

**Identifizierung und Quantifizierung der Gewässerbelastung  
durch endokrin wirksame Substanzen (endocrine disruptors)  
sowie deren Risikobewertung für die Reproduktionsbiologie -  
Amphibien als Indikator für Ökosysteme**

Gregor Levy<sup>1</sup>, Ilka Lutz<sup>1</sup>, Angela Krüger<sup>2</sup>, Andrew C. Cato<sup>3</sup> und Werner Kloas<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Abteilung Binnenfischerei, Leibniz-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei,  
Berlin

<sup>2</sup>Zentrales Chemielabor, Leibniz-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei, Berlin

<sup>3</sup>Institut für Toxikologie und Genetik, Forschungszentrum und Universität Karlsruhe

<sup>4</sup>Abteilung Endokrinologie, Institut für Biologie, Humboldt Universität zu Berlin

Förderkennzeichen: BWB 20006

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

Mai 2004

# **Identifizierung und Quantifizierung der Gewässerbelastung durch endokrin wirksame Substanzen (endocrine disruptors) sowie deren Risikobewertung für die Reproduktionsbiologie - Amphibien als Indikator für Ökosysteme**

Werner Kloas<sup>1,4</sup>, Gregor Levy<sup>1</sup>, Angela Krüger<sup>2</sup>, Andrew C. Cato<sup>3</sup> und Ilka Lutz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Abteilung Binnenfischerei, Leibniz-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei, Berlin

<sup>2</sup>Zentrales Chemielabor, Leibniz-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei, Berlin

<sup>3</sup>Institut für Toxikologie und Genetik, Forschungszentrum und Universität Karlsruhe

<sup>4</sup>Abteilung Endokrinologie, Institut für Biologie, Humboldt Universität zu Berlin

## **Zusammenfassung**

Mit dem Südafrikanischen Krallenfrosch *Xenopus laevis* konnte in den letzten Jahren ein Amphibien-Modell zum Nachweis (anti)östrogenen bzw. (anti)androgenen Wirkungen endokrin wirksamer Umweltchemikalien (endocrine disruptors (ED)) etabliert werden. Dieses Modell sollte im Rahmen des gegenwärtigen Projektvorhabens dazu dienen, in Verbindung mit chemischen Analysetechniken, die tatsächliche Bedrohung für die Reproduktionsbiologie durch die Gewässerbelastung mit ED in Baden-Württemberg am Beispiel der Alb zu klären. Es wurden Extrakte aus verschiedenen Probenahmestellen (Quellwasser, Wasser vor, aus und hinter Kläranlagenausläufen) genommen und daraus hergestellte Fraktionen analytisch untersucht. Es ergaben sich Hinweise auf endokrin wirksame Substanzen (Substanzklassen) in den einzelnen Fraktionen. Aussagen zur Menge der Fraktionsinhaltsstoffe, die an die entsprechenden Rezeptoren der Sexualsteroiden binden, lieferten Radiorezeptorassays, die als kompetitive Bindungsstudien sowohl für Östrogen- (ER) als auch für Androgenrezeptoren (AR) durchgeführt wurden. Es zeigte sich, dass vor allem in den Extrakten der Kläranlagenausläufe östrogen wirksame Substanzen vorhanden waren. Eine dieser Substanzen, Bisphenol A, wurde als Modellsubstanz eines östrogenen ED hinsichtlich seiner biologischen Wirkungen *in vivo* sowie auf sein quantitatives Vorkommen in den Alb-Proben charakterisiert. Hierbei zeigte sich, dass allein für diese Substanz der Unterschied zwischen den Werten für biologische Wirkung und den quantitativen Messungen in der Alb nur ca. 2-3 Zehner-Potenzen Abstand beträgt, was einen deutlichen Beitrag zur östrogenen Potenz der gesamten ED im Gewässer darstellt. Substanzen, die an den AR binden, finden sich ebenfalls in den meisten Proben. Die Charakterisierung der Proben entsprechend der aus ihnen hergestellten Fraktionen wurde neben der Rezeptorbindung durch die parallele Bestimmung der *in vitro* Expression zweier Biomarker, ER- und Retinol Binding Protein (RBP)-mRNA vorgenommen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Expression des reinen östrogenen Biomarkers ER-mRNA in allen Fraktionen wesentlich höher oder zumindest relativ gleich hoch ist wie die der RBP-mRNA. RBP wird durch Östrogene hoch- und durch Androgene herunterreguliert, deshalb muss daraus geschlossen werden, dass neben der Vielzahl an östrogen wirksamen

Substanzen ebenfalls nicht unerhebliche Mengen an androgenen Wirkstoffen vorhanden sein müssen, da die Expression von RBP-mRNA oft viel geringer war als die von ER-mRNA. Es wurden demnach erfolgreich Methodenansätze zur Aufarbeitung, Fraktionierung und biologischen Charakterisierung von Gewässerproben eingeführt, die dazu beitragen, die Risiko-Bestimmung der Gewässerbelastung durch ED mit dem Amphibien-Modell durchzuführen.

## **Identification and quantification of endocrine-disrupting chemicals in surface waters and their risk assessment concerning reproductive biology – amphibians as indicator organisms for ecosystems**

### **Summary**

The South African clawed toad *Xenopus laevis* was established as an amphibian model for the study of (anti)androgenic and (anti)estrogenic effects of endocrine-disrupting chemicals was established. The aim of the current project was to demonstrate the usefulness of this model with regard to endocrine disruptors occurring in surface waters and their potential risk for reproductive biology. Therefore, the river Alb in Baden-Württemberg was chosen as a typical river ecosystem and different sampling sites were defined from the river's source to its mouth. Water samples were extracted, fractionated and grossly analysed to gather first evidence of endocrine disrupting substances (substance classes) in the fractions. The nature of these particular substances was examined by conducting receptor binding studies which were carried out as competitive displacement experiments for estrogen and androgen receptor. It was shown that mainly the effluent water of the sewage treatment plants revealed estrogenic activities. One of these compounds, bisphenol A, was used as model substance of estrogenic ED and characterized by its biological effects *in vivo* and by its quantification in water samples of the river Alb. The differences between values of bisphenol A causing biological effects and quantitative measurements revealed around 2 to 3 orders of magnitude demonstrating a remarkable contribution of estrogenicity of the overall ED present in Alb surface water. However, binding to the androgen receptor was found also in most samples. Characterization of samples according to their fractionation was achieved beside receptor binding in parallel by determination of gene expression of two biomarkers, estrogen receptor and retinol binding protein-mRNA, *in vitro*. The results demonstrate that expression of the pure estrogenic biomarker estrogen receptor-mRNA was remarkable higher or at least at similar levels compared with that of retinol binding protein. Retinol binding protein is regulated up by estrogens and down by androgens and therefore we concluded that in addition to the great number of estrogenic compounds also androgenic substances have to be present, because the relative expression of retinol binding protein was much lower compared to that of

estrogen receptor indicating androgenic effects. This study invented successfully methodical approaches to examine, fractionate and characterize environmental water samples indicating the usefulness of the amphibian model for risk assessment of endocrine disruptors being found in a river ecosystem.

## Inhaltsverzeichnis

	Seitenzahl
1. Einleitung	1
1.1. Endocrine disruptors (ED)	1
1.2. Störungen des endokrinen Systems durch ED	1
1.3. ED in der Umwelt	5
1.4. Amphibien als Studienmodelle	7
1.5. Stand der Wissenschaft	9
1.6. Projektziele/Aufgabenstellung	10
2. Material und Methoden	12
2.1. Versuchstiere	12
2.1.1. Herkunft und Haltung der Versuchstiere	12
2.1.2. Zucht der Versuchstiere	12
2.2. Charakterisierung der östrogenen Wirkung von Bisphenol A (BPA) <i>in vivo</i>	13
2.2.1. BPA-Exposition von Kaulquappen während der Larvalentwicklung	13
2.2.2. Geschlechtsbestimmung der juvenilen Frösche	14
2.2.3. Histologische Untersuchung der Gonaden	15
2.2.4. Kurzzeitige Kaulquappenexposition mit BPA und Bestimmung des östrogenen Biomarkers Östrogenrezeptor (ER)-mRNA	17
2.2.5. Chemische Analyse von BPA in den Expositionsversuchen	17
2.3. Gewässeruntersuchungen	19
2.3.1. Charakterisierung des Modellgewässers Alb	19
2.3.2. Entnahme der Gewässerproben	19
2.3.3. Herstellen von Extrakten aus den Gewässerproben	20
2.3.4. Fraktionierung der Gewässerextrakte	22
2.3.5. Analyse der Gewässerproben mittels GC-MS	23
2.4. Bioassays zur Untersuchung der Gewässerextrakte	24
2.4.1. Rezeptorbindungsstudien	24
2.4.2. Induktion der Expression molekularer Biomarker durch Behandlung von Hepatocyten-Primärzellkulturen	28
2.4.2.1. Behandlung der Zellkulturen	28
2.4.2.2. Bestimmung der Retinol Binding Protein (RBP)-mRNA aus Hepatocyten- Primärzellkulturen	31
2.5. Statistik	31
3. Ergebnisse	32
3.1. <i>In vivo</i> -Exposition der Kaulquappen mit BPA	32
3.1.1. Wirkungen von BPA auf die Sexualdifferenzierung von <i>Xenopus laevis</i>	32
3.1.2. Wirkungen von BPA auf die Gonadenentwicklung	34

3.1.3. Nachweis der ER-mRNA-Expression <i>in vivo</i> nach kurzzeitiger Behandlung mit BPA	35
3.1.4. Analytischer Nachweis von BPA in den Expositionsversuchen	37
3.2. ED in Gewässerproben der Alb	42
3.2.1. Chemischer Nachweis von BPA in den Gewässerextrakten der Alb	42
3.2.2. Chemischer Nachweis weiterer ED in den Gewässerextrakten der Alb	44
3.3. Bioassays zum Nachweis von ED in den Gewässerextrakten der Alb	45
3.3.1. Rezeptorbindungsstudien mit Gewässerextrakten	45
3.3.2. Induktion von Biomarkern durch Behandlung der Zellkulturen mit Gewässerextrakten	47
3.3.2.1. Etablierung von RBP-mRNA als neuem Biomarker	48
3.3.2.2. Biomarker-Expression in Zellkulturen nach Behandlung mit Extrakten von Gewässerproben	53
4. Diskussion	56
4.1. Umweltbelastung mit ED - Einzelstoffansatz	56
4.1.1. <i>In vivo</i> -Labormethoden zur Untersuchung der Wirkungen von ED	56
4.1.2. Amphibien als Modellorganismen zur Untersuchung von ED	57
4.1.3. Einfluss von BPA auf die Sexualentwicklung von <i>Xenopus laevis</i>	59
4.2. Umweltbelastungen durch ED in Oberflächengewässern	63
4.2.1. Nachweis von BPA in Gewässerproben der Alb	63
4.2.2. ED in der Umwelt als komplexes Gemisch von Stoffen mit verschiedenen Wirkmechanismen	64
4.2.3. Untersuchungen von Gewässerproben der Alb mit Bioassays	65
4.2.3.1. Rezeptorbindungsstudien mit Alb-Extrakten	66
4.2.3.2. Etablierung von RBP-mRNA als Biomarker	67
4.2.3.3. Biomarker-Expression in Leberzellkulturen nach Behandlung mit Gewässerextrakten der Alb	70
4.2.4. Bewertung der Belastung der Alb mit ED	72
4.3. Vergleich der Untersuchungen von Einzelstoff- und Gemisch-Ansatz	75
5. Zusammenfassung und Ausblick	77
6. Literatur	79
7. Publikation der Ergebnisse	85

## **1. Einleitung**

### **1.1. Endocrine disruptors (ED)**

Unter „endocrine disruptors“ (ED) versteht man eine “exogene Substanz, die als Folge der Veränderung der endokrinen Funktionen adverse Gesundheitseffekte in einem intakten Organismus oder seiner Nachkommenschaft verursacht” (European Commission, 1996). Die Forschung auf dem Gebiet der ED ist ungebrochen aktuell und vielfältig, was an der großen Zahl der Veröffentlichungen, Kongresse und Workshops zu dieser Thematik abzulesen ist. Ein Schwerpunkt der Untersuchungen ist nach wie vor der Einfluss von ED auf die Reproduktionsbiologie. Dabei spielen u.a. Substanzen eine Rolle, die Wirkungen der natürlichen Sexualsteroiden (Androgene und Östrogene) imitieren oder verhindern können.

Die größte Aufmerksamkeit erlangten diejenigen Chemikalien, die in die hormonelle Steuerung der Fortpflanzung eingreifen können, denn die meisten dieser Substanzen vermitteln oder blockieren die Wirkungen der Sexualsteroiden. Es handelt sich zumeist um lipophile Chemikalien, die ähnliche Wirkungen wie die natürlichen weiblichen Sexualhormone induzieren können und die deswegen als Xenoöstrogene bezeichnet werden (Colborn & Clement, 1992; Colborn *et al.*, 1993). Die auftretenden Phänomene, die ursächlich mit den Xenoöstrogenen zusammenhängen, werden unter dem Begriff „Verweiblichung“ zusammengefasst.

Die Erforschung der Wirkungen von exogenen (Xeno)östrogenen ließ synthetische oder natürliche Substanzen unberücksichtigt, die als Antiöstrogene, Androgene oder Antiandrogene wirken können (Sonnenschein & Soto, 1998; Vos *et al.*, 2000). Dabei können antiandrogene ED ebenfalls zur Verweiblichung, antiöstrogene zur Entweiblichung bzw. Neutralisierung und androgene zur Vermännlichung führen (Kloas, 2002). Wie ED mit dem endokrinen System interagieren, zeigt das folgende Kapitel.

