85 – 90%. Dies zeigte die Positivkontrolle an (nicht abgebildet): kleine Konzentrationen 17β -Östradiol (10^{-11} M und 10^{-10} M) ergaben ebenfalls nur eine ^3H -Östradiol-Bindung von ca. 90%, höhere Konzentrationen stimmten jedoch wieder mit vorhergehenden Messungen überein.

Trotz statistischer Signifikanz fand also bei beiden Extrakten zumindest bei 1facher und 4facher Konzentrierung keine Bindung an den Rezeptor statt. SeeAach 4 wies auch bei 18facher bzw. 36facher Konzentrierung keine Bindung an den Rezeptor auf. Der Extrakt Oberzell zeigte bei 18facher Konzentrierung eine leichte Abnahme der Bindung, diese war noch deutlicher bei 36facher Konzentrierung mit einer Bindung von ca. 30% erkennbar.

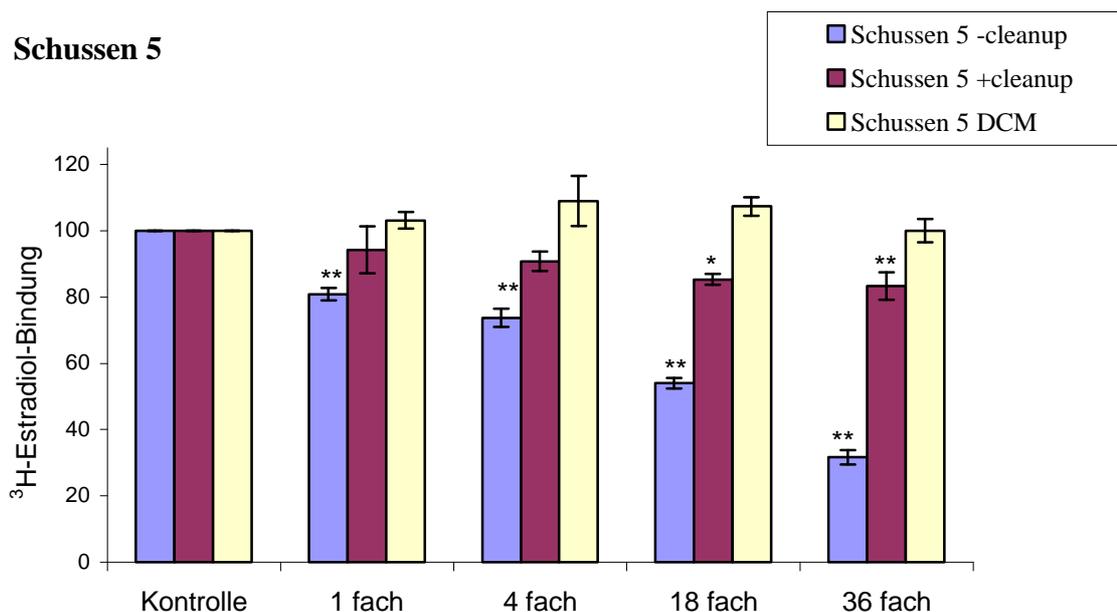


Abb. 3.17: Östrogenrezeptor-Bindung des Extrakts Schussen 5. Die Proben „+ cleanup“ bzw. „- cleanup“ wurden durch Festphasenextraktion aufgearbeitet. Probe „DCM“ wurde durch Ausschütteln mit Dichlormethan aufgearbeitet

Probe Schussen 5 wurde mit drei verschiedenen Extraktionen aufgearbeitet. Ein Extrakt wurde wie alle bisher gezeigten Extrakte durch Flüssig/flüssig-Extraktion mit Dichlormethan (2.2.2.1) erhalten. Die beiden anderen Extrakte wurden durch Festphasenextraktion gewonnen (2.2.2.3). Extrakt Schussen 5 –cleanup wurde nach Extraktion direkt in Ethanol aufgenommen, Extrakt Schussen 5 +cleanup wurde nach Extraktion einem cleanup über eine Kieselgelsäule unterzogen und dadurch von hochmolekularen bzw. polaren Substanzen befreit (siehe auch Kapitel 2.2.3.1).

Extrakt Schussen DCM zeigte keine Bindung an den Rezeptor. Extrakt Schussen 5 +cleanup wies ab 18facher Konzentrierung eine Bindung an den Rezeptor auf, diese betrug bei 36facher Konzentrierung ca. 20%. Extrakt Schussen 5 –cleanup zeigte schon bei 1facher Konzentrierung eine Bindung von ca. 20%, diese nahm stetig zu bis zu einer Bindung von 70% bei 36facher Konzentrierung.

Wochenganglinie Schussen 1.10. – 7.10.2000

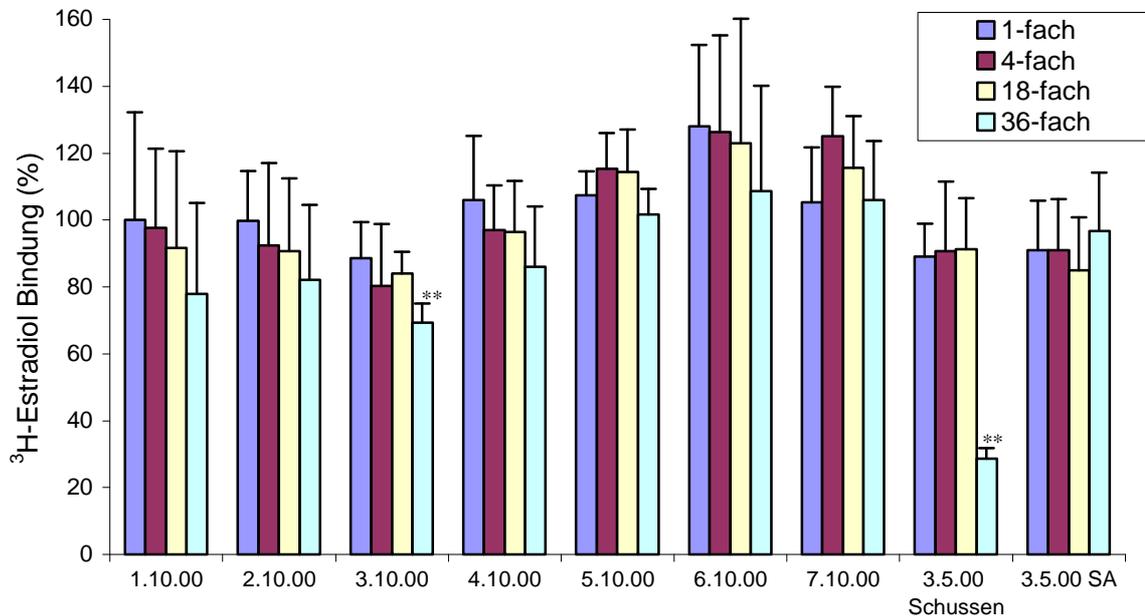


Abb. 3.18: Bindung von organischen Extrakten (+ cleanup) der untersuchten Wasserprobe an den Rezeptor der Regenbogenforelle. (SEM; $p < 0,01$: **)

Die Extrakte (+ cleanup) zeigten kein einheitliches Verhalten im CERBA. Zwar ist tendenziell eine Abnahme der Bindung bei steigender Konzentrierung des Extraktes zu sehen, durch die hohen Standardfehler wurde jedoch nur in zwei Fällen eine signifikant von der Kontrolle verschiedene Bindung gefunden. Hierbei handelt es sich um die Proben Schussen 3.5.2000 sowie Schussen 3.10.2000.

3.5 Vitellogenin-ELISA

3.5.1 Forelle

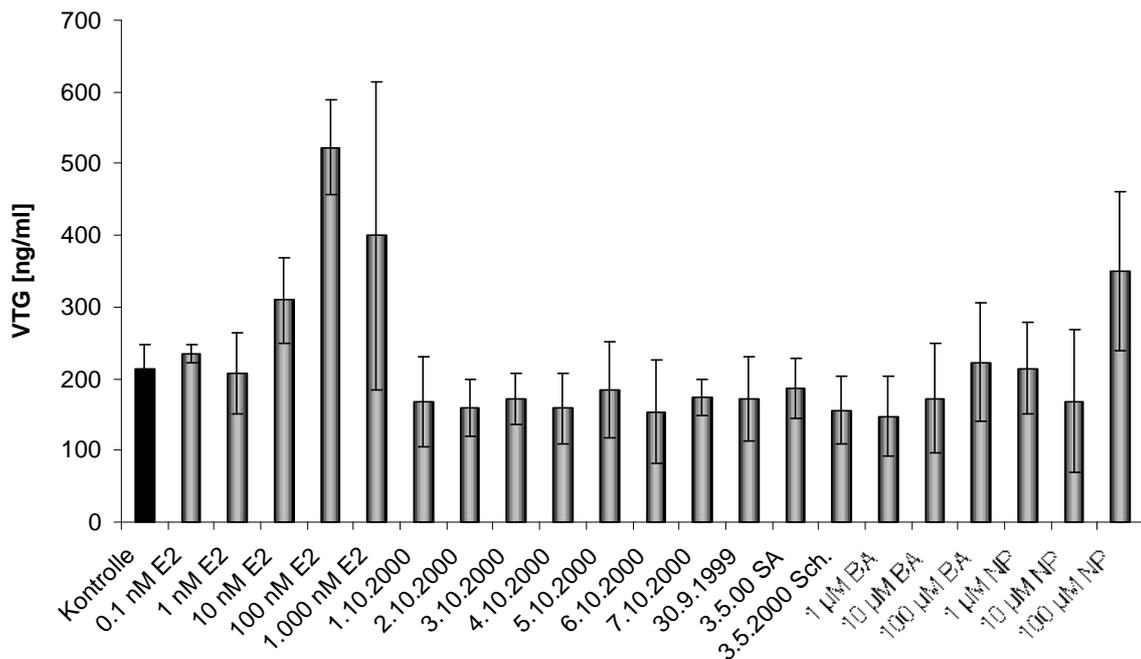


Abb. 3.19: Vitellogenin-Bestimmung im Überstand von Forellen-Hepatozyten mittels ELISA. Gemessen wurden versch. Konzentrationen von 17 β -Östradiol (E₂), Nonylphenol (NP) und Bisphenol A (BA) sowie die Wasserproben der Schussen vom 30.9.1999, 3.5.2000 und 1.-7.10.2000 sowie der Seefelder Aach (SA) vom 3.5.2000. (Werte \pm SEM).

Im Überstand der Forellen-Hepatozyten war nach Stimulation mit 10 nM 17 β -Östradiol (E₂) ein erster Anstieg des Vitellogenin- (Vtg) Spiegels zu sehen, der bei 100 nM E₂ sein Maximum erreichte und dann stagnierte. Keine der untersuchten Wasserproben bewirkte eine Änderung der Vtg- Konzentration. Nach Stimulation mit 100 μ M Nonylphenol wurde ein Anstieg der Vtg- Konzentration gefunden, die Konzentration erreichte jedoch nicht den Level wie nach Stimulation mit 100 nM E₂.

3.5.2 Karpfen

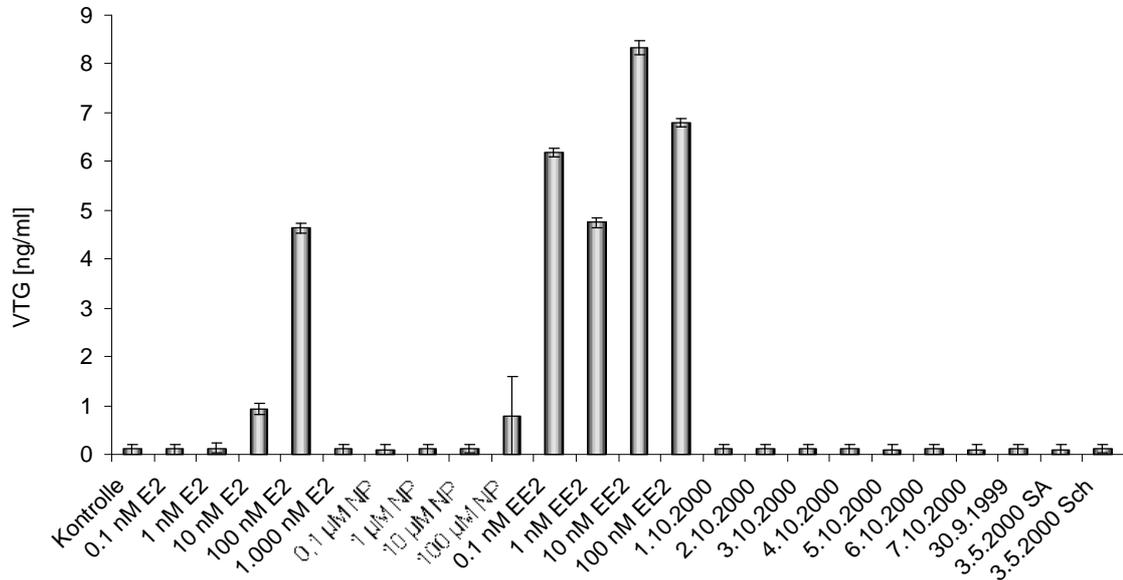


Abb. 3.20: Vitellogenin-Bestimmung im Überstand von Karpfen-Hepatozyten mittels ELISA.

In den Karpfen-Zellkulturen wurde bei einer E2-Konzentration von 10 nM, wie bereits in den Forellen-Zellkulturen, ein deutlicher Anstieg des Vtg-Spiegels im Überstand gefunden. Dieser Spiegel erreichte bei 100 nM E2 ein Maximum, fiel bei 1 µM E2 jedoch auf den Kontrollwert zurück. NP bewirkte bei einer Konzentration von 100 µM eine leichte Zunahme im Vtg-Level. Keine der untersuchten Wasserproben war in der Lage, eine Veränderung im Vtg-Spiegel zu bewirken. Die Karpfen-Zellkulturen wurden statt Bp A jedoch mit 17 α -Ethinylöstradiol (EE2) stimuliert. Hier wurde ein deutlicher Anstieg der Vg-Konzentration schon bei 0,1 nM mit einem Maximum bei 100 nM festgestellt.

3.6 Northern Blot

Der Nachweis von Östrogenrezeptor- und Vitellogenin-mRNA-Synthese in Forellen-Hepatozyten mittels Northern Blot wurde bereits in der Literatur (Le Guellec et al., 1988; Pakdel et al., 1991; Pakdel et al., 1990) beschrieben. Da für die Zeitabhängigkeit der Genexpression von Vg und ER bereits Daten vorhanden waren, wurden nur wenige Vorversuche durchgeführt, in denen sowohl die Dauer zwischen Zellpräparation und Stimulation als auch die Stimulationsdauer variiert wurden. Hepatozyten in Monolayer-Zellkulturen behalten ihre Fähigkeit, nach Östrogen-Stimulation ER- und Vg-mRNA zu synthetisieren von Tag 1 bis Tag 8 nach Präparation (Flouriot et al., 1993). Flouriot et al. (Flouriot et al., 1996) zeigten außerdem, dass die ER-mRNA nach Stimulation für 24 h bereits ein Plateau erreicht hat. Eine Verlängerung der Stimulationsdauer auf 36 h führte nur noch zu einer leichten Zunahme der ER-mRNA-Expression. Für die Vg-mRNA wurde nach 24 h bereits eine deutliche Expression gezeigt, maximale Werte für die mRNA-Synthese wurden allerdings erst nach 48 h beobachtet.

Um beide mRNAs zu erfassen wurde folgendermaßen vorgegangen: Die Zellen wurden nach Präparation 5 Tage in Kultur gehalten, am fünften Tag mit Testsubstanzen bzw. Wasserproben stimuliert und die Stimulationsdauer auf 24 h festgelegt.

In der Expression östrogenabhängiger Gene war neben der Zeitabhängigkeit auch auf einen Geschlechts-spezifischen Unterschied zu achten, da die Hepatozyten männlicher und weiblicher Forellen unterschiedliche Sensitivität gegenüber einer Stimulierung von ER- und Vg-mRNA zeigten.

Als erste Referenzsubstanz zur Validierung unseres Testsystems wurde 17 β -Östradiol (E₂) zur Stimulation der Hepatozyten verwendet.

Für die RNA aus Hepatozyten eines geschlechtsreifen Weibchens erhielten wir für die Hybridisierung mit der rtER-Sonde mehrere Banden, nachdem die Hepatozyten für 24 bzw. 48 h mit 10 bis 100 nM 17 β -Östradiol stimuliert worden waren. Das Auftreten mehrere ER-Banden wurde in keinem der folgenden Versuchsansätze (im Northern Blot) mehr beobachtet.

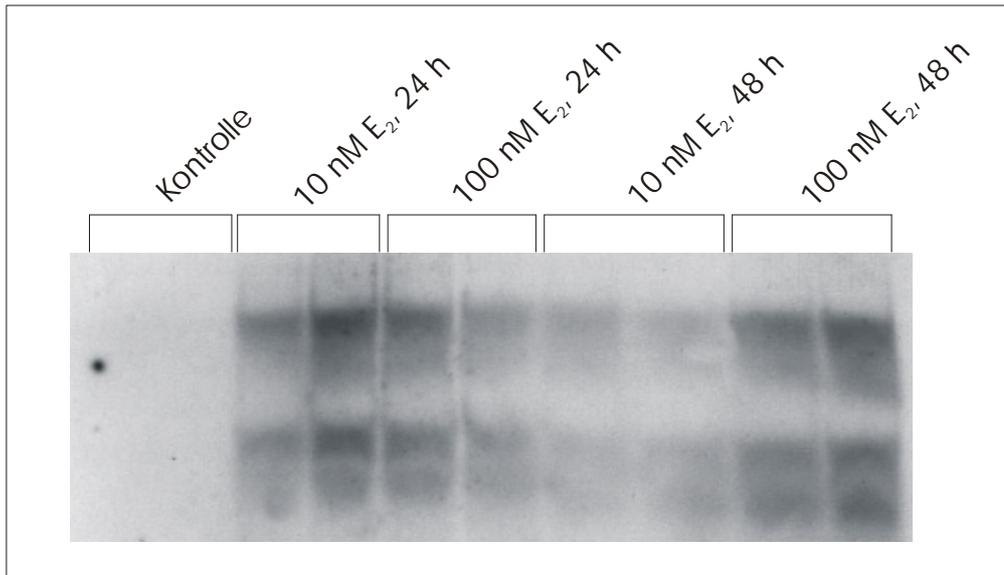


Abb. 3.21: ER-mRNA-Synthese in Hepatozyten einer geschlechtsreifen, weiblichen Regenbogenforelle nach Stimulation mit E₂ für 24 bzw. 48 h.

Bei der Stimulation der Hepatozyten einer adulten (ca. 2 Jahre alt), männlichen Forelle mit E₂ wurden erste Effekte in der Expression der ER-mRNA bei 1 nM gesehen. Zwischen 1 nM und 1 μM wurde keine Zunahme der ER-mRNA gesehen.

Als weitere Testsubstanzen wurden das synthetische Östrogen 17α-Ethinylöstradiol (EE), sowie die in der Industrie verwendeten Substanzen Nonylphenol (NP) und Bisphenol A (Bis A) eingesetzt.

Für die Vg-mRNA-Expression in Hepatozyten einer undifferenzierten Regenbogenforelle wurden für 100 pM EE und für 10 μM Bis A die ersten Effekte sichtbar. Für die ER-mRNA wurde eine Stimulation ab 10 nM EE und ab 100 μM Bis A gezeigt (Northern Blot nicht gezeigt).

Weiter wurden Hepatozyten eines Weibchens für 24 h mit NP stimuliert und sowohl für die Östrogenrezeptor- als auch für die Vitellogenin-mRNA wurde bei 10 μM NP ein eindeutiges Signal detektiert.

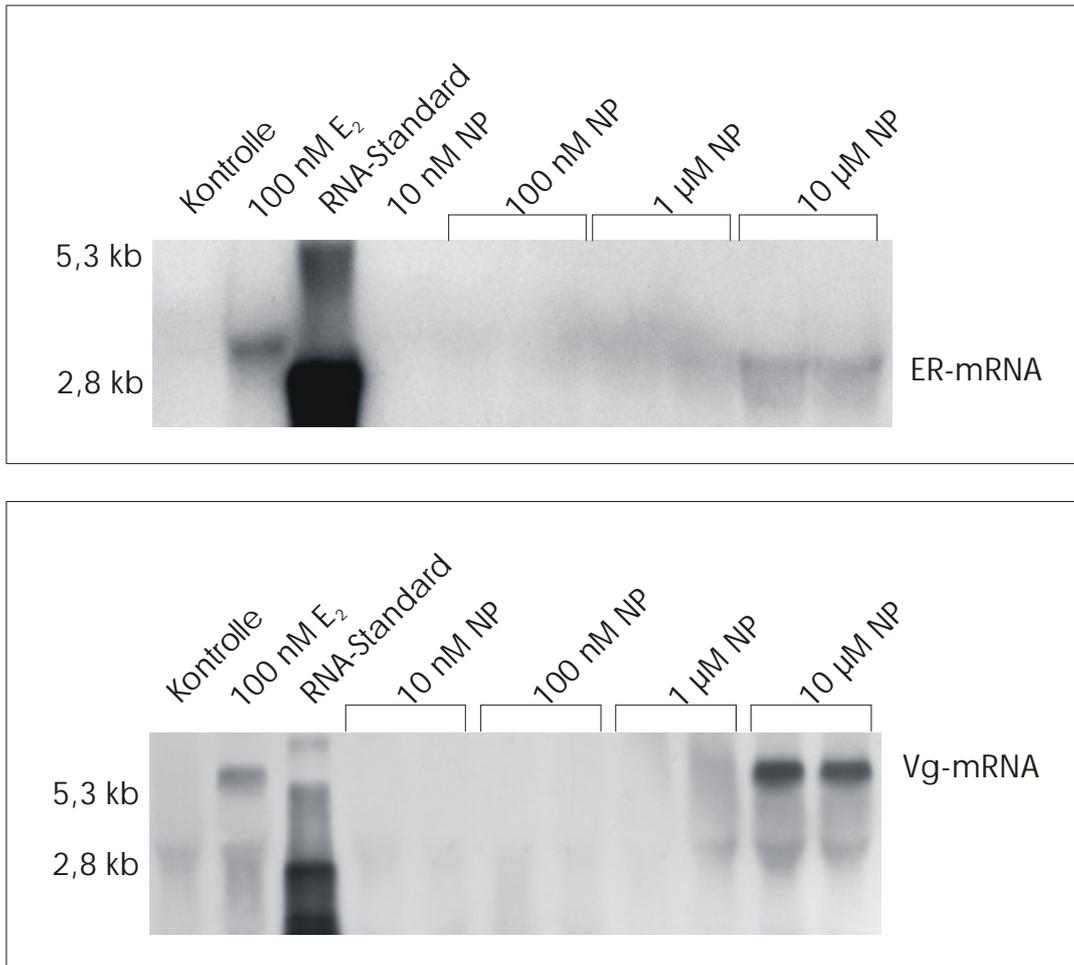


Abb. 3.22: ER- bzw. Vg-mRNA-Synthese in Hepatozyten einer weiblichen Regenbogenforelle nach Stimulation mit Nonylphenol für 24 h.

Wegen Problemen im Northern Blot bzw. einer wesentlichen Vereinfachung der mRNA-Detektion wurde im Folgenden mit RT-PCR gearbeitet.

3.7 RT-PCR (Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion)

3.7.1 Forelle

Für den Nachweis der mRNA-Synthese der östrogen-abhängigen Gene Vitellogenin und Östrogenrezeptor in der RT-PCR wurde mit Primern nach Ren et al. (Ren et al., 1996) gearbeitet. Neben den Primern für Vg- und ER-cDNA wurde ein β -Actin-Primer eingesetzt. β -Actin ist ein sogenanntes Haushalts-Gen und sollte in der Zelle immer auf gleichem Level exprimiert sein. Die Detektion eines Haushalts-Gens lässt somit in Bezug auf die eingesetzte RNA-Menge einen Vergleich zwischen den verschiedenen Proben zu.

Als Kontrolle für die RT-PCR wurde jeweils ein Versuchsansatz durchgeführt, der statt einer RNA-Probe nur MQ-Wasser enthielt. Das Auftreten von Banden in dieser Probe könnte auf Verunreinigung von Testsubstanzen mit RNA oder DNA hinweisen.

Zur Validierung des Testsystems wurden zunächst RNA-Proben aus Östrogen-stimulierten Hepatozyten untersucht. Dabei wurden auch geschlechtsspezifische Unterschiede in der Stimulierbarkeit der ER- und Vg-mRNA-Synthese durch ein natürliches und ein synthetisches Östrogen (17β -Östradiol und 17α -Ethinylöstradiol) nachgewiesen.

Grundsätzlich konnte in der RT-PCR ein deutlicher Unterschied in der Expression der ER-mRNA in den Hepatozyten in Abhängigkeit vom Geschlecht der Tiere beobachtet werden. So zeigten adulte, männliche Forellen in der Regel einen wesentlich geringeren bzw. nicht detektierbaren Grundlevel an ER-mRNA als adulte, weibliche Tiere. Abb. 3.23 zeigt die Stimulierbarkeit der Hepatozyten von drei verschiedenen männlichen Forellen. Bei allen drei Zellpräparationen konnte ein sehr niedriger bis nicht detektierbarer Grundlevel an ER-mRNA und ähnliche Stimulierbarkeit durch die Referenzsubstanzen E_2 und EE beobachtet werden. Außerdem zeigt Abb. 3.23 die Stimulation von ER- und Vg-mRNA durch $10 \mu\text{M}$ Genistein bei einer männlichen Forelle.

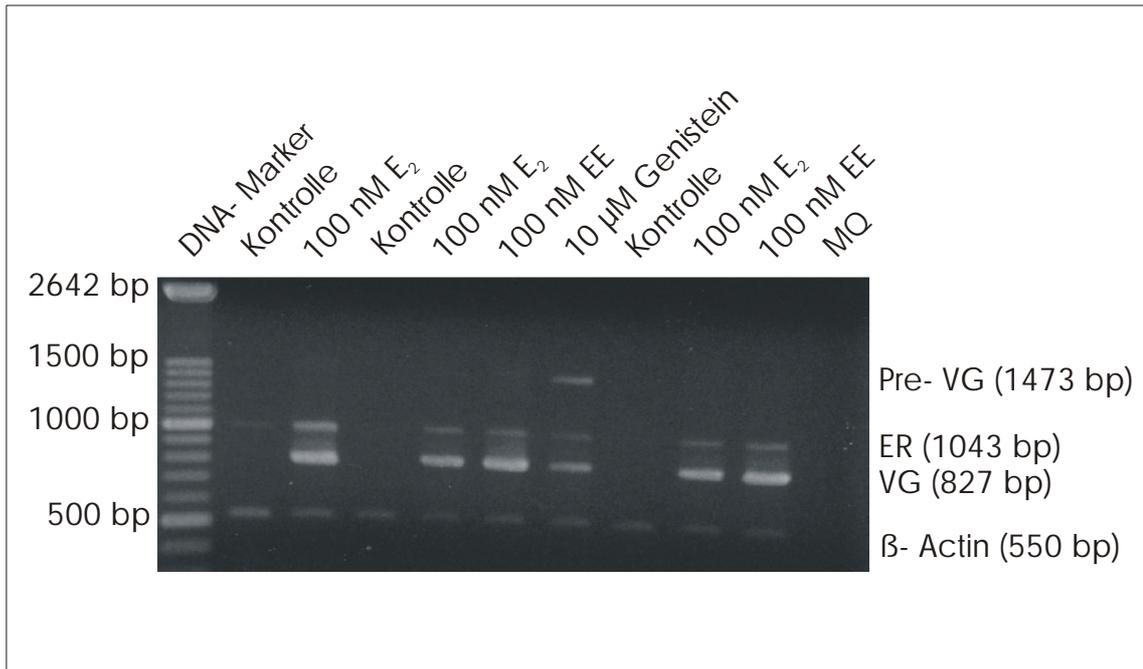


Abb. 3.23: Vergleich der Stimulierbarkeit von Hepatozyten männlicher Regenbogenforellen aus verschiedenen Präparationen nach 96 h Ruhephase sowie 24 h Inkubation.

Um die Expression von ER- und Vg-mRNA in männlichen Tieren mit E₂ anzuregen, wurden Konzentrationen von 1 bzw. 10 nM benötigt. So zeigt Abb. 3.24 eine Steigerung der ER-mRNA-Expression bei 1 nM E₂, die Vg-mRNA-Expression beginnt bei 10 nM E₂. Dieser Befund konnte in anderen Zellpräparationen bestätigt werden.



Abb. 3.24: Stimulation der Vg- und ER-mRNA-Synthese in Hepatozyten einer männlichen Forelle mit E₂ nach 96 h Ruhephase sowie 24 h Inkubation.

Bei adulten, weiblichen Rebenbogenforellen zeigt sich eine deutliche Zunahme der ER-mRNA erst bei 10 nM E₂ oder EE, Vg-mRNA-Expression setzt allerdings bereits bei 1 nM E₂ bzw. EE ein, also um eine Zehnerpotenz früher als beim männlichen Fisch. Eine Zunahme der ER-mRNA beim Weibchen ist allerdings mit dem bloßen Auge auch schwer zu bestimmen, da der Basislevel schon relativ hoch ist. 10 µM Genistein zeigen beim weiblichen Fisch eine deutliche Stimulation von ER- und Vg-mRNA. Hepatozyten weiblicher Fische wurden für die Testung niedrigerer Genistein-Konzentrationen, für NP und Bisphenol A, sowie für alle folgenden Substanzen nicht mehr benutzt, da die eigentliche Testung von fraglichen Substanzen bzw. Wasserproben in männlichen Fischen durchgeführt werden sollte. Männliche Fische zeigen zum einen einen wesentlich geringeren bis nicht detektierbaren Grundlevel der untersuchten mRNAs, zum anderen stellt die Induktion von ER und vor allem Vg im männlichen Tier einen unter normalen Bedingungen nicht auftretenden Effekt dar, dem aus diesem Grund größere Aufmerksamkeit geschenkt werden sollte.

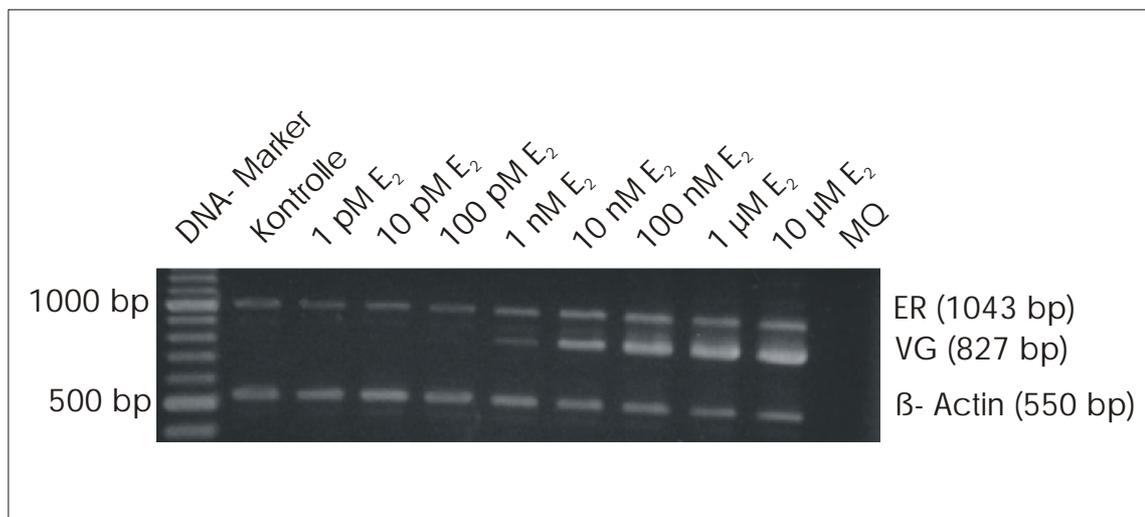


Abb. 3.25: Stimulation der Vg- und ER-mRNA-Synthese in Hepatozyten einer weiblichen Forelle mit E₂ nach 96 h Ruhephase sowie 24 h Inkubation.

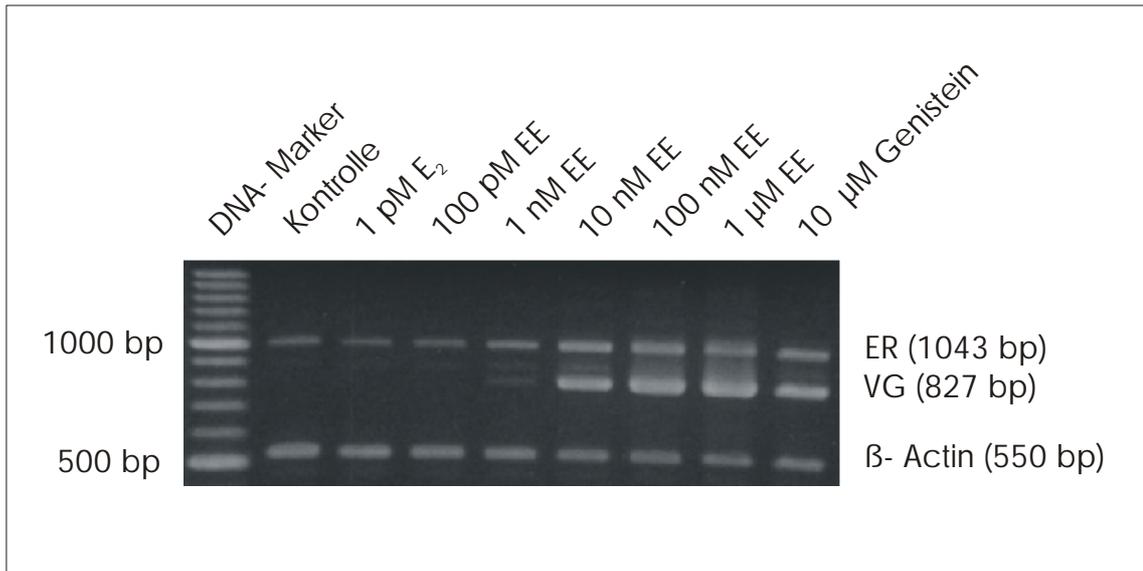


Abb. 3.26: Stimulation der Vg- und ER-mRNA-Synthese in Hepatozyten einer weiblichen Forelle mit E₂ bzw. EE nach 96 h Ruhephase sowie 24 h Inkubation.

E₂- und EE-, sowie NP- und Bis A-Konzentrationsreihen wurden auch in Hepatozyten einer als undifferenziert bezeichneten Regenbogenforelle betrachtet. Der Basislevel der ER-mRNA lag bei den Hepatozyten dieses Fisches allerdings sehr hoch, was die Annahme zulässt, dass es sich um ein in der Entwicklung befindliches Weibchen handelt; dies war bei Betrachtung der Gonaden mit bloßem Auge allerdings noch nicht sichtbar. Für E₂ und EE wurde bereits bei 100 pM eine Stimulation sowohl der ER-mRNA als auch der Vg-mRNA beobachtet. Für EE wurde außerdem eine konzentrationsabhängige Zunahme beider mRNAs beobachtet, die für E₂ nicht deutlich erkennbar ist.

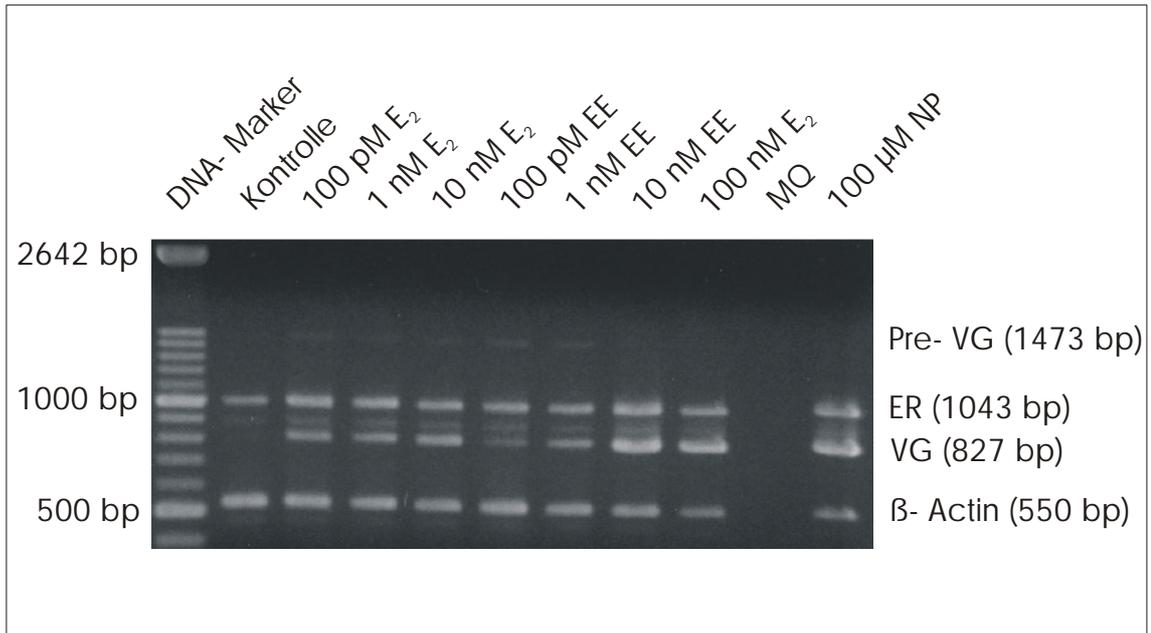


Abb. 3.27: Stimulation der Vg- und ER-mRNA-Synthese in Hepatozyten einer juvenilen weiblichen Regenbogenforelle mit E2 bzw. EE. nach 96 h Ruhephase sowie 24 h Inkubation.

Ab 10 μM NP wurde bei der Vg-mRNA ein leichtes Signal beobachtet, bei 100 μM NP wurde sowohl für Vg- als auch ER-mRNA eine deutliche Zunahme der Expression beobachtet. Für Bisphenol A wurde erst bei 100 μM eine leichte Stimulation der Vg-mRNA beobachtet (Abb. 3.28). Die Ergebnisse für NP und Bis A konnten auch für Hepatozyten adulter, männlicher Regenbogenforellen bestätigt werden. Auch hier zeigt sich bei 10 μM NP ein leichter Anstieg von Vg- und ER-mRNA, bei 100 μM eine sehr deutliche Stimulation.

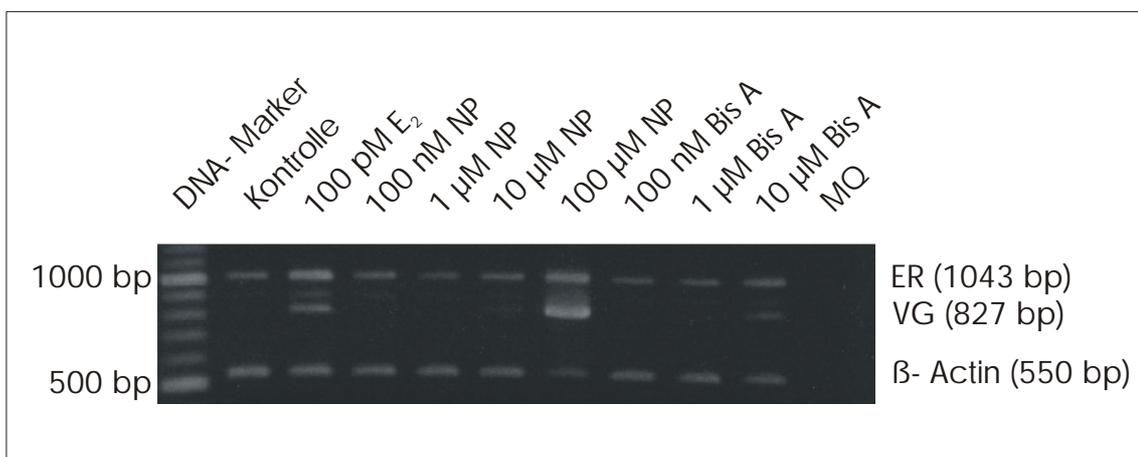


Abb. 3.28: Vg- und ER-mRNA-Synthese in Hepatozyten einer juv., weibl. Regenbogenforelle nach Stimulation mit NP bzw. Bis A nach 96 h Ruhephase sowie 24 h Inkubation.

Für Bis A zeigt sich wiederum erst bei 100 μM eine deutliche Expression beider mRNAs.

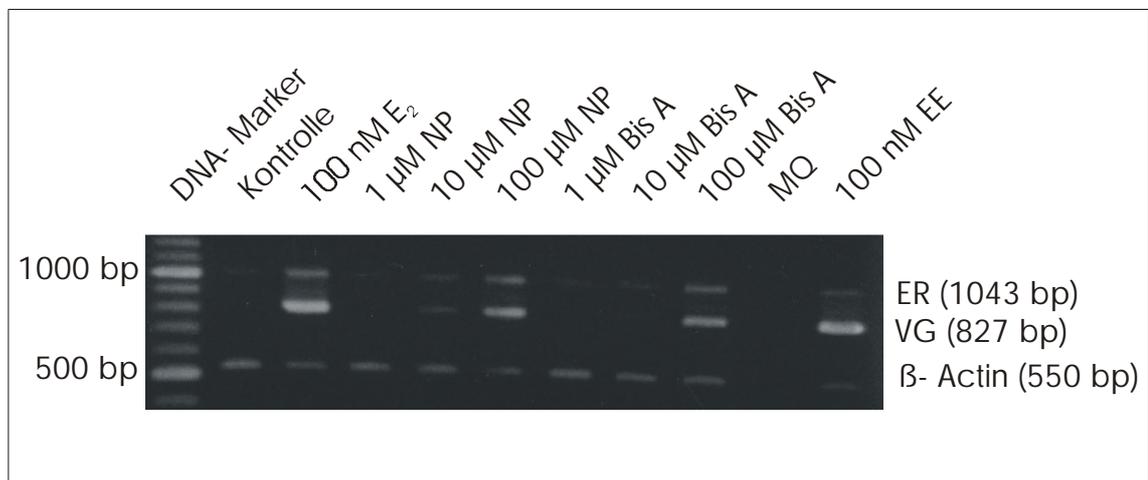


Abb. 3.29: Vg- und ER-mRNA-Synthese in Hepatozyten einer adulten, männlichen Regenbogenforelle nach Stimulation mit Nonylphenol (NP) bzw. Bisphenol A (Bis A) nach 96 h Ruhephase sowie 24 h Inkubation.

Weiter wurden verschiedene Pharmaka, Phytoöstrogene und die organischen Phasen von Wasserproben der Schussen und der Seefelder Aach an Hepatozyten männlicher Forellen getestet. Die höchste eingesetzte Konzentration der Pharmaka entspricht dabei der höchsten Konzentration, die in Ethanol gelöst werden konnte. Für Bezafibrat, Naproxen, Carbamazepin und Clofibrat konnte in keiner der eingesetzten Konzentrationen eine Stimulation der ER- und/oder Vg-mRNA (und somit östrogenen Aktivität) beobachtet werden. Eine Konzentrationsreihe des Phytoöstrogens Genistein wurde hier noch einmal mitgetestet. Eine östrogene Wirkung konnte aber auch hier erst bei 10 μM festgestellt werden, was den Ergebnissen aus Leberzellen weiblicher Fische entspricht.

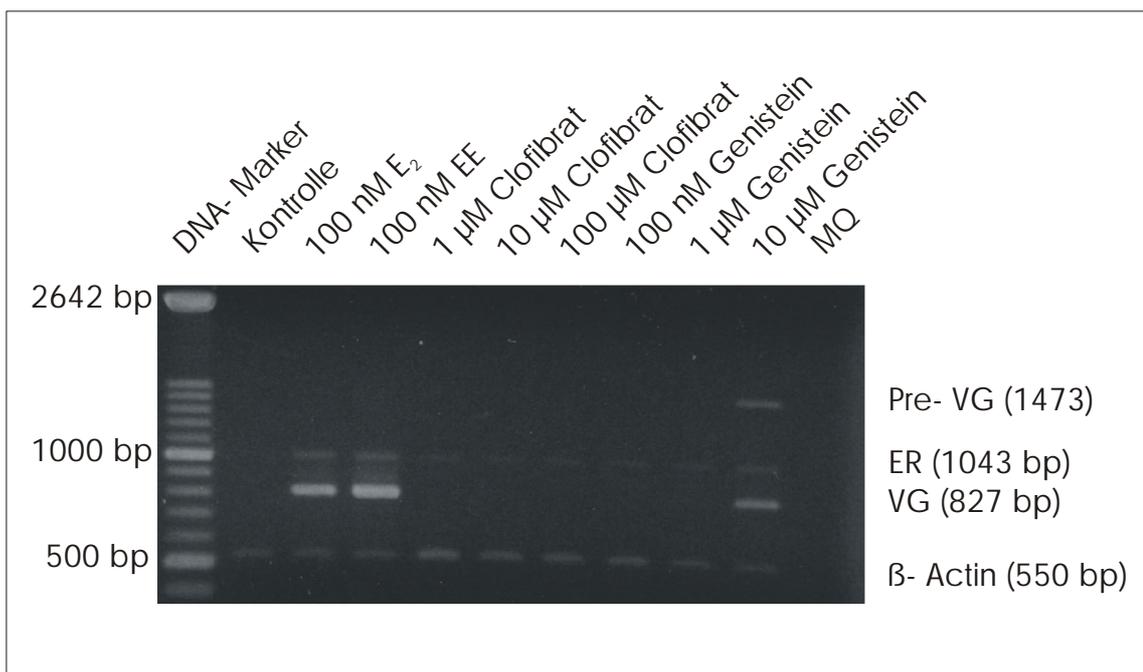
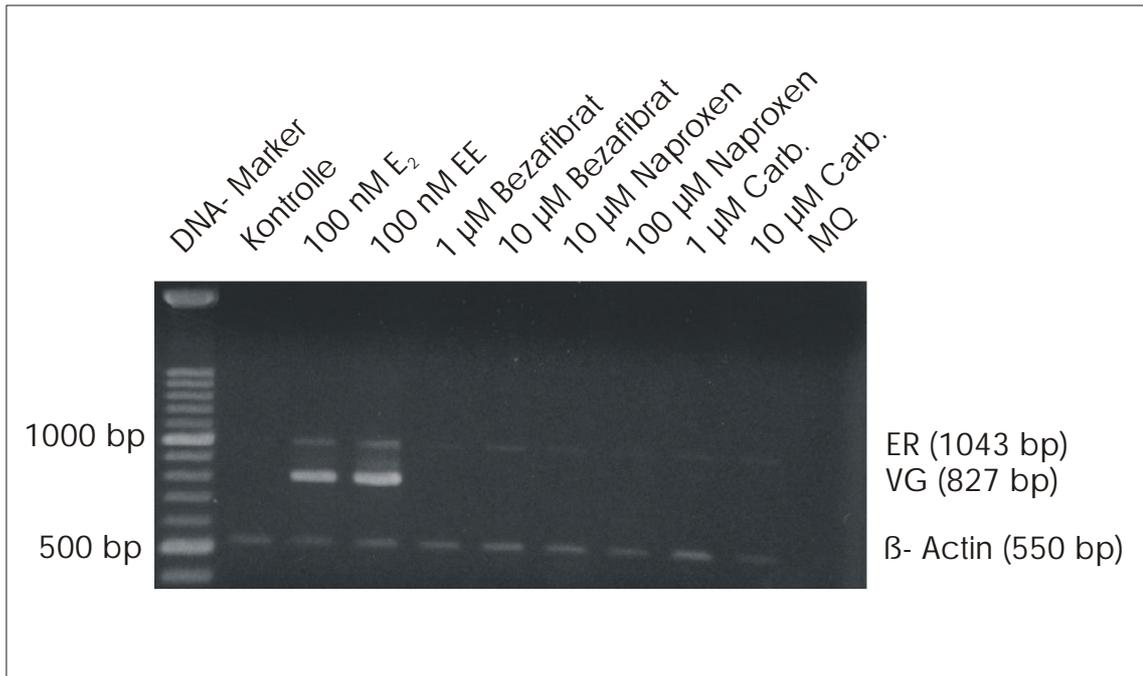


Abb. 3.30: Vg- und ER-mRNA-Synthese in Hepatozyten einer adulten, männlichen Regenbogenforelle nach Stimulation mit den Pharmaka Bezafibrat, Naproxen, Carbamazepin und Clofibrat, bzw. dem Phytoöstrogen Genistein nach 96 h Ruhephase sowie 24 h Inkubation.

Auffällig ist hier das Auftreten einer zusätzlichen Bande, die der von Ren (Ren et al., 1996) als pre-Vitellogenin-cDNA bezeichneten Bande entspricht. Weiter wurde die Wirkung von Diclofenac und β -Sitosterol untersucht. Auch für diese Substanzen

konnten in den eingesetzten Konzentrationen keine Effekte beobachtet werden (Abb. 3.31).



Abb. 3.31: Stimulation von Hepatozyten einer adulten, männlichen Regenbogenforelle mit Diclofenac bzw. β -Sitosterol nach 96 h Ruhephase sowie 24 h Inkubation.

Nachdem für die organischen Phasen der Wasserproben Seefelder Ach 1 und 2 und Schussen 1 und 2 in der Originalkonzentration keine Stimulation der ER- oder Vg-mRNA gefunden werden konnte, wurden die organischen Phasen aller vorhandener Wasserproben (zusätzlich zu den oben genannten auch Schussen 3 und Seefelder Ach 3 und 4, sowie Kläranlagen-Abfluss und Oberzell) um einen Faktor 10 aufkonzentriert und nochmals in der Zellkultur getestet. Bei der Probe Schussen 2 wurde eine leichte Stimulation der ER-mRNA gefunden, alle anderen Proben zeigten auch 10fach konzentriert keinen Effekt. In einer weiteren Zellpräparation konnte der Befund für die Probe Schussen 2 bestätigt sowie eine leichte Stimulation der ER-mRNA durch die 10fach konzentrierte organische Phase des Kläranlagen-Abflusses von Langwiese gefunden werden (Abb. 3.32). Für beide Proben wurde auch eine kompetitive Bindung an den ER gezeigt.

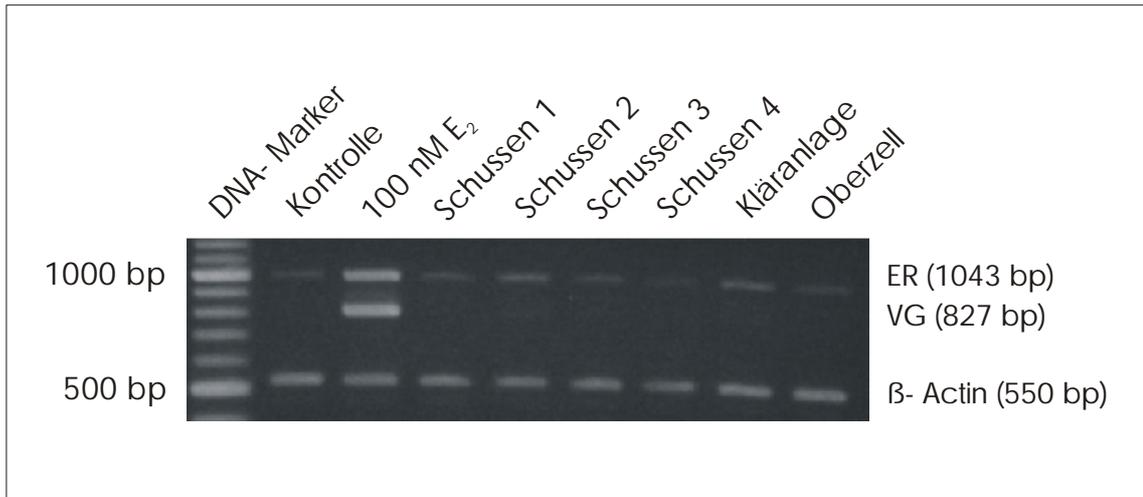


Abb. 3.32: Vg- und ER-mRNA-Synthese in Hepatozyten einer adulten, männlichen Regenbogenforelle nach Stimulation mit den 10fach konzentrierten, organischen Phasen von Wasserproben aus Schussen, Seefelder Aach und dem Abfluss der Kläranlage Langwiese nach 96 h Ruhephase sowie 24 h Inkubation.

Für Diclofenac und Carbamazepin wurden, wie bereits erwähnt, keine Induktion der ER- und Vg-mRNA-Synthese beobachtet. Da in Östrogenrezeptor-Bindungsstudien allerdings eine deutliche Bindung von Diclofenac an den ER gefunden, bzw. für Carbamazepin ein antiandrogener Effekt in Mäusen gezeigt wurde (Dietrich et al., 1998), wurden beide Substanzen auf eine hemmende bzw. additive Wirkung hin untersucht. Dafür wurden die Zellen mit der jeweiligen Substanz und 17 β -Östradiol stimuliert. Bei gleichzeitiger Stimulation der Zellen mit 100 nM E₂ und 10 μ M Carbamazepin wurde eine leichte Steigerung der ER-mRNA-Expression gefunden. Diclofenac wurde 6 $\frac{1}{2}$ h vor E₂ auf die Zellen gegeben. 100 μ M Diclofenac führte dabei zu einer deutlichen Hemmung der durch 100 nM E₂ stimulierten Vg-mRNA-Expression. Bei niedrigeren Diclofenac-Konzentrationen wurden keine Effekte beobachtet (Abb. 3.33).

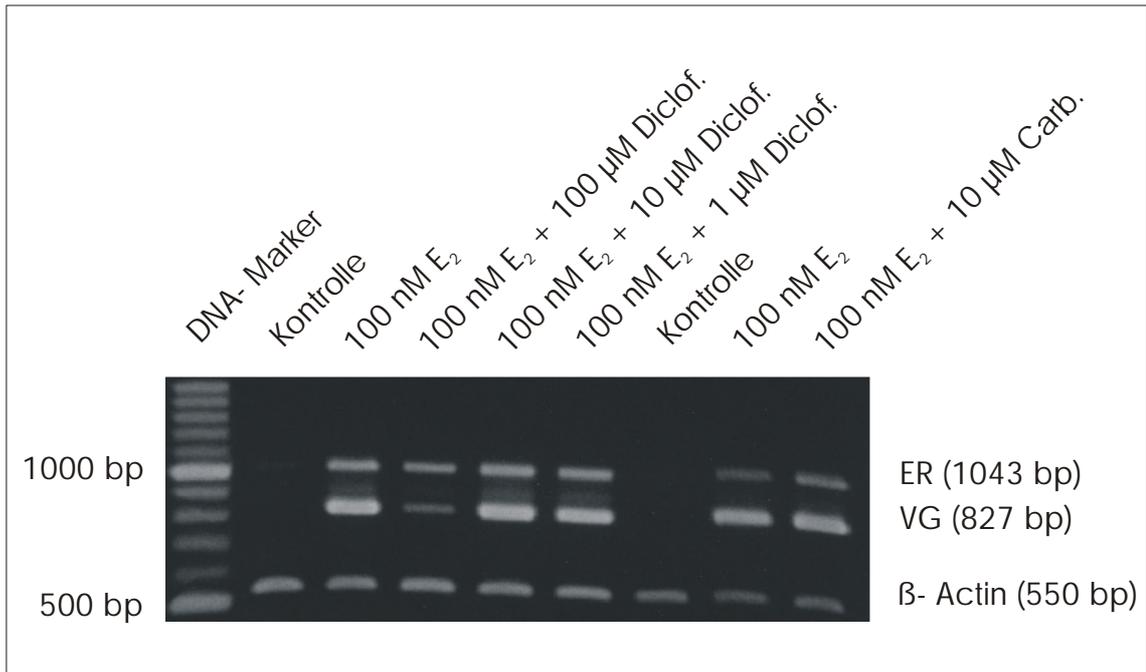


Abb. 3.33: Stimulation der Vg- und ER-mRNA-Synthese in Hepatozyten einer adulten, männlichen Regenbogenforelle nach Stimulation mit E₂ und Diclofenac bzw. E₂ und Carbamazepin, wobei Diclofenac bzw. Carbamazepin 6 ½h nach E₂ auf die Zellen gegeben wurde (Zellkultur: 96 h Ruhephase sowie 24 h Inkubation).

Um die für Diclofenac gefundenen Ergebnisse zu bestätigen wurden noch zwei weitere Hepatozyten-Präparationen herangezogen. Die Zellen wurden entweder gleichzeitig mit Diclofenac und E₂ stimuliert oder E₂ wurde 6 h vor Diclofenac bzw. Diclofenac 6 h vor E₂ gegeben. Die Zellen der zwei männlichen Forellen reagierten dabei genau gleich, was gegen individuelle Unterschiede in den Effekten spricht. Als E₂-Konzentrationen wurden 10 und 100 nM gewählt. Die Zugabe von 100 µM Diclofenac führte in allen Fällen (unabhängig vom Zeitpunkt der Stimulation) zu einer Steigerung der ER- und Vg-mRNA-Expression (Abb. 3.34). Bei niedrigeren Diclofenac-Konzentrationen war dieser Effekt nicht zu sehen. Hier lässt sich vielmehr bei 10 nM E₂ und 10 µM Diclofenac (6 h nach E₂-Gabe verabreicht) auf eine leichte Hemmung der durch E₂ stimulierten Vg-mRNA-Expression schließen.

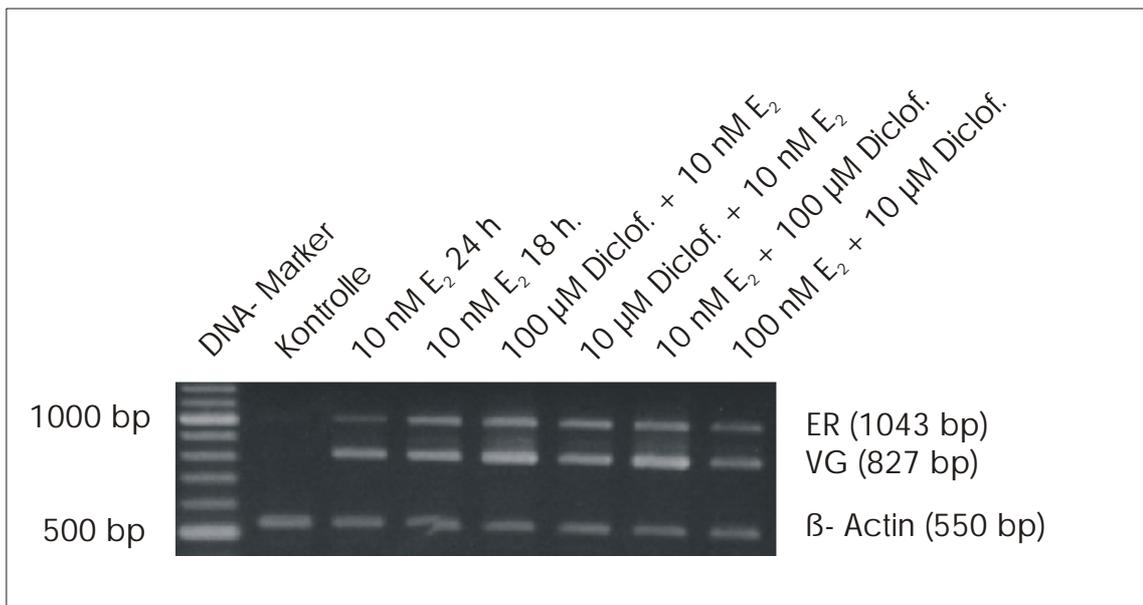


Abb. 3.34: Stimulation der Vg- und ER-mRNA-Synthese mit Diclofenac und E₂ nach 96 h Ruhephase sowie 24 h Inkubation.

Allgemein auffällig war das Auftreten einer weiteren cDNA-Bande zwischen ER-cDNA und Vg-cDNA. Vermutlich handelt es sich bei dieser Bande ebenfalls um ER-cDNA. Diese Annahme wurde durch Ergebnisse im Southern Blot bekräftigt.

Schließlich wurde mit Hilfe der RT-PCR noch die Expression von ER-mRNA in Gonadenzellen weiblicher Forellen untersucht. Dafür wurden Zellen der Passage 0 mit EtOH oder 100 nM E₂ stimuliert, Zellen der Passage 1 neben der Lösungsmittel-Kontrolle mit 1 nM bis 10 µM E₂. Unabhängig von der Passage zeigten die Gonadenzellen weder einen Basislevel an Östrogenrezeptor-mRNA, noch war eine Stimulation der ER-mRNA-Expression durch 17β-Östradiol möglich.

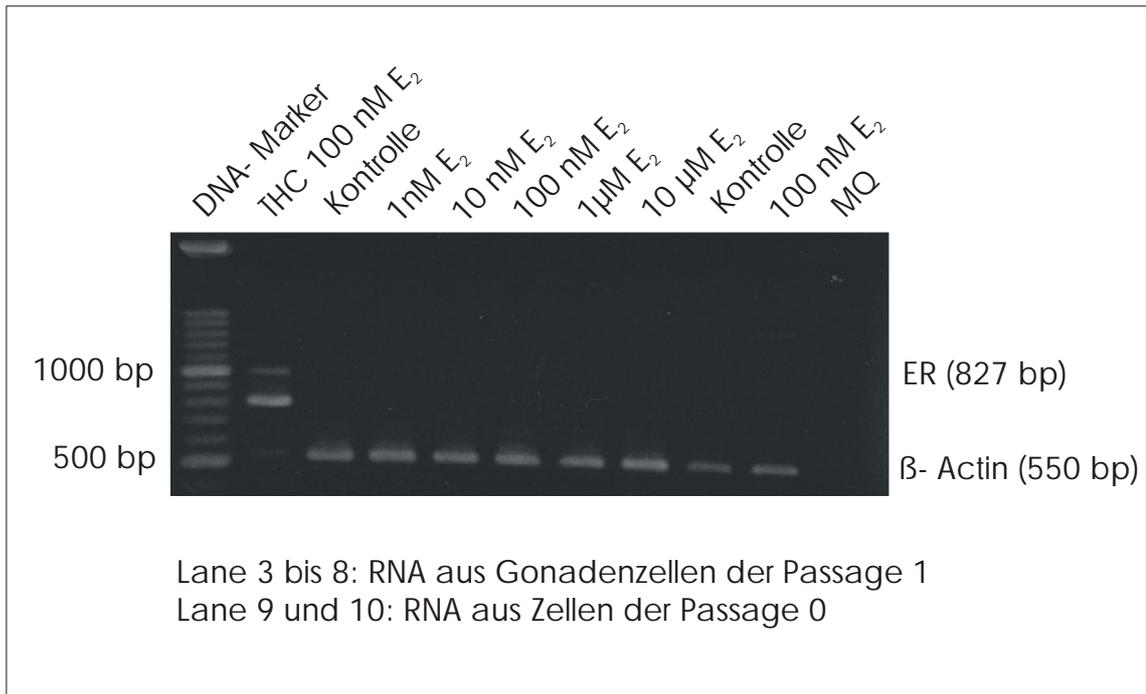


Abb. 3.35: Stimulation von Gonadenzellen einer weiblichen Regenbogenforelle mit E₂.

Stimulation der ER-mRNA sowie Vg-mRNA in primären Hepatozyten-Zellkulturen nach 72 h Ruhephase sowie 48 h Inkubation.

Die bisher gezeigten Abbildungen zur Induktion von Er- und Vg-mRNA bezogen sich alle auf eine Inkubationszeit von 24 h sowie eine vorhergehende Ruhephase der Zellen von 96 h. Im zweiten Jahr dieses Projektes wurde die Ruhephase auf 72 h verkürzt, die Inkubationszeit auf 48 h verlängert. Dies war notwendig, da zusätzlich zur Transkription auch die (nachfolgende) Translation und Freisetzung von Vg gemessen werden sollte.

Zu Beginn der Testreihen erfolgte die Stimulation von Forellen-Hepatozyten mit verschiedenen Konzentrationen von 17β -Östradiol (E_2). Hierdurch sollte zum Einen die Qualität sowie das Verhalten der verwendeten Zellkulturen geprüft werden, zum Anderen sollte zudem bei positivem Resultat der Wasserproben eine Wertung des Befundes ermöglicht werden. Weiterhin wurden zwei als endokrin aktiv bekannte Substanzen zur Validierung des Systems eingesetzt. Hierbei handelt es sich um Bisphenol A (Bp A) sowie Nonylphenol (NP). Weiterhin wurden diverse Wasserproben nach 10.000-facher Konzentrierung eingesetzt.