### **1.2. Störungen des endokrinen Systems durch ED**

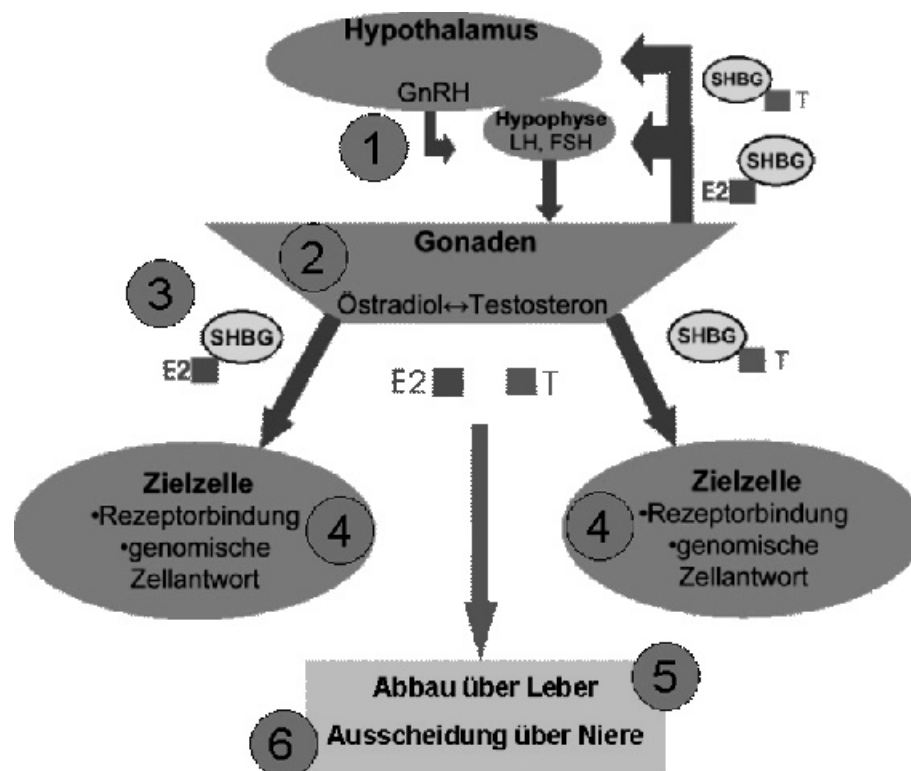
Das endokrine System gehört neben dem Immunsystem und dem Nervensystem zu den Kommunikationssystemen des Körpers. Seine Aufgabe besteht darin, durch Regulierung bestimmter physiologischer Vorgänge (z.B. Osmoregulation, Entwicklung oder Reproduktion) die Körperhomöostase eines Organismus aufrecht zu halten. Dazu verwendet es chemische Botenstoffe, die Hormone. Diese lassen sich grundsätzlich in zwei Klassen einteilen, nämlich in lipophile und in hydrophile Hormone. Zu den lipophilen Hormonen zählen Steroide und Schilddrüsenhormone, zu den hydrophilen

Catecholamine und Peptidhormone (Norris, 1997). Beide Gruppen unterscheiden sich grundsätzlich in der Art der Vermittlung ihrer Wirkung: Hydrophile Hormone binden an Rezeptoren auf der Zelloberfläche der Zielzelle und setzen damit eine Signaltransduktionskette in Gang, die in relativ kurzfristigen Zustandsänderungen der Zelle mündet (z.B. Beeinflussung von Ionenkanälen, Aktivierung intrazellulärer Enzyme, etc.). Die lipophilen Hormone vermitteln ihre Wirkung über eine Bindung an intrazelluläre Rezeptoren, wodurch eine differenzierte Beeinflussung der Genexpression stattfindet. Viele der bekannten ED, die einen Einfluss auf die Reproduktionsbiologie haben, wirken auf eine ähnliche Weise wie die Sexualsteroidhormone. Deswegen wird auf die Regulations- und Wirkmechanismen der Steroidhormone im Folgenden näher eingegangen.

Die Bildung und Ausschüttung der Sexualsteroidhormone unterliegen den negativen Rückkopplungsmechanismen (Feedback-Regulation) eines hierarchisch gegliederten Systems. Ein typisches Beispiel dafür ist die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse (Abb. 1.1). Im Zentralnervensystem wird in den Zellen des Hypothalamus das Gonadotropin-releasing Hormon (GnRH) gebildet. GnRH regt bestimmte Zellen der Hypophyse zur Abgabe der Gonadotropine (Luteinisierendes Hormon (LH) bzw. Follikel-stimulierendes Hormon (FSH)) an. Diese werden in den Blutkreislauf abgegeben. Bei weiblichen Tieren induzieren sie in den Follikelzellen des Ovars die Bildung von  $17\beta$ -Östradiol (E<sub>2</sub>). Zu diesem Zweck wird hauptsächlich in den Thekazellen gebildetes Testosteron (T) in die Granulosazellen transportiert und dort durch das Enzym Aromatase in E<sub>2</sub> umgewandelt. E<sub>2</sub> wird freigesetzt und die erhöhte E<sub>2</sub>-Konzentration im Blut bewirkt im Hypothalamus und in der Hypophyse über eine negative Rückkopplung, dass die Sekretion von GnRH und LH bzw. FSH vermindert wird. Im Blutkreislauf wird E<sub>2</sub> auf Grund seiner Lipophilie zu 90-95 % an Sexualhormon-bindendes Globulin (SHBG) gebunden und zu den Zielorganen transportiert. Bei den Wirbeltieren ist ein Hauptzielorgan von E<sub>2</sub> die Leber. Freies E<sub>2</sub> diffundiert durch die Zellmembran der Hepatocyte. Im Cytoplasma bindet E<sub>2</sub> an den Östrogenrezeptor (ER) und bewirkt eine spezifische Veränderung der Genexpression. E<sub>2</sub> wird ebenfalls in der Leber durch Metabolisierungsprozesse in eine wasserlösliche Form überführt und dann über die Niere als Glukoronid oder Sulfatester ausgeschieden. Bei männlichen Tieren führen FSH und LH in den interstitiellen (Leydig'schen) Zellen der Hoden zur Produktion der Androgene. Die Androgene binden an das gleiche SHBG wie E<sub>2</sub> und auch die Vermittlung der Androgenwirkung in den Zielzellen erfolgt analog zu den Östrogenen über cytosolische Rezeptoren und entsprechende Beeinflussung der Genexpression. Die beschriebenen Zusammenhänge verdeutlichen die vielfältigen Möglichkeiten der körperfremden endokrin wirksamen Substanzen, in die hormonelle Regulation einzugreifen.



In Abb. 1.1 sind die wichtigsten Angriffspunkte dargestellt: Es besteht zum Beispiel die Möglichkeit, die Regulation über Beeinflussung der Hypothalamus-Hypophysen-Achse zu stören (1). Änderungen der Aktivität steroidproduzierender Enzyme in den Gonaden (2) und Störungen der Funktion der steroidbindenden Moleküle (3) stellen weitere Eingriffsmöglichkeiten für ED dar. Es können weiterhin Veränderungen der Aktivität der Hormonrezeptoren durch agonistische oder antagonistische Bindung der ED verursacht werden (4) und schließlich können Eingriffe in die hormonabbauende Leberaktivität (5) und in die Ausscheidungsprozesse über die Niere (6) stattfinden.

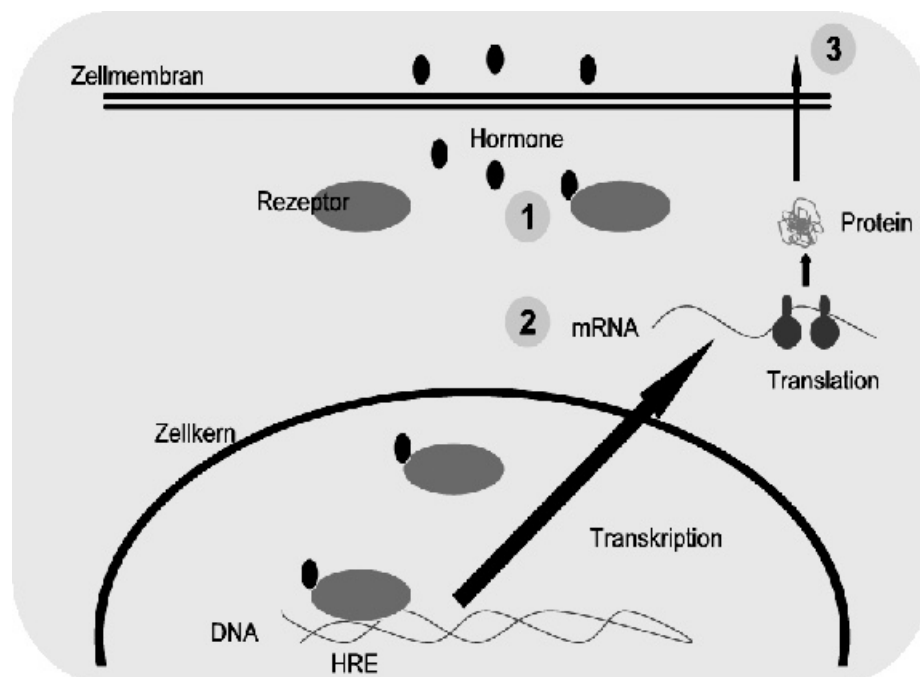


**Abb. 1.1:** Schematische Darstellung der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse und der möglichen Angriffspunkte für ED. GnRH: Gonadotropin-releasing Hormon, LH: Luteinisierendes Hormon, FSH: Follikel-stimulierendes Hormon, SHBG: Sexualhormon-bindendes Globulin, E2: 17 $\beta$ -Östradiol, T: Testosteron, 1-6: mögliche Angriffspunkte der ED, Erläuterungen s. Text.

Die Bindung an den Hormonrezeptor führt dazu, dass ED die Genexpression beeinflussen können, was bisher auch als Hauptwirkmechanismus von ED mit Einfluß auf die Reproduktion gilt. Damit ist dieser Vorgang derjenige, der die unmittelbarste Wirkung im Organismus hervorruft, indem bestimmte Merkmalsausprägungen verstärkt oder gehemmt werden. Die molekularen Prozesse in der Zielzelle, die bei

einer Bindung an den entsprechenden Hormonrezeptor stattfinden, werden im Folgenden beschrieben.

Der ER und der Androgenrezeptor (AR) gehören zur Superfamilie der Kernrezeptoren. Kernrezeptoren sind ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren mit charakteristischen Strukturen. Sie besitzen eine variable N-terminale Transaktivierungsdomäne, eine konservative DNA-Bindungsdomäne und eine variable C-terminale Ligandenbindungsdomäne. Diese generelle Struktur entwickelte sich in verschiedenen Kernrezeptorfamilien, die sich mit unterschiedlichen Liganden, wie z.B. Vitamin A (Retinol), Steroid- und Schilddrüsenhormonen, verbinden können. Zusätzlich sind eine Fülle von Wechselwirkungen zwischen den Liganden, den Rezeptoren und anderen zellspezifischen Faktoren (sogenannte Kofaktoren) bekannt (Harris *et al.*, 2002). Inzwischen wurden neue Rezeptor-Unterformen und Isorezeptoren gefunden. Ein prominentes Beispiel sind die beiden Unterformen des



**Abb. 1.2:** Schematische Darstellung der hormoninduzierten genomischen Zellantwort. Die Zahlen 1-3 dokumentieren die möglichen Nachweisebenen bei der Untersuchung potenzieller ED. 1. Nachweis der Bindung von ED an Hormonrezeptoren. 2. Nachweis der durch ED induzierten oder gehemmten mRNA-Synthese. 3. Nachweis der veränderten Merkmalsausprägung durch ED. DNA: Desoxyribonukleinsäure, HRE: hormonresponsives Element, mRNA: messenger Ribonukleinsäure.

ER, ER  $\alpha$  und ER  $\beta$ . Offensichtlich reicht eine einzige Hormonrezeptorform nicht aus, die ganze Bandbreite hormonphysiologischer Antworten alleine zu vermitteln. Die unterschiedliche Verteilung und Aktivität der Rezeptor-Unterformen in einem Organismus erlauben es bestimmten Liganden, gewebs- oder zellspezifische Wirkungen zu entfalten. Zusätzlich zeigen einige Rezeptor-Unterformen unterschiedliche Bindungseigenschaften gegenüber dem spezifischen Hormon bzw. synthetischen Liganden. Diese Beobachtung gibt Anlass zu der Vermutung, dass ligandenbedingte Selektivität zur Kontrolle der Hormonantworten durch die Kernrezeptoren beiträgt (Sperry & Thomas, 1999).

Im inaktiven Ausgangszustand bilden ER und AR mit Heat-Shock-Proteinen einen Komplex. Die Bindung von E2 an den ER bzw. von T an den AR führt zum Abdissoziieren dieser Proteine. Dadurch werden die Rezeptoren aktiviert und der Hormon-Rezeptor-Komplex gelangt in den Zellkern. Bevor die Bindung an die entsprechenden DNA-Bindungsstellen stattfindet, erfolgt eine Homodimerisierung zweier Hormon-Rezeptor-Komplexe. Die Homodimere binden an hormonresponsive Elemente (HRE), die üblicherweise aus zwei palindromischen Sequenzen innerhalb der Promotorregion steroidhormonregulierter Gene bestehen. Die an das HRE gebundenen Homodimere gehen dann mit weiteren Transkriptionsfaktoren eine Verbindung ein und regulieren dadurch die Aktivität der RNA-Polymerase (Abb. 1.2). Als Folge lassen sich Hemmungen oder Verstärkungen der Expression von Genen beobachten, die bestimmte biologische Wirkungen hervorrufen (Hiort & Holterhus, 2000).

### **1.3. ED in der Umwelt**

Laborstudien mit Einzelsubstanzen in standardisierten Bioassays geben Hinweise darauf, ob diese Substanzen als ED wirken können bzw. welche der im vorherigen Kapitel genannten Möglichkeiten der Störung des endokrinen Systems vorliegen. Aber weder die Untersuchung von Einzelsubstanzen noch die Verwendung einzelner Testorganismen repräsentieren die tatsächliche Situation in der Umwelt. Dort liegt immer ein Gemisch hormonaktiver Substanzen vor und unterschiedliche Organismen können betroffen sein. Diese haben bestimmte Voraussetzungen, um auf die Belastung zu reagieren, da sie über verschiedene Anpassungs-, Abbau- und Ausscheidungsmechanismen verfügen, mit denen sie die Wirkungen potenzieller ED verringern oder sogar aufheben können. Infolgedessen ist die tatsächliche Gefährdung für Menschen und Ökosysteme durch ED erst abschätzbar, wenn sowohl die Wirkmechanismen des Stressors als auch seine entsprechenden Einflüsse auf Organismen und Populationen bekannt sind (Kloas, 2002).