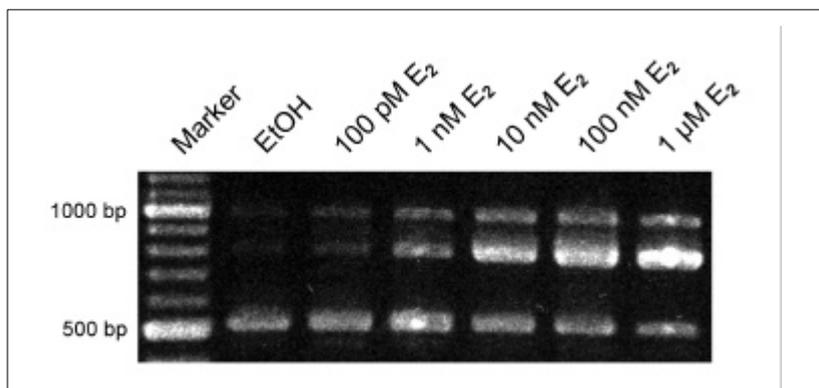


Abb. 3.36: Stimulation der Vitellogenin- (Vg: 827 bp) und Östrogenrezeptor- (ER: 1043 bp) mRNA in Forellen-Hepatozyten durch 17β -Östradiol (E_2)

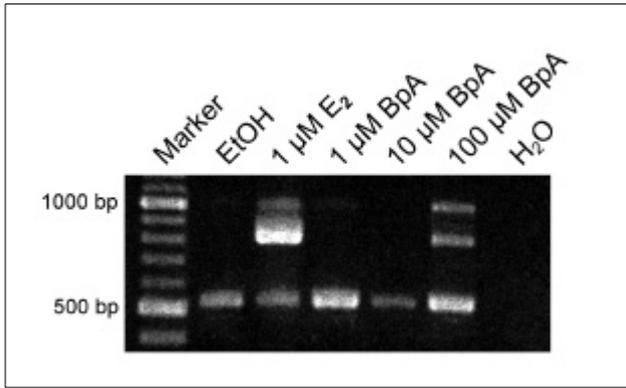


Abb. 3.37: Stimulation der Vitellogenin- (Vg: 827 bp) und Östrogenrezeptor- (ER: 1043 bp) mRNA in Forellen-Hepatozyten durch Bisphenol A (Bp A).

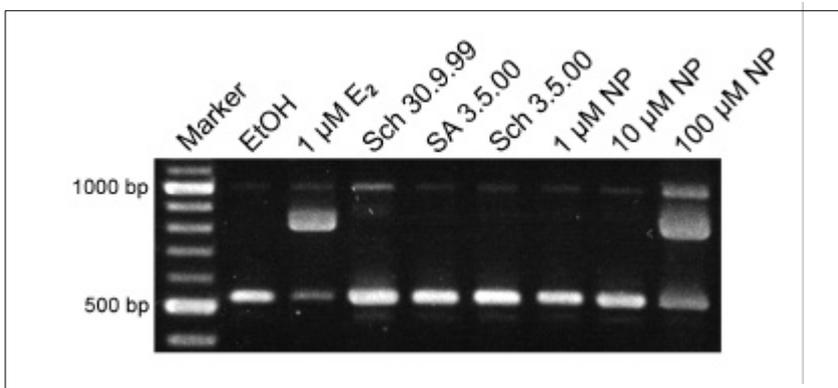


Abb. 3.38: Stimulation der Vg- (827 bp) und ER- (1043 bp) mRNA durch die Wasserproben Schussen 30.9.1999 bzw. 3.5.2000 und Seefelder Aach 3.5.2000, sowie durch Nonylphenol (NP).

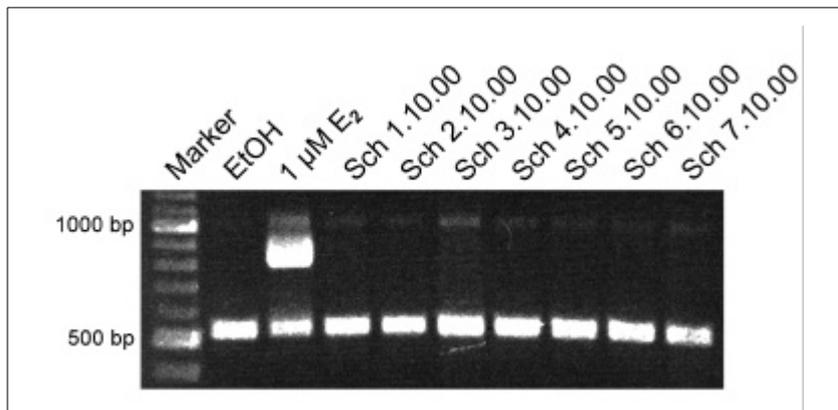


Abb. 3.39: Stimulation der Vg- (827 bp) und ER- (1043 bp) mRNA durch die Wasserproben Schussen 1.10.2000 bis 7.10.2000.

Die Stimulation der Forellen-Zellkultur mit 17β -Östradiol (E_2) ergab bereits für die Ausgangskonzentration von 100 pM eine, wenn auch sehr geringe, Induktion der Vitellogenin- (Vg) und Östrogenrezeptor- (ER) mRNA. Diese nahm bis zur Höchstkonzentration von E_2 (1 μ M) stetig zu. Bei 24 h Inkubation konnte diese

Induktion erst durch 1 nM E2 ausgelöst werden (Abb. 3.24). Nonylphenol und Bisphenol A konnten erst bei der Höchstkonzentration von 100 μ M die Induktion von Er- und Vg-mRNA bewirken. Bei Inkubation für 24 h konnte für NP hingegen schon ab 10 μ M eine schwache Induktion beobachtet werden (Abb. 3.29). Keine der untersuchten Wasserproben konnte die Induktion der Vg-mRNA auslösen. Zwei Proben bewirkten jedoch eine schwache Induktion der ER-mRNA. Hierbei handelte es sich um die Proben Schussen 30.9.1999 sowie Schussen 3.10.2000.

3.7.2 Karpfen

Die RT-PCR für den Karpfen brachte nur für α -Aktin ein positives Ergebnis, also gleichmässige Banden. Somit kann davon ausgegangen werden, dass zum Einen in der Zellkultur eine geregelte Transkription stattfand, zum Anderen die Präparation der mRNA erfolgreich durchgeführt wurde. Weder Vitellogenin- noch Östrogenrezeptor-mRNA konnten jedoch nachgewiesen werden. Grund hierfür dürfte die Herkunft der verwendeten Primer sein. Diese wurden ursprünglich für den Goldfisch, den Zebrafisch sowie die Fettkopfbresse konzipiert und erfolgreich angewendet. Diese Spezies sind zwar ebenfalls Cypriniden, die verwendeten Primer waren jedoch nicht kompatibel zum Karpfen. Somit kann die Induktion der Vg- und ER- mRNA erst gemessen werden, wenn die spezifischen Sequenzen für den Karpfen erstmals veröffentlicht werden.

3.8 Southern Blot

Der Southern Blot wurde durchgeführt um die Ergebnisse der RT-PCR zu überprüfen. Handelt es sich bei den Banden aus der RT-PCR tatsächlich um Vg- und ER-cDNA, so sollten diese von den ursprünglich im Northern Blot verwendeten cDNA-Sonden gegen Vg- und ER-mRNA erkannt werden. Für die ER-cDNA wurde eine eindeutige Bindung der ER-cDNA-Sonde gefunden. Da die PCR zu einer starken Amplifikation der cDNA führt und die Detektion der cDNA im Southern Blot sehr empfindlich ist, war das im Southern Blot gefundene Signal sehr stark. Eine Konzentrationsabhängigkeit des Signals für die eingesetzten Proben konnte deshalb nicht mehr festgestellt werden. Der Southern Blot diente allerdings ohnehin nur dem qualitativen und nicht einem quantitativen Nachweis.

Der Southern Blot wurde zweimal durchgeführt. Beim ersten mal wurde die Detektion allerdings mit NTB/BCIP durchgeführt (Abb. 3.40). Diese Detektion ist etwas weniger empfindlich als eine Detektion mit CSPD. Von Vorteil ist allerdings, dass in diesem Fall für den Östrogenrezeptor zwei Banden unterschieden werden können, was bei der CSPD-Detektion nicht mehr möglich ist (Abb. 3.41).

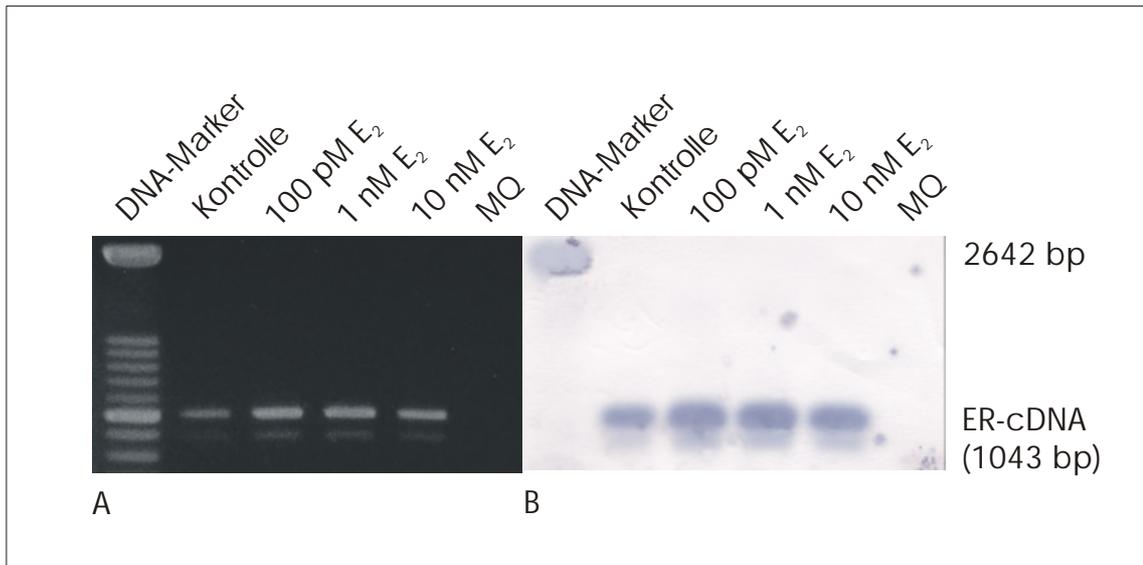


Abb. 3.40: Nachweis der ER-cDNA mittels Southern Blot. A) RT-PCR; B) Southern Blot: Detektion mit NTB/BCIP-Farbstoff.

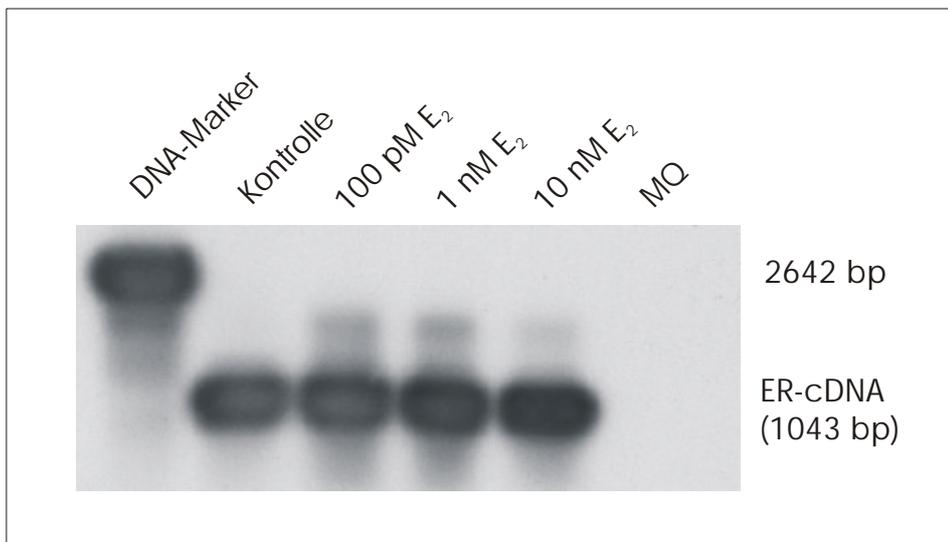


Abb. 3.41: Nachweis der ER-cDNA im Southern Blot. Detektion mit CSPD-Chemilumineszenz-Farbstoff.

Die zweite ER-Bande, die zwischen ER- und Vg-cDNA liegt, wurde bereits in der RT-PCR gesehen, und es wurde bereits vermutet, dass es sich dabei um ER-cDNA handelt. Der Southern Blot bekräftigte somit diese Vermutung.

Eine Detektion der Vg-cDNA im Southern Blot war mit der vorhandenen cDNA-Sonde nicht möglich. Um auszuschließen, dass eine fehlende Bindung der cDNA-Sonde in der Verwendung eines ungeeigneten Primers für Vg in der PCR begründet liegt, wurde in einem weiteren Versuch mit Vg-Primern (Vg-starting und Vg-ending) nach Mellanen et al. (Mellanen et al., 1996) gearbeitet. Im Southern Blot konnten auch die daraus resultierenden Vg-cDNA-Banden nicht detektiert werden. Es war aus zeitlichen Gründen nicht mehr möglich weitere Versuche durchzuführen, die diese Befunde erklären könnten.

4 DISKUSSION

4.1 Probennahme und Aufarbeitung

Die Probennahme erfolgte für alle Wasserproben mit Ausnahme der 7 Proben der Wochenganglinie Schussen durch Entnahme einer Zufalls-Stichprobe direkt aus der Flussmitte bzw. aus dem Kläranlagenauslauf. Bei der Wochenganglinie wurden hingegen Tagesmischproben genommen. Die Entnahme von Stichproben wurde für Oberflächenwasser z.B. von Stumpf (Stumpf et al. 1996), Ternes (Ternes et al. 1999; Ternes et al. 1999) und Wenzel (Wenzel et al. 1998) beschrieben. Die Beprobung von Kläranlagen erfolgte meist durch Entnahme von 24 h – Tagesmischproben (Desbrow et al. 1998; Spengler et al. 1999; Ternes et al. 1999), Stichproben waren aber auch möglich (Stumpf et al. 1996). Durch Mischproben sollten mögliche große Schwankungen im Substanzgehalt ausgeglichen werden wie sie v.a. in Kläranlagen, aber auch Fliessgewässern, abhängig von Tageszeit und Durchflussmenge, auftreten können. Dies macht eine bessere Abschätzung chronischer Belastungen möglich, während die Entnahme von Stichproben nur Aufschluss über eine akute Belastungssituation liefern kann. Nachteil der Entnahme von Mischproben ist jedoch, dass eine Belastung über 24 h unter dem Schwellenwert für adverse Effekte auf einen Organismus liegen kann, die Maximalbelastung innerhalb dieses Zeitraums jedoch durchaus einen akuten Effekt auslösen könnte. Um sowohl die akute als auch chronische Belastung einer Wasserprobe feststellen zu können, wäre deshalb eine Kombination aus Mischproben verschiedener Zeiträume zusammen mit regelmäßig verteilten Stichproben von Vorteil, der zeitliche und experimentelle Aufwand wäre jedoch enorm.

Die Aufarbeitung eines Großteils der Wasserproben erfolgte durch Flüssig-flüssig-Extraktion mit Dichlormethan. Dieses Verfahren war bereits in unserer Arbeitsgruppe etabliert (Krieger 1999). Ebenfalls eine Flüssig-flüssig-Extraktion mit Dichlormethan wurde von Desbrow (Desbrow et al. 1998) durchgeführt, hier gingen der DCM-Extraktion jedoch eine Festphasenextraktion sowie eine Fraktionierung durch HPLC zuvor. Trotz dieser zusätzlichen Schritte wurde dennoch eine Wiederfindungsrate für 17 β -Östradiol von 83 % ermittelt. Die in unserem Labor ermittelte Wiederfindungsrate für radioaktiv markiertes 17 β -Östradiol betrug $72 \pm 7,5$ %, der Wert für nichtradioaktives 17 β -Östradiol sollte diesem Wert wegen der gleichen chemischen

Eigenschaften entsprechen. Die Wiederfindungsrate unserer Dichlormethan-Extraktion ist damit nur geringfügig kleiner als der von Desbrow ermittelte Wert für 17 β -Östradiol. Mit dieser Methode werden neben den Östrogenen auch andere endokrin aktive Stoffe wie Nonylphenol und Nonylphenoldiethoxylat extrahiert (Jobling et al. 1995).

Die Flüssig-flüssig-Extraktion mit Dichlormethan war zwar lange Zeit das Hauptverfahren zur Isolierung organischer Verbindungen aus Wasser, wird aber in neuerer Zeit hauptsächlich von der Festphasenextraktion abgelöst. Die für die Probe Schussen 5 sowie die Wochenganglinie angewandte Festphasenextraktion entsprach hierbei der von Spengler (Spengler et al. 1999) und Merz (Merz et al. 1998) beschriebenen Methode. Ähnliche Methoden wurden ebenfalls von Schlett (Schlett und Pfeifer 1996), Ternes (Ternes et al. 1999; Ternes et al. 1999) und anderen beschrieben. Die Wiederfindungsrate unserer Festphasenextraktion für radioaktiv markiertes 17 β -Östradiol wurde nicht bestimmt, auch von Spengler bzw. Merz wurde keine Wiederfindung für Östrogene angegeben. Aus den Daten von Schlett für 17 α -Ethinylöstradiol (104 \pm 10 %), Ternes (Östrogene über 75 %) und Stumpf (Stumpf et al. 1996) (Östron 76 % - 17 α -Ethinylöstradiol 97 %) kann jedoch geschlossen werden, dass die Wiederfindungsrate für Östrogene ebenfalls mindestens 75 % beträgt.

Im Vergleich von Flüssig-flüssig-Extraktion mit Dichlormethan, Flüssig-flüssig-Extraktion mit Hexan sowie Festphasenextraktionen ist die Hexan-Extraktion mit einer Wiederfindungsrate von 4,4 % nicht zur Isolation von Östrogenen geeignet. Die beiden anderen Extraktionen hingegen zeigen eine Wiederfindungsrate von mindestens 75 %. Die Festphasenextraktion bietet hierbei verschiedene Vorteile: die Extraktion eines Liters Wasser ist in kürzerer Zeit möglich, zusätzlich können bei Verwendung einer Vakuumkammer bis zu 20 Liter Wasser gleichzeitig aufgearbeitet werden, statt hintereinander wie bei der Dichlormethan-Aufarbeitung. Zudem entfällt die Bildung einer Intermediärphase, ein möglicher Substanzverlust auf diesem Weg wird also ausgeschlossen. Lediglich die Kapazität einer Festphase muss von Beginn an gut gewählt sein. Bei Proben mit hoher Matrix ist ansonsten schon vor Ende der Extraktion das Säulenmaterial so stark mit organischen Stoffen besetzt, dass ein Großteil der gesuchten Analyten ungehindert die Säule passiert und somit einer Messung entzogen wird. Nachteil an beiden Aufarbeitungsmethoden ist, dass nur unpolare Verbindungen isoliert werden können. Polare und ionische Stoffe jedoch, die einen Großteil der organischen Stoffe stellen, werden durch diese Verfahren nicht extrahiert (Castillo und Barceló 1997).

Welchen Stellenwert die Aufarbeitung von Wasserproben für den Einsatz in biologischen *in vitro* Testsystemen hat, verdeutlichen die Ergebnisse des Rezeptor-Bindungsassays mit dem organischen Extrakt der Probe Schussen 5. Hier wurde die

Bindung des Extraktes nach verschiedener Aufarbeitung verglichen (Aufarbeitung mit Dichlormethan, Festphasenextraktion mit Cleanup sowie Festphasenextraktion ohne Cleanup). Hierbei zeigte sich, dass die Matrixbestandteile in diesem Testsystem nach reiner Festphasenextraktion ohne Cleanup einen falsch positiven Effekt verursachen können. Die Wahl der geeigneten Aufarbeitungsmethode ist demnach von entscheidender Bedeutung für die Aussagekraft von biologischen Testsystemen. Die Aufarbeitung muss hierbei dem jeweiligen Testsystem angepasst werden.

4.2 Analytik mittels GC-MS: Östrogene und endokrin aktive Substanzen

Die Analytik der Schussen-Wochenganglinie sowie der Flusswasserprobe Schussen 5 unterscheidet sich in grundlegender Weise von der Analytik der Flusswasserextrakte. In der Wochenganglinie und in Schussen 5 wurde der Gehalt an Östrogenen und anderen endokrin aktiven Stoffen direkt im Flusswasser bestimmt. Hierzu war die Zugabe von internen Standards zum Flusswasser vor Aufarbeitung der Probe nötig. Die Zugabe der internen Standards erfolgte bei den Flusswasserextrakten Schussen 1, Schussen 2, Schussen 4, Kläranlage und SeeAach 2 erst nach Aufarbeitung des Flusswassers (Flüssig/flüssig-Extraktion mit Dichlormethan). Eine Bestimmung der Analytkonzentrationen ist in diesem Fall also nur für den Extrakt selbst möglich, nicht für die ursprüngliche Flusswasserprobe. Um trotzdem einen Rückschluss auf den Gehalt der untersuchten Substanzen im Flusswasser ziehen zu können, wurde deshalb im Fall des 17 β -Östradiols für einige Wasserproben die Wiederfindungsrate für radioaktives 17 β -Östradiol nach Aufarbeitung bestimmt. Da sich radioaktives 17 β -Östradiol aufgrund seiner gleichen chemischen Eigenschaften genauso verhält wie nichtradioaktives 17 β -Östradiol, konnte somit direkt der Gehalt an 17 β -Östradiol im Flusswasser errechnet werden. Aus der bestimmten Wiederfindungsrate ergaben sich somit fürs Flusswasser 17 β -Östradiol-Konzentrationen von $41,6 \pm 1,3$ ng/l für die Schussen 2 – Probe, $2,0 \pm 0,1$ ng/l für die Schussen 4 – Probe sowie 1,2 ng/l für die Kläranlagen – Probe. Rückschlüsse auf andere Analytkonzentrationen konnten nicht gezogen werden, hierzu hätte für jeden Stoff gesondert eine Wiederfindungsrate bestimmt werden müssen, der Substanzgehalt im Flusswasser entspricht jedoch mindestens dem Gehalt an Substanz im Extrakt.

4.2.1 Endokrin aktive Stoffe im Flusswasser und ihre Bedeutung für aquatische Organismen

Östrogene im Flusswasser :

In allen untersuchten Extrakten wurde 17 β -Östradiol mit einem Median von 2,8 ng/l nachgewiesen, ebenso im Flusswasser der Probe Schussen 5 mit einem Gehalt von 0,6 ng/l. Die Werte der Wochenganglinie liegen mit 0,6 - 1,4 ng/l ebenfalls in diesem Bereich. Extrakt Schussen 2 wich mit 31,8 ng/l (41,6 ng/l) deutlich von diesen Werten ab. Östron wurde in den Extrakten mit einem Median von 0,8 ng/l bestimmt, in Probe Schussen 5 sowie den Wasserproben der Wochenganglinie mit 1,3 - 1,6 ng/l, . Das Kontrazeptivum Mestranol konnte in keiner der untersuchten Proben gefunden werden. 17 α -Ethinylöstradiol, ein weiteres synthetisches Steroid und Kontrazeptivum, wurde in der Wochenganglinie mit einem Maximum von 5 ng/l an allen 7 Tagen kontinuierlich nachgewiesen. In Messungen von Stumpf (Stumpf et al. 1996) bzw. Ternes (Ternes et al. 1999; Ternes et al. 1999) konnte 17 β -Östradiol in keinem der dort untersuchten deutschen Flüsse nachgewiesen werden, ebenso wenig Mestranol. Östron wurde von Ternes nur in 3 von 15 deutschen Flüssen mit einem Maximum von 1,6 ng/l bestimmt. 17 α -Ethinylöstradiol wurde nur von Stumpf vereinzelt zwischen 1 und 4 ng/l detektiert. Wenzel (Wenzel et al. 1998) berichtet von einem Median von 1,7 ng/l 17 β -Östradiol sowie einem Maximum von 29,1 ng/l 17 β -Östradiol in 7 von 52 untersuchten deutschen Flüssen. Östron wurde von Wenzel mit einem Median von 2,2 ng/l (Maximum 20,1 ng/l) in 8 Flüssen, 17 α -Ethinylöstradiol mit einem Median von 3,4 ng/l (Maximum 6,7 ng/l) in 5 Flüssen detektiert. Mestranol wurde von Wenzel nur in 3 Flüssen gefunden, allerdings in beträchtlicher Konzentration (Maximum 27,5 ng/l).

Insgesamt sind die veröffentlichten Werte gut vergleichbar mit den eigenen Messungen. Lediglich der hohe Gehalt von 17 β -Östradiol in Probe Schussen 2 übersteigt noch das Maximum der von Wenzel gemessenen Werte. Mögliche Ursachen dieser hohen Konzentration könnten in den Wetterbedingungen zum Zeitpunkt der Probennahme liegen. Starke Regenfälle hatten damals vielerorts zu einer regelrechten Durchspülung der Kläranlagen geführt, das Abwasser gelangte ungeklärt in die Flüsse. Landwirtschaftliche Einflüsse kommen als zweite Ursache in Betracht. Die zu diesem Zeitpunkt ausgebrachte Gülle konnte durch die Regenfälle von den Feldern direkt in die Flüsse geschwemmt werden, ein Überlaufen von Güllegruben ist auch nicht ausgeschlossen. Hohe Östrogenwerte für Gülle wurden von Wenzel (Wenzel et al. 1998) gezeigt. Diese Annahme bestätigt Probe Schussen 1. Hier wurden bei Hochwasser mit 4,0 ng/l 17 β -Östradiol und 9,1 ng/l Östron ebenfalls erhöhte Östrogengehalte festgestellt. All diesen Argumenten widerspricht jedoch, dass zum Zeitpunkt der Probennahme von Schussen 2 die starken Regenfälle schon einen Tag

zuvor geendet hatten, die Hauptbelastung im Fluss also bereits vorüber war. Außerdem führten die Regenfälle auch zu einer Erhöhung der Wassermenge im Fluss, ein erhöhter Eintrag an Substanzen hätte durch diese Verdünnung also zumindest teilweise kompensiert werden müssen.

Alkylphenolpolyethoxylate und Abbauprodukte im Flusswasser :

4-t-Nonylphenol wurde in allen Flusswasser-Extrakten sowie im Flusswasser der Probe Schussen 5 mit einem Median von 8 ng/l bzw. mit 9 ng/l gefunden. 4-t-Octylphenol konnte mit einem Median von 33 ng/l (Maximum 98,4 ng/l), 4-t-Nonylphenoldiethoxylat mit einem Median von 24,7 ng/l (Maximum 65,4 ng/l) detektiert werden. Im Flusswasser von Probe Schussen 5 befanden sich 8,5 ng/l 4-t-Octylphenol und 602,3 ng/l 4-t-Nonylphenoxyessigsäure (4-t-NP2EO: n.a.). In der Wochengangline wurde 4-t-Nonylphenoxyessigsäure in Konzentrationen von bis zu 1,57 µg/l kontinuierlich nachgewiesen. Neuere Daten aus Schweizer Flüssen (Rhein, Glatt und Thur) weisen auf eine geringe Belastung mit 4-t-Nonylphenol (im Mittel 150 ng/l) sowie 4-t-Nonylphenoldiethoxylat (maximal 160 ng/l) hin (Bätscher et al. 1999). In bayrischen Flüssen wurden ebenfalls nur geringe 4-t-Nonylphenolkonzentrationen (~10 – 100 ng/l) gefunden (Zellner und Kalbfus 1997). 4-t-Octylphenol wurde in Flüssen bisher nicht untersucht, Daten aus Kläranlagenabläufen deuten aber auf eine ähnlich niedrige Belastung wie mit Nonylphenol hin (Spengler 1999). All diese Daten weisen auf eine geringe Belastung der lokalen Oberflächengewässer mit Alkylphenolen und ihren Abbauprodukten hin. Lediglich 4-t-Nonylphenoxyessigsäure war in einigen Schussenproben in höherer Konzentration vertreten, Referenzdaten aus anderen Untersuchungen fehlen hierzu jedoch noch gänzlich.

Phytohormone im Flusswasser :

Genistein konnte nur in zwei Extrakten detektiert werden mit Konzentrationen von 2,9 ng/l und 6,3 ng/l. Literaturdaten zu Genistein in Oberflächenwasser liegen derzeit zwar nicht vor, geringe Konzentrationen in Kläranlagenabläufen (Spengler et al. 1999) lassen aber auf sehr kleine bis nicht nachweisbare Konzentrationen im Flusswasser schließen. β-Sitosterol wurde in allen Extrakten nachgewiesen mit einem Median von 190,3 ng/l. Im Flusswasser der Schussen fanden sich kontinuierlich hohe Gehalte von bis zu 1,76 µg/l. Stumpf (Stumpf et al. 1996) fand in allen 20 von ihm beprobten Flüssen β-Sitosterol bis maximal 56 ng/l. Die Messungen von Wenzel (Wenzel et al. 1998) ergaben zum Teil deutlich höhere Werte für β-Sitosterol. Bei einem Median von 288,4 ng/l wurde hier ein Maximalwert von 1279,2 ng/l gefunden.

Der hohe Gehalt an β-Sitosterol im Wasser der Schussen kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen befindet sich im Einzugsgebiet der Schussen eine Papierfabrik.

Papierfabriken setzen β -Sitosterol aus dem benötigten Holz bzw. Recyclingmaterial frei (Tremblay und Van der Kraak 1999). β -Sitosterol ist zudem ein Bestandteil von Pflanzen wie Hopfen und Mais. Das Einzugsgebiet der Schussen ist ein wichtiges Hopfenanbauggebiet. Inwieweit diese Faktoren jedoch tatsächlich für den hohen Gehalt an β -Sitosterol in der Schussen verantwortlich sind, muss noch geklärt werden. Ob die Diskrepanz zwischen den hohen Werten von β -Sitosterol im Flusswasser und den weit geringeren Werten für die Flusswasser-Extrakte auf der verschiedenen Aufarbeitung oder aber auf saisonalen Schwankungen der Konzentration im Fluss beruht, ist zur Zeit ebenfalls noch nicht eindeutig zu beantworten.

Weitere endokrin aktive Substanzen im Flusswasser :

Bisphenol A wurde in allen Flusswasser-Extrakten mit einem Median von 102,4 ng/l gefunden. Probe Schussen 5 weist einen Bisphenol A - Gehalt von 37,8 ng/l auf, in der Wochenganglinie liegen die Werte zwischen 0,03 μ g/l und 0,41 μ g/l. Der von Wenzel (Wenzel et al. 1998) gefundene Medianwert von 23 ng/l mit einem Maximum bei 229 ng/l bestätigt diese Ergebnisse. Die Phthalate Di-n-Butylphthalat (DBP) sowie Benzyl-n-Butylphthalat (BBP) wurden nur für Probe Schussen 5 bestimmt. Mit einem Gehalt von 247,1 ng/l für DBP (BBP nicht auswertbar) entspricht die Belastung in etwa derjenigen des Flusses Rhein bei Weil am Rhein mit einem Mittelwert von 70 ng/l und Maximalwerten von bis zu 1,69 μ g/l für 1996 bzw. 0,51 μ g/l für 1997 (Bätscher et al. 1999).

Einschätzung der Belastungssituation

Die Belastung der Schussen mit Östrogenen war im Zeitraum der Probennahmen nicht einheitlich. Die beiden ersten Proben besaßen einen z.T. weit höheren Gehalt an 17 β -Östradiol bzw. Östron als die Proben von Spätsommer bzw. Frühherbst. Ursache hierfür ist jedoch wahrscheinlich keine saisonale Mehrbelastung in der ersten Hälfte des Jahres, vielmehr scheinen mit dem damaligen Hochwasser klimatische Faktoren für diesen Effekt verantwortlich. Routledge (Routledge et al. 1998) fand bei männlichen Rotaugen (*Rutilus rutilus*) und Regenbogenforellen bei Wasserkonzentrationen von 100 ng/l 17 β -Östradiol nach 3-wöchiger Exposition eine signifikante Induktion von Vitellogenin; diese wurde auch schon bei kleineren Konzentrationen ausgelöst, war jedoch noch nicht signifikant. Hieraus schätzte Routledge eine Schwellenkonzentration für eine Vitellogenininduktion von 1 – 10 ng/l 17 β -Östradiol sowie 25 – 50 ng/l Östron. Für 17 α -Ethinylöstradiol wurde eine Vitellogenininduktion in männlichen Regenbogenforellen schon bei einer Konzentration von 0,1 – 0,5 ng/l und einer Expositionsdauer von 10 Tagen festgestellt (Purdom et al. 1994).

Wochenganglinie Schussen 1.10.2000 - 7.10.2000

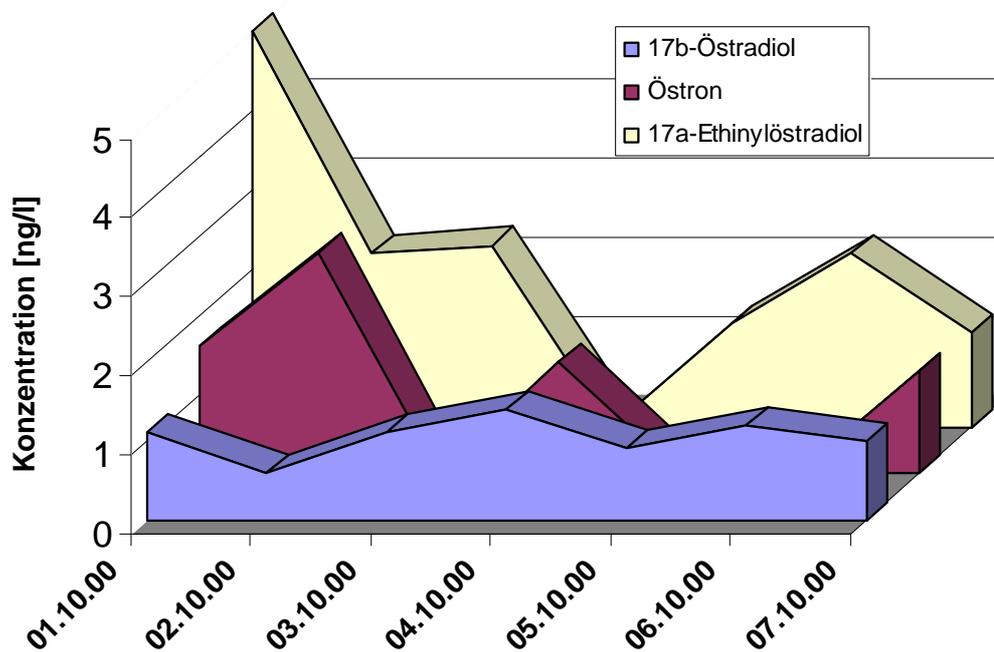


Abb. 4.1: Östrogengehalt im Flusswasser der Schussen-Wochenganglinie

Wie Abb. 4.1 zeigt, war 17 α -Ethinylöstradiol kontinuierlich im Flusswasser der Schussen in Konzentrationen vorhanden, die deutlich über den von Purdom definierten Schwellenwerten für die Induktion von Vitellogenin lagen. Somit kann ein endokriner Effekt dieser Substanz im Wasser der Schussen nicht ausgeschlossen werden. Östron konnte in allen Proben der Schussen detektiert werden, das gemessene Maximum von 9,1 ng/l lag hierbei nur um ca. die Hälfte unter der Schwellenkonzentration. Die 17 β -Östradiolkonzentration lag sogar mit der niedrigsten gefundenen Konzentration noch nahe an der untersten Grenze des Schwellenwerts (1 ng/l), diese unterste Grenze wurde z.T. auch überschritten. Mit 31,8 ng/l (41,6 ng/l) 17 β -Östradiol für Probe Schussen 2 lag der Wert sogar um das 3fache (4fache) über der höchsten Schwellenwertkonzentration (10 ng/l). Berechnet man nun ein, dass die Belastung mit Östrogenen über einen längeren Zeitpunkt zumindest am unteren Ende des Schwellenwertes lag und diesen Schwellenwert zeitweise sogar überstieg, so besteht zumindest die Möglichkeit von adversen Effekten aufs endokrine System vieler Fischen. Die Belastung der Schussen mit anderen endokrin aktiven Substanzen ist als gering zu betrachten und dürfte für Fische kein Risiko bezüglich Auswirkungen aufs endokrine System haben. So liegen für die Regenbogenforelle die Schwellenwerte für eine Vitellogenininduktion durch Nonylphenol bei 10 μ g/l (Lech et al. 1996; Ren et al. 1996) bzw. 20 μ g/l (Jobling et al.

1995). Jobling gibt für Nonylphenoxyessigsäure und Nonylphenoldiethoxylat eine Vitellogeninbildung bei 30 µg/l an (kleinere Konzentrationen wurden nicht getestet), den Schwellenwert für Octylphenol gibt sie mit 4,8 µg/l an. Für Nonylphenol wurde eine geringe Bioakkumulation in Fischgewebe mit einem Faktor von 87 ± 124 festgestellt (Liber et al. 1999). Da in keiner der von uns untersuchten Proben die Schwellenwertkonzentrationen aber auch nur annähernd erreicht wurden, kann somit das Risiko von adversen endokrinen Effekten durch Alkylphenolpolyethoxylate und deren Abbauprodukten auf die Fische der Schussen trotz möglicher Bioakkumulation als nicht existent betrachtet werden. Auch die Belastung der Schussen durch Bisphenol A ist gering, eine Risikoabschätzung ist aber nicht möglich, da über eine östrogene Wirkung auf aquatische Organismen bisher keine Daten bestehen. Versuche mit Primärzellkulturen aus der Leber der Regenbogenforelle zeigten zwar eine Bildung von Vitellogenin durch Bisphenol A, die dafür benötigten Konzentrationen lagen jedoch um ein Vielfaches über den in der Schussen gefundenen Werten (Sumpter und Jobling 1995; eigene Daten). Zudem ist die Bindung an den Östrogenrezeptor der Regenbogenforelle um den Faktor 10000 schwächer als die Bindung von 17β-Östradiol. Somit ist davon auszugehen, dass auch Bisphenol A in der gemessenen Konzentration keine endokrinen Effekte auf die Fischpopulation der Schussen hervorruft. Das gleiche gilt auch für Dibutylphthalat (DBP). Auch zu diesem Stoff bestehen fürs aquatische Milieu nur Daten aus *in vitro* Experimenten. Diese liefern zum Teil widersprüchliche Aussagen (Jobling et al. 1995; Petit et al. 1997; Zacharewski et al. 1998), bestenfalls kann aber von einer sehr schwachen östrogenen Aktivität von DBP und anderen Phthalaten gesprochen werden. In Anbetracht der geringen Konzentration an DBP kann also eine Gefahr weitgehend ausgeschlossen werden, eine endgültige Risikobewertung für diesen Stoff ist aber aufgrund der nur einmaligen GC-MS - Messung nicht möglich. Für Genistein bestehen ebenfalls keine Daten über Einflüsse aufs aquatische Milieu, Daten aus *in vitro* Tests lassen aber auf eine potentielle Gefährdung aquatischer Organismen schließen. Da allerdings die Konzentration an Genistein in der Schussen nur sehr klein bis nicht detektierbar ist, kann eine solche Gefährdung durch Genistein ausgeschlossen werden. β-Sitosterol zeigte ab Konzentrationen von 25 µg/l und dreiwöchiger Exposition in sexuell undifferenzierten Regenbogenforellen eine Induktion von Vitellogenin, diese erreichte aber auch bei höheren Konzentrationen (bis 150 µg/l) nicht annähernd die bei niedrigerer Östradiolkonzentration (0,25 µg/l) ausgelöste Antwort (Tremblay und Van der Kraak 1998). Zwar liegt die maximale β-Sitosterol-Konzentration der Schussen nur ein zwanzigstel unter der effektiven Konzentration von 25 µg/l, durch die geringe östrogene Potenz von β-Sitosterol ist jedoch ein östrogenen Einfluss auf die Fischpopulation der Schussen nur unwahrscheinlich. Selbst bei additiver Verstärkung wären die Einzelwirkungen aller Nicht-Östrogene zu klein um eine hormonelle Wirkung auszulösen. Somit ist

anzunehmen, dass in der Schussen nur die Östrogene, allen voran 17 α -Ethinylöstradiol und 17 β -Östradiol, adverse Effekte aufs endokrine System vieler Fische besitzen können.

Die Belastung des Flusses Seefelder Aach konnte nur anhand einer analysierten Probe abgeschätzt werden. Der Gehalt an Östrogenen war etwas geringer als in der Schussen. Alle weiteren endokrin aktiven Substanzen wurden in z.T. viel kleineren Konzentrationen gefunden. Betrachtet man die Bevölkerungsstruktur sowie die Zahl an industriellen Betrieben im Einzugsgebiet der Seefelder Aach so ist dieses Ergebnis nicht verwunderlich. Östrogene sind in beiden Flüssen zu finden, aufgrund der höheren Bevölkerungsdichte jedoch mehr in der Schussen. Nonylphenol, Oktylphenol und Nonylphenoldiethoxylat sind nur in Spuren zu finden. Diese Spuren können aus den wenigen Industriebetrieben, aber auch aus in Haushalten verwendeten Reinigungsmitteln etc. stammen. Ebenso verhält es sich mit Bisphenol A, Genistein und β -Sitosterol. Insgesamt betrachtet ist die Belastung der Seefelder Aach mit endokrin aktiven Substanzen in der untersuchten Probe nur sehr gering. Es scheint somit zwar wahrscheinlich, dass das Risiko adverbser Effekte auf das endokrine System aquatischer Organismen gering ist, eine endgültige Risikoabschätzung ist jedoch aufgrund der nur einmaligen Analyse nicht möglich.

4.2.2 Endokrin aktive Stoffe im Ablauf der Kläranlage Langwiese

Die Stichprobe der Kläranlage zeigte für alle Substanzen außer 4-t-Octylphenol nur eine sehr geringe Belastung. Wenzel (Wenzel et al. 1998) berichtet für vergleichbare Kläranlagen (kommunal, mittlere industrielle Einleiter, Krankenhäuser, < 50000 Einwohner) von Östrogenkonzentrationen von 20,3 – 43,5 ng/l 17 β -Östradiol (Median 21,8 ng/l) und 1,5 – 68,6 ng/l Östron (Median 6,9 g/l). Mestranol und 17 α -Ethinylöstradiol konnten von ihm, wie bei uns auch, nicht gefunden werden. In 7 englischen Kläranlagenausläufen wurden Konzentrationen von 2,7 – 48 ng/l für 17 β -Östradiol, 1,4 – 76 ng/l für Östron sowie 0 – 7,0 ng/l 17 α -Ethinylöstradiol gefunden (Desbrow et al. 1998). Mit Medianwerten von 4,2 ng/l für 17 β -Östradiol, 5,1 ng/l für Östron, 2,0 ng/l für 17 α -Ethinylöstradiol und 1,0 ng/l für Mestranol liegt Spengler (Spengler et al. 1999) ebenfalls leicht über den von uns bestimmten Werten. Lediglich die von Ternes bzw. Stumpf ermittelten Östrogengehalte liegen ebenfalls im Konzentrationsbereich von nicht bestimmbar bis wenige Nanogramm pro Liter (Stumpf et al. 1996; Ternes et al. 1999; Ternes et al. 1999). Die Konzentration an Nonylphenol und Nonylphenoldiethoxylat in der Kläranlage Langwiese liegt mit 25,1 ng/l und 41,9 g/l weit unter den von Spengler gefundenen Medianwerten von 757 ng/l und 2248 ng/l. In einer kleinen schwedischen Kläranlage mit v.a. kommunaler Belastung konnten ebenfalls ein weit höherer Wert für Nonylphenol mit 840 ng/l gefunden werden

(Larsson et al. 1999). Der Wert für 4-t-Octylphenol jedoch ist mit einer Konzentration von 397 ng/l ungewöhnlich hoch, übersteigt die von Spengler ermittelten Werte um das 4fache (Spengler 1999). Die Belastung der Kläranlage Langwiese mit Bisphenol (66,2 ng/l) entspricht weitgehend derjenigen, die auch von Spengler (Spengler 1999) und Wenzel (Wenzel et al. 1998) in deutschen Kläranlagen gefunden wurde. Die Belastung der Kläranlage Langwiese mit Phytohormonen hingegen ist weit geringer als es die Werte von Spengler und Wenzel mit einem Median von 709 ng/l bzw. 503,5 ng/l vermuten lassen, lediglich Stumpf (Stumpf et al. 1996) befindet sich mit einem Median von 89 ng/l β -Sitosterol in 20 deutschen Kläranlagen (Maximum 402 ng/l) in einen ähnlichen Konzentrationsbereich.

Insgesamt sind die für die Kläranlage Langwiese ermittelten Werte für endokrin aktive Substanzen sehr niedrig, liegen noch unter den in anderen deutschen Kläranlagen ermittelten Konzentrationen. Lediglich der hohe Wert für 4-t-Octylphenol erstaunt. 4-t-Octylphenol kommt beispielsweise in der Textilindustrie sowie der Farbenindustrie zum Einsatz. Tatsächlich befindet sich nur wenige Meter von der Kläranlage eine textilverarbeitende Fabrik, ob zwischen dieser Fabrik und dem hohen Gehalt an Octylphenol jedoch ein Zusammenhang besteht, muss noch geklärt werden. Die Ergebnisse dieser einen Stichprobe aus der Kläranlage Langwiese dürfen zudem nicht überbewertet werden. Zum einen handelte es sich nur um eine Stichprobe, die meisten Werte aus der Literatur stammen jedoch aus Mischproben. Mögliche Schwankungen im Substanzgehalt wurden also durch unsere Messungen nicht erfasst, es könnte also durchaus möglich sein, dass zum Zeitpunkt der Probennahme ein Belastungsminimum erreicht war. Zudem handelt es sich nur um eine Messung, um eine Aussage über eine durchschnittliche Belastung treffen zu können, müssten aber Messungen an mehreren Tagen, auch saisonal verteilt, erfolgen. Somit ist eine Risikoabschätzung für die Kläranlage Langwiese nicht möglich, hierzu müssten mehr Daten vorliegen. Auch die bestehende Messung ist nicht eindeutig bewertbar. Da die Östronkonzentration nicht auswertbar war, ist eine Abschätzung des Risikos durch die Östrogene nicht möglich. Lediglich alle anderen endokrin aktiven Substanzen liegen in der vorliegenden Messung in Konzentrationen vor, die ein Risiko auf aquatische Organismen, zumal nach Einleitung des Abwassers in die Schussen noch eine Verdünnung der Substanzen erfolgt, ausschließen.

4.2.3 Pharmaka im Flusswasser der Schussen

Die Belastung der Schussen mit Pharmaka ist gut vergleichbar mit der Belastung in anderen deutschen Flüssen. Zu nennen ist hier v.a. ein umfangreiches Screening-Programm verschiedener Pharmaka in 40 deutschen Flüssen, das vom ESWE-Institut für Wasserforschung und Wassertechnologie, Wiesbaden, unter der Leitung von T. Ternes durchgeführt wurde (Ternes et al. 1999). Auch die Schussen wurde schon auf Pharmaka getestet (Hetzenauer 1998). Hierbei konnten im Wesentlichen die Substanzen gefunden werden, wie sie auch in unserer Analyse nachgewiesen wurden. Auch die Konzentrationen waren gut vergleichbar. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die von uns nachgewiesenen Pharmaka ubiquitär in deutschen Flüssen in vergleichbarer Konzentration vorhanden sind. Für diese Pharmaka ist demnach durchaus eine chronische Belastung gegeben. Dies verdeutlicht auch die von uns gemessene Wochenganglinie. Abb. 4.2 zeigt die Konzentrationen für den Lipidsenker Bezafibrat, das Antirheumatikum Diclofenac sowie für das Antiepileptikum Carbamazepin und das Analgetikum Propiphenazon. Die Konzentration an Diclofenac schwankt im Probennahmezeitraum zwischen 41 ng/l und 137 ng/l, während die Konzentration an Propiphenazon in den Schussenproben relativ konstant ist. Eine Tendenz ist hieraus allerdings nicht erkennbar.

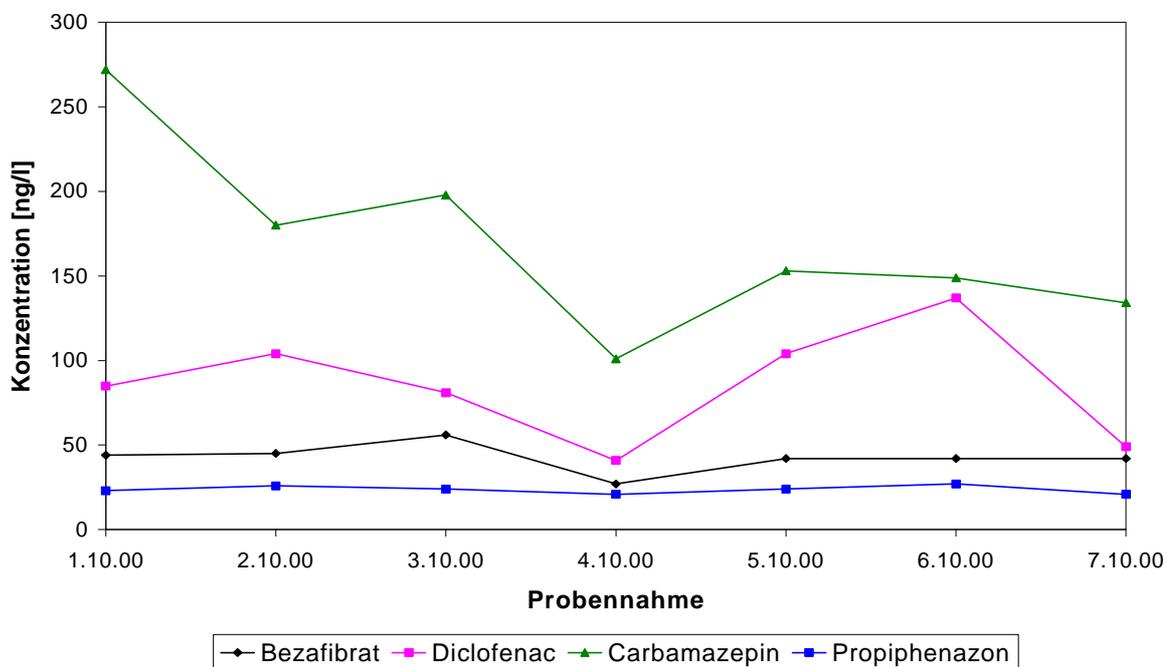


Abb. 4.2: Schussen-Wochenganglinie für Bezafibrat, Diclofenac, Carbamazepin und Propiphenazon

Zur Toxizität der nachgewiesenen Pharmaka auf aquatische Organismen ist kaum etwas bekannt, wenn überhaupt beschränkt sich die Information auf standardisierte Ökotoxikologietest wie etwa den Daphnien Immobilisationstest oder Embryotoxizitätstests wie den DRETA oder den FETAX (Pfluger et al. 2000; Pfluger und Dietrich 2000; Dietrich et al. 1998; Dietrich und Prietz 1999). Genau diese Tests wurden von uns deshalb auch angewendet, um die Toxizität bzw. Embryotoxizität der Wasserproben zu bestimmen. Hierdurch sollte geklärt werden, ob im Flusswasser Substanzen vorhanden sind, die toxische Effekte hervorrufen können. Zwar wurden in einigen Proben solche Substanzen (Pharmaka und endokrin aktive Substanzen) identifiziert, ihre Konzentration war jedoch zu gering, um toxische Effekte auslösen zu können. Sollten dennoch toxische Effekte auftreten, könnten demnach entweder unbekannte Substanzen dafür verantwortlich sein, oder aber die identifizierten Substanzen besitzen eine synergistische bzw. über-additive Wirkung im Gemisch.

4.3 Untersuchung der akuten Toxizität sowie Embryotoxizität von Flusswasserproben

Die Untersuchung der Schussen-Wochenganglinie im Daphnientest erbrachte keinen toxischen Effekt, d.h. im Wasser der Schussen befanden sich keine Substanzen, die einen toxischen Effekt in diesem Testsystem hatten. Dies bedeutet jedoch nicht, dass auch tatsächlich keine toxischen Substanzen in den Wasserproben vorhanden waren. Hierzu ist der Daphnien-Immobilisations-Assay zu insensitiv, Effekte treten erst bei hohen Konzentrationen auf. Mit diesem Test könnte deshalb nur eine sehr hohe Gewässerverschmutzung zweifelsfrei nachgewiesen werden, wie sie praktisch nur noch nach Unfällen oder direkt an stark belasteten Kläranlagenausläufen gefunden werden kann. Generell ist der Einsatz von Akuttests zur Testung von Wasserproben als eher fragwürdig einzustufen, da sich viele toxischen Effekte erst zu einem späteren Zeitpunkt manifestieren. So ist beispielsweise die Wirkung von endokrin aktiven Stoffen auf embryonale / juvenile Fische oft erst mit dem Erreichen der Geschlechtsreife feststellbar.

Gerade dieser Abschnitt, also die Embryonalentwicklung, ist oft ein sehr kritisches Fenster für die Wirkung von toxischen Substanzen. Aus diesem Grund wurden deshalb von uns zwei Embryotoxizitätstests durchgeführt, der DRETA sowie der FETAX. Beide Tests sind zwar mit 96 h Dauer eher den Akuttests zuzuordnen, sie besitzen jedoch einige entscheidende Vorteile. Größter Vorteil ist die rasante Entwicklung der beiden Spezies. In nur 96 h durchlaufen die Embryonen im FETAX ca. 45 Stadien (Nieuwkoop und Faber, 1975) vom Einzellerstadium übers Schlüpfen bis zur Kaulquappe, die bei

heimischen Fröschen weit länger dauern. Trotzdem aber sind nach Bantle (Bantle, 1995) Ergebnisse aus dem FETAX gut mit Daten für andere Frosch-Spezies vergleichbar. Der Vergleich von Ergebnissen aus dem DRETA, der mit dem Zebrafisch auch keine heimische Art verwendet, mit Daten aus anderen Toxizitäts-Tests zeigt ebenfalls, dass auch hier keine starken Abweichungen zu finden sind und die angegebenen Daten somit also durchaus relevant sind. Die Verwendung anderer Spezies für einen 96 h-Embryotoxizitätstest ist zudem nur schwer möglich, da die Eiablage bei anderen Arten nicht im Labor, z.B. durch Injektion von Hormonen im FETAX, stimuliert werden kann. Neben der guten Eignung von Zebrafisch (*Danio rerio*) und Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) als Labortiere sind also v.a. die rasante Entwicklung sowie die gute Vergleichbarkeit der erzielten Ergebnisse mit den Daten aus anderen Labors rund um den Globus von entscheidender Bedeutung. Zudem sind die Endpunkte, also Mortalität, Malformation sowie Länge, gut erkennbar sowie dokumentierbar. Schließlich haben sich beide Testsysteme noch als sensitiv zur Erfassung von embryotoxischen Effekten durch wasserbürtige Stoffe erwiesen, wie z.B. Untersuchungen von Diclofenac im DRETA zeigten (Dietrich et al. 1998; Dietrich und Prietz 1999).

Die Untersuchung der Wasserproben ergab weder für den DRETA noch für den FETAX embryotoxische Effekte. Somit könnte man darauf schließen, dass in den untersuchten Wasserproben tatsächlich keine embryotoxischen Substanzen vorhanden sind. Wie die GC-MS Analysen aber ergaben, sind in den Wasserproben durchaus Substanzen vorhanden, die, allerdings in weit höheren Konzentrationen, embryotoxische Effekte auslösen könnten. Die beiden Tests DRETA und FETAX besagen also lediglich, dass keine Embryo-Toxizität in Form von Mortalität, Malformation oder Längenänderung gefunden werden kann. Ob aber im Wasser vorhandene Substanzen einen anderweitigen, spezifischen Effekt auslösen können, wird nicht erfasst. So ist es beispielsweise nicht sinnvoll, akute Toxizitätstests oder Embryotoxizitätstests zur Untersuchung des ökotoxikologischen Potentials von 17 α -Ethinylöstradiol zu verwenden, wenn bereits bekannt ist, dass endokrinologische Endpunkte von weit größerer Relevanz sind. Dies wird auch durch eine Studie von Henschel und Mitarbeitern verdeutlicht (Henschel et al 1997). Hier wurden 4 Pharmaka in verschiedenen Standardtests sowie nichtstandardisierten Ökotoxikologie-Tests untersucht. Wie sich hierbei zeigte, waren die Nicht-Standard Tests, z.B. eine BF-2 Fischzelllinie, weit sensitiver als die Standardtests. Ursache hierfür war die Wahl von relevanten Endpunkten. Für die Abschätzung des ökotoxikologischen Risikos einer Substanz sollte daher großes Augenmerk gelegt werden auf die Wahl des richtigen Testsystems mit relevanten Endpunkten, die den spezifischen Wirkmechanismus der Substanz mit erfassen.

4.4 CERBA – Bindungsstudien

4.4.1 Bindung von Einzelsubstanzen an den Östrogenrezeptor

Zur Bestimmung der Bindung von Einzelsubstanzen wurde der Östrogenrezeptor der Regenbogenforelle auf seine Affinität und Anzahl charakterisiert. Der Sättigungsassay ergab hierbei eine einheitliche und homologe Rezeptorpopulation mit einer K_d von $1,02 \pm 0,25$ nM und einem B_{max} von $72,7 \pm 9,7$ fmol/mg Protein. Diese Werte entsprechen den bisher veröffentlichten Daten zum Östrogenrezeptor der Regenbogenforelle (Campbell et al. 1994; Chou 1999; Krieger 1999). Die Bindung des natürlichen Liganden 17β -Östradiol an den Östrogenrezeptor erwies sich mit einem IC_{50} von 1,79 nM als die stärkste aller getesteten Substanzen. Der IC_{50} – Wert war dabei gut vergleichbar mit den effektiven Konzentrationen anderer Veröffentlichungen (Thomas und Smith 1993; Flouriot et al. 1995; Le Dréan et al. 1995; Chou 1999; Krieger 1999). 17β -Östradiol erwies sich in anderen *in vitro* Testsystemen auch als hochaktiv, löste z.B. mit einer Schwellenwertkonzentration von 0,1 nM die Bildung von Vitellogenin sowie Östrogenrezeptor in primären Hepatocyten-Zellkulturen der Regenbogenforelle aus. Auch in Reporter-Gen-Assays (Petit et al. 1997) und Proliferations-Assays wie dem E-Screen Assay (Soto et al. 1995) erwies sich 17β -Östradiol als starker Agonist. Die natürlichen Metabolite Östron sowie Östriol zeigten ebenfalls eine starke Bindung an den Rezeptor, wenn auch um den Faktor 3 bzw. 35 schwächer als 17β -Östradiol. Die Bindung an den menschlichen Östrogenrezeptor α war für Östron um den Faktor 2, für Östriol um den Faktor 8 schwächer (Kuiper et al. 1997). Trotzdem aber wurde für Östriol im E-Screen Assay ein höherer Proliferationseffekt der menschlichen Brusttumorzellen festgestellt als für Östron (1/10 der 17β -Östradiolantwort gegen 1/100) (Soto et al. 1995). In einem Reporter-Genassay mit dem Östrogenrezeptor der Regenbogenforelle wurde für beide Substanzen eine um den Faktor 100 schwächere Transkription als für 17β -Östradiol festgestellt (Petit et al. 1995). Somit sind beide Substanzen zwar volle Agonisten, zumindest im Fall von Östron bedeutet aber die Bindung an den Östrogenrezeptor noch nicht, dass auch eine Genantwort ausgelöst wird. Dies ist im Hinblick auf den Gesamtorganismus wichtig. Die Metabolite Östron sowie v.a. Östriol werden in der Leber gebildet und gelangen übers Blut in die Niere, letztendlich erfolgt die Ausscheidung v.a. von Östriol über den Urin. Der Transport im Blut bringt die Metabolite jedoch auch zu den Zielzellen des natürlichen Hormons 17β -Östradiol. Würde hier eine Bindung an den Rezeptor auch eine Antwort hervorrufen, so würde sich hierdurch die Regulation des östrogenen Hormonsystems im Körper stark verlangsamen, da lediglich durch die langsame Ausscheidung der Metaboliten, nicht aber durch die schnelle Metabolisierung des 17β -Östradiols durch Enzyme der Leber eine Regulation erfolgen könnte. Folglich besitzen beide Metaboliten zwar durch ihre

sehr ähnliche chemische Struktur noch eine hohe Affinität zum Östrogenrezeptor, eine Bindung führt jedoch nicht automatisch zu einer Aktivierung der Transkription. Die natürlich im Körper vorkommenden Östron- bzw. Östriolkonzentrationen führen also zwar nicht zu einer hormonellen Antwort, wird dieser Spiegel im Blut aber künstlich erhöht, so kann dennoch eine Antwort hervorgerufen werden. Diese künstliche Zufuhr ist z.B. für Fische denkbar durch die Aufnahme von im Flusswasser befindlichem Östron oder Östriol über die Kiemen, der gleiche Effekt wurde aber auch medizinisch genutzt durch die orale Verabreichung des Metaboliten Östron in frühen Formen der Anti-Baby-Pille. Die heute verabreichten Kontrazeptiva beinhalten zumeist ein synthetisch hergestelltes Östrogen, das 17 α -Ethinylöstradiol. Dieses wird in der Leber nur langsam metabolisiert und verweilt dadurch sehr viel länger im Blutkreislauf, an den Zielzellen wirkt es anschließend wie 17 β -Östradiol. Für den menschlichen Östrogenrezeptor wurde für 17 α -Ethinylöstradiol sogar eine etwas höhere Bindung als für 17 β -Östradiol festgestellt (Andersen et al. 1999), der Effekt im E-Screen-Assay war für beide Substanzen gleich hoch (Soto et al. 1995). Die gezeigte Bindung an den Östrogenrezeptor der Regenbogenforelle war etwa um den Faktor 5 schwächer als die Bindung von 17 β -Östradiol, die Vitellogenininduktion in primären Hepatozyten-Zellkulturen männlicher Lachsforellen setzte aber schon bei gleicher Konzentration (1nM) ein. Diese gegenüber der Bindung verstärkte Genantwort ist evtl. durch die langsamere Metabolisierung von 17 α -Ethinylöstradiol erklärbar: 17 β -Östradiol wird von den Hepatozyten schneller abgebaut und steht dadurch der Zelle weniger lang zur Verfügung. 17 α -Ethinylöstradiol ist also wie 17 β -Östradiol ein sehr potentes Östrogen und schon in kleinsten Konzentrationen hochwirksam, eine Bindung an den Rezeptor führt bei beiden Substanzen zu einer direkten Genantwort. Östron und Östriol binden ebenfalls mit einer hohen Affinität, die Genantwort erfolgt aber erst bei höheren Konzentrationen, als es die Bindung anzeigt. Insgesamt betrachtet sind die effektiven Konzentrationen aber in den gezeigten *in vitro* Testsystemen für alle untersuchten Östrogene sehr gering.