Anthropogen bedingte Umweltverschmutzung beeinträchtigt die Lebensvorgänge und kann im extremsten Fall zum Tod von Lebewesen führen. Eine Kategorie umweltbelastender Stoffe umfasst die bereits eingeführten endokrin wirksamen Substanzen. ED, die ihre Auswirkungen durch indirekte Einflüsse über das endokrine System ausüben und in den entferntesten Gegenden der Erde gefunden wurden. Aufgrund ihrer geringen Größe und ihrer relativen Persistenz gelangen sie mit Hilfe von Wind- und Meeresströmungen an entlegenste Orte wie Arktis oder Antarktis. Dort können sie sich ansammeln, obwohl der Ort ihrer Freisetzung weit entfernt liegt. Außerdem wurden ED in sämtlichen Komponenten der Biosphäre gefunden, nämlich im Boden, im Wasser, in der Luft und in den Lebewesen selbst (Colborn *et al.*, 1996). Oberflächengewässer dienen als hauptsächliche Stoffsenke für ED (Sumpter & Jobling, 1993, Kloas *et al.*, 2000). Kommunales und industrielles Kläranlagenauslaufwasser kann den Vorfluter mit zahlreichen Schadstoffen verunreinigen. Dazu gehören Xenööstrogene und natürliche Östrogene, pharmazeutische Wirkstoffkomponenten, polyaromatische Kohlenwasserstoffe, Pestizide und Schwermetalle. Diese Verunreinigungen stammen aus Haushaltschemikalien, Medikamenten, Industriechemikalien und deren Abbauprodukten. Weiterhin werden ED von landwirtschaftlichen Nutzflächen (z.B. Herbizidwirkstoffe) und aus Industrieanlagen ausgewaschen und in die Oberflächengewässer gespült. Diese Eintragsquellen sind flächenmäßig nicht klar abgrenzbar und somit quantitativ schwer zu erfassen. Anders verhält es sich mit den zuerst genannten Verunreinigungen durch Kläranlagenauslaufwasser, die als punktuelle Eintragsquellen bekannt, leicht zugänglich und quantifizierbar sind (Sumpter, 1997).

Der Abbau der ED in den Kläranlagen ist zumeist unvollständig und unzureichend, so dass sich bestimmte Substanzen im Auslaufwasser der Kläranlage in relevanten Konzentrationen feststellen lassen. So wiesen beispielsweise Toft & Baatrup (2001) in Kläranlagenauslaufwasser in Dänemark E2, das synthetische Östrogen Ethinylöstradiol (EE) und die östrogen wirksame Chemikalie Bisphenol A (BPA) in Konzentrationen von 0,2-0,6 ng/L, 0,4-2 ng/L und 20-700 ng/L nach. Diese Werte lassen erkennen, dass die Leistungsfähigkeit der spurenanalytischen Methoden gestiegen ist. Dadurch erhöhte sich auch die Zahl der entdeckten organischen Verbindungen in Oberflächengewässern und Kläranlagenausläufen. Die meisten Schadstoffe kommen in Konzentrationsbereichen von ng/L bis µg/L vor. Diese Konzentrationsbereiche liegen meist außerhalb der für aquatische Organismen akuten toxischen Konzentrationen, aber innerhalb der wirksamen Konzentrationen für Störungen ihrer endokrinen Systeme.

Die meisten Lebewesen in Gewässern sind wirbellose Tiere, bei denen ab dem Stamm der Coelenteraten schon Hormonsysteme vorhanden sind. Dennoch fokussiert sich die Forschung auf die Wirkungen von ED auf Wirbeltiere und vernachlässigt die

Wirbellosen, obwohl deren Lebenszyklen zum Teil intensiv der hormonellen Regulation unterliegen (z.B. Larvalstadien, Verpuppung, Metamorphose, Diapause, etc.) (Kloas *et al.*, 2003). Ein Beispiel zur Schädigung von Wirbellosen in Oberflächengewässern ist die Süßwassermuschel *Elliptio complanata*. Es wurde gezeigt, dass Muscheln im Flusswasser unterhalb eines Kläranlagenauslaufs überdurchschnittlich viel Vitellogenin (Vg) produzierten (Gagné *et al.* 2001). Vg ist ein Vorstufenprotein der Eidotterbildung in oviparen Lebewesen und wird häufig als östrogenen Biomarker verwendet, da seine Biosynthese durch weibliche Sexualhormone reguliert wird. Süßwassermuscheln und andere Invertebraten (z.B. Schnecken, vgl. Oehlmann *et al.* 2001) stellen eine besondere Risikogruppe dar, da sie stationär leben bzw. geringe Mobilität zeigen und sich somit der Belastungssituation nicht entziehen können.

Niedere Wirbeltiere, die ihr Leben vollständig oder teilweise im Wasser verbringen, sind Fische und Amphibien. Aus beiden Wirbeltierklassen liegen Untersuchungen vor, die Wirkungen von ED auf die Reproduktionsbiologie sowohl in Laborversuchen als auch im Freiland zeigten (Kime, 1998, Opitz *et al.*, 2002). In einem klassischen Experiment konnten Purdom *et al.* (1994) nachweisen, dass männliche Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*), die im Auslaufwasser britischer Kläranlagen in Käfigen gehalten wurden, Verweiblichungserscheinungen aufwiesen. Diese äußerten sich in signifikant erhöhter Vg-Synthese in den männlichen Tieren. Seither wurden viele weitere Beispiele gefunden, die einen Einfluss verschiedener Einleiter in Oberflächengewässern auf die Reproduktionsbiologie vor allem von Fischen zeigten (zur Übersicht: Tyler *et al.*, 1998; Kloas, 2002).

Bei im Meerwasser lebenden Säugetieren wurden Schädigungen entdeckt, die ebenfalls als Auswirkungen einer Belastung mit ED interpretiert wurden. Reduzierter Fortpflanzungserfolg, Tumorbildung in den Gonaden oder zwittrige Gonadenentwicklung wurden zum Beispiel bei Walen oder Seehunden gefunden (De Guise *et al.*, 1995). Schädigungen von im Süßwasser lebenden Säugetieren wie Biber oder Otter werden kontrovers diskutiert. Selbst Menschen können von der Belastung der Gewässer mit ED betroffen sein. Die Gefährdung besteht darin, dass Oberflächenwasser als Rohwasser zur Trinkwassergewinnung benutzt wird und so manche ED in z.T. messbaren Konzentrationen auch im Trinkwasser vorkommen.

#### **1.4. Amphibien als Studienmodelle**

Amphibien sind aufgrund ihrer aquatischen Lebensweise dazu geeignet, als Testorganismen zur Untersuchung der Gewässerbelastung mit ED zu dienen. Amphibien stellen bevorzugte Studienmodelle in der Endokrinologie und der

Entwicklungsbiologie dar, sind in der ED-Forschung aber nicht weit verbreitet, obwohl auch Amphibien von den Umweltverschmutzungen mit ED betroffen sind. In den vergangenen Jahrzehnten wurde weltweit ein Rückgang der Amphibienpopulationen beobachtet (Blaustein & Wake, 1990). Neben zunehmender Belastung durch UV-Strahlung (Blaustein *et al.*, 1994), Kontaminationen mit toxischen Stoffen und Habitatszerstörungen (Carey, 2000) stehen ED im Verdacht, einen Beitrag zum Amphibiensterben zu leisten (Carey & Bryant, 1995).

Amphibien leben zumindest während der Larvalentwicklung obligatorisch aquatisch. Dadurch sind sie Schadstoffen im Gewässer kontinuierlich ausgesetzt. Der Laich weist, im Gegensatz zu allen anderen Anamniota, weder eine Schale noch eine Membran auf und die Kaulquappen besitzen eine hochpermeable Haut, so dass exogene Substanzen während der gesamten Embryonal- und Larvalentwicklung nahezu ungehindert in den Organismus gelangen können. Der Zeitraum bis zum Abschluss der Metamorphose stellt somit die sensitivste Phase gegenüber dem Einfluss exogener Faktoren und damit auch gegenüber dem Einfluss von ED bei Amphibien dar.

Die Geschlechtsdifferenzierung bei Amphibien unterliegt der Kontrolle der Geschlechtshormone. Die Verteilung der Geschlechter kann sich unabhängig vom Genotyp ändern, wenn während des Zeitraumes der Keimzellendifferenzierung eine Behandlung mit Sexualsteroiden erfolgt. Eine Behandlung mit Östrogenen erzeugt einen erhöhten Anteil weiblicher Phänotypen, während die Gegenwart von Androgenen im Umgebungsmedium in dieser Entwicklungsphase zu einer Vermännlichung führen kann (Witschi & Allison, 1950; Witschi, 1971; Gallien, 1974; Hayes, 1998; Wallace *et al.*, 1999; Bögi *et al.*, 2002). Damit bieten Amphibien die Möglichkeit, an ihnen den Einfluss von exogenen Substanzen auf die Sexualdifferenzierung *in vivo* zu untersuchen.

Als Studienmodell diente in der vorliegenden Arbeit der Südafrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis* (Daudin, 1803). In unserer Arbeitsgruppe ist *Xenopus laevis* als Studienobjekt zur Untersuchung der Wirkungen von Substanzen auf das Hormonsystem etabliert (Kloas *et al.*, 1999; Lutz & Kloas, 1999; Kloas, 2002; Opitz *et al.*, 2002; Bögi *et al.*, 2002). Zum einen ermöglichen Rezeptorbindungsstudien die Untersuchung der Bindungsaffinität von ED an die cytosolischen Hormonrezeptoren. Zum anderen lässt sich die biologische Wirkung von ED durch Behandlung von primären Hepatocytenkulturen nachweisen, indem die ED-induzierte Transkription bestimmter Biomarker gemessen wird. Außerdem wurde ein *in vivo*-Testsystem entwickelt, das die Untersuchung der Wirkung von ED auf die Sexualdifferenzierung und der Metamorphose während der Larvalentwicklung ermöglicht (vgl. Abb. 1.2).

*Xenopus laevis* ist ein geeigneter Testorganismus sowohl für *in vitro*- als auch für *in vivo*-Experimente zur Detektion hormonähnlicher Wirkungen. Zusätzlich können die

Tiere einfach gehalten werden und ganzjährig reproduzieren (Deuchar, 1975; Hilken *et al.*, 1995). Die Entwicklung des Krallenfrosches vom befruchteten Ei bis zum juvenilen Tier wurde in einer Normentafel in 66 Stadien unterteilt (Nieuwkoop & Faber, 1994), mit der die Angaben zu den Entwicklungsphasen in dieser Arbeit übereinstimmen.

## 1.5. Stand der Wissenschaft

Prinzipiell kann die Reproduktionsbiologie bei Wirbeltieren über vier Wirkmechanismen beeinflusst werden: Stoffe mit östrogenen und antiandrogenen Wirkung führen zur Verweiblichung, Stoffe mit antiöstrogenen Wirkung zur Entweiblichung bzw. Neutralisierung und Stoffe mit androgenen Wirkung zur Vermännlichung (für Übersichtsdarstellungen siehe: Colborn *et al.*, 1993; Crisp *et al.*, 1998; Tyler *et al.*, 1998; McLachlan, 2001; Kloas, 2002). Deshalb ist es das Ziel unserer Arbeitsgruppe mit *Xenopus laevis* ein Modell zu etablieren, das in der Lage ist, sowohl (anti)östrogene als auch (anti)androgene Effekte *in vitro* und *in vivo* nachzuweisen.

Inzwischen hat sich die Erkenntnis durchgesetzt, dass nur die Kombination von standardisierten *in vitro*- und *in vivo*-Methoden sowie die Überprüfung der damit erzielten Ergebnisse in Ökosystemstudien zu einer fundierten Aussage über das tatsächliche Gefährdungspotential endokrin wirksamer Substanzen auf Mensch und Tier führt (Zacharewski, 1998). Mit dem Modellorganismus *Xenopus laevis* liegt ein dreistufiges Testsystem vor, das zum Nachweis (anti)androgenen und (anti)östrogenen Wirkungen bekannter Umweltchemikalien herangezogen werden kann (Kloas *et al.*, 1999; 2000; Lutz & Kloas, 1999). Da Umweltbelastungen mit ED sich hauptsächlich in den Oberflächengewässern, die als Stoffsenke dienen, zeigen (Sumpter & Jobling, 1993; Kloas & Lutz, 2001), sind Lebewesen, die sich permanent oder während bestimmten Entwicklungsabschnitten in Gewässern aufhalten in besonderem Maße davon bedroht (Opitz *et al.*, 2002). Amphibien befinden sich zwangsläufig während der Larvalentwicklung in Gewässern. In dieser Zeit finden auch die meisten Prozesse der Geschlechtsausprägung und -entwicklung statt, so dass Amphibien als empfindliches Modell zur Erkennung und Bewertung einer möglichen Belastung der Oberflächengewässer mit endokrin wirksamen Substanzen gelten (Bögi *et al.*, 2002).

Die bisherige einseitige Fokussierung auf östrogene Wirkungen von Umweltbelastungen vernachlässigte die Tatsache, dass anthropogen belastete Oberflächengewässer immer eine Mischung der verschiedensten Substanzen enthalten, die potentiell alle vier für die Reproduktionsbiologie relevanten Wirkmechanismen ((anti)östrogen, (anti)androgen) aufweisen können. Bisher wurden deshalb aus Gewässerproben nahezu ausschließlich östrogene Effekte untersucht und der Versuch unternommen, diese mit entsprechenden

Xenoöstrogenen, abhängig von der zur Verfügung stehenden chemischen Analytik, zu korrelieren. Bei einer solchen Vorgehensweise werden alle antiöstrogen, androgen und antiandrogen wirksamen Substanzen ignoriert und auch die Korrelation mit gemessenen Xenoöstrogenen wird immer nur einen Bruchteil der insgesamt vorhandenen östrogenen Stoffe erfassen. Für eine eindeutige Risikobewertung der Gewässerbelastung für die Reproduktionsbiologie von Vertebraten durch ED ist es deshalb unerlässlich, diese Substanzen anhand ihrer 4 möglichen Wirkmechanismen zu charakterisieren, zu identifizieren und sie sowohl chemisch als auch hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität zu quantifizieren. Nur durch die Identifizierung und Quantifizierung der Hauptkomponenten in Gewässerproben lassen sich deren potentielle Herkünfte ermitteln, was zu Handlungsempfehlungen führt, die die Vermeidung und Verminderung dieser Umweltbelastung zum Ziel haben.