Eine ähnlich kleine effektive Konzentration verspricht aus den Bindungsstudien von allen weiteren getesteten Substanzen nur das Phytohormon Genistein. Dieses besitzt mit einer IC₅₀ von 64 nM etwa die selbe Affinität zum Östrogenrezeptor wie Östriol. Vorhergehende Bindungsstudien zeigten für Genistein eine ca. hundertfach schwächere Bindung als für 17 β -Östradiol (Tremblay und Van der Kraak 1998), die von Knudsen gefundene Bindung war sogar 1000fach schwächer (Knudsen und Pottinger 1999). Die höhere Affinität in unseren Bindungsstudien kann hierbei verschiedene Ursachen wie etwa Unterschiede in der Aufzucht und Haltung der Fische oder in der Präparation des Zytosols haben, eine endgültige Klärung dieser Frage ist aber nicht möglich. Versuche an Hepatozyten-Zellkulturen der Regenbogenforelle zeigten, dass die Bindung von Genistein nicht direkt auch eine Genantwort auslöst. Erst bei einer Konzentration von

10^{-5} M konnte die Bildung von Vitellogenin und Östrogenrezeptor beobachtet werden, der IC₅₀ – Wert für die Bindung lag aber um das 150fache unter dieser Konzentration. Diese Diskrepanz zwischen Bindung und verspäteter Genantwort wurde auch schon in anderen *in vitro* Tests an Ratte und Mensch gezeigt (Hopert et al. 1998; Stahl et al. 1998). Damit könnte Genistein in kleinen Konzentrationen als Antagonist wirken, da es die Bindungsstellen am Rezeptor besetzt und somit keine Aktivierung der Genexpression durch 17 β -Östradiol zulässt. Dies würde für den Gesamtorganismus anti-östrogene Effekte bedeuten. Tierversuche an Ratten und Mäusen sowie Zellkulturversuche mit menschlichem Gewebe zeigten aber, dass die Wirkung aufs endokrine System nicht definitiv einer östrogenen oder anti-östrogenen Wirkung durch eine Rezeptorbindung als Agonist bzw. Antagonist zuzuordnen ist. Vielmehr scheinen auch weitere Faktoren wie etwa eine Hemmung der P450-abhängigen Monooxygenase Aromatase, die für die Umwandlung von Testosteron zu Östradiol verantwortlich ist, eine Rolle zu spielen (Pelissero und Lenczowski 1996). Dieser Effekt könnte auch für die Hemmung des Tumorwachstums bei Ratten nach Fütterung mit Genistein verantwortlich sein (Kao et al. 1998). Interessant ist in diesem Zusammenhang aber auch die Bindung an den menschlichen Östrogenrezeptor Beta. (ER β). Genistein zeigt für den β -Rezeptor eine 20fach höhere Affinität als für den α -Rezeptor. Welche Bedeutung dies für den menschlichen Organismus hat ist noch unklar. In der Regenbogenforelle wurde (noch) kein zweiter Östrogenrezeptor gefunden, Versuche mit Hepatozyten-Zellkulturen ergaben aber in der PCR eine zweite Bande für den Östrogenrezeptor. Ob es sich hierbei jedoch um einen funktionellen eigenständigen Rezeptor oder aber nur um ein Splicing- oder Abbauprodukt handelt, muss noch geklärt werden. Genistein hat also einen Einfluss auf das endokrine System von Fischen, der genaue Mechanismus ist aber noch nicht verstanden. Ebenso verhält es sich mit dem zweiten untersuchten Phytohormon β -Sitosterol. Hier wurden nach Fütterung junger Regenbogenforellen mit β -Sitosterol Effekte wie eine Vitellogenininduktion, eine Reduktion der Plasma-Steroidgehalte sowie eine schwache Bindung an den Östrogenrezeptor beschrieben (Tremblay und Van der Kraak 1998). Die Reduktion der Plasma-Steroide beruht vermutlich auf einer Hemmung der Aktivität des Enzyms Cytochrom P₄₅₀SCC (Side Chain Cleavage). Dieses Enzym ist für die Transformation des Steroidvorläufers Cholesterol zu Pregnenolon verantwortlich. Die Induktion der Vitellogeninsynthese ist auf die Bindung β -Sitosterols an den Östrogenrezeptor zurückzuführen (Tremblay und Van der Kraak 1998). In unseren Bindungsstudien konnte eine solche Bindung an den Östrogenrezeptor nicht bestätigt werden. Selbst bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 10^{-3} M ist keine Bindung erkennbar. Auch in Tests mit primären Hepatozyten Zellkulturen der Regenbogenforelle konnte keine Induktion von Östrogenrezeptor-mRNA bzw. Vitellogenin-mRNA gefunden werden. Auch in menschlichen MCF-7 Brustzellen zeigte β -Sitosterol keine proliferativen

Effekte (Mellanen et al. 1996). Die widersprüchlichen Ergebnisse können mannigfaltige Ursachen haben. So stammt das von Tremblay verwendete β -Sitosterol aus einer eigenen Präparation, das in unserer Arbeitsgruppe verwendete β -Sitosterol wurde jedoch käuflich bei Sigma erworben. Beachtet man nun, dass evtl. für einen östrogenen Effekt von β -Sitosterol eine vorhergehende Metabolisierung nötig ist, wie von Mellanen postuliert (Mellanen et al. 1996), so ist es möglich, dass schon ein geringer Unterschied in der Molekülstruktur den Effekt beeinflusst. Die postulierte Metabolisierung könnte auch für das unterschiedliche Ergebnis in der Zellkultur verantwortlich sein. Möglicherweise besaßen die Zellkulturen Tremblays eine höhere Metabolisierungsaktivität als unsere Zellen. Für Bindungsstudien und Zellkulturen gilt außerdem, dass Unterschiede in der Wahl der Fische das Ergebnis stark beeinflussen können. Tremblay verwendete unreife Fische beiderlei Geschlechts (ca. 500 g) und behandelte sie vor Präparation zweimal mit 17β -Östradiol zur Erhöhung der Rezeptordichte. Die in unseren Bindungsstudien verwendeten Fische waren reife Weibchen zwischen 600 und 1000 g, die nicht vorbehandelt waren. Weiterhin sind Unterschiede in der Präparation und in der Testdurchführung (andere Puffer, mehr Rezeptor pro Ansatz bei Tremblay) möglicherweise für die unterschiedlichen Ergebnisse verantwortlich. In jedem Fall aber erscheint eine Klärung dieser Frage als sinnvoll, da β -Sitosterol in der aquatischen Umwelt sehr häufig in z.T. hoher Konzentration gefunden wird und in *in vivo* Experimenten schon als östrogen-aktiver Stoff identifiziert wurde (siehe Kapitel 4.2.1). Zusätzlich wird aus der Untersuchung der Phytohormone klar, dass zur genauen Charakterisierung der endokrinen Wirkung dieser Substanzen mehrere *in vitro* Tests benötigt werden, um die oft vielfachen Wirkungen dieser Substanzen alle erfassen zu können.

Nonylphenol zeigte in unseren Bindungsstudien eine um das 10000fache schwächere Affinität zum Östrogenrezeptor als 17β -Östradiol. Dieser Wert liegt im Einklang mit der von Flouriot, Knudsen und White gefundenen Bindung (White et al. 1994; Flouriot et al. 1995; Knudsen und Pottinger 1999). Die Induktion von Vitellogenin- bzw. Östrogenrezeptor-mRNA in Hepatozyten-Zellkulturen der Regenbogenforelle setzte ebenfalls ab einer Konzentration von 10^{-5} M ein. Auch im E-Screen Assay an menschlichem Brusttumorgewebe konnte ab $10 \mu\text{M}$ Nonylphenol der maximale Zellertrag (30 pM für 17β -Östradiol) mit einer Relativen Proliferativen Potenz (RPP) von $3 * 10^{-4}$ erzielt werden (Soto et al. 1995), die Bindung am menschlichen Östrogenrezeptor erwies sich mit $4,3 \mu\text{M}$ etwas höher als bei der Regenbogenforelle (Andersen et al. 1999). Östrogen-Antagonisten wie Tamoxifen konnten die östrogenen Effekte von Nonylphenol blockieren (White et al. 1994; Flouriot et al. 1995), die Wirkung von Nonylphenol beruht also auf der Bindung an den Östrogenrezeptor. Wie für die Phytohormone wurden aber auch für Nonylphenol noch weitere mögliche Effekte wie z.B. die Aktivierung von Steroid-Hydroxylasen und P450 – Cytochromen

sowie die Erhöhung der Zahl der konjugierenden Enzyme festgestellt (Arukwe et al. 1997). Bisphenol A zeigte eine um den Faktor 2 höhere Bindung an den Östrogenrezeptor der Regenbogenforelle als Nonylphenol. Die Induktion der Vitellogenin- und Östrogenrezeptor-mRNA in Primärzellkulturen aus der Leber der Regenbogenforelle erfolgte wie für Nonylphenol ab einer Konzentration von 10^{-5} M. Auch in Testsystemen wie dem E-Screen-Assay erwies sich Bisphenol A als östrogen wirksam (Bätscher et al. 1999), eine Bindung an den menschlichen Östrogenrezeptor á wurde ebenfalls gezeigt (Andersen et al. 1999). Die Bindung an den Östrogenrezeptor ist damit für die östrogene Wirkung von Bisphenol A verantwortlich, daneben wurde aber auch schon über androgene Effekte in Hefezell-Assays durch Bisphenol A berichtet (Sohoni und Sumpter 1998).

Von allen untersuchten Pharmaka zeigte nur Diclofenac eine Bindung an den Östrogenrezeptor der Regenbogenforelle. In Hepatozyten-Zellkulturen der Regenbogenforelle konnte Diclofenac allein keine Induktion von Vitellogenin- und Östrogenrezeptor-mRNA auslösen. Vergleichswerte zu diesen und weiteren *in vitro* bzw. *in vivo* Tests existieren derzeit nicht. Mit einem IC_{50} -Wert von 1,22 mM für die Bindung an den Östrogenrezeptor der Regenbogenforelle liegt aber die effektive Konzentration weit über der in deutschen Flüssen gefundenen Maximalkonzentration von ca. 4 nM (Schussen : maximal 0,7 nM Diclofenac) (Hetzenauer 1998; Ternes et al. 1999), ein endokriner Effekt über die Bindung an den Östrogenrezeptor ist also für Diclofenac im Flusswasser auszuschließen. Inwieweit Diclofenac jedoch trotzdem einen Effekt aufs endokrine System aquatischer Organismen über andere Mechanismen als die Östrogenrezeptor-induzierte Genantwort hat, ist aufgrund der fehlenden Daten nicht möglich. Dies gilt auch für die weiteren untersuchten Pharmaka. Keiner dieser Stoffe zeigt eine Bindung an den Östrogenrezeptor, weitere *in vitro* oder *in vivo* Tests wurden bisher jedoch nicht durchgeführt. β -Sitosterol zeigte ebenfalls keine Bindung an den Rezeptor, *in vivo* konnten aber östrogene Effekte durch β -Sitosterol festgestellt werden. Dies zeigt, dass die untersuchten Pharmaka nicht aufgrund eines Tests bewertet werden dürfen, für eine Risikoabschätzung ist die Datenlage also zu klein.

Wertung und Kritik :

Die Untersuchung der Bindung von Einzelsubstanzen an den Östrogenrezeptor ist ein nützliches Instrument zur Abschätzung der östrogenen Potenz vieler Umweltchemikalien. Substanzen wie 17 β -Östradiol, 17 α -Ethinylöstradiol, Nonylphenol und Bisphenol A rufen nach Bindung an den Östrogenrezeptor direkt eine Genantwort aus. Die effektiven Konzentrationen von Rezeptorbindung und Genantwort sind hierbei weitestgehend gleich. Auch die Minimalkonzentrationen für einen östrogenen Effekt dieser Substanzen in *in vivo* Experimenten korrelieren sehr stark mit den effektiven Konzentrationen der *in vitro* Tests (siehe Diskussion GC-MS, Kapitel 4.2). Dass allerdings die Bindung einer Substanz an den Östrogenrezeptor auch nicht überbewertet werden darf, wird ebenfalls aus den Bindungsstudien ersichtlich. Stoffe wie Östron und v.a. Genistein binden zwar mit hoher Potenz an den Östrogenrezeptor, sie rufen aber erst bei höherer Konzentration auch eine Antwort hervor. Dies könnte also bedeuten, dass diese Substanzen in hoher Konzentration als Agonisten, d.h. östrogen wirken, in kleinen Konzentrationen aber als Antagonisten, d.h. anti-östrogen wirken. Dies konnte nur durch einen weiteren *in vitro* Test mit anderen untersuchten Endpunkten (Vitellogenin- und Östrogenrezeptor-mRNA – Synthese) gezeigt werden. Die Durchführung verschiedener Testsysteme ist also wichtig um alle oft widersprüchlichen Effekte erfassen zu können. Damit ist es auch möglich andere Mechanismen als die durch Bindung an den Östrogenrezeptor induzierte Genantwort zu messen (siehe Genistein, β -Sitosterol, Nonylphenol, Bisphenol A). Ein Kritikpunkt am Bindungs-Assay ist außerdem, dass nur die Bindung der Originalsubstanz bestimmt wird. Oft entstehen aber während der Passage einer Substanz durch die Kläranlage oder aber nach Aufnahme in den Organismus Metaboliten dieser Substanz. Ob ein Metabolit aber besser an den Östrogenrezeptor binden und dadurch eine Antwort auslösen kann, kann durch den Bindungs-Assay nicht geklärt werden. Ein negativer Befund im Bindungs-Assay bedeutet also nicht, dass diese Substanz auch keine Östrogenrezeptor-induzierte Genantwort hervorrufen kann (siehe β -Sitosterol). Zudem ist eine Übertragung der Ergebnisse der Bindungsstudien auf den Gesamtorganismus nicht ohne weiteres möglich, da der Bindungs-Assay in einem stark vereinfachten zellfreien System durchgeführt wird. Hier liegt der Rezeptor durch die starke mechanische Belastung der Rezeptorpräparation und durch die Inkubation unter subphysiologischen Bedingungen bei 4 °C evtl. in einem anderen Zustand vor als im Tier selbst. Die Bindung einer Substanz könnte *in vivo* also ganz anders ausfallen als dies *in vitro* bestimmt wurde. Zudem kommen die gezeigten Substanzen in der Umwelt immer im Gemisch vor. Wie sich aber Substanzen im Gemisch in Bezug auf ihre Rezeptorbindung verhalten ist aus den Einzelsubstanz-Bindungsstudien nicht ersichtlich, hierzu wurde deshalb die Bindung von Gemischen untersucht. Das Ergebnis hierzu wird im folgenden Kapitel diskutiert.

4.4.2 Bindung von Gemischen

Nach dem Konzept der Konzentrations-Additivität für Stoffe mit ähnlicher Wirkung müsste sich die Einzelwirkung, in unserem Fall ist dies die Bindung einer Substanz an den Östrogenrezeptor, für jede Einzelsubstanz aufaddieren. Neben dieser Additivität von Einzelsubstanzen ist auch noch ein synergistischer Effekt denkbar. So wurde von Arnold (Arnold et al. 1996; Arnold et al. 1997) eine synergistische Verstärkung der Bindung von Xenobiotikas an den Östrogenrezeptor von Alligator und Mensch beobachtet. Arnold führte dies auf eine oder mehrere Bindungsstellen am Rezeptor zurück, die nach Bindung eines Liganden die Affinität des Rezeptors für eine Chemikalie an einer anderen Bindungsstelle drastisch verstärkten. Spätere Versuche konnten dieses Ergebnis jedoch nicht bestätigen, die Veröffentlichung wurde zurückgezogen. Auch in unseren Bindungsstudien konnte gezeigt werden, dass keines der untersuchten Gemische eine synergistische Bindung an den Rezeptor hervorruft. Tatsächlich zeigten die untersuchten Gemische aber auch keine additiven Effekte in ihrer Rezeptorbindung. Laut den Ergebnissen aus den Einzelbindungsstudien hätten nach dem Konzept der Konzentrations-Additivität zumindest die Gemische Östradiol + Östron, Östradiol + Östron + Östriol + Ethinylöstradiol sowie Östradiol + Östron + Diclofenac bei den Konzentrationen 10^{-8} M und 10^{-9} M eine Verstärkung der Bindung hervorrufen müssen. Dies jedoch ist nicht der Fall, die Bindung wird in den untersuchten Gemischen bei gleichen Konzentrationen immer von dem Stoff mit der höchsten Affinität, 17β -Östradiol, bestimmt. In ähnlichen Bindungsstudien am Östrogenrezeptor der Regenbogenforelle konnte jedoch für zwei Phytohormone mit etwa gleicher Affinität ein additiver Effekt gefunden werden (Knudsen und Pottinger 1999), der das Konzept der Konzentrations-Additivität bestätigte. Hier nun könnte ein Ansatzpunkt für das Fehlen von additiven Effekten in unseren Messungen liegen. Knudsen setzte Substanzen in gleicher Konzentration und mit gleicher Affinität ein. Unsere Gemische liegen zwar in gleicher Konzentration vor, die Affinität der Einzelsubstanzen aber ist sehr unterschiedlich. Durch diesen Unterschied in der Affinität fällt jedoch der mögliche additive Effekt sehr viel kleiner aus, die Bindung wird v.a. vom Stoff mit der höchsten Affinität bestimmt. Der ohnehin kleine additive Effekt könnte in unserem Fall also durch messbedingte Schwankungen kompensiert worden sein. Zur Klärung dieses Sachverhaltes müssen also weitere Gemische untersucht werden. Diese müssen jedoch nach ihrer Affinität, z.B. dem IC_{50} -Wert, gemischt sein. Für Östradiol + Östron + Östriol + Ethinylöstradiol wäre also das Mischungsverhältnis ungefähr 1 : 2,5 : 37,5 : 5,2 statt 1 : 1 : 1 : 1, erst dann wäre ein additiver Effekt auch deutlich sichtbar. Bis dahin sind also keine endgültigen Aussagen über die Gültigkeit des Konzepts der additiven Wirkung auch in unserem System möglich. In jedem Fall aber können nach unseren Messungen synergistische Effekte durch die untersuchten Substanzen ausgeschlossen werden, die Bindung wird in allen

gezeigten Gemischen durch 17 β -Östradiol bestimmt. Dies zeigen auch die Bindungskurven der Gemische Östradiol + Diclofenac sowie Östradiol + Nonylphenol. Weder Diclofenac noch Nonylphenol hatten einen Einfluss auf die Bindung.

4.4.3 Bindung von Wasserproben im Vergleich zu ihrem Gehalt an endokrin aktiven Substanzen

Flusswasser und geklärtes Abwasser stellen hochkomplexe chemische Mischungen dar. Zu den vielen enthaltenen Substanzen zählen auch Stoffe mit endokriner Wirkung. Viele dieser Stoffe entfalten ihre endokrine Wirkung über die Bindung an den Östrogenrezeptor. Befinden sich also im Wasser bzw. im daraus aufgearbeiteten Extrakt solche Stoffe, so müsste dies im Bindungs-Assay als Abnahme der Bindung des radioaktiv markierten Östradiols sichtbar sein. In der vorliegenden Arbeit wurden die Flüsse Seefelder Aach und Schussen sowie die Kläranlage Langwiese untersucht. Der hier diskutierte Bindungs-Assay sollte dabei zeigen, ob und wie viel in den Extrakten endokrin aktive Stoffe vorhanden waren. Das Ergebnis dieser Bindungsstudien für die Wasserproben wurde außerdem noch mit der GC-MS – Analyse verglichen, die für einige der Extrakte durchgeführt wurde. Hierdurch sollten mögliche Verursacher für die Bindung an den Rezeptor identifiziert werden. Für diese identifizierten Substanzen sollte anhand der Einzelbindungsstudien zudem gezeigt werden, welchen Anteil sie an der Höhe der Bindung der Wasserproben besitzen.

Die Extrakte der Seefelder Aach (SeeAach 1 – 4) zeigten nur in einem Fall eine leichte Bindung: Extrakt SeeAach 2 filtriert verdrängte nach 36facher Konzentrierung ca. 18 % \pm 10 % des radioaktiven Östradiols. Dieser Extrakt war auch der einzige der Seefelder Aach – Extrakte, der mit GC-MS untersucht wurde. Hierbei erwies sich nur 17 β -Östradiol als möglicher Verursacher dieser Bindung, die übrigen Stoffe waren zu schwach konzentriert. Mit einem Gehalt von 0,7 ng/l im Flusswasser entsprach 17 β -Östradiol nach 36facher Konzentrierung dabei im Reaktionsansatz einer Konzentration von ca. 0,1 nM. Bei dieser Konzentration zeigte sich in den Einzelbindungsstudien für 17 β -Östradiol eine Bindung von ca. 5 % \pm 5 %. 17 β -Östradiol scheint somit zumindest teilweise für die Bindung der Wasserprobe SeeAach 2 filtriert verantwortlich zu sein, die hohen Standardabweichungen in den Bindungstests erlauben jedoch keine absoluten Aussagen. Auffällig ist die Diskrepanz zwischen der Bindung der Extrakte SeeAach 2 filtriert und SeeAach 2 unfiltriert. Der unfiltrierte Extrakt zeigte eine etwas kleinere Verdrängung von radioaktivem Östradiol als der filtrierte Extrakt. Besonders deutlich wurde dies für Extrakt Schussen 2. Hier zeigte der filtrierte Extrakt eine um 20 % höhere Bindung als der unfiltrierte Extrakt. Mögliche Ursache hierfür wäre

beispielsweise, dass Stoffe aus dem Filter freigesetzt werden, welche die höhere Bindung verursachen, Kontrollproben mit gefiltertem destilliertem Wasser ergaben jedoch, dass dies nicht der Fall ist. Es ist vielmehr wahrscheinlich, dass beim Filtrieren lose an Schwebstoffe gebundene Substanzen durch die Einwirkung von mechanischen Kräften wie z.B. Scherkräften rückgelöst werden und somit wieder verfügbar sind.

Extrakt Schussen 1 zeigte nach 36facher Konzentrierung eine Bindung von ca. 15 ± 5 %. Die GC-MS – Analyse ergab nur für 17β -Östradiol und Östron für eine Bindung ausreichende Werte. Mit einer Konzentration von 0,5 nM nach 36facher Konzentrierung würde sich für 17β -Östradiol als Einzelstoff betrachtet eine Bindung von ca. 20 % ergeben, für Östron eine Bindung von ca. 15 % (1,2 nM). Bei additiver Wirkung wäre dies also eine Bindung von 35 %, die tatsächliche Bindung liegt aber tiefer. Da auch schon bei künstlichen Gemischen, wie im Kapitel vorher diskutiert, die tatsächliche Bindung vom Stoff mit der höchsten Affinität vorgegeben wird, wäre es denkbar, dass auch der Gehalt an 17β -Östradiol alleinig für die Bindung in der Wasserprobe verantwortlich ist und Östron nichts zu dieser Bindung beiträgt. Hierzu muss jedoch erst in künstlichen Gemischen geklärt werden, ob es in den Bindungsstudien zu additiver Bindung kommen kann oder nicht. Erst dann können messtechnische Schwankungen und andere Einflüsse ausgeschlossen und eine endgültige Bewertung dieses Ergebnisses getroffen werden.

Ein eindeutiges Ergebnis liefert der Vergleich von GC-MS – Analyse und Bindungs-Assay für den Extrakt Schussen 2. Die Analyse des filtrierte Extrakts lieferte hier einen hohen 17β -Östradiolgehalt (31,8 ng/l) der für die Bindung verantwortlich gemacht werden kann, der Rest der untersuchten Substanzen spielte hingegen keine Rolle. Tabelle 4.1 zeigt, dass die Bindung von Östradiol als Einzelsubstanz zur Bindung der verschiedenen konzentrierten Wasserproben ungefähr deckungsgleich ist. Die Bindung der Wasserprobe kann damit direkt auf den Gehalt an Östradiol zurückgeführt werden.

Tabelle 4.1: Vergleich der Bindung des Extrakts Schussen 2 filtriert mit dem Gehalt an 17 β -Östradiol

| Konzentrierung der Wasserprobe | Östradiol-konzentration [nM] | Bindung als Einzelsubstanz | Gemessene Bindung |
|--------------------------------|------------------------------|----------------------------|-------------------|
| 1fach | 0,12 nM | 5 – 10 % | 10 % |
| 4fach | 0,47 nM | 25 – 30 % | 30 \pm 10 % |
| 18fach | 2,1 nM | 50 – 55 % | 60 \pm 5 % |
| 36fach | 4,2 nM | 70 – 75 % | 75 \pm 5 % |

Die Probe Schussen 3 zeigte keine Bindung an den Östrogenrezeptor. Eine GC-MS-Analyse wurde für diesen Extrakt nicht durchgeführt. Eine GC-MS-Analyse wurde auch für den Extrakt Oberzell nicht durchgeführt, die Bindungsstudien ergaben hier eine Bindung von 15 – 20 %. Welche Stoffe für diese Bindung verantwortlich waren konnte aufgrund der fehlenden Analyse nicht bestimmt werden. Der Extrakt der Probe Schussen 4 zeigte eine (statistisch nicht signifikante) leichte Bindung von 5 – 10 % bei 36facher Konzentrierung. Die GC-MS – Analyse ergab für diesen Extrakt einen Gehalt an 17 β -Östradiol, der in etwa dieser Bindung entsprach, auch in diesem Fall schien also Östradiol für die Bindung verantwortlich zu sein.

Die Wasserprobe Schussen 5 wurde auf drei verschiedene Arten aufgearbeitet. Ein Teil wurde durch Flüssig/flüssig-Extraktion mit Dichlormethan aufgearbeitet, dies gilt auch für alle bisher beschriebenen Extrakte. Die beiden anderen Extrakte wurden durch Festphasenextraktion aufgearbeitet, an einem dieser Extrakte wurde zusätzlich ein Cleanup zur Eliminierung von organischen Verunreinigungen wie z.B. Huminsäuren durchgeführt. Im Bindungs-Assay zeigten alle drei Extrakte eine unterschiedliche Bindung. Für den mit Dichlormethan aufgearbeiteten Extrakt fand sich gar keine Bindung, der Extrakt mit Cleanup zeigte eine schwache Bindung von 11 – 18 % bei 36facher Konzentrierung, der Extrakt ohne Cleanup zeigte schon bei 1facher Konzentration eine hohe Bindung, die bei 36facher Konzentrierung auf eine Bindung von 70 % anwuchs. Diese Bindung konnte mit den kleinen Gehalten von Östradiol und Östron nicht erklärt werden, die im Maximalfall bei additiver Wirkung eine Bindung von 10 % ergeben würden. Ein Grund für die höhere Bindung im +Cleanup-Extrakt könnte sein, dass nach Festphasenextraktion die Wiederfindungsrate für endokrin aktive Substanzen, insbesondere aber für Östrogene, höher ist als für die Dichlormethan-Aufarbeitung. Keine Erklärung jedoch besteht für die hohe Bindung des Extrakts ohne

Cleanup. Im Extrakt ohne Cleanup sind neben den Huminstoffen lediglich noch die Stoffe Dibutylphthalat (DBP), Benzylbutylphthalat (BBP) sowie Nonylphenoxyessigsäure (NP1EC) zusätzlich enthalten, der Rest der analysierten Substanzen jedoch ist gleich wie im Extrakt mit Cleanup (die genannten Substanzen werden beim Cleanup eliminiert). Da für DBP, BBP und NP1EC die Konzentration jedoch zu klein ist um selbst bei 36facher Konzentrierung eine Bindung hervorzurufen (White et al. 1994), muss die hohe Bindung auf eine andere Weise erklärbar sein. Entweder wird die Bindung durch eine bisher unbekannte Substanz ausgelöst, die nur durch Festphasenextraktion, nicht aber durch Dichlormethan-Aufarbeitung extrahiert werden kann und zusätzlich beim Cleanup eliminiert wird. Wahrscheinlicher jedoch erscheint es, dass die hohe Belastung mit organischen Stoffen wie Huminstoffen und Huminsäuren zu der hohen Bindung geführt hat. Denkbar ist z.B., dass die hochmolekularen, „sperrigen“ Stoffe unspezifisch die Bindungshöhle des Rezeptors „verkleben“ und somit die spezifische Bindung generell verhindern. Dies war auch bei Bindungsstudien von Spengler der Fall, bei denen mit Festphasenextraktion aufgearbeitete Kläranlagenproben bei zu hoher Matrix nicht mehr gemessen werden konnten (Spengler 1999). Bei der Dichlormethan-Aufarbeitung jedoch wird die organische Matrix nur teilweise extrahiert, der Großteil verbleibt in der Intermediärphase. Ob die Dichlormethan-Aufarbeitung deshalb im Fall von Bindungsstudien an Wasserproben einen generellen Vorteil gegenüber der Festphasenextraktion besitzt, muss in weiteren Versuchen geklärt werden. Einen gegenteiligen Schluss legen die Bindungsstudien am Extrakt Kläranlage nahe. Die hohe Bindung dieses Extrakts (30 – 40 %) bei 36facher Konzentrierung konnte nur teilweise durch den Substanzgehalt erklärt werden. Die Einzelbindung von Östradiol betrug nur ca. 5 %, Octylphenol war zu schwach konzentriert um eine Bindung hervorzurufen (White et al. 1994). Östron war leider nicht auswertbar, müsste aber in einer Originalkonzentration von 25 ng/l vorliegen, um die hohe Bindung bewirken zu können. Das Fehlen der Östronkonzentration macht eine Bewertung dieses Ergebnisses deshalb nicht möglich. In jedem Fall aber war die organische Belastung der Kläranlagenprobe höher als dies für die Flusswasserproben der Fall war, ob diese organische Belastung aber auch Schuld an der hohen Bindung war, lässt sich nicht eindeutig klären. Dagegen spricht, dass in Zellkulturversuchen an primären Hepatozyten der männlichen Regenbogenforelle nach Stimulation mit dem 10fach konzentrierten Kläranlagen-Extrakt eine Östrogenrezeptor-mRNA – Bildung gefunden wurde.

Von den beiden im Mai 2000 genommenen Proben zeigte nur die Probe Schussen 3.5.2000 bei 36-facher Konzentrierung eine Bindung an den Rezeptor. Zwar wurde für diese Probe keine GC-MS Analyse durchgeführt, so dass die Bindung nicht bestimmten Substanzen zugeordnet werden kann. Auffallend ist hier jedoch, dass diese Bindung nicht schon nach 18-facher bzw. 4-facher Bindung auftritt. Betrachtet man die

anderen Ergebnisse, erkennt man immer eine kontinuierliche Abnahme der Bindung bei steigender Konzentrierung. Im Fall der Probe Schussen 3.5.2000 ist daher ein messtechnisches Artefakt eher für die Bindung wahrscheinlich als das Vorhandensein endokrin aktiver Stoffe. Dies deuten auch die Ergebnisse des ELISA bzw. der PCR an, in denen keine Effekte für diese Probe gefunden werden konnten.

Die Schussen-Wochenganglinie ergab nur in einem Fall einen positiven Effekt. Probe Schussen 3.10.2000 wies bei 36-facher Konzentrierung eine Bindung von ca. 30 % auf. In den 6 anderen Proben wurde zwar eine Abnahme der Bindung bei steigender Konzentrierung des Extrakts beobachtet, hier waren jedoch die Standardabweichungen so hoch, dass keine Signifikanz auftrat. Festzuhalten bleibt zudem, dass sich die Östrogengehalte in den 7 Proben nicht wesentlich unterscheiden. Weshalb also lediglich eine Probe positiv getestet wurde, ist nicht eindeutig erklärbar. Die Östrogengehalte würden zwar für alle Proben die leichte Abnahme der Bindung erklären können, messbedingte Schwankungen spielen jedoch eine zu große Rolle.

Zusammenfassung und Bewertung der Bindungsstudien an Wasserproben

Betrachtet man die Ergebnisse aus den Bindungsstudien so kann insgesamt von einer geringen Belastung der untersuchten Gewässer gesprochen werden. Die Extrakte der Seefelder Aach zeigten keine Bindung bis auf SeeAach 2, hier trat die Bindung jedoch erst nach 36facher Konzentrierung auf und war sehr klein. Ein saisonaler Unterschied war für die Extrakte der Seefelder Aach nicht erkennbar. Auch die Extrakte der Schussen zeigten keine saisonalen Unterschiede, die hohe Bindung der Probe Schussen 2 sticht als Folge einer außergewöhnlichen Wetterlage aus der ansonsten übers ganze Jahr gleichbleibenden leichten Bindung heraus. Die leichten Effekte wurden ebenfalls meist erst nach 36facher Konzentrierung erreicht, lediglich die Extrakte Schussen 2 und Schussen 5 ohne Cleanup zeigen schon bei Normalkonzentration (1fach) eine Bindung. Für Extrakt Schussen 2 konnte diese Bindung gut mit den Ergebnissen aus den GC-MS – Analysen korreliert werden. Dies traf auch für die Extrakte Schussen 4 und mit Einschränkung für SeeAach 2 zu. Für diese Proben zeigte sich auch, dass die Bindung der Wasserproben v.a. durch den Gehalt an Östradiol bestimmt wird. Dies steht in Einklang mit dem Befund von Spengler und von Desbrow, die in Kläranlagenabwässern die Östrogene 17 β -Östradiol, Östron sowie 17 α -Ethinylöstradiol als Hauptverursacher für einen östrogenen Effekt im E-Screen-Assay bzw. einem Hefe-Reportergen-Assay identifizieren konnten (Desbrow et al. 1998; Spengler et al. 1999). Für einige Proben traf diese Korrelierbarkeit von Östrogengehalt und Bindung jedoch nicht zu. Probe Schussen 1 besaß für die gemessene Bindung einen zu hohen Östrogengehalt, hier könnten jedoch Schwankungen in der Messung der Bindung eine Rolle spielen. Die sehr

hohe Bindung der Probe Schussen 5 +cleanup beruhte jedoch nicht auf solchen Schwankungen, vielmehr scheinen eine bisher unbekannte Substanz oder aber die hohe Belastung mit organischen Verunreinigungen Schuld an dieser hohen Bindung zu haben. Für die hohe Matrix sprechen ähnliche Befunde von Spengler (Spengler 1999). Für diese Hypothese spricht auch, dass für Probe Schussen 5 nach Aufarbeitung mit Dichlormethan sowie nach einem Cleanup und der dadurch geringeren Belastung mit organischer Matrix auch die Bindung viel kleiner war. Die Aufarbeitung spielt demzufolge auch eine große Rolle für das Ergebnis der Bindungsstudien, v.a. hinsichtlich der Extraktion der Matrix. In diesem Zusammenhang ist auch interessant, dass nach Filtern der Probe noch vor Aufarbeitung eine Erhöhung der Bindung festgestellt wurde, die auf das Rücklösen von Schwebstoff-gebundenen Substanzen zurückgeführt wurde. Viele wichtigen endokrinen Substanzen liegen also nicht frei im Wasser vor, sondern sind lose an Partikel gebunden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass zwar Bindungsstudien an Wasserproben ein nützliches Instrument zum Nachweis endokrin aktiver Substanzen im Wasser sind, dass aber ihre Aussagekraft durch die Möglichkeit falsch positiver Befunde, ausgelöst z.B. durch eine hohe Belastung mit organischen Stoffen, stark eingeschränkt ist. Es erscheint daher wichtig, dass zu den Bindungsstudien noch weitere *in vitro* Tests durchgeführt werden, um die Ergebnisse abzusichern. So zeigte sich in Zellkulturversuchen an primären Hepatozyten der Regenbogenforelle nur für die Extrakte Schussen 2, Schussen 5, Schussen 3.10.2000 und Kläranlage eine Induktion von Östrogenrezeptor-mRNA, allerdings erst nach 10facher Konzentrierung. In ganzen Zellen nun ist ein störender Einfluss von hochmolekularen organischen Verbindungen im Gegensatz zum zellfreien System des Bindungs-Assays aufgrund der fehlenden Aufnahme in die Zelle unwahrscheinlich. Der positive Befund in beiden Testsystemen kann für die beiden Proben somit zweifelsfrei auf endokrin aktive Stoffe im Extrakt zurückgeführt werden, in allen übrigen Proben ist die Konzentration der endokrin aktiven Substanzen zu klein für einen positiven Befund.

4.5 Detektion östrogenen Aktivität auf Protein-Ebene (Vg-ELISA)

Bindet der natürliche Ligand 17 β -Östradiol an Östrogenrezeptor, wird eine östrogene Antwort ausgelöst. Im Fall von Vitellogenin bedeutet dies, dass zuerst die Vg-mRNA gebildet wird, anschließend wird die mRNA in der Translation umgeschrieben ins Protein. Dieses Protein wird schlussendlich aus der Zelle freigesetzt und übers Blut in die Eizellen im Ovar transportiert. Dieser ganze Vorgang ist jedoch keine Alles-oder

Nichts Antwort. Eine Bindung an den Rezeptor bedeutet nicht zwangsläufig, dass auch eine bestimmte Menge an Protein gebildet wird. Dazwischen existieren vielmehr viele steuernde und regelnde Prozesse. Nicht zuletzt ist auch eine anti-östrogene Bindung an den Rezeptor möglich, also eine Bindung ohne nachfolgende Transkription. Will man also die östrogene Antwort untersuchen, empfiehlt es sich, zwei verschiedene Wirkebenen zu testen. Dies ist zum Einen die Transkription, also die Bildung der mRNA z.B. von Vitellogenin und Östrogenrezeptor. Zum Anderen ist es die Bildung (Translation) und Freisetzung des Proteins, in unserem Falle von Vitellogenin.

Die Messung des Vitellogenins auf Protein-Ebene könnte zusätzliche Informationen zum östrogenen Effekt bzw. zum Wirkmechanismus einer Substanz liefern. mRNA-Synthese und Menge der mRNA lassen keinen direkten Schluss auf die Proteinsynthese zu. Post-transkriptionelle Regulation findet zum Beispiel über eine Variabilität der mRNA-Stabilität statt, z.B. durch Bindung spezifischer Proteine an die RNA. Solche Proteine können entweder protektiv wirken oder ein Signal geben, das zu einem schnelleren Abbau der mRNA führt. Für E₂ wurde bereits ein stabilisierender Effekt auf ER-mRNA gezeigt (Brock and Shapiro, 1983b; Flouriot et al., 1996). Dass verschiedene mRNA-Spezies unterschiedlicher Regulation unterliegen, zeigt sich auch in einer unterschiedlichen Kinetik der Protein-Synthese von ER und Vg (Flouriot et al., 1996; Pakdel et al., 1991). Aus einem Vergleich der Ergebnisse für die ER- und Vg-mRNA-Synthese mit der anschließend resultierenden Vg-Menge könnten mögliche Unterschiede im Wirkpotential verschiedener Testsubstanzen aufgezeigt werden. Stimuliert ein Östrogen bzw. Xenoöstrogen nicht nur die Rezeptor-vermittelte Genexpression, sondern ist zusätzlich an der Stabilisierung der mRNA beteiligt, ist eine größere Proteinmenge zu erwarten als bei Genexpression ohne folgende mRNA-Stabilisierung. Weiter sind auch Effekte von Substanzen auf die durch Östrogene regulierten Komponenten des Hormonsystems denkbar, die nicht ER-vermittelt sind, d.h. die nicht über eine Bindung an den ER und anschließender Aktivierung östrogenabhängiger Gene wirken.

In unserem Fall wurden für Forelle und Karpfen zwei unterschiedliche ELISA-Systeme verwendet. Für die Forelle war dies ein kompetitiver ELISA, bei dem die ELISA-Platte mit aufgereinigtem Antigen beschichtet wird und anschließend Antikörper und Probe zusammen in die Vertiefungen gegeben werden. Nur Antikörper, die nicht an Antigene aus der Probe binden, stehen noch für eine Bindung an das Antigen auf der Platte zur Verfügung. Detektiert werden schließlich die an die Platte gebundenen Antikörper. Die Signalstärke lässt einen indirekten Schluss auf den Antigengehalt der Probe zu, wobei ein starkes Signal auf einen geringen Antigengehalt schließen lässt, ein niedriges Signal auf einen hohen Gehalt. Ein kompetitiver ELISA zur Detektion des Vitellogenin der Fettkopffbrasse (*Pimephales promelas*) wird in einer Zusammenarbeit des

Umwelttoxikologie-Labors der Universität Konstanz und Schering (Berlin) bereits angewandt. Ein indirekter kompetitiver ELISA zum Nachweis von Karpfen (*Cyprinus carpio*)-Vitellogenin im Medium-Überstand von Hepatozyten-Kulturen wird auch von Smeets (Smeets et al., 1999) beschrieben.

Bei der Überprüfung der Standardsubstanzen zeigte der Forellen-ELISA für 17 β -Östradiol eine erste Freisetzung von Vg ab einer Konzentration von 10 nM sowie ein Maximum bei 100 bzw. 1000 nM. Nonylphenol und Bisphenol A konnten erst bei der Höchstkonzentration von 100 μ M diese Freisetzung bewirken. Diese Freisetzung war jedoch bei weitem schwächer als die Maximalfreisetzung von 17 β -Östradiol. Keine der untersuchten Wasserproben war in der Lage, die Freisetzung von Vitellogenin zu bewirken. Hierzu muss jedoch gesagt werden, dass die Vitellogenin-Konzentration der Kontrolle nahe an der Nachweisgrenze dieses ELISA von 150 ng/ml lag. Eventuelle darunter auftretende Effekte können also mit diesem System nicht festgestellt werden. Trotzdem ist dieses ELISA-System gut geeignet für die Forelle, da die östrogene Antwort bei Forellen weit stärker ausgeprägt ist als die Antwort im Karpfen (Purdom et al., 1994).

Um für den Karpfen eine sensitivere Detektion von Vitellogenin zu ermöglichen, wurde ein nicht-kompetitiver Sandwich-ELISA eingesetzt. In diesem Fall werden die Platten mit einem Antikörper beschichtet, an den das Antigen spezifisch binden kann. Dadurch kann auch eine relativ geringe Menge an Antigen quasi aus der Probe herausgefiltert werden. Für einen Sandwich-ELISA sind zwei Antikörper (ein monoklonaler und ein polyklonaler) nötig. Hierdurch konnte das Detektionslimit auf 0,24 ng/ml herabgesetzt werden. Dennoch lag die Karpfen-Kontrolle nahe an diesem Detektionslimit, im männlichen Karpfen ist die natürliche Vg-Konzentration also sehr gering. Nach Inkubation mit E2 wurde ebenfalls, wie zuvor bei der Forelle, ab 10 nM eine Freisetzung von Vg beobachtet. Diese Freisetzung erreichte bei 100 nM ihr Maximum, fiel jedoch bei 1000 nM E2 ab. Offensichtlich war diese Konzentration für Karpfen-Hepatozyten also bereits toxisch. Dies war auch bereits rein optisch an der Zellkultur erkennbar (ohne Abbildung). Keiner der Extrakte aus den Wasserproben konnte jedoch, trotz hoher EE2-Konzentrationen in den Wasserproben, die Freisetzung von Vg bewirken. Vermutlich war hierzu die 10.000-fache Aufkonzentrierung der Wasserproben zu gering. Eine höhere Aufkonzentrierung war jedoch aufgrund der hohen Matrixbelastung der Extrakte nicht möglich. Als weitere Standardsubstanzen wurden wiederum Nonylphenol sowie statt Bisphenol A 17 α -Ethinylöstradiol (EE2) eingesetzt. Nonylphenol bewirkte ebenfalls wie bei der Forelle ab 100 μ M die Freisetzung von Vg. EE2 hingegen zeigte schon bei der kleinsten eingesetzten Konzentration von 0,1 nM eine starke Vg-Freisetzung, die sogar die maximale Vg-Freisetzung für E2 übertraf. Tatsächlich ist auch schon in früheren Studien eine sehr

hohe östrogene Potenz für EE2 festgestellt worden, die sogar die Potenz von E2 übersteigt (Larsson et al.; 1999, Purdom et al., 1994). Eine mögliche Ursache für diese höhere Potenz könnte beispielsweise in der schlechteren Abbaubarkeit von EE2 liegen. Durch die zusätzliche Ethinylgruppe kann EE2 schlechter metabolisiert werden und dadurch weit länger seine östrogene Wirkung in den Zellen entfalten.

4.6 Detektion östrogenener Aktivität verschiedener Reinsubstanzen auf mRNA-Ebene (Northern Blot und RT-PCR) und Abschätzung einer ökotoxikologischen Relevanz der gefundenen Effekte.

Der Nachweis der RNA kann sowohl im Northern Blot als auch in der RT-PCR erfolgen. Während der Durchführung der Northern Blots war noch keine gezielte Auswahl der Fische möglich. Die Forellen wurden aus der Fischereigenossenschaft in Staad bezogen, wobei es sich um ca. 1 Jahr alte Fische handelte, die noch nicht geschlechtsreif waren. Sofern eine Geschlechtsbestimmung bereits möglich war, stellten wir fest, dass ca. 80 % der erhaltenen Fische weiblich waren. Erst die Möglichkeit, 2 Jahre alte Fische aus der Fischzucht Ernst (Utting, Ammersee) zu beziehen, machte eine eindeutige Identifizierung des Geschlechts und eine gezielte Auswahl der Fische möglich. Da die Ergebnisse aus dem Northern Blot unvollständig sind und Mangels einer Standardisierung der Hepatozyten-Kultur in Bezug auf Geschlecht und Alter der verwendeten Forellen keine einheitliche Beurteilung der Ergebnisse möglich ist, werden im Folgenden vor allem die Ergebnisse aus der RT-PCR diskutiert. Ein Vergleich der Ergebnisse aus beiden Tests zeigt, dass die Sensitivität beider Systeme vergleichbar ist. Zur Validierung der etablierten Testsysteme wurde zunächst jeweils der Effekt des natürlichen Östrogens 17β -Östradiol (E_2) auf ER- und Vg-mRNA-Synthese untersucht. Sowohl im Northern Blot als auch in der RT-PCR wurde nach 24 h Inkubation eine erste Induktion der ER-mRNA in Hepatozyten adulter (ca. 2 Jahre alter), männlicher Regenbogenforellen nach Stimulation mit 1 nM E_2 detektiert. Nach 48 h Inkubation wurde in der PCR eine erste Induktion bereits bei 0,1 nM E_2 gefunden.

Ein Nachteil der zum mRNA-Nachweis verwendeten Testsysteme ist, dass eine Quantifizierung der mRNA nicht möglich war. Die Etablierung einer quantitativen RT-PCR konnte aus Zeitgründen nicht mehr in Angriff genommen werden.

Für Hepatozyten einer geschlechtsreifen, weiblichen Regenbogenforelle (kurz vor der Eiablage) wurden im Northern Blot drei ER-mRNA-Banden gefunden. Bei den verschiedenen Banden könnte es sich z.B. um Splicing-Varianten des selben Genprodukts handeln. Ob bei der Regenbogenforellen bzw. bei Salmoniden allgemein mehrere Östrogenrezeptoren exprimiert werden, d.h. analog zu ER α und ER β bei verschiedenen Säuger-Spezies (Byers et al., 1997; Enmark and Gustafsson, 1998) mehrere unterschiedliche ER-Gene vorliegen, ist noch nicht bekannt. Allerdings zeigten Pakdel et al. (Pakdel et al., 1991; Pakdel et al., 1989) bereits, dass in der Leber von Forellen zwei ER-mRNA-Spezies von 3,5 und 4,5 kb exprimiert werden.

Die Möglichkeit ER- und Vg-mRNA in der RT-PCR gleichzeitig und verlässlich zu detektieren, gewährleistete die Vollständigkeit der Ergebnisse. Zusätzlich kann über die Detektion von β -Actin als Standard die für die einzelnen Proben eingesetzte RNA-Menge kontrolliert werden. Im Gegensatz dazu stellte der mRNA-Nachweis im Northern Blot, mit Hilfe einer Vg- und einer ER-cDNA-Sonde keine verlässliche Methode dar. Zum anderen machte die Verwendung von geschlechtsreifen, eindeutig männlichen bzw. weiblichen Forellen eine gezielte Untersuchung geschlechtsspezifischer Unterschiede in der Stimulierbarkeit von ER- und Vg-mRNA möglich.

Im Folgenden werden Ergebnisse für Vg- und ER-Induktion aus der RT-PCR diskutiert. Für die Stimulation mit E₂ zeigte sich, dass die Vg-mRNA-Synthese in Hepatozyten männlicher Fische nach 24 h Inkubation erst bei einer um eine Zehnerpotenz höheren Konzentration induziert wird als bei weiblichen Fischen. So wurde nach erste Stimulation der Vg-mRNA-Synthese im weiblichen Fisch bei 1 nM E₂ beobachtet, beim männlichen Fisch bei 10 nM E₂. Hepatozyten männlicher Fische zeigen in unserem System im Gegensatz zu Hepatozyten weiblicher Regenbogenforellen, für die bereits in der Kontrolle ein relativ hoher ER-mRNA-Gehalt gezeigt wurde, keine bzw. sehr geringe, detektierbare Basislevel an ER-mRNA. Eine erste Zunahme der ER-mRNA in Hepatozyten männlicher Forellen konnte nach Stimulation mit 1 nM E₂ beobachtet werden (24 h Inkubation), eine deutliche Zunahme bei weiblichen Hepatozyten allerdings erst bei 10 nM. Flouriot und Mitarbeiter (Flouriot et al., 1996) zeigten für Hepatozyten männlicher Regenbogenforellen eine signifikante Induktion von Vg- und ER-mRNA nach Stimulation mit 1 nM E₂, bei 0,5 μ M E₂ wurde ein Plateau der Vg- und ER-mRNA-Synthese erreicht.

Das Erreichen eines Plateaus bei E₂-Konzentrationen im mikromolaren Bereich kann auch in unserem System beobachtet werden. Da keine Quantifizierung der mRNA-Mengen möglich war, kann allerdings hier kein genauer Wert bestimmt werden. Pakdel et al. (Pakdel et al., 1991) geben an, dass bei *in vivo*-Stimulation ER-mRNA mit einer

geringeren E_2 -Konzentration induziert werden kann als Vg-mRNA. Dies stimmt mit unseren Beobachtungen bei Hepatozyten männlicher Fische überein.

Zur Standardisierung der vorgestellten Methode erschien es uns weiterhin sinnvoll, Untersuchungen zur östrogenen Aktivität fraglicher Substanzen bzw. Wasserproben an Hepatozyten männlicher Forellen durchzuführen. Zum einen erleichtert das Fehlen eines ER-mRNA-Basislevels die Beobachtung einer Veränderung in der ER-mRNA-Menge. Zum anderen stellt die Induktion von ER- und vor allem Vg-mRNA im männlichen Fisch einen natürlich nicht vorkommenden Effekt dar, dem möglicherweise eine größere Relevanz beigemessen werden sollte. Es ist allerdings nicht klar, inwiefern die Synthese von Vitellogenin im männlichen Fisch diesen beeinträchtigt.

Auch die Verwendung weiterer Testsubstanzen mit einer bekannten östrogenen Wirkung zeigte, dass sich das System gut zur Detektion östrogenen Aktivität eignet.

Die Schwellenwerte für die Induktion von ER- und Vg-mRNA durch das synthetische Östrogen Ethinylöstradiol stimmen mit den für E_2 benötigten Konzentrationen überein. Allerdings führt EE2 zu einer stärkeren Expression von ER- und Vg-Gen. In anderen Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass EE2 effektiver in der Induktion der Vitellogenese ist als E_2 (Larsson et al., 1999). Dieser Effekt könnte auf eine schlechtere Metabolisierung der Substanz und somit höheren Verfügbarkeit für den Östrogenrezeptor zurückzuführen sein.

Der Einsatz der bekannterweise östrogen wirkenden Industrie-Chemikalien Nonylphenol und Bisphenol A führte in den Hepatozyten ebenfalls zu einer deutlichen Stimulation der ER- und Vg-mRNA-Synthese, allerdings erst bei den relativ hohen Konzentrationen von 10 μM bzw. 100 μM . Die Detektion von 10 μM NP in Kläranlagenausläufen in Großbritannien (Jobling and Sumpter, 1993) zeigt jedoch die Umwelt-Relevanz des gefundenen Effekts.

Für E_2 , EE2, NP und Bis A konnte ein Zusammenhang zwischen einer kompetitiven Bindung an den Östrogenrezeptor und der Vg- und ER-mRNA-Induktion gezeigt werden. Die für die verschiedenen Substanzen ermittelten Schwellenwerte für eine Vg- und ER-Genexpression decken sich mit den im kompetitiven Östrogenrezeptor-Bindungs-Assay (CERBA) gefundenen EC_{50} -Werten (Tabelle 4.2). Dies deutet auf eine agonistische Wirkung am Rezeptor hin, wobei die Bindung an den Rezeptor für alle Substanzen in direktem Zusammenhang zur Aktivierung der Genexpression steht.

Tabelle 4.2: Vergleich der EC₅₀-Werte für die kompetitive Bindung einer Substanz an den Östrogenrezeptor mit der Schwellenkonzentration für Stimulation von ER- und Vg-mRNA-Synthese in Forellen-Hepatozyten.

| | EC ₅₀ [M] | Detektionslimit in der RT-PCR [M] |
|-----------------------------|-----------------------|-----------------------------------|
| 17β-Östradiol | 1,76x10 ⁻⁹ | 1,0x10 ⁻¹⁰ |
| 17α-Ethinylöstradiol | 9,26x10 ⁻⁹ | 1,0x10 ⁻⁹ |
| Nonylphenol | 1,17x10 ⁻⁵ | 1,0x10 ⁻⁵ |
| Bisphenol A | 6,45x10 ⁻⁶ | 1,0x10 ⁻⁵ |
| Genistein | 6,36x10 ⁻⁸ | 1,0x10 ⁻⁵ |
| Diclofenac | 1,22x10 ⁻³ | Keine agonistische Wirkung |

Phytoöstrogene werden zum Beispiel bei der Papierherstellung freigesetzt und gelangen in größeren Mengen in Oberflächengewässer. Hier ist vor allem β-Sitosterol zu nennen, für das eine östrogene Wirkung in Fischen gezeigt wurde (Mellanen et al., 1996). Die Stimulation der Zellen mit β-Sitosterol zeigte keinen östrogenen Effekt in der Zellkultur. Dieser Befund deckt sich gut mit den Ergebnissen aus dem CERBA, in dem keine kompetitive Bindung von β-Sitosterol an den ER gefunden wurde. Allerdings steht dieser Befund im Widerspruch zu Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die für β-Sitosterol eine kompetitive Bindung an den ER aus der Rattenleber (Rosenblum et al., 1993) und der Leber von Regenbogenforellen (Tremblay and Van Der Kraak, 1998) sowie eine Induktion von Vg in Forellen zeigen konnten, sowohl nach *in vivo*-Exposition (Mellanen et al., 1996) als auch in Hepatozyten-Kulturen (Tremblay and Van Der Kraak, 1998). Eine Erklärung für die widersprüchlichen Befunde liegt nicht vor.

In der Hepatozyten-Zellkultur führte Genistein erst in einer Konzentration von 10 μM zu einer Stimulation von ER- und Vg-mRNA-Synthese. Höhere Konzentrationen konnten wegen der schlechten Löslichkeit der Substanz nicht getestet werden. Deshalb fehlen Untersuchungen zur Zunahme und Konzentrationsabhängigkeit des Effektes. Für Genistein zeigte sich kein direkter Zusammenhang zwischen kompetitiver ER-Bindung und Schwellenwert der mRNA-Induktion. Der im CERBA ermittelte EC₅₀-Wert für Genistein liegt um drei Zehnerpotenzen niedriger als die gefundene Schwellenkonzentration. Für dieses Phytoöstrogen wäre die Untersuchung einer

antagonistischen oder additiven Wirkung zu E₂ sinnvoll. Die bei niedrigeren Konzentrationen der Substanz beobachtete Bindung an den Rezeptor könnte den ER blockieren und so zu einer Hemmung der natürlichen Regulation durch E₂ führen. Auch lässt sich nicht ausschließen, dass eine Substanz, die allein die Genexpression nicht stimulieren kann, die natürliche Stimulation durch E₂ verstärkt.

Eine Stimulation der ER- und Vg-mRNA-Synthese sowie die Bindung an den ER wurde im folgenden noch für Pharmaka untersucht, über deren östrogenes Potential teilweise noch nichts bekannt war. Für Naproxen, Clofibrat, Bezafibrat und Carbamazepin konnte weder ein östrogenener Effekt in der Hepatozyten-Zellkultur noch eine Bindung an den ER gezeigt werden. Da für Carbamazepin allerdings bereits eine androgene Wirkung in Ratten bekannt ist (Dietrich et al., 1998), wurde ein möglicher antagonistischer Effekt bei gleichzeitiger Gabe von E₂ untersucht. Dieser Ansatz führte zu keinem deutlichen Effekt auf die ER- oder Vg-Genexpression. Somit konnte hier keine weitere Aussage über eine mögliche Wirkung von Carbamazepin auf das Hormonsystem getroffen werden. Als weiteres Pharmakon wurde Diclofenac getestet. Diclofenac führte allein zu keiner Stimulation der ER- und Vg-mRNA-Synthese. Da im CERBA allerdings eine Bindung des Pharmakons an den ER gezeigt wurde ($EC_{50} = 1,22 \times 10^{-3}$), konnte ein antagonistischer oder additiver Effekt erwartet werden, was durch Stimulation der Zellen mit E₂ und Diclofenac untersucht wurde. Bei diesem Experiment erhielten wir widersprüchliche Ergebnisse aus verschiedenen Ansätzen. Während in einem ersten Ansatz eine Hemmung der E₂-induzierten mRNA-Synthese durch die höchste eingesetzte Diclofenac-Konzentration (100 µM) gefunden wurde, verhielt sich Diclofenac in weiteren Versuchen additiv zu E₂, führte also zu einer Steigerung der östrogen-regulierten mRNA-Synthese. Dieser Effekt war nicht abhängig davon, ob beide Substanzen gleichzeitig auf die Zellen gegeben wurden oder Diclofenac 6 h vor bzw. 6 h nach E₂. Eine mögliche Erklärung für die widersprüchlichen Befunde könnte darin liegen, dass die hohe eingesetzte Diclofenac-Konzentration (100 µM) einen toxischen Effekt auf die Hepatozyten-Zellen der Regenbogenforellen ausgeübt hat. Dies lassen Versuche an primären Hepatozyten von Ratte und Mensch vermuten, bei denen schon bei einer Konzentration von 100 µM Diclofenac subtoxische Effekte wie die 50prozentige Hemmung zweier ATP-verbrauchender Prozesse (Gluconeogenese und Albuminsynthese) gefunden wurden, der LC₅₀-Wert lag bei ca. 400 µM (Bort et al. 1999).

Unabhängig von der Testsubstanz wurde in der RT-PCR mit Vg- und ER-Primern nach Ren (Ren et al., 1996) eine zusätzliche Bande zwischen der ER und der Vg-Bande gefunden. Da diese zusätzliche Bande auch beobachtet wurde, wenn in der PCR nur die

ER-Primer verwendet wurden, lag die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um Östrogenrezeptor-cDNA handelt. Diese Vermutung konnte in einem Southern Blot bekräftigt werden, da die ER-cDNA-Sonde, die wir von der Arbeitsgruppe Valotaire erhalten hatten, auch diese Bande detektierte (Abb. 20).

In verschiedenen RNA-Proben trat außerdem eine zusätzliche Bande bei 1,437 kbp auf, die bereits von Ren et al. (Ren et al., 1996) beschrieben und als pre-Vg-cDNA bezeichnet wurde. Diese Bande zeigte sich in unseren Versuchen besonders deutlich nach Stimulation der Hepatozyten einer männlichen Forelle mit 10 μ M Genistein. Ren und Mitarbeiter arbeiteten mit noch nicht geschlechtsreifen Forellen, die *in vivo* stimuliert wurden (IP). In diesen Versuchsansätzen wurde Pre-Vg-cDNA in den Lebern von männlichen und weiblichen Kontrollfischen gefunden. In Fischen, die mit E₂, NP, Dimethyl-Formamid oder Ethylenglykol stimuliert wurden, war die Vg-cDNA nicht mehr vorhanden. Hier wird vermutet, dass Östrogene das Splicing der mRNA regulieren, bei fehlender Stimulation also nur Vorläufer-Vg-mRNA vorliegt. Die gefundene Pre-Vg-mRNA entspricht der Länge nach genomischer Vg-DNA, was die Vermutung bekräftigt, dass es sich hierbei um eine noch nicht gesplicete Vorläufer-mRNA handelt. Für die *in vitro*-Stimulation von Hepatozyten adulter Tiere konnte ein solcher Zusammenhang nicht gezeigt werden. Nach Stimulation der Kontroll-Zellen mit dem Lösungsmittel Ethanol wurde kein pre-Vg gefunden. Eine Erklärung für das Vorhandensein von deutlich mehr pre-Vg-cDNA nach Stimulation mit Genistein als nach Induktion mit anderen Östrogenen oder Xenoöstrogenen, wurde noch nicht gefunden.

Als weiteres Testsystem für die Detektion östrogenener Effekte wurde in unserer Gruppe eine Gonaden-Zellkultur etabliert. Analog zum E-Screen, der mit einer östrogen-sensitiven Brustkrebszelllinie (MCF-7) arbeitet (Mellanen et al., 1996; Soto et al., 1994; Soto et al., 1995), wurde eine Proliferation der Gonadenzellen nach Stimulation mit Östrogenen vermutet. Proliferationstests konnten aus Zeitgründen nicht mehr durchgeführt werden. Allerdings wurden Gonadenzellen juveniler, weiblicher Fische auf das Vorhandensein von ER-mRNA bzw. hinsichtlich einer Stimulierung der ER-mRNA-Synthese durch 17 β -Östradiol untersucht. Es wurde weder ein ER-mRNA-Basislevel gefunden noch war eine ER-mRNA-Induktion möglich. Dieser Befund deckt sich mit Ergebnissen aus der Arbeitsgruppe Pakdel (Pakdel et al., 1990), die mit *in-situ*-Hybridisierung arbeiteten und keine ER-mRNA in den Ovarien juveniler Fische detektieren konnten, was zu der Vermutung führte, dass der Östrogenrezeptor möglicherweise nur bei bestimmten, kritischen Schritten der Ei-Reifung exprimiert wird. Allerdings konnten Pakdel und Mitarbeiter (Pakdel et al., 1991) ER-mRNA in den Gonaden juveniler, männlicher Forellen nachweisen. Gonadenzellen männlicher Fische konnten von uns nicht untersucht werden, da sie sich nicht in Zellkultur halten ließen.

4.7 Überprüfung der ER- und Vg-cDNA-Banden aus der RT-PCR im Southern Blot

Die Verwendung spezifischer Primer in der PCR lässt nicht zweifelsfrei darauf schließen, dass es sich bei den resultierenden Banden wirklich um die gesuchte cDNA handelt. Bei einer Länge der Primer von ca. 20 bp ist das Auftreten von Homologien zu verschiedenen RNAs möglich, was zu einer Amplifikation einer anderen cDNA führen kann. Handelt es sich bei den Banden aus der RT-PCR um Vg- und ER-cDNA, sollten die von der Arbeitsgruppe Valotaire bereitgestellten cDNA-Sonden für Vg- und ER-mRNA diese erkennen und eine Detektion mittels Southern Blot möglich machen. In den durchgeführten Southern Blots wurden jeweils nur die Primer für eine spezifische cDNA eingesetzt und nach Blotten der Banden auf eine Nylonmembran mit der entsprechenden cDNA-Sonde hybridisiert. Der Nachweis von ER-cDNA wurde zweimal durchgeführt und führte bei der Detektion sowohl mit dem Farbstoff BCIP/NTB als auch mit CSPD zu starken Signalen (Abb. 20 und 21). Nach Färbung mit BCIP/NTB konnten zwei ER-Banden unterschieden werden, die der bekannten ER-cDNA und der zusätzlichen Bande zwischen ER- und Vg-cDNA entsprechen. Bei der Detektion mit CSPD waren die Signale zu stark, um noch zwei getrennte Banden unterscheiden zu können. Die Vermutung, dass es sich bei der zusätzlichen Bande um ER-cDNA handelt, wird durch die Ergebnisse aus den Southern Blots gestützt. Pakdel (Pakdel et al., 1990, 1991) berichtete bereits von einem Nachweis verschiedener Östrogenrezeptor-mRNAs in unterschiedlichen Geweben mittels in situ-Hybridisierung. Ob in der Regenbogenforelle analog zu ER α und ER β in mehreren Vertebraten-Spezies (Byers et al., 1997; Enmark and Gustafsson, 1998) zwei verschiedene Östrogenrezeptoren vorhanden sind, wurde bis jetzt noch nicht gezeigt. Bei der von uns gefundenen, zusätzlichen ER-cDNA könnte es sich sowohl um eine Splicing-Variante der bereits bekannten ER-mRNA handeln als auch um ein unabhängiges Genprodukt, d.h. um die mRNA eines zweiten ER. Ein Ansatz zur Identifizierung dieser cDNA könnte die Amplifikation einer größeren Menge cDNA in der PCR, anschließender Extraktion der erhaltenen cDNA aus dem Agarose-Gel und Sequenzierung der cDNA-Probe ergeben.