## **1.6. Projektziele/Aufgabenstellung**

Ziel des Projektes war es mit dem Amphibien-Modell *Xenopus laevis* an verschiedenen Probenahmestellen (Quellwasser, Wasser vor, aus und unterhalb von Kläranlagenausläufen) eines typischen anthropogen belasteten Fließgewässers in Baden-Württemberg, der Alb, die Zusammensetzung an ED anhand der vorhandenen (anti)östrogenen bzw. (anti)androgenen Wirkmechanismen zu identifizieren und anhand ihrer biologischen Wirkungen zu charakterisieren. Aus den Gewässerproben werden die lipophilen Substanzen, die auch die ED enthalten, extrahiert und mittels HPLC in weitere Fraktionen aufgetrennt. Danach werden Proben des Gesamtextraktes sowie die einzelnen Fraktionen den entsprechenden Bioassays unterzogen. Durch die enge Verzahnung von Bioassays mit chemischer Analytik sollte die Identifizierung der biologisch wirksamsten ED erreicht werden. Deshalb wurde als positive Kontrolle der östrogene ED Bisphenol A (BPA) herangezogen, um dessen biologische Wirkungen *in vivo* auf die Sexualdifferenzierung sowie auf die Induktion des östrogenen Biomarkers ER-mRNA zu charakterisieren. Parallel hierzu wurde die entsprechende chemische Analytik etabliert, um BPA sowohl während der Expositionversuche als auch aus den Gewässerproben der Alb quantitativ bestimmen zu können.

Zur biologischen Charakterisierung der Alb-Proben sollten neben den bereits etablierten Radiorezeptorassays zur Bestimmung der AR bzw. ER-Bindung die Entwicklung *Xenopus*-spezifischer Reporter-Gen-Assays für ER und AR erfolgen, da nur so auch die Wirkmechanismen hinsichtlich ihrer östrogenen und antiöstrogenen bzw. androgenen und antiandrogenen Eigenschaften differenziert bestimmt werden können. Eine Überprüfung dieser Befunde sollte anhand der Effekte auf die *in vitro*-Induktion spezifischer östrogenen (ER-mRNA) bzw. androgener (Retinol Binding



Protein (RBP)-mRNA) Biomarker in *Xenopus*-Hepatocyten-Primärzellkulturen stattfinden. Die Überprüfung von so identifizierten Substanzen *in vivo* hinsichtlich der Beeinflussung der Geschlechtsdifferenzierung während der Larvalentwicklung sollte eine Risikobewertung der tatsächlichen Gewässerbelastung bzw. der darin befindlichen Stoffe zulassen.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Versuchstiere**

#### **2.1.1. Herkunft und Haltung der Versuchstiere**

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Krallenfrösche bzw. Kaulquappen entstammten der Amphibienhaltung der Abteilung Binnenfischerei des Instituts für Gewässerökologie und Binnenfischerei in Berlin. Sie wurden ursprünglich von der African Xenopus Facility (Knysna, Republic of South Africa) geliefert. Die adulten Krallenfrösche wurden in Kunststoffbehältern (Fassungsvermögen 50 L) gehalten, in die 30 L Leitungswasser gegeben wurde. Der Raum für die Froschhaltung hatte ausschließlich künstliche Lichtquellen, die eine regelmäßige Hell- und Dunkelphase von jeweils 12 Stunden Dauer erzeugten. Die Fütterung erfolgte zweimal wöchentlich, zum einen mit Fischfutter (fisch-fit, Alleinfutter für Forellen, Interquell, Wehringen) und zum anderen mit gehacktem Schweineherz. Ebenfalls zweimal wöchentlich erfolgte ein Wasserwechsel und die Reinigung der Behälter.

Die Versuche mit *Xenopus laevis* wurden vom Berliner Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit (LAGetSi) gemäß § 4,3 und § 6,1 Tierschutzgesetz Berlin unter der Antragsnummer G0141/00 genehmigt. Nicht genehmigungspflichtige Arbeiten mit den Tieren wurden bei der Behörde angezeigt.

#### **2.1.2. Zucht der Versuchstiere**

### **Chemikalien und Lösungen**

HCG (Human Chorionic Gonadotropin)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Meersalz Tropic Marin <sup>®</sup>	Dr. Biener GmbH, Wartenberg
H <sub>2</sub> O entionisiert: Leitfähigkeit < 18 µS/cm	RiOs 16, Millipore, Eschborn
Injektionslösung:	
200 Units HCG/100 µL H <sub>2</sub> O entionisiert	
Standardmedium:	
2,5 g Meersalz/L H <sub>2</sub> O entionisiert	

### **Durchführung der Nachzucht**

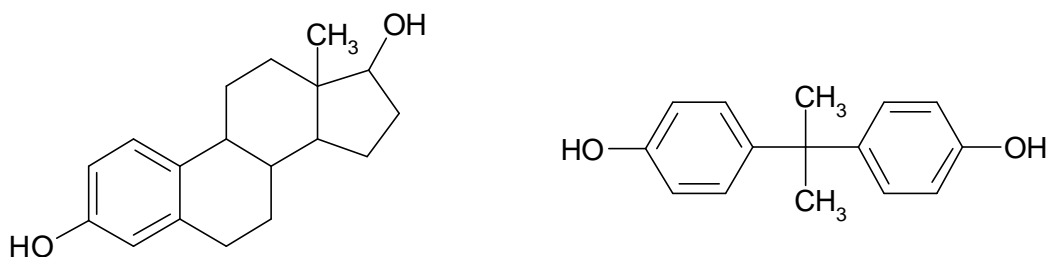
Geschlechtsreifen männlichen Fröschen wurden morgens 150 µL HCG-Lösung in den Rückenlymphsack gespritzt. Am Abend des gleichen Tages bekamen die Männchen erneut 150 µL Injektionslösung verabreicht und den Weibchen wurden 500 µL HCG-

Lösung injiziert. Über Nacht wurden je ein Weibchen und ein Männchen in ein abgedunkeltes Aquarium gesetzt, das mit 40 L Standardmedium befüllt war. Dieses hatte eine dem Trinkwasser entsprechende Osmolarität. Mit einem Heizstab wurde das Wasser auf 21°C erwärmt und über Sprudelsteine mit Sauerstoff belüftet. Am darauffolgenden Morgen wurden die erwachsenen Tiere aus den Becken entfernt. Bei erfolgreichem Laichvorgang befanden sich ca. ein- bis zweitausend Eier in den Behältern. Aus durchschnittlich 75 % der Eier entwickelten sich Kaulquappen, denen sofort nach dem Schlüpfen Futter (Sera micron, Sera, Heinsberg) gegeben wurde.

## 2.2. Charakterisierung der östrogenen Wirkung von Bisphenol A (BPA) *in vivo*

### 2.2.1. BPA-Exposition von Kaulquappen während der Larvalentwicklung

Mit Expositionsversuchen kann bei *Xenopus laevis* getestet werden, ob bestimmte Substanzen einen Einfluss auf die Sexualdifferenzierung bei den Tieren haben bzw. ob diese in der Lage sind spezifische Biomarker zu induzieren. Dazu wurden die Substanzen, der östrogene ED BPA und als Positivkontrolle E2 (Abb. 2.1), in gelöster Form dem Standardmedium zugegeben. Die Methode wurde angewandt, um einen bestimmten Endpunkt, nämlich die Entwicklung der Gonaden zu Hoden oder Ovarien unter dem Einfluss von BPA im Vergleich zu E2, zu bestimmen und damit Aussagen über den Einfluss der getesteten Substanz zu treffen. Begleitend wurden mittels chemischer Analytik quantitative Daten über BPA während der Expositionen erhoben, um Erkenntnisse über die real vorhandenen Konzentrationen im semistatischen Expositionsregime sowie über Abbau- bzw. potentiell Aufnahmeverhalten bei den Kaulquappen zu erhalten.



**Abb. 2.1:** Strukturformeln der in die Expositionsversuche eingesetzten Substanzen E2 (links) und BPA (rechts).

### **Chemikalien und Lösungen**

17 $\beta$ -Östradiol (E2)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Bisphenol A (BPA)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Ethanol 99% p.a.	Roth, Karlsruhe
Standardmedium: 2,5 g Meersalz/L H <sub>2</sub> O entionisiert	

### **Durchführung des Expositionsansatzes**

5-7 Tage nach der induzierten Laichabgabe und -befruchtung hatten die geschlüpften Kaulquappen das Entwicklungsstadium 42-43 erreicht und wurden in die Versuchsbecken eingesetzt. Dazu wurden 12,5 L fassende Glasbecken mit 10 L Standardmedium befüllt und in eine Brutrinne gestellt. Diese wurde mit temperiertem Wasser (23 °C) gefüllt, das um die Glasbecken zirkulierte, um eine konstante Temperatur in allen Becken zu gewährleisten. Das Standardmedium in den Glasbecken wurde durch Sprudelsteine mit Sauerstoff belüftet und in jedes Becken wurden 40 Kaulquappen des Stadiums 42 gegeben. Am Abend erfolgte eine erste Futterzugabe. Am nächsten Morgen wurde überprüft, ob die Kaulquappen ohne Schädigung das Umsetzen in die Versuchsbecken überstanden hatten, um eventuell geschädigte Tiere austauschen zu können. Danach erfolgte die erste Zugabe der Testsubstanzen. Der Versuchsansatz umfasste 10 Becken, davon 2 Lösungsmittelkontrollbecken (Ethanol 99% p.a.). Kaulquappen in 2 Becken wurden als Positivkontrollen verwendet (Behandlung jeweils mit E2 10<sup>-7</sup> M) und 6 Becken waren BPA-Testbecken (je zwei Mal BPA 10<sup>-6</sup> M, 10<sup>-7</sup> M und 10<sup>-8</sup> M). Aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit der Testsubstanzen wurden diese in Ethanol 99% p.a. gelöst. Die Chemikalien bzw. das Lösungsmittel wurden jeweils in einem Volumen von 100  $\mu$ L zugegeben. Chemikalienlösungen wurden ein Mal wöchentlich neu angesetzt und drei Mal in der Woche wurde das Wasser komplett gewechselt (montags, mittwochs, freitags). An diesen Tagen erfolgte jeweils eine erneute Testsubstanzen- und Futterzugabe, sodass sich ein semistatisches Expositionsregime ergab. Als Futter wurde kommerziell erhältliches Jungfischaufzuchtfutter verwendet (Sera micron, Sera, Heinsberg). Veränderungen im Tierbestand und die Wassertemperatur im Umgebungsbecken wurden notiert.

### **2.2.2. Geschlechtsbestimmung der juvenilen Frösche**

#### **Chemikalien und Lösungen**

Aminobenzoessäureethylmethansulfonat (MS-222)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
--	----------------------------

Betäubungslösung:

3 g MS-222/L Leitungswasser

Fixiermedium:

Bouin-Fertiglösung

Sigma-Aldrich, Schnelldorf

### **Durchführung der Geschlechtsbestimmung**

Circa 6 Wochen nach dem Schlüpfen hatten die ersten Kaulquappen die Metamorphose vollendet. Eine sofortige Entnahme der kleinen Frösche war erforderlich, weil diese zu Kannibalismus neigen und eine Gefahr für weniger weit entwickelte Kaulquappen in ihrem Becken sein könnten. Dann wurde das jeweilige Geschlecht identifiziert. Dazu wurden die Tiere in Betäubungslösung gelegt und durch einen Genickschnitt sowie durch Ausbohren des Rückenmarks mit einer Präpariernadel getötet. Daraufhin wurde die Bauchdecke aufgeschnitten und die Gonaden freigelegt. Das Geschlecht der Tiere wurde mit Hilfe eines Binokulars (Zoom 2000, Leica Microsystems, Heidelberg) bestimmt, notiert und später der Gesamtauswertung zugeführt.

Nach 120 Behandlungstagen wurden die Versuche aufgelöst, die noch in der Metamorphose befindlichen Tiere wurden abgetötet und ihr Geschlecht bestimmt. Eine Geschlechtsbestimmung ließ sich ab Stadium 56 problemlos durchführen, da zu diesem Zeitpunkt eine grob morphologische Unterscheidung der Gonaden in Hoden und Ovarien möglich ist. Die juvenilen Frösche wurden vor der Geschlechtsuntersuchung gewogen und damit ihr Körpergewicht bestimmt. Zur besseren Unterscheidung der Gonaden wurden diese direkt nach der Freilegung mit Bouin-Lösung fixiert und mit dem Binokular das Geschlecht bestimmt. Danach wurden die fixierten Nieren-Gonaden-Komplexe herauspräpariert und in 70 % Ethanol für weitere histologische Untersuchungen aufbewahrt. Die Geschlechtsbestimmungen wurden immer von zwei Personen unabhängig voneinander durchgeführt.

### **2.2.3. Histologische Untersuchung der Gonaden**

Alle Hoden des Versuchsansatzes wurden histologisch untersucht, um mögliche zelluläre Schädigungen bzw. die potenzielle Induktion von Oocyten in den Geweben als Folge der BPA-Behandlung zu entdecken. Schnitte von Ovarien wurden nur vereinzelt angefertigt, da nicht davon ausgegangen wurde, dass BPA die Entwicklung der weiblichen Geschlechtsorgane stört.

### **Chemikalien und Lösungen**

Chloroform

Roth, Karlsruhe

Ethanol 99 % p.a.

Roth, Karlsruhe

Einbettungsmedium:	
Rotiplast	Roth, Karlsruhe
Färbelösung:	
Eosin-Stammlösung	Merck, Darmstadt
Hämalaun-Stammlösung nach Mayer	Merck, Darmstadt
Fixiermedium:	
Bouin-Fertiglösung	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Schnelleindeckmedium:	
Entellan	Merck, Darmstadt

### **Durchführung der histologischen Untersuchungen**

Die herauspräparierten Hoden-Nieren-Komplexe wurden erneut in Bouin-Lösung fixiert und nach drei Stunden zwei Mal mit 70 % Ethanol gewaschen. Vor dem Anfertigen der mikroskopischen Schnitte erfolgte eine Überführung der Gewebe in Einbettkassetten und deren Entwässerung in einem Gewebereinbettautomaten (Barimed, Kuno Vieth Mikrotome GmbH, ORT). Die Entwässerung der fixierten Gonaden erfolgte mit Hilfe einer Ethanolkonzentrationsreihe (80 % - 2 h, 95 % - 2 h, 95 % - 2 h, 95 % - 2 h, 99 % - 1 h, 99 % - 2 h). Danach wurden die Gewebe mit Chloroform behandelt (insgesamt 3 Stunden) und schließlich in einer automatischen Gewebe-Ausblock-Station (DDM-P066/II, FIRMA, ORT) in Paraffin-Einbettungsmedium eingebettet (insgesamt 8 Stunden). Die Gewebeschnitte wurden mit einem Rotationsmikrotom (2065 Supercut, Leica Microsystems, Heidelberg) in einer Schnittdicke von 8 µm angefertigt. Nach dem Herstellen der Schnitte wurden diese auf Objektträger aufgezo-gen und gegebenenfalls durch leichte Erwärmung geglättet. Die Anfärbung der Präparate erfolgte in einem Färbeautomaten (HMS, Carl-Zeiss Inc., Jena) mit Hämatoxylin-Eosin-Lösung. Dazu wurde 1 %ige wässrige Eosinlösung mit Hämalaun-Fertiglösung nach Mayer im Verhältnis 8:1 gemischt und in den Färbeautomaten gefüllt. Nach der Färbung zeigten sich die Zellkerne blau und das Cytoplasma rot gefärbt. Schließlich wurden die Schnitte mit Schnelleindeckmedium eingedeckelt.

Die Analyse der histologischen Präparate wurde mit Hilfe eines Lichtmikroskopes (Olympus BX50, Olympus Optical Europe, Hamburg) durchgeführt. Schließlich wurden die Objekte mit einer Digitalkamera fotografiert und die Bilder mit einer Bildbearbeitungssoftware gespeichert (ColorView 12 und analySIS 3.1, Soft Imaging System, Münster).

#### **2.2.4. Kurzzeitige Kaulquappenexposition mit BPA und Bestimmung des östrogenen Biomarkers Östrogenrezeptor (ER)-mRNA**

Dieser Versuch diente dazu, die östrogene Wirkungsweise von BPA in den Kaulquappen näher zu bestimmen. Dabei sollte gezeigt werden, dass eine kurzzeitige Exposition der Tiere mit BPA die Expression eines typischen östrogenen Biomarkers induzieren konnte. Ein geeigneter östrogen Biomarker ist der ER (Bögi et al. 2002), dessen mRNA-Expression in Kaulquappen in diesem Versuchsansatz nachgewiesen wurde. Der Nachweis erfolgte durch die Reverse Transcriptase – Polymerase-Chain-Reaction (RT-PCR). Die RT-PCR ist eine Methode, welche die reverse Transkription (RT) der mRNA mit der Amplifizierung der daraus erhaltenen komplementären DNA (cDNA) durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) verbindet (Byrne *et al.*, 1988; Wang *et al.*, 1989).

Die Kaulquappen wurden wie in Kapitel 2.1.2. beschrieben gezüchtet und aufgezogen. Es wurden jeweils 10 Kaulquappen im Entwicklungsstadium 50 in Glasbecken gegeben und mit Ethanol 99 % p.a.,  $10^{-7}$  M E2 und  $10^{-7}$  M BPA zwei Wochen lang behandelt. Die Versuchsdurchführung glich derjenigen in Kapitel 2.2.1. RNA-Isolierung und Durchführung der RT-PCR mit daran anschließender Darstellung durch Gelelektrophorese und deren Auswertung für die ER-mRNA-Bestimmung erfolgte entsprechend den Angaben von Bögi *et al.* (2002).

#### **2.2.5. Chemische Analyse von BPA in den Expositionsversuchen**

Zum Nachweis, in welchen Konzentrationen BPA tatsächlich im Standardmedium vorhanden war, war es erforderlich, chemische Analysen des Expositionswassers vorzunehmen. Zusätzlich konnte überprüft werden, dass sich BPA tatsächlich nur in den Testbecken befand und nicht in den Kontroll- oder Positivkontroll (E2)-Becken. Durch eine zeitliche Probenentnahme ließ sich die Änderung der BPA-Konzentration im Zeitverlauf bestimmen (vgl. Levy *et al.*, 2004a).

#### **Chemikalien und Lösungen**

Aceton (HPLC grade)	Roth, Karlsruhe
Acetonitril (HPLC grade)	Roth, Karlsruhe
Methanol (HPLC grade)	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Octadecyl (C18, Bakerbond)	J.T. Baker, Deventer, Holland
Quecksilberchlorid (HgCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich, Steinheim
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt

### **Durchführung der BPA-Analyse**

Der BPA-Gehalt im Wasser aller Glasbecken des Expositionsansatzes wurde chemisch analysiert. Dazu wurden Wasserproben unmittelbar nach der Zugabe der BPA-Nominalkonzentration entnommen. Weiterhin wurde die BPA-Konzentration in den Becken in Zeitintervallen von 6 Stunden über einen Gesamtzeitraum von 48 Stunden gemessen, also zwischen zwei aufeinander folgenden Wasserwechsell. Die Wasserproben der Zeitverläufe stammten aus drei verschiedenen Behandlungsbecken: Erstens aus Becken des Expositionsansatzes, in denen sich folglich BPA, Standardmedium, Futter und Kaulquappen befanden. Zweitens aus Becken, die BPA, Standardmedium und Futter enthielten, sowie drittens aus Becken, die nur BPA und Standardmedium beinhalten. Probenentnahme und Analyse wurden dreifach ausgeführt, in einigen wenigen Fällen zweifach.

Es wurden jeweils 0,5 – 2 L Wasser entnommen, abhängig von der zugesetzten BPA-Konzentration. Zu jeder Wasserprobe wurde 1 ml  $\text{HgCl}_2/\text{L}$  Wasser gegeben und die Wasserproben wurden in Glasflaschen (Schott Duran, Merck, Darmstadt) bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Für die Extraktion von BPA aus den Wasserproben wurde eine Festphasenextraktionsmethode verwendet. Glasfritten wurden mit 500 mg Octadecyl gefüllt und mit Aceton, Methanol und 0,01 M Salzsäure (pH 2) konditioniert. Die Wasserproben wurden aufgetaut und in 500 ml von diesen wurden jeweils 2,5 g NaCl und 2,5 ml Salzsäure 30 % gegeben. Die konditionierte Extraktionssäule wurde mit den Wasserproben beschickt. Der Durchlauf des Wassers durch die Säule erfolgte zuerst durch die Schwerkraft alleine. Schließlich wurde mit einer Vakuumpumpe der in der Säule verbliebenen Flüssigkeitsrest ausgetrieben, wobei eine Fließrate von ungefähr 25 ml/min entstand. BPA wurde mit 2 x 2,5 ml Aceton aus den Säulen eluiert. Das Eluat wurde unter Stickstoffatmosphäre in einem Rotationsverdampfer (Rotavapor R-200, Büchi, ORT) zur Trockene eingedunstet und in Acetonitril wieder aufgenommen.

Die Bestimmung der BPA-Konzentration erfolgte durch Trennung mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) und anschließender Fluoreszenzmessung (Gynkotek HPLC, Idstein). Zur Auftrennung wurde eine 250 mm x 3 mm Ultrasep ES Säule (Sepserv, Berlin) verwendet, die isokratisch mit einem Laufmittelgemisch aus 65 % Acetonitril und 35 % eines 0,01 M Phosphatpuffers (pH 6) bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,8 ml/min bearbeitet wurde. Die BPA-Detektion erfolgte durch Fluoreszenzlicht mit einer Anregungswellenlänge von 229 nm und einer Emissionswellenlänge von 360 nm. Die BPA-Konzentrationen wurden quantifiziert, indem die Werte der Integrale der BPA-Peaks mit den Werten einer Standardkurve verglichen wurden. Um Aussagen über die Empfindlichkeit und die Reproduzierbarkeit der Methode zu erhalten, wurden die



Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sowie die Wiederfindungsrate für BPA ermittelt (Funk *et al.*, 1992).

## **2.3. Gewässeruntersuchungen**

### **2.3.1. Charakterisierung des Modellgewässers Alb**

Die Alb ist ein kleiner Nebenfluss des Rheins. Sie hat eine Länge von ca. 50 km und ein Einzugsgebiet von ungefähr 460 km<sup>2</sup>, wovon ein Drittel im Buntsandsteingebiet des Schwarzwaldes liegt. Ihre Quelle liegt in der Nähe von Bad Herrenalb (Baden-Württemberg). Die Fließgeschwindigkeiten im Oberlauf liegen bei durchschnittlich 0,5 m/s und verlangsamen sich im Unterlauf auf ca. 0,3 m/s (LFU, 1982). Der mittlere Abfluss liegt bei 2,34 m<sup>3</sup>/s (1964-1996). Bevor die Alb in den Rhein mündet, durchquert sie die Stadt Karlsruhe und ein Raffineriegelände (weitere Angaben: Huber *et al.*, 1994; LFU, 1997; Schäfer, 1999).

Abbildung 2.2 zeigt die geographische Lage der gewählten Probennahmestellen und ein Schema ihrer Anordnung im Flussverlauf. Es wurde eine möglichst unbelastete Referenzstelle im Quellgebiet gewählt (Alb 0). Die anderen Stellen gruppieren sich um zwei Kläranlagenausläufe (Alb 2, Alb 5) herum, jeweils eine Stelle flussaufwärts (Alb 1, Alb 4) und eine Stelle flussabwärts (Alb 3, Alb 6) des Einleiters.

In Tabelle 2.1 wurden die wichtigsten Lagemerkmale der einzelnen Probennahmestellen vermerkt. Diese wurden durch Begehung der unmittelbaren Umgebung der jeweiligen Stellen erfasst. Die Begehung fand kreisförmig um den Ort der Probennahme statt und der Radius des Begehungskreises betrug – wenn keine Hindernisse den Weg versperrten – ungefähr 300 m.

### **2.3.2. Entnahme der Gewässerproben**

An den jeweiligen Probennahmestellen des Flusses (Alb 0, 1, 3, 4, 6) wurden 40 – 50 l Wasser entnommen. Die Entnahme erfolgte jeweils in der Flussmitte, ungefähr 10 cm unter der Wasseroberfläche. Die Temperatur des Wassers wurde vor Ort gemessen und die Proben wurden in Glasbehältern zur Aufarbeitung in die Kläranlagen gefahren. Die Proben unterschiedlicher Flussabschnitte wurden zu ähnlichen Zeitpunkten an aufeinanderfolgenden Tagen genommen. Das Kläranlagenauslaufwasser wurde auf dem Gelände der beiden Kläranlagen direkt aus dem Auslaufkanal entnommen, wobei aufgrund des hohen Schwebstoffgehaltes nur 10-15 l des Kläranlagenauslauf Alb 5 extrahiert wurden.

Es fanden drei Probennahmen zu unterschiedlichen Jahreszeiten statt, und zwar im Juli 2001, im Februar 2002 und im August 2002.

### 2.3.3. Herstellen von Extrakten aus den Gewässerproben

#### Chemikalien und Lösungen

Aceton

Roth, Karlsruhe

Dichlormethan

Roth, Karlsruhe

Methanol

Roth, Karlsruhe

n-Hexan

Roth, Karlsruhe

Natriumchlorid (NaCl)

Merck, Darmstadt

Natriumsulfat (NaSO<sub>4</sub>)

Merck, Darmstadt

Salzsäure 3,7 % (HCl)

Merck, Darmstadt

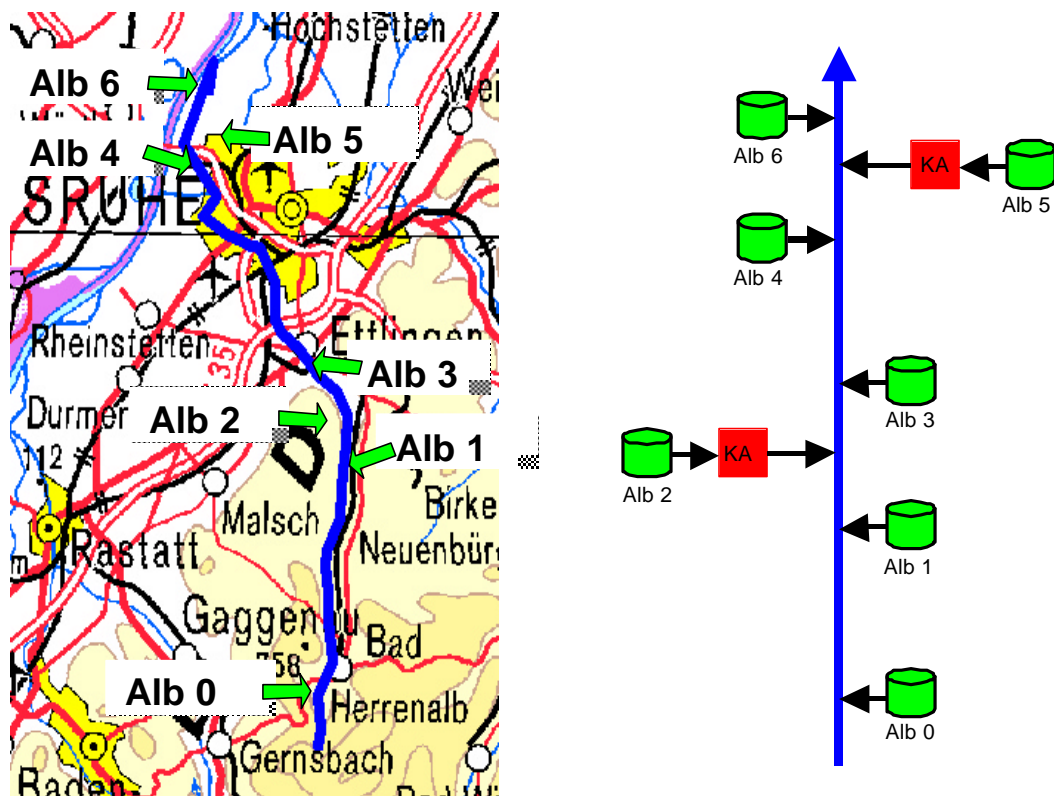


Abb. 2.2: Geographische Lage des Modellgewässers (links) und schematische Darstellung der Probennahmestellen im Flussverlauf (rechts). KA: Kläranlagenauslauf.