Ein Vergleich der Sequenz mit bereits in Genbanken vorhandenen, bekannten ER-mRNA-Spezies von Salmoniden könnte Aufschluss darüber geben, ob es sich nur um ein Bruchstück der gleichen mRNA handelt oder um ein deutlich unterschiedliches Genprodukt. Die molekular-biologischen Methoden für eine weitere Analyse des

Genprodukts sind in unserem Labor nicht etabliert, liegen allerdings auch nicht in unserem größtenteils anwendungs-orientierten Forschungsgebiet.

Ein Nachweis der Vg-cDNA unserer RT-PCR im Southern Blot war nicht möglich. Allerdings legen Ergebnisse aus Northern Blot-Experimenten den Schluss nahe, dass die Vg-cDNA-Sonde nicht mehr intakt ist, da auch ein Vg-mRNA-Nachweis im Northern Blot nicht mehr oder nur sehr schwach möglich war. Um diese Annahme zu untersuchen, wurde eine PCR mit anderen Vg-Primern (Mellanen et al., 1996) durchgeführt. Die Produkte dieser PCR, die sich von denen, mit Primern nach Ren et al. (Ren et al., 1996) erhaltenen, unterschieden, waren allerdings im Southern Blot ebenfalls nicht nachweisbar. Dieser Befund untermauert die Annahme, dass die Vg-cDNA-Sonde Vg-cDNA-Bruchstücke allgemein nicht mehr erkennt. Auf berechtigte Zweifel an der Identität der als Vg-cDNA bezeichneten Banden lassen die Ergebnisse aus dem Southern Blot nicht schließen.

4.8 Schlußbetrachtung: Stellen endokrin aktive Stoffe eine Gefahr für die Seefelder Aach und die Schussen dar

Diese Schlussbetrachtung soll dazu dienen die Grundaussagen aus Analytik sowie biologischen Tests zusammenzuführen. Neben einem Empfindlichkeitsvergleich zwischen GC/MS – Analyse und den eingesetzten Testsystemen soll v.a. die Frage geklärt werden, ob endokrin aktive Stoffe für die Fische der untersuchten Flüsse ein Risiko darstellen.

Im Bindungs-Assay konnte für die Extrakte in der Originalkonzentration (36-fach) nur für die Probe Schussen 2 ein zweifelsfreier positiver Befund von endokrin aktiven Substanzen erbracht werden. Da der Bindungs-Assay aber eine akute Belastung widerspiegelt und zudem nur einen von vielen möglichen Endpunkten darstellt, ist die Empfindlichkeit des Bindungs-Assays gegenüber *in vivo* Expositionsversuchen kleiner, liegt womöglich sogar über dem Schwellenwert für eine endokrine Wirkung.

Bei Einsatz der Originalkonzentration wurde ebenfalls für keine der Proben ein agonistischer Effekt in Form einer Induktion von ER- oder Vg-mRNA-Synthese in Hepatozyten männlicher Regenbogenforellen gefunden. Wurden die Wasserproben 10fach konzentriert auf die Zellen gegeben, zeigte sich für einige der Schussen-Proben eine Zunahme der ER-mRNA. Diese Proben zeigten auch im CERBA (ab 4facher bzw. 36facher Konzentrierung) eine Bindung an den Östrogenrezeptor. Das lässt den Schluss zu, dass die beobachtete mRNA-Synthese über die Aktivierung des Östrogenrezeptors

ausgelöst wurde. Vergleiche der gefundenen Effekte mit den Ergebnissen aus chemischen Analysen der Wasserproben zeigten, dass sich die kompetitive Bindung an den ER jeweils durch eine bekannterweise östrogene Substanz erklären lässt. So wurde in der Probe aus dem Kläranlagenfluss ein stark erhöhter Gehalt an 4-Octylphenol (397,0 ng/l) gefunden, für die Probe der Schussen zeigte sich ein ungewöhnlich hoher Gehalt an 17 β -Östradiol (31,8 ng/l).

Neben der Untersuchung der östrogenen Aktivität von Flusswasserproben sollte auch die Embryotoxizität der Proben erfasst werden. Ein Vergleich der Ergebnisse sollte einen möglichen Zusammenhang zwischen einem Eingriff in das Hormonsystem und einer teratogenen bzw. letalen Wirkung während der Embryonalentwicklung aufdecken. Eine toxische Wirkung auf die Embryonalentwicklung von Krallenfrosch und Zebrafisch konnte für keine der Wasserproben aus Schussen und Seefelder Aach gezeigt werden. Auch die Probe aus dem Kläranlagen-Abfluss führte weder zu erhöhter Mortalität noch zu einer Zunahme der Malformationsrate oder Inhibition des Längenwachstums der Embryonen. Zwischen östrogenen Wirkung und Embryotoxizität konnte also kein Zusammenhang hergestellt werden.

Für den Fluss Seefelder Aach zeigten GC-MS – Analyse und die biologischen Testsysteme keine Gefahr an. Es erscheint somit wahrscheinlich, dass endokrine Substanzen in diesem Gewässer kein Risiko für die Fischpopulation bedeuten.

In der Schussen ergab die GC-MS – Analyse, dass die bestimmten Werte für 17 β -Östradiol immer nahe am Schwellenwert von 1 – 10 ng/l für eine endokrine Wirkung lagen, z.T. sogar deutlich darüber. Auch für 17 α -Ethinylöstradiol konnte ein kontinuierlicher Nachweis in der Wochenprobe erbracht werden, wobei die Konzentrationen mit einem Maximum von 5 ng/l deutlich über dem Schwellenwert für eine östrogene Wirkung (EE₂: 0,1 – 0,5 ng/l) lagen. Die Schwellenwerte wurden nach mehrwöchiger Exposition von Regenbogenforellen in *in vivo* Tests bestimmt, sie gelten also für eine chronische Belastung (Purdom et al., 1994; Routledge et al., 1998). Die Relevanz dieses Befundes wird zudem durch die Ergebnisse aus dem ELISA verdeutlicht. Hier zeigte die Inkubation der Karpfen-Zellkultur mit EE₂ einen weit stärkeren Befund als mit E₂. Schon 0,1 nM EE₂ bewirkten nach 48 h Inkubation eine Ausschüttung von Vg ins Zellkultur-Medium, dieser Effekt wurde von E₂ erst durch Stimulation mit 10 nM erreicht. EE₂ besitzt demzufolge eine sehr hohe östrogene Potenz, die z.B. auf eine schlechtere Abbaubarkeit von EE₂ durch den Organismus zurückgeführt werden kann. Die chronisch vorhandenen E₂ und EE₂-Konzentrationen der Schussen könnten also durchaus ausreichend hoch sein, um in männlichen Fischen die Induktion von Vg auszulösen. Was dies jedoch für den Organismus selbst sowie für

die Population bedeutet, ist bis dato noch nicht geklärt. Unklar ist beispielsweise, ob die Induktion von Vitellogenin im Männchen einen Einfluss auf dessen Fortpflanzungserfolg hat. Auch der Fund von Intersex in Fischen kann nicht zwingend auf die Exposition mit endokrin aktiven Substanzen zurückgeführt werden, wie eine Studie von Schwaiger et al. zeigte. Hier wurden in Jungfischen beiderlei Geschlechts Fälle von Intersex unabhängig davon gefunden, ob ihre Elterntiere für 4 Monate mit 1 bzw. 10 µg/l Nonylphenol exponiert waren, oder aber der Kontrollgruppe angehörten (Schwaiger et al., 2001).

Aus diesen Befunden geht hervor, dass die hier vorgestellten *in vitro* Tests nur bedingt für die Untersuchung von chronischen, vergleichsweise geringen Belastungssituationen geeignet sind. Ein Grund hierfür dürfte beispielsweise das Vorhandensein einer komplexen Matrix von Huminsäuren, Huminen etc. im Flusswasser sein. Diese Substanzen werden durch die heute gängigen Methoden der Probenaufbereitung mit erfasst und können in den *in vitro* Tests zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen. Zudem verhindern die Matrixbestandteile eine hohe Aufkonzentrierung der Extrakte, wie sie für die Tests erforderlich wäre. Dem Abhilfe schaffen könnte zwar eine Aufreinigung der Extrakte, wie in dieser Arbeit teilweise geschehen, hierdurch könnten jedoch auch für die Messung relevante Stoffe eliminiert werden. Um deshalb mögliche Störfaktoren ausschließen zu können, müssen verschiedene *in vitro* Tests parallel durchgeführt werden.

Zudem ist die Wahl der Endpunkte der jeweiligen Tests von entscheidender Bedeutung. Die (endokrinen) Endpunkte in diesem Projekt decken beispielsweise ein breites Spektrum an möglichen Wirkungen ab. So wird im CERBA die Bindung von Xenobiotika an den Rezeptor gemessen, in der RT-PCR wird die daraus resultierende Transkription bestimmt, im ELISA wird festgestellt, ob es danach auch zur Translation und Freisetzung des Proteins kommt.

Durch die Abdeckung der verschiedenen Wirkungs-Ebenen stellen die hier vorgestellten *in vitro* Tests trotz ihrer Mängel deshalb wichtige Werkzeuge zur Untersuchung endokrin aktiver Stoffe dar. Zum Einen sind, trotz großer Bemühungen, viele Fragen bezüglich der molekularen Wirkung einzelner Substanzen noch unklar. Der Blick auf verschiedene Wirkebenen kann hier von entscheidender Bedeutung sein, wie das Beispiel von EE₂ im ELISA zeigt. Zum Anderen sind *in vitro* Tests weit einfacher und kostengünstiger durchzuführen sowie weniger von äusseren Einflüssen abhängig als *in vivo* - Expositionsversuche. Dennoch aber sollten in Zukunft verstärkt auch *in vivo* Tests durchgeführt werden, um die Relevanz vieler Daten, die in *in vitro* Tests erzielt wurden, für das Freiland aufzuzeigen und dadurch ein 'risk assessment' möglich zu machen. Im konkreten Fall bedeutet dies, dass es zwar wünschenswert wäre, die

Schussen aufgrund der chronischen Belastung mit Östrogenen weiterhin unter Beobachtung zu stellen, dass jedoch der Forschungsschwerpunkt auf Expositions- und Freilandversuche gesetzt werden müsste, um eine endgültige Bewertung aller eingesetzten Untersuchungsmethoden ermöglichen zu können.

5 **ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

| | | |
|------------|--|----|
| Abb. 1.1: | Östrogenrezeptor-vermittelte Wirkung von 17 β -Östradiol auf die Genexpression..... | 5 |
| Abb. 1.2: | Vitellogenin-Synthese in weiblichen Forellen | 10 |
| Abb. 1.3: | Karte des Bodensees mit wichtigen Flüssen und Städten..... | 13 |
| Abb. 2.1: | Chemische Strukturformeln aller untersuchten Substanzen | 18 |
| Abb. 2.2: | Analysenschema zur Bestimmung endokrin aktiver Substanzen in Flusswasserextrakten | 23 |
| Abb. 2.3: | Analysenschema zur Bestimmung endokrin aktiver Substanzen in Flusswasser | 26 |
| Abb. 2.4: | Standardadditionsverfahren für die Bestimmung von Diclofenac..... | 28 |
| Abb. 2.5: | Entwicklung von Zebrafischembryonen und Durchführung des DRETA..... | 31 |
| Abb. 2.6: | Forellen-Hepatozyten in 150facher und 300facher Vergrößerung | 38 |
| Abb. 2.7: | Karpfen-Hepatozyten in 75facher und 300facher Vergrößerung. | 39 |
| Abb. 2.8: | Gonadenzellen einer weiblichen Regenbogenforelle | 40 |
| Abb. 3.1: | Mortalität, Malformationen und Längenwachstum bei Xenopus-Embryonen nach Exposition mit Wasserproben im 96 h-Akutttest. | 67 |
| Abb. 3.2: | Mortalität, Malformationen und Längenwachstum bei Xenopus-Embryonen nach Exposition mit Wasserproben der Wochenganglinie im 96 h-Akutttest. | 68 |
| Abb. 3.3: | Mortalität, Malformationen und Längenwachstum bei Zebrafisch-Embryonen nach Exposition mit Wasserproben im 96 h-Akutttest..... | 70 |
| Abb. 3.4: | Mortalität, Malformationen und Längenwachstum bei Zebrafisch-Embryonen nach Exposition mit Wasserproben der Wochenganglinie Schussen im 96 h-Akutttest..... | 71 |
| Abb. 3.5: | Sättigungs-Assay der ersten Zytosol-Präparation..... | 72 |
| Abb. 3.6: | Scatchard Plot der ersten Zytosol-Präparation. | 73 |
| Abb. 3.7: | Östrogenrezeptor-Bindung von Östrogenen..... | 74 |
| Abb. 3.8: | Östrogenrezeptor-Bindung von Phytohormonen..... | 75 |
| Abb. 3.9: | Östrogenrezeptor-Bindung von Bisphenol A und Nonylphenol. | 75 |
| Abb. 3.10: | Östrogenrezeptor-Bindung ausgewählter Pharmaka | 76 |
| Abb. 3.11: | Östrogenrezeptor-Bindung von Östrogen-Gemischen. | 78 |
| Abb. 3.12: | Östrogenrezeptor-Bindung von Gemischen. | 79 |
| Abb. 3.13: | Östrogenrezeptor-Bindung der Flusswasserextrakte SeeAach 1 und 2..... | 80 |
| Abb. 3.14: | Östrogenrezeptor-Bindung der Flusswasserextrakte Schussen 1 und 2. | 81 |
| Abb. 3.15: | Östrogenrezeptor-Bindung der Extrakte Kläranlage, Schussen 3 und Schussen 4..... | 82 |
| Abb. 3.16: | Östrogenrezeptor-Bindung der Extrakte Oberzell und SeeAach 4..... | 83 |

| | |
|---|-----|
| Abb. 3.17: Östrogenrezeptor-Bindung des Extrakts Schussen 5..... | 84 |
| Abb. 3.18: Bindung von organischen Extrakten (+ cleanup) der untersuchten Wasserprobe an den Rezeptor der Regenbogenforelle. (SEM; $p < 0,01$: **) | 85 |
| Abb. 3.19: Vitellogenin-Bestimmung im Überstand von Forellen-Hepatozyten mittels ELISA. | 86 |
| Abb. 3.20: Vitellogenin-Bestimmung im Überstand von Karpfen-Hepatozyten mittels ELISA. | 87 |
| Abb. 3.21: ER-mRNA-Synthese in Hepatozyten einer geschlechtsreifen, weiblichen Regenbogenforelle nach Stimulation mit E2 für 24 bzw. 48 h..... | 89 |
| Abb. 3.22: ER- bzw. Vg-mRNA-Synthese in Hepatozyten einer weiblichen Regenbogenforelle nach Stimulation mit Nonylphenol für 24 h. | 90 |
| Abb. 3.23: Vergleich der Stimulierbarkeit von Hepatozyten männlicher Regenbogenforellen aus verschiedenen Präparationen nach 96 h Ruhephase sowie 24 h Inkubation..... | 92 |
| Abb. 3.24: Stimulation der Vg- und ER-mRNA-Synthese in Hepatozyten einer männlichen Forelle mit E2 nach 96 h Ruhephase sowie 24 h Inkubation. | 92 |
| Abb. 3.25: Stimulation der Vg- und ER-mRNA-Synthese in Hepatozyten einer weiblichen Forelle mit E2 nach 96 h Ruhephase sowie 24 h Inkubation. | 93 |
| Abb. 3.26: Stimulation der Vg- und ER-mRNA-Synthese in Hepatozyten einer weiblichen Forelle mit E2 bzw. EE nach 96 h Ruhephase sowie 24 h Inkubation. | 94 |
| Abb. 3.27: Stimulation der Vg- und ER-mRNA-Synthese in Hepatozyten einer juvenilen weiblichen Regenbogenforelle mit E2 bzw. EE. nach 96 h Ruhephase sowie 24 h Inkubation. | 95 |
| Abb. 3.28: Vg- und ER-mRNA-Synthese in Hepatozyten einer juv., weibl. Regenbogenforelle nach Stimulation mit NP bzw. Bis A nach 96 h Ruhephase sowie 24 h Inkubation..... | 95 |
| Abb. 3.29: Vg- und ER-mRNA-Synthese in Hepatozyten einer adulten, männlichen Regenbogenforelle nach Stimulation mit Nonylphenol (NP) bzw. Bisphenol A (Bis A) nach 96 h Ruhephase sowie 24 h Inkubation. | 96 |
| Abb. 3.30: Vg- und ER-mRNA-Synthese in Hepatozyten einer adulten, männlichen Regenbogenforelle nach Stimulation mit den Pharmaka Bezafibrat, Naproxen, Carbamazepin und Clofibrat, bzw. dem Phytoöstrogen Genistein nach 96 h Ruhephase sowie 24 h Inkubation. | 97 |
| Abb. 3.31: Stimulation von Hepatozyten einer adulten, männlichen Regenbogenforelle mit Diclofenac bzw. b-Sitosterol nach 96 h Ruhephase sowie 24 h Inkubation. | 98 |
| Abb. 3.32: Vg- und ER-mRNA-Synthese in Hepatozyten einer adulten, männlichen Regenbogenforelle nach Stimulation mit den 10fach konzentrierten, organischen Phasen von Wasserproben aus Schussen, Seefelder Aach und dem Abfluss der Kläranlage Langwiese nach 96 h Ruhephase sowie 24 h Inkubation. | 99 |
| Abb. 3.33: Stimulation der Vg- und ER-mRNA-Synthese in Hepatozyten einer adulten, männlichen Regenbogenforelle nach Stimulation mit E2 und Diclofenac bzw. E2 und Carbamazepin. | 100 |

| | |
|--|-----|
| Abb. 3.34: Stimulation der Vg- und ER-mRNA-Synthese mit Diclofenac und E2 nach 96 h Ruhephase sowie 24 h Inkubation..... | 101 |
| Abb. 3.35: Stimulation von Gonadenzellen einer weiblichen Regenbogenforelle mit E2..... | 102 |
| Abb. 3.36: Stimulation der Vitellogenin- (Vg: 827 bp) und Östrogenrezeptor- (ER: 1043 bp) mRNA in Forellen-Hepatozyten durch 17 β -Östradiol (E2)..... | 103 |
| Abb. 3.37: Stimulation der Vitellogenin- (Vg: 827 bp) und Östrogenrezeptor- (ER: 1043 bp) mRNA in Forellen-Hepatozyten durch Bisphenol A (Bp A)..... | 104 |
| Abb. 3.38: Stimulation der Vg- (827 bp) und ER- (1043 bp) mRNA durch die Wasserproben Schussen 30.9.1999 bzw. 3.5.2000 und Seefelder Aach 3.5.2000, sowie durch Nonylphenol (NP) .. | 104 |
| Abb. 3.39: Stimulation der Vg- (827 bp) und ER- (1043 bp) mRNA durch die Wasserproben Schussen 1.10.2000 bis 7.10.2000. | 104 |
| Abb. 3.40: Nachweis der ER-cDNA mittels Southern Blot. A) RT-PCR; B) Southern Blot: Detektion mit NTB/BCIP-Farbstoff..... | 106 |
| Abb. 3.41: Nachweis der ER-cDNA im Southern Blot. Detektion mit CSPD-Chemilumineszenz- Farbstoff. | 106 |
| Abb. 4.1: Östrogengehalt im Flusswasser der Schussen-Wochenganglinie..... | 114 |
| Abb. 4.2: Schussen-Wochenganglinie für Bezafibrat, Diclofenac, Carbamazepin und Propiphenazon..... | 118 |

6 TABELLENVERZEICHNIS

| | |
|---|-----|
| Tabelle 2.1: Untersuchte Substanzen mit Molekulargewicht (MG) sowie Herkunftsfirma | 17 |
| Tabelle 2.2: Gaschromatographische Analysebedingungen | 24 |
| Tabelle 2.3: Analytierte Verbindungen mit Retentionszeit, zur Quantifizierung verwendeten internen Standards sowie den gemessenen Ionen | 25 |
| Tabelle 2.4: Im CERBA getestete Substanzen mit Konzentrationsbereich | 35 |
| Tabelle 3.1: Probennahmestelle, Datum, weitere Bezeichnung im Text, pH-Wert und Temperatur der Wasserprobe sowie Verwendungszweck der Extrakte..... | 58 |
| Tabelle 3.2: Wiederfindungsrate ausgewählter Wasserproben für radioaktiv markiertes Östradiol nach Dichlormethanaufarbeitung | 60 |
| Tabelle 3.3: GC-MS-Analyse der Flusswasser-Extrakte | 62 |
| Tabelle 3.4: Östrogene und endokrin aktive Substanzen im Flusswasser der Schussen..... | 63 |
| Tabelle 3.5: Neutrale, saure und basische Arzneimittel in der Schussen. | 64 |
| Tabelle 3.6: Mortalität, Malformationen und Längenwachstum bei Xenopus-Embryonen nach Exposition mit Wasserproben im 96 h-Akutttest..... | 66 |
| Tabelle 3.7: Mortalität, Malformationen und Längenwachstum bei Xenopus-Embryonen nach Exposition mit Wasserproben im 96 h-Akutttest..... | 66 |
| Tabelle 3.8: Mortalität, Malformationen und Längenwachstum bei Zebrafisch-Embryonen nach Exposition mit Wasserproben im 96 h- Akutttest..... | 69 |
| Tabelle 3.9: Dissoziationskonstante K_d und Anzahl der Bindungsstellen B_{max} | 73 |
| Tabelle 3.10: Östrogenrezeptor-Bindung der Einzelsubstanzen : IC_{50} - Werte mit 95 % Konfidenzintervall..... | 77 |
| Tabelle 4.1: Vergleich der Bindung des Extrakts Schussen 2 filtriert mit dem Gehalt an 17 β -Östradiol | 130 |
| Tabelle 4.2: Vergleich der EC_{50} -Werte für die kompetitive Bindung einer Substanz an den Östrogenrezeptor mit der Schwellenkonzentration für Stimulation von ER- und Vg-mRNA-Synthese in Forellen-Hepatozyten..... | 139 |

7 LITERATURVERZEICHNIS

Andersen, H.R.; Andersson, A.M.; Arnold, S.F.; Autrup, H.; Barfoed, M.; Beresford, N.A.; Bjerregaard, P.; Christiansen, L.B.; Gissel, B.; Hummel, R.; Jorgensen, E.B.; Korsgaard, B.; Le Guevel, R.; Leffers, H.; McLachlan, J.; Moller, A.; Nielsen, J.B.; Olea, N.; Oles-Karasko, A.; Pakdel, F.; Pedersen, K.L.; Perez, P.; Skakkeboek, N.E.; Sonnenschein, C.; Soto, A.M.; Sumpter, J.P.; Thorpe, S.M. und Grandjean, P. (1999). "Comparison of Short-Term Estrogenicity Tests for Identification of Hormone-Disrupting Chemicals." *Environ Health Perspect* 107 (1): 89-108.

Armour, K.J., D.B. Lehane, F. Pakdel, Y. Valotaire, R. Graham, R.G. Russell, and I.W. Henderson. 1997. Estrogen receptor mRNA in mineralized tissues of rainbow trout: calcium mobilization by estrogen. *FEBS Lett.* 411:145-8.

Arnold, S.F.; Klotz, D.M.; Collins, B.M.; Vonier, P.M.; Guillette, L.J., Jr. und McLachlan, J.A. (1996). "Synergistic activation of estrogen receptor with combinations of environmental chemicals [retracted by J.A. McLachlan, *Science* 1997 Jul 25;277(5325):462-3]." *Science* 272 (5267): 1489-92.

Arnold, S.F.; Vonier, P.M.; Collins, B.M.; Klotz, D.M.; Guillette, L.J. und McLachlan, J.A. (1997). "In vitro synergistic interaction of alligator and human estrogen receptors with combinations of environmental chemicals." *Environ Health Perspect* 105 (618): 615-618.

Arukwe, A.; Förlin, L. und Goksoyr, A. (1997). "Xenobiotic and Steroid Biotransformation Enzymes in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Liver Treated with an Estrogenic Compound, 4-Nonylphenol." *Environ Toxicol Chem* 16 (12): 2576-2583.

Ashby, J., and H. Tinwell. 1998. Uterotrophic activity of bisphenol A in the immature rat. *Environ Health Perspect.* 106:719-20.

ASTM. 1991. *Standart Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus (FETAX)*. American Society for Testing and Materials, Philadelphia.

Babin, P.J., and J.M. Vernier. 1989. Plasma lipoproteins in fish. *J Lipid Res.* 30:467-89.

Bantle, J.A. 1995. FETAX - A developmental toxicity assay using frog embryos. In *Fundamentals of Aquatic Toxicology; Effects, Environmental Fate and Risk Assessment*. G.M. Rand (ed.). Taylor & Francis, 1995.

Bätscher, R.; Studer, C. und Fent, K. (1999). "Stoffe mit endokriner Wirkung in der Umwelt", Eidgenössische Anstalt für Wasserversorgung, Abwasserreinigung und Gewässerschutz (EAWAG), Zürich, und Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft (BUWAL), Bern.

- Birnbaum, L.S. (1995). "Developmental effects of dioxin." *Environ Health Perspect* 103 (7): 89-94.
- Bolger, R.; Wiese, T.E.; Ervin, K.; Nestich, S. und Checovich, W. (1998). "Rapid screening of environmental chemicals for estrogen receptor binding capacity." *Environ Health Perspect* 106 (9): 551-7.
- Bort, R.; Ponsoda, X.; Jover, R.; Gomez-Lechon, M.J. und Castell, J.V. (1999). "Diclofenac toxicity to hepatocytes: a role for drug metabolism in cell toxicity." *J Pharmacol Exp Ther* 288 (1): 65-72.
- Brock, M.L., and D.J. Shapiro. 1983a. Estrogen regulates the absolute rate of transcription of the *Xenopus laevis* vitellogenin genes. *J Biol Chem.* 258:5449-55.
- Brock, M.L., and D.J. Shapiro. 1983b. Estrogen stabilizes vitellogenin mRNA against cytoplasmic degradation. *Cell.* 34:207-14.
- Brotans, J.A.; Olea-Serrano, M.F.; Villalobos, M.; Pedraza, V. und Olea, N. (1995). "Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans." *Environ Health Perspect* 103 (6): 608-612.
- Brzozowski, A.M.; Pike, A.C.; Dauter, Z.; Hubbard, R.E.; Bonn, T.; Engstrom, O.; Ohman, L.; Greene, G.L.; Gustafsson, J.A. und Carlquist, M. (1997). "Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor." *Nature* 389 (6652): 753-8.
- BUA-Stoffbericht 203. 1995. Bisphenol A. Stand 1995. Beratergremium für umweltrelevante Altstoffe, Gesellschaft Deutscher Chemiker.
- Bulger, W. und Kupfer, D. (1983). "Estrogenic activity of DDT analogs." *American Journal of Industrial Medicine* 4 : 163-173.
- Bulger, W.; Muccitelli, R. und Kupfer, D. (1978). "Studies on the in vivo and in vitro estrogenic activities of methoxychlor and its metabolites. Role of hepatic mono-oxygenase in methoxychlor activation." *Biochem Pharmacol* 27 : 2417-2423.
- Byers, M., G.G. Kuiper, J.A. Gustafsson, and O.K. Park-Sarge. 1997. Estrogen receptor-beta mRNA expression in rat ovary: down-regulation by gonadotropins. *Mol Endocrinol.* 11:172-82.
- Campbell, P.M.; Pottinger, T.G. und Sumpter, J.P. (1994). "Changes in the affinity of estrogen and androgen receptors accompany changes in receptor abundance in brown and rainbow trout." *Gen Comp Endocrinol* 94 (3): 329-40.
- Carlsen, E., A. Giwercman, N. Keiding, and N. Skakkebaek. 1992. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ.* 305:609-613.
- Castillo, M. und Barceló, D. (1997). "Analysis of industrial effluents to determine endocrine-disrupting chemicals." *trends in analytical chemistry* 16 (10): 574-583.
- Chou, Y.-J. (1999). "Embryotoxic, Teratogenic and Endocrine Modulating Activity of Musk Fragrances in Fish and Amphibians." Dissertation AG Umwelttoxikologie, Universität Konstanz.

- Chou, Y.-J. and D.R. Dietrich, Interactions of nitromusk parent compounds and their amino-metabolites with the estrogen receptors of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and the South African clawed frog (*Xenopus laevis*). *Toxicol. Lett.*, 1999. 111: p. 27-36.
- Chou, Y.-J. and D.R. Dietrich, Toxicity of nitromusks in early lifestages of South African clawed frog (*Xenopus laevis*) and zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicol. Lett.*, 1999. 111: p. 17-25.
- Clark, J.H., W.T. Schrader, and B.W. O'Malley. 1992. Mechanism of action of steroid hormones. *Textbook of Endocrinology*, Eds Wilson, J.D. & Foster, D.W. New York: W.B. Saunders Company:35-90.
- Coldham, N.G., M. Dave, S. Sivapathasundaram, D.P. McDonnell, C. Connor, and M.J. Sauer. 1997. Evaluation of a recombinant yeast cell estrogen screening assay. *Environ Health Perspect.* 105:734-42.
- Cooke, B.K., and A. Stringer. 1982. Distribution and breakdown of DDT in orchard soil. *Pestic Sci.* 13:545-551.
- Copeland, P.A., J.P. Sumpter, T.K. Walker, and M. Croft. 1986. Vitellogenin levels in male and female rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) at various stages of the reproductive cycle. *Comp Biochem Physiol [B]*. 83:487-93.
- Crain, D.A., L.J. Guillette, Jr., A.A. Rooney, and D.B. Pickford. 1997. Alterations in steroidogenesis in alligators (*Alligator mississippiensis*) exposed naturally and experimentally to environmental contaminants. *Environ Health Perspect.* 105:528-33.
- Cravédi, J.-P., A. Paris, G. Monod, A. Devaux, G. Flouriot, and Y. Valotaire. 1996. Maintenance of cytochrome P450 content and phase I and phase II enzyme activities in trout hepatocytes cultured as spheroidal aggregates. *Comparative Biochemistry and Physiology.* 113C:241-246.
- Crews, D.; Bergeron, J. und McLachlan, J. (1995). "The role of estrogen in turtle sex determinations and the effects of PCBs." *Environ Health Perspect* 103 (7): 73-77.
- Danzo, B.J. 1997. Environmental xenobiotics may disrupt normal endocrine function by interfering with the binding of physiological ligands to steroid receptors and binding proteins. *Environ Health Perspect.* 105:294-301.
- Davis, D.L., D. Axelrod, L. Bailey, M. Gaynor, and A.J. Sasco. 1998. Rethinking breast cancer risk and the environment: the case for the precautionary principle. *Environ Health Perspect.* 106:523-9.
- Day, D.A., and M.F. Tuite. 1998. Post-transcriptional gene regulatory mechanisms in eukaryotes: an overview. *J Endocrinol.* 157:361-71.
- Desbrow, C.; Routledge, E.J.; Brighty, G.C.; Sumpter, J.P. und Waldock, M. (1998). "Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 1. Chemical Fractionation and in Vitro Biological Screening." *Environ Sci Technol* 32 (11): 1549-1558.