**Tab. 2.1:** Lagemerkmale der einzelnen Probennahmestellen entlang des Flussverlaufs der Alb.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Beschreibung der Probennahmestelle</b>
Alb 0	Liegt ca. 2 km unterhalb der Quelle bei Bad Herrenalb, keine Einleiter bekannt, möglicherweise Eintrag durch Vieh- und Forstwirtschaft. Am Ort ist die Alb ca. 2-3 m breit, 10 bis 50 cm tief, linkes Ufer bewaldet, rechtes Ufer offengelassene Weide.
Alb 1	Probennahme in Fischweier, ca. 3 km oberhalb der Kläranlage Neurod, mögliche Einleitung durch Landwirtschaft, Bahn- und PKW-Verkehrseinflüsse möglich; Linkes Ufer Weide, rechtes Ufer Bäume und Bahndamm; Alb ca. 3-4 m breit und 20-60 cm tief.
Alb 2	Auslaufwasser der Kläranlage Neurod, die Abwasser von 40000 Einwohneräquivalenten und ausschließlich kommunales Abwasser der Albtagemeinden bearbeitet.
Alb 3	Probennahme ca. 2 km unterhalb der Kläranlage Neurod und etwa 500 m vom Einleitungskanal der Kläranlage entfernt am Ortseingang von Ettlingen. Die Alb hat hier das Industriegebiet „Ettlinger Spinnerei“ durchflossen, der Fluss ist 4-5 m breit und 50-70 cm tief, linkes Ufer Firmengelände, rechtes Ufer Bäume und Parkplatz.
Alb 4	Probennahme am Ortsausgang Karlsruhe-Knielingen, ca. 1 km vor Eintritt in Raffineriegelände und 2,5 km vor Einleitungskanal der Kläranlage Neureut, Alb verlässt hier Karlsruher Stadtgebiet; der Fluss ist 8-10 m breit und 80-100 cm tief; linkes und rechtes Ufer als Damm mit Spazierwegen angelegt.
Alb 5	Auslaufwasser der Kläranlage Karlsruhe-Neureut, die im Gewerbegebiet Neureut-Süd liegt und Abwasser von 740000 Einwohneräquivalenten bearbeitet, wobei es sich um Industrie- und kommunales Mischabwasser handelt.
Alb 6	Probennahme in der Nähe des Baggersees Eggenstein, max. 1 km vor der Mündung; Entfernung zum Einleitungskanal der Kläranlage Neureut ca. 2,5 km; der Fluss ist ca. 10 m breit und 100-250 cm tief und beiderseits von einem Damm eingefasst, wobei sich hinter dem linken Uferdamm die Rheinaue befindet.

### **Durchführung der Extraktion**

Die Extraktion der Gewässerproben erfolgte jeweils auf dem Gelände der Kläranlagen, sodass eine unmittelbare Aufarbeitung durch kurze Transportwege gewährleistet war. Dies war erforderlich, um mögliche mikrobielle Prozesse, die zur Veränderung der Zusammensetzung der Wasserinhaltsstoffe führen könnten, so gering wie möglich zu halten. Die Extraktionsmethode war eine Festphasenextraktion über C18-Extraktionsdisks (3M Empore High Performance Extraction Disks, 3M Center, St. Paul, USA). Zuvor wurde das Wasser mit 3,7 %iger Salzsäure (2,5 ml/l Wasser) angesäuert und mit NaCl (2,5 g/l Wasser) versetzt. Dann wurde es durch Glasfaserfilter (Schleicher & Schuell, Dassel) mit 50 µm Porendurchmesser filtriert und anschließend mithilfe einer Vakuumpumpe durch die Extraktionsdisks gesaugt, die vorher mit jeweils 20 ml Aceton, Methanol und 0,01 M Salzsäure (pH 2) konditioniert wurden. Je nach Probennahmestelle konnten 1-4 l Wasser pro Disk extrahiert werden. Die Extraktionsdisks wurden in Alufolie verpackt und kühl gelagert und im Labor weiter bearbeitet.

Die Disks wurden im Labor unter Stickstoffatmosphäre getrocknet und daraufhin wurden die zurückgehaltenen Substanzen aus den Disks eluiert. Um ein möglichst großes Spektrum an Substanzen herauszulösen, wurden drei unterschiedlich polare Lösungsmittel (Aceton, Dichlormethan und Hexan) im Überschuss zugegeben. Die so erhaltenen Gesamtextrakte wurden mit einem Rotationsverdampfer (Rotavapor R-200, Büchi, ORT) unter Stickstoffatmosphäre eingengt und in einem Dichlormethan/Hexan-Gemisch (30 % zu 70 %) aufgenommen. Anschließend erfolgte noch eine Filtration über eine NaSO<sub>4</sub>-Säule, um bestimmte Makromoleküle (z.B. Chlorophylle) zu entfernen. Die Gesamtextrakte wurden daraufhin der Fraktionierung zugeführt. Die Extrakte waren gegenüber den Originalproben 1000-fach konzentriert.

### **2.3.4. Fraktionierung der Gewässerextrakte**

#### **Chemikalien und Lösungen**

Dichlormethan	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
n-Hexan	Roth, Karlsruhe

#### **Durchführung der Fraktionierung**

Die Fraktionierung der Wasserextrakte aus der Alb wurde entsprechend der Methode von Snyder *et al.* (1999) durchgeführt und unseren Laborbedingungen angepasst. Es handelte sich um eine Normalphasenchromatographie mit einer Trennsäule (Phenomenex, Aschaffenburg (Luna 5 µm Silica Säule (250 mm x 4,6 mm))). Zur

Auftrennung wurde eine präparative HPLC (System Gold, Beckman, Fullerton, USA) verwendet und die Fraktionen wurden von einem automatischen Probensammler (ISCO Fraktionensammler, Foxy 200, Colora Messtechnik, Lorch) aufgenommen. Zur Herstellung der ersten drei Fraktionen diente eine dreistufige, isokratische Arbeitsweise, wobei die einzelnen Stufen in der Abfolge 15 min 30% Dichlormethan in Hexan, 20 min Dichlormethan, 20 min Methanol bei einer jeweiligen Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min und einer Beladung der Säule mit jeweils 2,5 ml Extrakt durchgeführt wurden.

### **2.3.5. Analyse der Gewässerproben mittels GC-MS**

Das Grundprinzip der Massenspektrometrie ist es, aus anorganischen oder organischen Substanzen in geeigneter Weise Ionen zu erzeugen und diese Ionen nach ihrer Masse und Ladung zu trennen. Ein entsprechendes Registriersystem erlaubt danach die qualitative und quantitative Erfassung der Ionen nach Masse und Häufigkeit. Das Massenspektrum spiegelt also das Verhältnis von Ionenmasse zu Ionenladung wider. Die Massenspektrometrie verbraucht zwar den Analyt bei der Messung, ist dafür aber sehr empfindlich (bis in den pg-Bereich bei Spurenanalytik). Zur Detektion werden Sekundärelektronen-Vervielfacher genutzt. Der Ionenstrahl trifft auf eine Konversionsdynode aus einem Halbleitermaterial. Dadurch werden Elektronen freigesetzt, die auf die nächste Dynode hin beschleunigt werden. Über mehrere Stufen wird so eine Verstärkungskaskade ausgelöst, die das Signal um den Faktor  $10^6$  -  $10^8$  verstärkt. Anhand von Referenzspektren lassen sich gut substanzklassenspezifische Charakteristika erkennen. Mithilfe von Spektrenbibliotheken können dann unbekannte Verbindungen identifiziert werden.

### **Chemikalien und Lösungen**

Hexan

Roth, Karlsruhe

Fraktionen der Gewässerextrakte

### **Durchführung**

Zur Probenvorbereitung wurden die Eluate mit einem Rotationsverdampfer (FIRMA) bei 30 °C zur Trockene eingengt. Anschließend wurden sie in Hexan aufgenommen. Dabei wurde das Volumen des Lösungsmittel so gewählt, dass eine 1000-fache Aufkonzentrierung der Proben vorlag.

Die Auftrennung der Proben erfolgte im Gaschromatographen (FIRMA). Dabei wurden jeweils 2 µL der zu trennenden Proben injiziert. Als inertes Trägergas wurde Helium verwendet, das mit einer konstanten Fließgeschwindigkeit von 1,3 mL/min die

Trennsäule (DB5ms, FIRMA, 0,25 mm x 60 m x 0,25 µm) überströmte. Die Initialtemperatur der Trennung betrug 100°C und es folgte eine sukzessive Aufheizung auf 720°C mit einer Aufheizrate von 250°C/min. Danach startete das Ofentemperaturprogramm bei 50°C. Dabei wurde zuerst auf 130°C mit einer Aufheizrate von 20°C/min erhitzt. Die weiteren Schritte waren: 10 minütige Erhitzung auf 145°C (4,2°C/min), 10 minütige Erhitzung auf 240°C (4,1°C/min) und 10 minütige Erhitzung auf 320°C (3°C/min). Dadurch wurden die Probenbestandteile in die Gasphase überführt und konnten mit Hilfe des Trägergases getrennt werden.

Das Verbindungsstück zwischen Gaschromatograph und Massenspektrometer wird als Interface bezeichnet. Dieses hatte bei den Analysen in der vorliegenden Arbeit eine Temperatur von 280°C. Die Bestandteile des Gemisches wurden dann durch Elektronenstoßionisation ionisiert. Dabei entstanden substanztypische Fragmentierungsmuster. Die massenspektrometrische Analyse erfolgte in einem Scanbereich von 50-500 amu (atomic mass units).

Mit der vorliegenden Methodik konnten aus Gewässerextrakten außer BPA die ED EE, die Sterole, Campesterol und  $\beta$ -Sitosterol, sowie o,p'-DDE quantitativ bestimmt werden.

## **2.4. Bioassays zur Untersuchung der Gewässerextrakte**

### **2.4.1. Rezeptorbindungsstudien**

#### **Reportergenassays**

Prinzipiell müssten die Radiorezeptorassays zum Nachweis der Bindung von Umweltchemikalien an Östrogen- bzw. Androgenrezeptoren durch Reportergenassays ersetzt werden, da z.B. für die Antiandrogene p,p'-DDE und Vinclozolin keine kompetitive Bindung an der Ligandenbindungsstelle des Androgenrezeptors stattfindet. Die Bindung erfolgt vielmehr an einer anderen Stelle, die zwar die Bindung von [<sup>3</sup>H]-Testosteron an den Rezeptor erlaubt, aber den aktivierten Androgen-Androgenrezeptor-Komplex so in seiner Konformation ändert, dass keine spezifische Genexpression stattfindet. Dies lässt sich nur mit einem Androgenrezeptor-Reportergenassay, der die Transaktivierung einschließt, nachweisen. Antiandrogene Effekte werden bei gleichzeitiger Zugabe von einer bestimmten Menge Androgen und steigenden Konzentrationen an Antiandrogen als Hemmung der Androgenreaktion erfasst. Für potentielle Antiöstrogene gilt prinzipiell Entsprechendes.

Zur Etablierung dieses Reportergenassays wurde das Plasmid, das den ARE (androgenresponsives Element) enthält, herangezogen. Trotz vielfältiger Versuche zur Optimierung der entsprechenden Zellkulturbedingungen ergaben sich hierbei

unerwartet große Schwierigkeiten zum erfolgreichen Nachweis einer Transaktivierung des Androgenrezeptors. Es zeigte sich, dass mit Primärzellen der Leber von *Xenopus laevis*, die sowohl ER als auch AR enthielten, eine zu geringe Transfektionsrate mit dem das ARE enthaltenden Plasmids erreicht werden konnte, so dass für einzelne Messungen mindestens ca. 5-10 Millionen Hepatocyten benötigt wurden. Da im Durchschnitt bei der Herstellung einer Primärzellkultur nur ca. 20-60 Millionen Zellen anfallen, kann mit diesem experimentellen Ansatz, der mindestens mit Doppelbestimmungen zu erfolgen hat, keine praktisch sinnvolle Anwendung zum notwendigen Screening endokrin wirksamer Substanzen erfolgen. Der hier verfolgte experimentelle Ansatz, die Transaktivierung der in den Primärhepatocyten von *Xenopus laevis* vorhandenen ER bzw. AR mittels transfizierter ERE bzw. ARE, die jeweils an das Reporterogen Luciferase gekoppelt sind, zu messen, ist somit unter den bisher gegebenen Bedingungen als nicht praktikabel anzusehen und wurde deshalb zum Ende des Projektes aufgegeben. Die Alternative hierzu ist der klassische Weg über eine Klonierung der ER bzw. AR und deren Überführung in rezeptordefiziente Zellen bzw. Zelllinien. Ein Vorteil hiervon ist weiterhin, dass im Zuge der Rezeptorklonierung auch die bisher strittige Frage geklärt werden kann, ob auch bei Amphibien verschiedene ER- bzw. AR-Typen vorhanden sind. Hierzu sind mittlerweile in Kooperation mit Dr. Iguchi (Okazaki, Japan) die entsprechenden Klone für jeweils einen ER $\alpha$  sowie einen AR vorhanden, so dass in weiterführenden Arbeiten die Etablierung und Anwendung der klassischen Reporterogenassays für *Xenopus laevis* mit den in diesem Projekt gewonnenen Alb-Proben erfolgen kann.

### **Radiorezeptorassays**

Da aufgrund der fehlenden Praktikabilität der hier eingeführten Reporterogenassays mit Verwendung von Hepatocyten-Primärzellkulturen von *Xenopus laevis* keine Durchführung des Screenings auf (anti)östrogene und (anti)androgene der Gewässerproben möglich war, wurde auf die Anwendung klassischer Radiorezeptorassays zurückgegriffen, um eventuell in der Alb vorhandene ED, die an den ER bzw. AR binden, nachzuweisen. Mit dieser Methodik sollten die Steroidrezeptoren ER und AR bezüglich ihres Bindungsverhaltens für bestimmte Liganden charakterisiert werden. Die Messung der Bindung erfolgte über mit [ $^3\text{H}$ ] radioaktiv markiertem E2 oder T. Nicht Rezeptor gebundenes [ $^3\text{H}$ ]-E2 oder [ $^3\text{H}$ ]-T wurde aus den Ansätzen entfernt. So ließ sich zuerst die Gesamtbindung (total binding, TB) ermitteln, bei der Rezeptoren sowie unspezifische Bindungsstellen besetzt sind. Die unspezifische Bindung (non-specific binding, NB) wurde festgestellt, indem die natürlichen Liganden (E2 oder T) im Überschuss zugegeben wurden, damit alle Rezeptoren von diesen besetzt werden konnten und die gemessene Strahlungsenergie

von markierten Liganden stammen musste, die unspezifisch an im Cytosol vorhandene Bindungsstellen gebunden waren. Die Differenz aus Gesamt- und unspezifischer Bindung ergab folglich die spezifische Bindung (specific binding, SB) des markierten Liganden an den entsprechenden Rezeptor. Durch Zugabe von unmarkierten Hormonen oder Testsubstanzen können die markierten Liganden von den Rezeptoren verdrängt werden.

Mit dieser Methode lassen sich sowohl Sättigungs- und Dissoziationsexperimente als auch Konkurrenzexperimente durchführen (Lutz & Kloas, 1999). Da im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden sollte, ob in den Gewässerextrakten Substanzen vorhanden waren, die an den AR oder ER binden, wurden ausschließlich Konkurrenzexperimente durchgeführt. Für die grundlegenden Aussagen zur Bindungsaffinität und zur Sättigungskonzentration wurde auf die Ergebnisse umfangreicher Untersuchungen von Lutz (1999) zurückgegriffen.

Ein Maß für die Affinität, also für die Bindungsstärke zwischen Rezeptor und Ligand, ist die Dissoziationskonstante  $K_d$ . Diese stellt die Konzentration des markierten Liganden dar, wenn dieser 50 % der Rezeptoren besetzt hat. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten kompetitiven Verdrängungsexperimenten wurden die Radioliganden ( $[^3\text{H}]\text{-E2}$  oder  $[^3\text{H}]\text{-T}$ ) in der Konzentration der  $K_d$ -Werte eingesetzt. Die Verdrängungskapazität der zu untersuchenden Substanz oder Gewässerprobe wurde bestimmt, indem diese in steigender Konzentration zugegeben wurde. Dadurch wurde der markierte Ligand verdrängt und der Messwert sank proportional zur Verdrängung. Daraus ließen sich Verdrängungskurven ableiten, die durch eine logit-log Transformation linearisiert wurden. Weiterhin wurde der  $\text{IC}_{50}$ -Wert (inhibiting concentration 50 %) bestimmt, bei dem 50 % des gebundenen markierten Liganden verdrängt wurden.

### Chemikalien und Lösungen

17 $\beta$ -Östradiol (E2) Sigma-Aldrich, Schnelldorf

Testosteron (T) Sigma-Aldrich, Schnelldorf

Tris-HCl-Puffer (direkt vor Gebrauch frisch anzusetzen):

Tris-HCl	20	mM	Roth, Karlsruhe
Saccharose	250	mM	Merck, Darmstadt
Na <sub>2</sub> -Molybdat	10	mM	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	5	mM	Sigma-Aldrich, Schnelldorf

Aktivkohlesuspension:

Tris-HCl-Puffer	20	mM	
Aktivkohle Norit A, 4-7 $\mu\text{m}$	3,75%		Serva, Heidelberg
Dextran T 70	0,375%		Roth, Karlsruhe



Hormonlösung (radioaktiv):

[ <sup>3</sup> H]-17β-Östradiol, 54 Ci/mmol	Amersham, Freiburg
Ethanol, 5%	Merck, Darmstadt
[ <sup>3</sup> H]-Testosteron, 57/mmol	Amersham, Freiburg
Szintillationscocktail Ultima Gold	Perkin Elmer, Köln

### **Durchführung der kompetitiven Rezeptorbindungsstudien**

Um aus der Leber von *Xenopus laevis* rezeptorhaltiges Cytosol zu gewinnen, wurde der Tris-HCl-Puffer für jeden Versuch neu angesetzt und sofort auf Eis gestellt. Ein männlicher *Xenopus laevis* wurde betäubt, mit einer Schere wurde das Genick durchgeschnitten und anschließend das Rückenmark ausgebohrt. Die beiden Leberlappen wurden herauspräpariert, in eiskalten Tris-HCl-Puffer gelegt und gewogen. In einem Potter (B. Braun Biotech, Melsungen) wurde die Leber homogenisiert und dann gleichmäßig auf Zentrifugenröhrchen verteilt. In einer Ultrazentrifuge (CO-L60, Beckman, München) wurde mit 12000 g 12 min bei 4 °C zentrifugiert. Der cytosolhaltige Überstand wurde in neue Zentrifugenröhrchen überführt. Danach erfolgte der zweite einstündige Zentrifugationsschritt mit 35000 g bei 4 °C. Der Überstand, der das rezeptorhaltige Cytosol enthielt, wurde abgenommen und mit Tris-HCl-Puffer verdünnt, sodass pro Gramm Leber 8 ml Cytosol vorlagen. Dieses wurde sofort auf Eis gekühlt.

Die natürlichen Liganden (E2 und T) wurden als 10<sup>-2</sup> M Stammlösungen angesetzt. Diese dienten der Herstellung einer Konzentrationsreihe (10<sup>-4</sup> M – 10<sup>-9</sup> M). Die 1000-fach angereicherten Extrakte der Gewässerproben wurden ebenfalls in einer Konzentrationsreihe angesetzt, und zwar unverdünnt, 1:2, 1:10 und 1:50 verdünnt. Schließlich wurden die Lösungen der radioaktiv markierten Liganden hergestellt, sodass im Ansatz 15 nM [<sup>3</sup>H]-E2 bzw. 20 nM [<sup>3</sup>H]-T vorlagen.

Die Inkubationsansätze enthielten jeweils 25 µL [<sup>3</sup>H]-E2 oder [<sup>3</sup>H]-T, 150 µL Tris-HCl-Puffer, 100 µL Lebercytosol und 10 µL Wasserextrakt. Wasserextrakte wurden parallel zu einer Konzentrationsreihe von 10<sup>-9</sup> M bis 10<sup>-4</sup> M unmarkierten E2 oder T eingebracht. Somit konnte in der Auswertung ein Vergleich des kompetitiven Verdrängungspotentials der Extraktinhaltsstoffe mit dem des natürlichen Liganden durchgeführt werden.

Der Versuchsansatz wurde abgestoppt, indem 300 µl Aktivkohlesuspension zu den Proben gegeben und 5 min inkubiert wurde. Als nächstes wurde 15 min mit 3500 g zentrifugiert. Vom Überstand, der die Rezeptor gebundenen Liganden enthält, wurden 400 µl abgenommen und zu maximal 3 ml Szintillationsflüssigkeit in spezielle Plastikfläschchen (PonyVials (Polyethylene), Perkin Elmer, Köln) gegeben. Die

Fläschchen wurden geschüttelt und in einen Flüssigkeitsszintillationszähler (LSC, TriCarb 1900TR, Packard) zum Messen gestellt.

#### **2.4.2. Induktion der Expression molekularer Biomarker durch Behandlung von Hepatocyten-Primärzellkulturen**

Aus Lebern von adulten männlichen *Xenopus laevis* wurden Zellkulturen hergestellt, die mit unterschiedlichen Substanzen und Gewässerextrakten in verschiedenen Konzentrationen behandelt wurden, um die Expression bestimmter molekularer Biomarker zu induzieren. Bei diesen Biomarkern handelte es sich zum einen um den östrogenen Biomarker ER, welcher der Regulation durch östrogene oder östrogenartige Substanzen unterliegt. Zum anderen wurde das RBP als Biomarker etabliert. RBP unterliegt der antagonistischen Regulation männlicher und weiblicher Sexualsteroiden und konnte erfolgreich eingesetzt werden, um Aussagen über verschiedene Wirkmechanismen der Testsubstanzen und der Gewässerextrakte zu erhalten.

Detaillierte Beschreibungen zur Herstellung der Zellkulturen finden sich bei Kloas *et al.* (1999) und zur Methodik der Bestimmung der Biomarker, ER- und RBP-mRNA, bei Bögi *et al.* (2002) bzw. Lutz *et al.* (submitted) und Levy *et al.* (2004b).

##### **2.4.2.1. Behandlung der Zellkulturen**

Bevor die Zellkulturen für das Screening von Umweltproben eingesetzt werden konnten, musste getestet werden, welche Kultivierungs- und Behandlungsgegebenheiten geeignet waren, um eine möglichst sensitive Antwort der Zellen auf eine Exposition mit ED zu erhalten.

#### **Lösungen und Testsubstanzen**

Ethanol 99 % p.a	Roth, Karlsruhe
E2	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
EE	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
BPA	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Tamoxifen (TAM)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
T	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Dihydrotestosteron (DHT)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Methyltestosterone (MT)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Vinclozolin (VC)	Riedel-de-Haen, Seelze
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe

## **Durchführung der Zellexposition**

Zum Ermitteln des geeigneten Expositionszeitraumes wurden nach 28, 32 und 36 Stunden nach Beginn der Behandlung die Zellen abgenommen. Als Testsubstanzen wurden jeweils die Lösungsmittelkontrolle (Ethanol 99 % p.a.) sowie E2, EE, DHT und T in den Konzentrationen  $10^{-9}$  M,  $10^{-8}$  M und  $10^{-6}$  M eingesetzt. Die Auswertung der jeweiligen Biomarkerexpression ergab den geeigneten Kultivierungszeitraum und das geeignete Behandlungsintervall.

Zur Etablierung des RBP als neuem Biomarker wurden die Leberzellen mit folgenden Chemikalien behandelt, deren Strukturformeln die Abbildung 2.3 zeigt (Formeln für E2 und BPA vgl. Abb. 2.1):

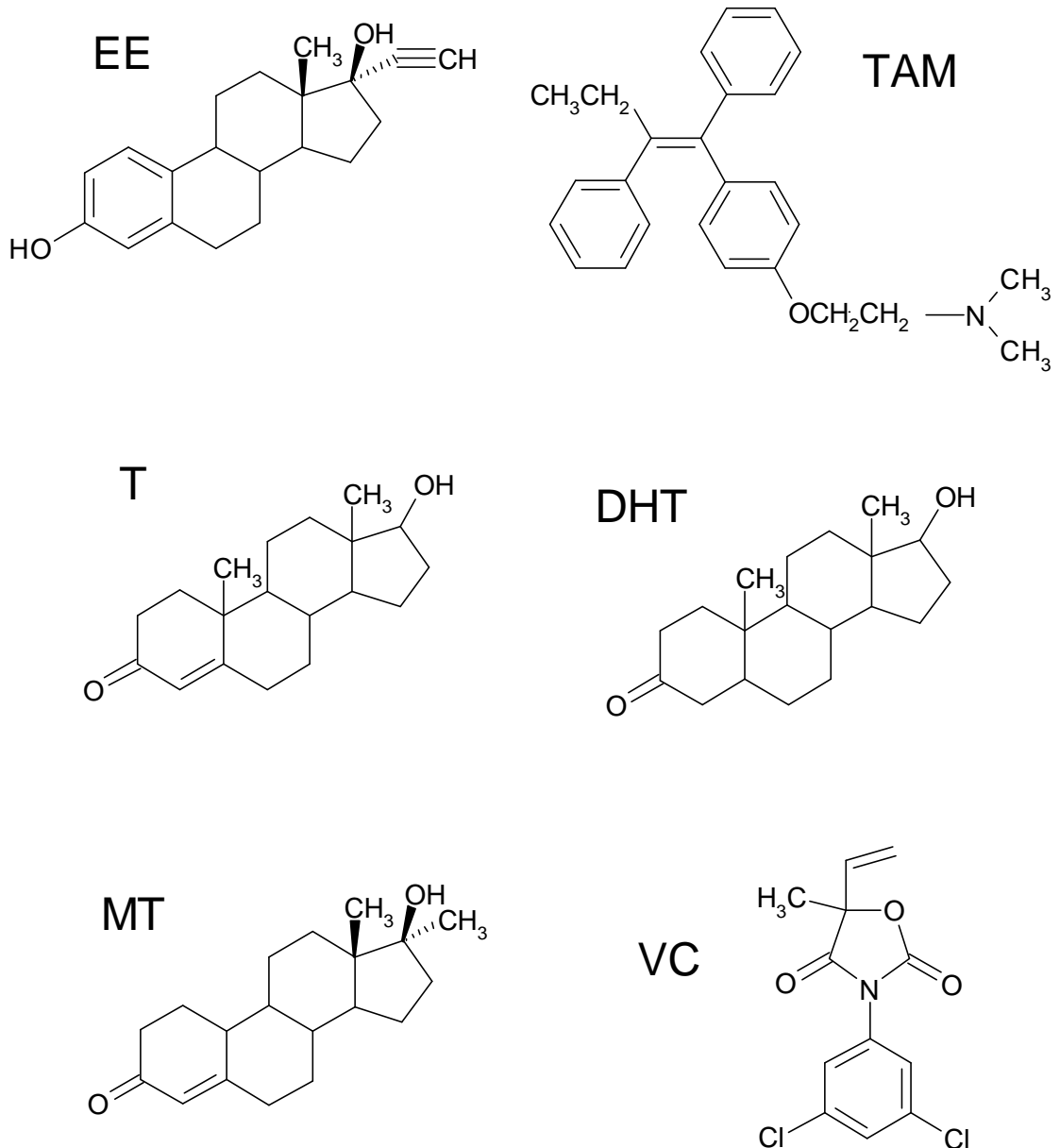
- Östrogene Substanzen E2, EE und BPA
- Antiöstrogene Substanz TAM
- Androgene Substanzen T, DHT und MT
- Antiandrogene Chemikalie VC.