- Dietrich, D.R., A. Prietz, and M.A. Kiamos. 1998. Danio rerio embryotoxicity and teratogenicity assay (DRETA) for detecting waterborne embryo-toxicants and teratogens. *Toxicol. Sci.*, 1998. 42(1-S): p. 259.
- Dietrich, D.R., H. Schreiber, and S. Rumpf. 1998. *Literaturrecherche zu Pharmaka im aquatischen Milieu*. LFU-Langenargen:38 pp.
- Ekelund, R., A.A. Bergman, A. Granmo, and M. Berggren. 1990. Bioaccumulation of 4-nonylphenol in marine animals. A re-evaluation. *Environmental Pollut.* 64:107-120.
- Enmark, E., and J.-A. Gustafsson. 1998. Estrogen receptor β - a novel receptor opens up new possibilities for cancer diagnosis and treatment. *Endocrine-Related Cancer*. 5:213-222.
- Farhat, M.Y., M.C. Lavigne, and P.W. Ramwell. 1996. The vascular protective effects of estrogen. *Faseb J.* 10:615-24.
- Fleig, M., and H.-J. Brauch. 1997. Untersuchungen im Längsprofil der Schussen. In *AWBR-Jahresbericht 1997*. St. Gallen.
- Flouriot, G., C. Vaillant, G. Salbert, C. Pelissero, J.M. Guiraud, and Y. Valotaire. 1993. Monolayer and aggregate cultures of rainbow trout hepatocytes: long-term and stable liver-specific expression in aggregates. *Journal of Cell Science*. 105:407-416.
- Flouriot, G., F. Pakdel, and Y. Valotaire. 1996. Transcriptional and post-transcriptional regulation of rainbow trout estrogen receptor and vitellogenin gene expression. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 124:173-183.
- Flouriot, G., F. Pakdel, B. Ducouret, and Y. Valotaire. 1995. Influence of xenobiotics on rainbow trout liver estrogen receptor and vitellogenin gene expression. *Journal of Molecular Endocrinology*. 15:143-151.
- Folmar, L.C., N.D. Denslow, V. Rao, M. Chow, D.A. Crain, J. Enblom, J. Marcino, and L.J. Guillette, Jr. 1996. Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. *Environ Health Perspect.* 104:1096-101.
- Förlin, L., T. Andersson, U. Koivusaari, and T. Hasson. 1984. Influence of biological and environmental factors on hepatic steroid and xenobiotic metabolism in fish: interaction with PCB and β -naphthoflavone. *Marine Environmental Research*. 14:47-58.
- Fox, G. Epidemiological and pathological evidence of contaminant induced alterations in sexual development in free-living wildlife. In: *Chemically-induced alterations in sexual and functional development: the wildlife/human connection* (Colborn, T.; Clement, C. eds) Princeton, NJ: Princeton Scientific Publishing:147-158.

- Fry, D.M. (1995). "Reproductive effects in birds exposed to pesticides and industrial chemicals." *Environ Health Perspect* 103 (7): 165-171.
- Fry, D.M., and C.K. Toone. 1981. DDT-induced feminization of gull embryos. *Science*. 213:922-4.
- Garrison, A.W., and D.W. Hill. 1972. Organic pollutants from mill persist in downstream waters. *Am. Dyest. Rep.* 61:21-25.
- Golden, R.J., K.L. Noller, L. Titus-Ernstoff, R.H. Kaufman, R. Mittendorf, R. Stillman, and E.A. Reese. 1998. Environmental endocrine modulators and human health: an assessment of the biological evidence. *Critical Reviews in Toxicology*. 28:109-227.
- Graef, V., S.W. Golf, and G. Goerz. 1979. Effect of hexachlorobenzene on enzymes of steroid metabolism in rat liver. *Archives of Toxicology*. 43:115-120.
- Gray, L.E., Jr. (1998). "Xenoendocrine disrupters: laboratory studies on male reproductive effects." *Toxicol Lett* 102-103 : 331-5.
- Gray, M.A., and C.D. Metcalfe. 1997. Induction of testis-ova in japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to p-nonylphenol. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 16:1082-1086.
- Guillette, L.J., Jr., and E.A. Guillette. 1996. Environmental contaminants and reproductive abnormalities in wildlife: implications for public health? *Toxicol Ind Health*. 12:537-50.
- Guillette, L.J., Jr., D.B. Pickford, D.A. Crain, A.A. Rooney, and H.F. Percival. 1996. Reduction in penis size and plasma testosterone concentrations in juvenile alligators living in a contaminated environment. *Gen Comp Endocrinol*. 101:32-42.
- Guillette, L.J.; Gross, T.S.; Mason, G.R.; Matter, J.M.; Percival, H.F. und Woodward, A.R. (1994). "Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex-hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida." *Environ Health Perspect* 102 (8): 680-688.
- Harries, J.; Sheahan, D.; Jobling, S.; Matthiessen, P.; Neall, P.; Routledge, E.; Rycroft, R.; Sumpter, J. und Tylor, T. (1996). "A survey of estrogenic activity in United Kingdom inland waters." *Environ Toxicol Chem* 15 (11): 1993-2002.
- Harries, J.E.; Sheahan, D.A.; Jobling, S.; Matthiessen, P.; Neall, P.; Sumpter, J.P.; Tylor, T. und Zaman, N. (1997). "Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout." *Environ Toxicol Chem* 16 (3): 534-542.
- Heppell, S.A., N.D. Denslow, L.C. Folmar, and C.V. Sullivan. 1995. Universal assay of vitellogenin as a biomarker for environmental estrogens. *Environ Health Perspect*. 103 Suppl 7:9-15.
- Hessisches Ministerium für Umwelt, Energie, Jugend, Familie und Gesundheit.

- Hetzenauer, H. 1998. Arzneimittel-Rückstände im Bodensee-Obersee, Argen und Schussen. Institut für Seenforschung, Langenargen.
- Hooper, S.W., C.A. Pettigrew, and G.S. Saylor. 1990. Ecological fate, effects and prospects for elimination of environmental polychlorinated biphenyls (PCBs). *Environmental Toxicol Chem.* 9:655-667.
- Hopert, A.C.; Beyer, A.; Frank, K.; Strunck, E.; Wunsche, W. und Vollmer, G. (1998). "Characterization of estrogenicity of phytoestrogens in an endometrial-derived experimental model." *Environ Health Perspect* 106 (9): 581-6.
- Jobling, S., and J.P. Sumpter. 1993. Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: an in vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquatic Toxicology.* 27:361-372.
- Jobling, S., D. Sheahan, J.A. Osborne, P. Matthiessen, and J.P. Sumpter. 1996. Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* 15:194-202.
- Jobling, S., T. Reynolds, R. White, M.G. Parker, and J.P. Sumpter. 1995. A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ Health Perspect.* 103:582-7.
- Kao, Y.C., C. Zhou, M. Sherman, C.A. Laughton, and S. Chen. 1998. Molecular basis of the inhibition of human aromatase (estrogen synthetase) by flavone and isoflavone phytoestrogens: a site-directed mutagenesis study. *Environmental Health Perspectives.* 106:85-92.
- Katzenellenbogen, J.A. 1995. The structural pervasiveness of estrogenic activity. *Environ Health Perspect.* 103 Suppl 7:99-101.
- Kelce, W.R. und Wilson, E.M. (1997). "Environmental antiandrogens: developmental effects, molecular mechanisms, and clinical implications." *J Mol Med* 75 (3): 198-207.
- Kloas, W.; Lutz, I. und Einspanier, R. (1999). "Amphibians as a model to study endocrine disruptors: II. Estrogenic activity of environmental chemicals in vitro and in vivo." *Sci Total Environ* 225 (1-2): 59-68.
- Klotz, D.M.; Beckman, B.S.; Hill, S.M.; McLachlan, J.A.; Walters, M.R. und Arnold, S.F. (1996). "Identification of environmental chemicals with estrogenic activity using a combination of in vitro assays." *Environ Health Perspect* 104 (10): 1084-1089.
- Knudsen, F.R. und Pottinger, T.G. (1999). "Interaction of endocrine disrupting chemicals, singly and in combination, with estrogen-, androgen-, and corticosteroid-binding sites in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." *Aquat Toxicol* 44 : 159-170.

- Korach, K.S., S. Migliaccio, and V.L. Davis. 1994. Estrogens. In: Munson, P.L. (ed) Principles of Pharmacology - Basic concepts and clinical applications. Chapman and Hall, New York:809-825.
- Korte, J. J., M. D. Kahl, K. M. Jensen, M. S. Pasha, L. G. Parks, G. A. LeBlanc and G. T. Ankley. Fathead Minnow Vitellogenin: Complementary DNA sequence and messenger RNA and protein expression after 17 β -estradiol treatment. Environ. Toxicol. Chem., 2000. 19(4 I): p. 972-981.
- Krieger, H. (1999). "Untersuchung zu endokrinen und hepatotoxischen Wirkungen von Stoffen in Kläranlagenausläufen des Kantons Luzern auf Salmoniden." Diplomarbeit AG Umwelttoxikologie, Universität Konstanz.
- Kuiper, G.G.; Carlsson, B.; Grandien, K.; Enmark, E.; Haggblad, J.; Nilsson, S. und Gustafsson, J.A. (1997). "Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta." Endocrinology 138 (3): 863-70.
- Langenargen, Institut für Seenforschung (1997). "Zur stofflichen Belastung baden-württembergischer Bodenseezuflüsse", Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg.
- Larsson, D., M. Adolfsson-Erici, J. Parkkonen, M. Pettersson, A.H. Berg, P.-E. Olsson, and L. Förlin. 1999. Ethinyloestradiol - an undesired fish contraceptive. Aquatic Toxicology. 45:91-97.
- Le Dréan, Y.; Kern, L.; Pakdel, F. und Valotaire, Y. (1995). "Rainbow trout estrogen receptor presents an equal specificity but a differential sensitivity for estrogens than human estrogen receptor." Mol Cell Endocrinol 109 (1): 27-35.
- Le Guellec, K., K. Lawless, Y. Valotaire, M. Kress, and M. Tenniswood. 1988. Vitellogenin gene expression in male rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Gen Comp Endocrinol. 71:359-71.
- Lech, J.; Lewis, S. und Ren, L. (1996). "In vivo estrogenic activity of nonylphenol in rainbow trout." Fundam Appl Toxicol 30 : 229-232.
- Liber, K.; Gangl, J.A.; Corry, T.D.; Heinis, L.J. und Stay, F.S. (1999). "Lethality and bioaccumulation of 4-nonylphenol in bluegill sunfish in littoral enclosures." Environ Toxicol Chem 18 (3): 394-400.
- Lutz, I., and W. Kloas. 1999. Amphibians as a model to study endocrine disruptors: I. Environmental pollution and estrogen receptor binding. Sci Total Environ. 225:49-57.
- MacLatchy, D.L., and G.J. Van Der Kraak. 1995. The phytoestrogen beta-sitosterol alters the reproductive endocrine status of goldfish. Toxicol Appl Pharmacol. 134:305-12.
- Matthiessen, P. und Gibbs, P.E. (1998). "Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks." Environ Toxicol Chem 17 (1): 37-43.
- McLeese, D.W. 1981. Lethality and accumulation of alkylphenols in aquatic fauna. Chemosphere. 10:723-730.

- McMaster, M.E., C.B. Portt, K.R. Munkittrick, and D.G. Dixon. 1992. Milt characteristics, reproductive performance, and larval survival and development of white sucker exposed to bleached kraft mill effluent. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 23:103-117.
- McMaster, M.E., G.J. Van Der Kraak, C.B. Portt, K.R. Munkittrick, P.K. Sibley, I.R. Smith, and D.G. Dixon. 1991. Changes in hepatic mixed-function oxygenase (MFO) activity, plasma steroid levels and age at maturity of a white sucker (*Catostomas commersoni*) population exposed to bleached kraft pulp mill effluent. *Aquatic Toxicology.* 21:199-218.
- Mekeny, O.G., G.D. Veith, D.J. Call, and G.T. Ankley. 1996. A QSAR evaluation of Ah receptor binding of halogenated aromatic xenobiotics. *Environ Health Perspect.* 104:1302-10.
- Mellanen, P., T. Petänen, J. Lehtimäki, S. Mäkelä, G. Bylund, B. Holmbom, E. Mannila, A. Oikari, and R. Saniti. 1996. Wood- derived estrogens: studies in vitro with breast cancer cell lines and in vivo in trout. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 136:381-388.
- Merz, W.; Metzger, J.W.; Kempter, C. und Jenkins, E. (1998). "Untersuchungen zum Eintrag, Verhalten und Verbleib von Sexualhormonen im Abwasser und Klärschlamm", Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte und Abfallwirtschaft der Universität Stuttgart, Abteilung Hydrochemie, Stuttgart.
- Möhle, E. (1999). Identifizierung schwer abbaubarer Stickstoffverbindungen im kommunalen Abwasser. Fakultät für Bauingenieur- und Vermessungswesen. Stuttgart, Universität Stuttgart: 157.
- Möhle, E., S. Horvath, W. Merz and J. W. Metzger (1999). "Bestimmung von schwer abbaubaren organischen Verbindungen - Identifizierung von Arzneimittelrückständen." *Vom Wasser* 92: 207-223.
- Monje, P. und Boland, R. (1999). "Characterization of membrane estrogen binding proteins from rabbit uterus." *Mol Cell Endocrinol* 147 (1-2): 75-84.
- Nieuwkoop, P.D., and J. Faber. 1975. Normal tables of *Xenopus laevis* (Daudin): A systematical and chronological survey of the developmental stages from the fertilized egg till the end of metamorphosis. North Holland publishing company, Amsterdam, The Netherlands.
- Nimrod, A.C. and W.H. Benson, Xenobiotic interaction with and alteration of channel catfish estrogen receptor. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1997. 147: p. 381-390.
- Nunez Rodriguez, J., E. Bon, and F. Le Menn. 1996. Vitellogenin receptors during vitellogenesis in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J Exp Zool.* 274:163-70.
- O'Shea, T.J., W.J. Fleming, and E. Cromartie. 1980. DDT contamination at Wheeler National Wildlife Refuge. *Science.* 209:509-560.
- Odum, J.; Lefevre, P.A.; Tittensor, S.; Paton, D.; Routledge, E.J.; Beresford, N.A.; Sumpter, J.P. und Ashby, J. (1997). "The Rodent Uterotrophic Assay: Critical Protocol Features, Studies with Nonyl Phenols, and Comparison with a Yeast Estrogenicity Assay." *Regul Toxicol Pharmacol* 25 : 176-188.

OECD, *Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test and Reproduction Test. OECD Guidelines For Testing of Chemicals, 1984. 202.

Olea, N.; Pulgar, R.; Pérez, P.; Olea-Serrano, F.; Rivas, A.; Novillo-Fertrell, A.; Pedraza, V.; Soto, A.M. und Sonnenschein, C. (1996). "Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry." *Environ Health Perspect* 104 : 298-305.

Olsen, G.W., K.M. Bodner, J.M. Ramlow, C.E. Ross, and L.I. Lipshultz. 1995. Have sperm counts been reduced 50 percent in 50 years? A statistical model revisited. *Fertil Steril*. 63:887-93.

Ostrander, G.K., J.B. Blair, B.A. Stark, G.M. Marley, W.D. Bales, R.W. Veltri, D.E. Hinton, M. Okihiro, L.S. Ortego, and W.E. Hawkins. 1995. Long-term primary culture of epithelial cells from rainbow trout (*Onkorhynchus mykiss*) liver. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 31:367-378.

Pakdel, F., C. Le Guellec, C. Vaillant, M.G. Le Roux, and Y. Valotaire. 1989. Identification and estrogen induction of two estrogen receptor (ER) messenger ribonucleic acids in the rainbow trout liver: sequence homology with other ERs. *Molecular Endocrinology*:44-51.

Pakdel, F., F. Le Gac, P. Le Goff, and Y. Valotaire. 1990. Full-length sequence and in vitro expression of rainbow trout estrogen receptor cDNA. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 71:195-204.

Pakdel, F., S. Féon, F. Le Gac, F. Le Menn, and Y. Valotaire. 1991. In vivo estrogen induction of hepatic estrogen receptor mRNA and correlation with vitellogenin mRNA in rainbow trout. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 75:205-212.

Parker, M.G. (1993). "Steroid and related receptors." *Curr Opin Cell Biol* 5 (3): 499-504.

Paulozzi, L.J. (1999). "International trends in rates of hypospadias and cryptorchidism." *Environ Health Perspect* 107 (4): 297-302.

Pelissero, C., B. Bennetau, P. Babin, F. Le Menn, and J. Dunogués. 1991. The estrogenic activity of certain phytoestrogens in the siberian sturgeon *Acipenser baeri*. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 38:293-299.

Pelissero, C., G. Flouriot, J.L. Foucher, B. Bennetau, J. Dunogués, F. Le Gac, and J.P. Sumpter. 1993. Vitellogenin synthesis in cultured hepatocytes: an in vitro test for the estrogenic potency of chemicals. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 44:263-272.

Pelissero, C.; Lenczowski, M.J.; Chinzi, D.; Davail-Cuisset, B.; Sumpter, J.P. und Fostier, A. (1996). "Effects of flavonoids on aromatase activity, an in vitro study." *J Steroid Biochem Mol Biol* 57 (3-4): 215-23.

Perazzolo, L.M., K. Coward, B. Davail, E. Normand, C.R. Tyler, F. Pakdel, W.J. Schneider, and F. Le Menn. 1999. Expression and localization of messenger ribonucleic acid for the vitellogenin receptor in

ovarian follicles throughout oogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biol Reprod.* 60:1057-68.

Petit, F., P. Le Goff, J.-P. Cravédi, Y. Valotaire, and F. Pakdel. 1997. Two complementary bioassays for screening the estrogenic potency of xenobiotics: recombinant yeast for trout estrogen receptor and trout hepatocyte cultures. *Journal of Molecular Endocrinology.* 19:321-335.

Petit, F.; Valotaire, Y. und Pakdel, F. (1995). "Differential functional activities of rainbow trout and human estrogen receptors expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Eur J Biochem* 233 (2): 584-92.

Pfluger, P. and D. R. Dietrich (2000). Pharmaceuticals in the environment - an overview and principle considerations. *Pharmaceuticals in the Environment.* K. Kuemmerer. Heidelberg, Springer Verlag.

Pfluger, P., A. Prietz, B. Wasserrab, C. Koster, B. Knörzer and D. R. Dietrich (2000). Untersuchungen zur aquatischen Toxizität und zur endokrinen Aktivität von Carbamazepin. Konstanz, EUREGIO Ökotoxikologie Service Labor, Universität Konstanz.

Purdom, C.E., P.A. Hardiman, V.J. Bye, N.C. Eno, C.R. Tyler, and J.P. Sumpter. 1994. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem. Ecol.* 8:275-285.

Reeder, A.L., G.L. Foley, D.K. Nichols, L.G. Hansen, B. Wikoff, S. Faeh, J. Eisold, M.B. Wheeler, R. Warner, J.E. Murphy, and V.R. Beasley. 1998. Forms and prevalence of intersexuality and effects of environmental contaminants on sexuality in cricket frogs (*Acris crepitans*). *Environ Health Perspect.* 106:261-6.

Regitz, J.F.U.M. 1995. *Römpp Chemie Lexikon.* Thieme Verlag, Stuttgart, New York. S. 4184.

Reijnders, P.J. 1986. Reproductive failure in common seals feeding on fish from polluted coastal waters [published erratum appears in *Nature* 1986 Dec 4- 10;324(6096):418]. *Nature.* 324:456-7.

Ren, L., A. Meldahl, and J.J. Lech. 1996. Dimethyl formamide (DMFA) and ethylene glycol (EG) are estrogenic in rainbow trout. *Chemico- Biological Interactions.* 102:63-67.

Ren, L., S.K. Lewis, and J.J. Lech, Effects of estrogen and nonylphenol on the post-transcriptional regulation of vitellogenin gene expression. *Chem. Biol. Interact.*, 1996. 100: p. 67-76.

Rosenblum, E.R., R.E. Stauber, D.H. Van Thiel, I.M. Campbell, and J.S. Gavalier. 1993. Assessment of the estrogenic activity of phytoestrogens isolated from bourbon and beer. *Alcohol Clin Exp Res.* 17:1207-9.

Roßknecht, H. and Hetzenauer, Zum Vorkommen von Arzneimittel-Rückständen im Bodensee-Obersee und in einigen baden-württembergischen Bodensee-Zuflüssen.. 2000, Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg, Institut für Seenforschung: Karlsruhe. p. 19.

- Routledge, E.J.; Sheahan, D.; Desbrow, C.; Brighty, G.C.; Waldock, M. und Sumpter, J.P. (1998). "Identification of estrogenic chemicals in STW. 2. In vivo responses in trout and roach." *Environ Sci Technol* 32 : 1559-1565.
- Safe, S.; Wang, F.; Porter, W.; Duan, R. und McDougal, A. (1998). "Ah receptor agonists as endocrine disruptors: antiestrogenic activity and mechanisms." *Toxicol Lett* 102-103 : 343-7.
- Safe, S.H. (1986). "Comparative Toxicology and mechanism of action of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans." *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 26 : 371-99.
- Santti, R.; Makela, S.; Strauss, L.; Korkman, J. und Kostian, M.L. (1998). "Phytoestrogens: potential endocrine disruptors in males." *Toxicol Ind Health* 14 (1-2): 223-37.
- Schlett, C. und Pfeifer, B. (1996). "Bestimmung von Steroidhormonen in Trink- und Oberflächenwässern." *Vom Wasser* 87 : 327-333.
- Schneider, C. and J.W. Metzger, *Pharmaka und Hormone in der aquatischen Umwelt*. 2001, Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte und Abfallwirtschaft, Universität Stuttgart: Stuttgart.
- Schrader, S.M., T.W. Turner, and J.M. Ratcliffe. 1988. The effects of ethylene dibromide on semen quality: a comparison of short-term and chronic exposure. *Reprod Toxicol*. 2:191-8.
- Schwabe, U. 1997. *Arzneiverordnungs-Report '97*. G. Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm.
- Schwabe, U., and D. Paffrath. 1993. *Arzneiverordnungs-Report '93*. G. Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm. Bd.9.
- Schwaiger, J., U. Mallow, H. Ferling, S. Knoerr, T. Braunbeck, W. Kalbfus and R. D. Negele (2001). "A transgenerational study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as test organism." *Aquatic Toxicology* in press.
- Semenza, J.C., P.E. Tolbert, C.H. Rubin, L.J. Guillette, Jr., and R.J. Jackson. 1997. Reproductive toxins and alligator abnormalities at Lake Apopka, Florida. *Environ Health Perspect*. 105:1030-2.
- Sharpe, R.M., J.S. Fisher, M.M. Millar, S. Jobling, and J.P. Sumpter. 1995. Gestational and lactational exposure of rats to xenoestrogens results in reduced testicular size and sperm production. *Environ Health Perspect*. 103:1136-43.
- Shelby, M.D., R.R. Newbold, D.B. Tully, K. Chae, and V.L. Davis. 1996. Assessing environmental chemicals for estrogenicity using a combination of in vitro and in vivo assays. *Environ Health Perspect*. 104:1296-300.
- Shore, L.S. (1993). "Estrogen as an environmental pollutant." *Bull Environ Contam Toxicol* 51 : 361-366.

- Smeets, J.M., I. van Holsteijn, J.P. Giesy, W. Seinen, and M. van den Berg. 1999b. Estrogenic potencies of several environmental pollutants, as determined by vitellogenin induction in a carp hepatocyte assay. *Toxicol Sci.* 50:206-13.
- Smeets, J.M., T.R. Rankouhi, K.M. Nichols, H. Komen, N.E. Kaminski, J.P. Giesy, and M. van den Berg. 1999a. In vitro vitellogenin production by carp (*Cyprinus carpio*) hepatocytes as a screening method for determining (anti)estrogenic activity of xenobiotics. *Toxicol Appl Pharmacol.* 157:68-76.
- Sohoni, P. und Sumpter, J.P. (1998). "Several environmental oestrogens are also anti-androgens." *J Endocrinol* 158 (3): 327-39.
- Soto, A.M., C. Sonnenschein, K.L. Chung, M.F. Fernandez, N. Olea, and F.O. Serrano. 1995. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ Health Perspect.* 103 Suppl 7:113-22.
- Soto, A.M., H. Justicia, J.W. Wray, and C. Sonnenschein. 1991. p-Nonyl-phenol: an estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene. *Environ Health Perspect.* 92:167-73.
- Soto, A.M., K.L. Chung, and C. Sonnenschein. 1994. The pesticides endosulfan, toxaphene, and dieldrin have estrogenic effects on human estrogen-sensitive cells. *Environ Health Perspect.* 102:380-3.
- Spengler, P. (1999). 4-t-Octylphenol-Konzentrationen in Kläranlagenausläufen, persönliche Mitteilung.
- Spengler, P. (1999). Bindungsstudien am menschlichen Östrogenrezeptor, persönliche Mitteilung.
- Spengler, P., W. Körner, and J.W. Metzger, Schwer abbaubare Substanzen mit östrogenartiger Wirkung im Abwasser von kommunalen und industriellen Kläranlagenabläufen. *Vom Wasser*, 1999. 93: p. 141-157.
- Spies, R.B., D.W. Rice, and J. Felton. 1988. Effects of organic contaminants on reproduction of the starry flounder, *Platichthys stellatus*, in San Francisco Bay. II. Reproductive success of fish captured in San Francisco Bay and spawned in the laboratory. *Marine Biology.* 98:191-200.
- Stahl, S., T.Y. Chun, and W.G. Gray. 1998. Phytoestrogens act as estrogen agonists in an estrogen-responsive pituitary cell line. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 152:41-48.
- Stifani, S., F. Le Menn, J.N. Rodriguez, and W.J. Schneider. 1990. Regulation of oogenesis: the piscine receptor for vitellogenin. *Biochim Biophys Acta.* 1045:271-9.
- Strauss, L.; Santti, R.; Saarinen, N.; Streng, T.; Joshi, S. und Makela, S. (1998). "Dietary phytoestrogens and their role in hormonally dependent disease." *Toxicol Lett* 102-103 : 349-54.
- Stumpf, M., T.A. Ternes, K. Haberer, and W. Baumann. 1996. Nachweis von natürlichen und synthetischen Östrogenen in Kläranlagen und Fließgewässern. *Vom Wasser.* 87:251-261.

- Sumpter, J.P. und Jobling, S. (1995). "Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment." *Environ Health Perspect* 103 (7): 173-178.
- Swan, S.H., E.P. Elkin, and L. Fenster. 1997. Have sperm densities declined? A reanalysis of global trend data. *Environ Health Perspect*. 105:1228-32.
- Ternes, T.A., Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Res.*, 1998. 32(11): p. 3245-3260.
- Ternes, T.A., R.W. Hirsch, M. Stumpf, T. Eggert, B.F. Schuppert, and K. Haberer. 1999. Nachweis und Screening von Arzneimittelrückständen, Diagnostika und Antiseptika in der aquatischen Umwelt. Projektträger des BMBF für Wassertechnologie und Schlammbehandlung (Forschungsvorhaben 02 WU9567/3)
- Ternes, T.A.; Stumpf, M.; Müller, J.; Haberer, K.; Wilken, R.D. und Servos, M. (1999). "Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil." *Sci Total Environ* 225 : 81-90.
- Thomas, P. und Smith, J. (1993). "Binding of xenobiotics to the estrogen receptor of spotted seatrout: A screening assay for potential estrogenic effects." *Marine Environ. Res.* 35 : 147-151.
- Tremblay, L. und Van der Kraak, G. (1999). "Comparison between the effects of the phytosterol β -sitosterol and pulp and paper mill effluents on sexually immature rainbow trout." *Environ Toxicol Chem* 18 (2): 329-336.
- Tremblay, L., and G. Van Der Kraak. 1998. Use of a series of homologous in vitro and in vivo assays to evaluate the endocrine modulating actions of β -sitosterol in rainbow trout. *Aquatic Toxicology*. 43:149-162.
- Turner, R.T., B.L. Riggs, and T.C. Spelsberg. 1994. Skeletal effects of estrogen. *Endocr Rev.* 15:275-300.
- Tyler, C.R.; Jobling, S. und Sumpter, J.P. (1998). "Endocrine disruption in wildlife: a critical review of the evidence." *Crit Rev Toxicol* 28 (4): 319-61.
- Valotaire, Y., M. Tenniswood, C. Le Guellec and J. R. Tata, The preparation and characterization of vitellogenin messenger RNA from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Biochem. J.*, 1984. 217(1): p. 73-7.
- Van Der Kraak, G.J., K.R. Munkittrick, M.E. McMaster, C.B. Portt, and J.P. Chang. 1992. Exposure to bleached kraft pulp mill effluent disrupts the pituitary-gonadal axis of white sucker at multiple sites. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 115:224-233.
- Vartiainen, T., J.J. Jaakkola, S. Saarikoski, and J. Tuomisto. 1998. Birth weight and sex of children and the correlation to the body burden of PCDDs/PCDFs and PCBs of the mother. *Environ Health Perspect.* 106:61-6.

- Vartiainen, T., S. Saarikoski, J.J. Jaakkola, and J. Tuomisto. 1997. PCDD, PCDF, and PCB concentrations in human milk from two areas in Finland. *Chemosphere*. 34:2571-83.
- Vinggaard, A.M., E.C. Joergensen, and J.C. Larsen. 1999. Rapid and sensitive reporter gene assays for detection of antiandrogenic and estrogenic effects of environmental chemicals. *Toxicol Appl Pharmacol*. 155:150-60.
- Von Westernhagen, H., H. Rosenthal, V. Dethlefsen, W. Ernst, U.L. Harms, and P.-D. Hansen. 1987. Chlorinated hydrocarbon residues in gonads of marine fish and effects on reproduction. *Sarisa*. 72:419-422.
- Wahli, W., I.B. Dawid, G.U. Ryffel, and R. Weber. 1981. Vitellogenesis and the vitellogenin gene family. *Science*. 212:298-304.
- Wallace, R.A. 1985. Vitellogenesis and oocyte growth in nonmammalian vertebrates. *Dev Biol*. 1:127-77.
- Wallace, R.A., and D.W. Jared. 1968. Studies on amphibian yolk. VII. Serum phosphoprotein synthesis by vitellogenic females and estrogen-treated males of *Xenopus laevis*. *Can J Biochem*. 46:953-9.
- Watabe, S., Y. Hirayama, J. Imai, K. Kikuchi and M. Yamashita, Sequences of cDNA clones encoding a-actin of carp and goldfish skeletal muscles. *Fisheries Sci.*, 1995. 61: p. 998-1003.
- Watson, C.S.; Pappas, T.C. und Gametchu, B. (1995). "The other estrogen receptor in the plasma membrane: implications for the actions of environmental estrogens." *Environ Health Perspect* 103 (7): 41-50.
- Wenzel, A., T. Küchler, K.-P. Henschel, S.-P. W., M. Diedrich, and J. Müller. 1998. Konzentration östrogen wirkender Substanzen in Umweltmedien. Umweltforschungsplan des Bundesministers für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit; Umweltchemikalien / Schadstoffwirkungen; Forschungsbericht 216 02 011 /11.
- Westerfield, M. 1995. *The zebrafish book*. University of Oregon Press, Eugene, OR, USA.
- White, R., S. Jobling, S.A. Hoare, J.P. Sumpter, and M.G. Parker. 1994. Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology*. 135:175-182.
- Whorton, M.D., R.M. Krauss, S. Marshall, and T.H. Milby. 1977. Infertility in male pesticide workers. *Lancet*. 2:1259-1261.
- Williams, J., B.C. Gladen, T.W. Turner, S.M. Schrader, and R.E. Chapin. 1991. The effects of ethylene dibromide on semen quality and fertility in the rabbit: evaluation of a model for human seminal characteristics. *Fundam Appl Toxicol*. 16:687-700.
- Wine, R.N., L.-H. Li, L. Hommel Barnes, D.K. Gulati, and R.E. Chapin. 1997. The reproductive toxicity of di-n-butylphthalate in a continuous breeding protocol in Sprague-Dawley rats. *Environmental Health Perspectives*. 105:102-107.

Zacharewski, T. 1997. In vitro bioassays for assessing estrogenic substances. Environ. Sci. Technol. 31:613-623.

Zacharewski, T.R.; Meek, M.D.; Clemons, J.H.; Wu, Z.F.; Fielden, M.R. und Matthews, J.B. (1998). "Examination of the in vitro and in vivo estrogenic activities of eight commercial phthalate esters." Toxicol Sci 46 : 282-293.

Zellner, A. und Kalbfus, W. (1997). "Belastung bayrischer Gewässer durch Nonylphenole." In: Stoffe mit endokriner Wirkung im Wasser. Münchener Beiträge zur Abwasser-, Fischerei- und Flussbiologie 50. München, Bayrisches Landesamt für Wasserwirtschaft - Institut für Wasserforschung: 55-64.

Zerulla, M., Etablierung einer RT-PCR zum Nachweis der Vtg- und ER- mRNA von Fettkopfbrassen (*Pimephales promelas*). Unpublished Results; 2000.