Alle Substanzen wurden in Ethanol 99 % p.a. gelöst und es wurden jeweils 5 µl Lösung einer Konzentrationsreihe der jeweiligen Substanz pro Kavität eingesetzt. Die Konzentrationsreihe umfasste Konzentrationen von  $10^{-9}$  M bis  $10^{-6}$  M. Die Chemikalien wurden sowohl einzeln als auch in bestimmten Kombinationen getestet. Dabei wurden jeweils T-, DHT-, MT- und TAM-Konzentrationsreihen mit EE  $10^{-6}$  M kombiniert. Weiterhin wurden Zellen mit DHT  $10^{-6}$  M und einer VC-Konzentrationsreihe in Kombination behandelt. Für die jeweiligen Behandlungsansätze wurden die Kontrollkavitäten entsprechend mit einem höheren Volumen Lösungsmittel versetzt (10 µl). Ebenso wurden die Positivkontrollen (EE  $10^{-6}$  M bzw. DHT  $10^{-6}$  M) zusätzlich mit 5 µl Ethanol versetzt, um ebenfalls das Endvolumen von 10 µl in den Kombinationsexperimenten zu erreichen.

Zum Screening der Extrakte der Gewässerproben wurden die Zellen mit der Lösungsmittelkontrolle (Ethanol), den Positivkontrollen (EE  $10^{-6}$  M und DHT  $10^{-6}$  M) sowie den Extrakten der Gewässerproben behandelt. Diese wurden unverdünnt, 1:2, 1:5 und 1:10 verdünnt eingesetzt. Alle Behandlungen erfolgten als Doppelansatz in jeweils drei separaten Zellkulturen.

Aus den Vorversuchen ging hervor, dass die Zellen am empfindlichsten reagierten, wenn die erste Chemikalienzugabe erfolgte, nachdem die Zellen zwei Stunden zum Absetzen im Brutschrank gestanden hatten. Danach fand alle 12 Stunden ein Mediumwechsel und eine erneute Chemikalienzugabe statt. Beim Mediumwechsel wurde das Medium in den Kavitäten vollständig mit einer Pipette abgezogen. Dann wurden vorsichtig 500 µl Medium hinzugegeben, die wiederum vollständig entnommen wurden. Schließlich wurden nochmals 500 µl Medium in die Kavitäten gegeben. Durch diese Vorgehensweise sollte ein möglichst vollständiger Austausch des Mediums

gewährleistet werden. Nach dem Mediumwechsel fand die Chemikalienzugabe statt und die Zellen kamen für weitere 12 Stunden in den Brutschrank. Nach 36 Stunden wurde der Versuch abgebrochen. Das Medium wurde vollständig abgenommen. Die Zellen wurden in 500 µl Trizol resuspendiert und in sterile 2 ml Eppendorfgefäße mit flachem Boden überführt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur Weiterverarbeitung in der RNA-Isolierung konnten die Zellen bei -70 °C aufbewahrt werden.



**Abb. 2.3:** Strukturformeln der in die Zellkulturen eingesetzten Testsubstanzen. EE: 17 $\alpha$ -Ethinylöstradiol, TAM: Tamoxifen, T: Testosteron, DHT: Dihydrotestosteron, MT: Methyltestosteron, VC: Vinclozolin.

#### **2.4.2.2. Bestimmung der Retinol Binding Protein (RBP)-mRNA aus Hepatocyten-Primärzellkulturen**

Für die detaillierte Beschreibung der Aufarbeitung der Zellkulturen, RNA-Isolierung und Bestimmung der RBP-mRNA durch RT-PCR siehe Levy *et al.* (2004b).

#### **2.5. Statistik**

Die statistische Analyse der Daten hinsichtlich signifikanter Unterschiede wurde mit der statistischen Software SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, Version 9.0.1, SPSS Inc., Chicago, USA) durchgeführt. Dabei kamen zur Analyse der BPA-Ergebnisse als Testverfahren der Kruskal-Wallis-Test (Kruskal & Wallis, 1952) sowie der Mann-Whitney U-Test (Weber, 1986) zur Anwendung. Der Kruskal-Wallis-Test prüfte, ob die Wertegruppen einer Grundgesamtheit entstammen, damit ein Vergleich zweier Gruppen auf signifikante Unterschiede gerechtfertigt werden konnte. Zwei Gruppen wurden daraufhin mit dem nicht parametrischen Mann-Whitney U-Test auf signifikante Unterschiede getestet. Als Signifikanzniveau ( $p$ ) wurde in der Regel  $p < 0,05$  definiert, bei Bedarf erfolgte eine Gewichtung der signifikanten Unterschiede durch Signifikanzniveauintervalle (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ).

Die Analyse der Zellkulturansätze erfolgte nach dem Wilcoxon-Test für gepaarte Werte, um statistisch signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungen festzustellen.

### 3. Ergebnisse

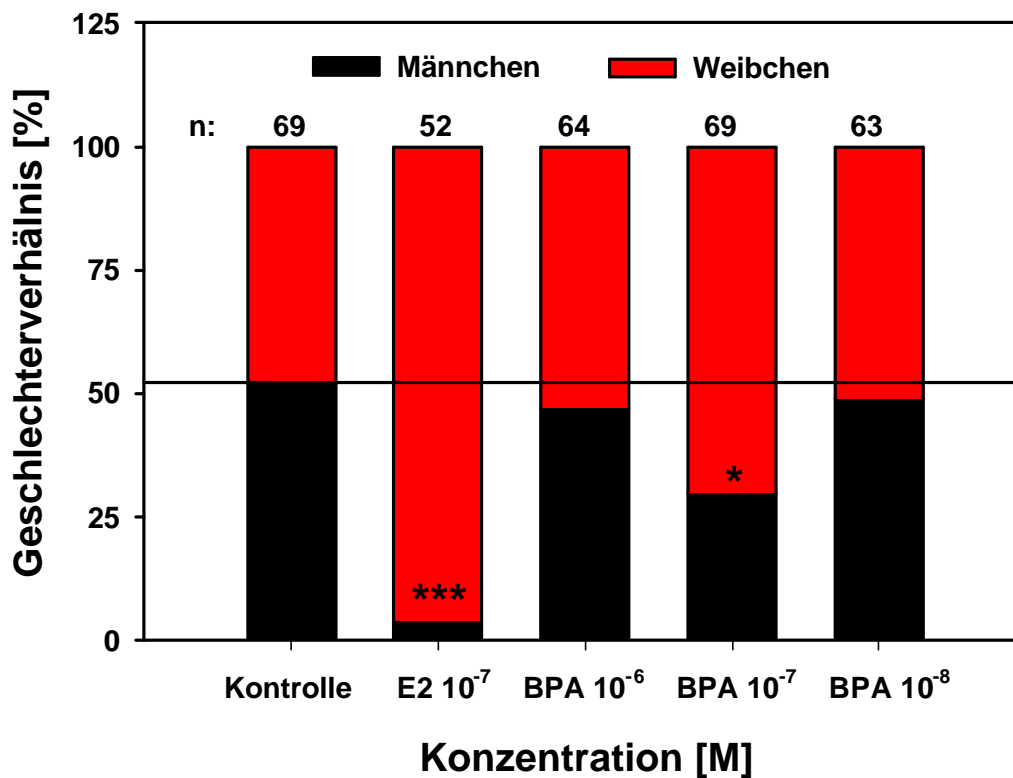
#### 3.1. *In vivo*-Exposition der Kaulquappen mit BPA

Die Wirkungen von ED auf den sich entwickelnden Gesamtorganismus ließen sich durch Expositionsexperimente nachweisen. Bei der Larvalentwicklung von *Xenopus laevis* ist die Geschlechtsentwicklung von den Sexualsteroiden abhängig. Durch die Bestimmung des Geschlechterverhältnisses der Tiere nach der Metamorphose konnte die Wirkung verschiedener Substanzen nachgewiesen werden (Witschi & Allison, 1950; Kloas, 2002, Bögi *et al.*, 2003).

In der vorliegenden Arbeit beschränkten sich die Expositionsexperimente auf die Untersuchung der bekannten östrogen wirksamen Chemikalie BPA. Da bereits in einem anderen Zusammenhang die verweiblichenden Effekte dieser Substanz in Expositionsversuchen gezeigt wurden (Kloas *et al.*, 1999), konnte auf diesen Erkenntnissen aufgebaut werden. Eine umfassende Studie der Wirkungen verschiedener BPA-Konzentrationen sowie des Abbauverhaltens von BPA im Expositionsansatz wurden durchgeführt. Als Positivkontrolle diente E2, das in zahlreichen Versuchen unserer Arbeitsgruppe als konstant verweiblichende Chemikalie wirkte.

##### 3.1.1. Wirkungen von BPA auf die Sexualdifferenzierung von *Xenopus laevis*

In vorangegangenen Testdurchgängen der BPA-Experimente waren wie hier keine Schädigungen der Tiere durch die zugegebenen Substanzen in den entsprechenden Konzentrationen festgestellt worden. Die Ergebnisse des Expositionsansatzes stellt Abb. 3.1 dar. Die Behandlung mit BPA erfolgte in drei Konzentrationen ( $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M und  $10^{-8}$  M), während die Positivkontrolle E2 mit  $10^{-7}$  M behandelt wurde. Die Tiere wurden nach Beendigung der Metamorphose gewogen, um einen möglichen Einfluss der Chemikaliengabe auf einen Wachstumsparameter (Körpergewicht) festzustellen (Abb. 3.2). Die Sterberate lag bei 10-20 % und mindestens 75 % der überlebenden Tiere beendeten die Metamorphose. Eine statistische Untersuchung der Anzahl der gestorbenen oder unterentwickelten Tiere in den jeweiligen Testbecken ergab keine Signifikanzen hinsichtlich der Behandlung. Folglich wurden parallele Behandlungsgruppen in der Auswertung zusammengeführt. Die Ungleichverteilung der Stichprobenanzahl (n) ist wiederum auf die unterschiedlich hohen Sterbe- und Entwicklungsraten in den einzelnen Becken zurückzuführen.

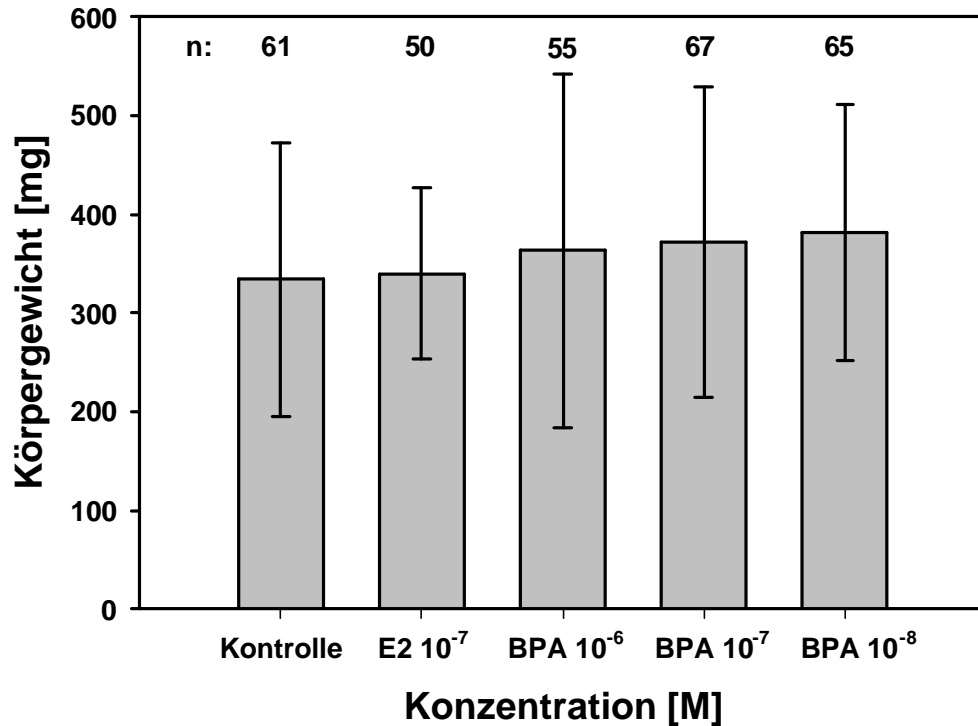


**Abb. 3.1:** Prozentuale Verteilung der Geschlechter in den unterschiedlichen Kontroll- und Behandlungsgruppen (17 $\beta$ -Östradiol (E2) 10<sup>-7</sup> M und Bisphenol A (BPA) 10<sup>-6</sup> M, 10<sup>-7</sup> M und 10<sup>-8</sup> M). Die schwarze Linie unterteilt die Graphik in die Anteile der Männchen und Weibchen der Kontrollgruppe. Die Sterne bezeichnen statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich mit der Kontrollgruppe (\*\*\*: p<0,001; \*: p<0,05). Die Stichprobenanzahl (n) ist angegeben.

Die Verteilung der Geschlechter in der Kontrolle war bei einem Verhältnis von Männchen und Weibchen von 52 zu:48% nahezu ausgeglichen. Die Behandlung der Tiere mit 10<sup>-7</sup> M E2 führte zu einem Weibchenanteil von 96 %. Dieser war hoch signifikant (p < 0,001) verschieden von der Kontrollgruppe. Bei den verschiedenen BPA-Behandlungen zeigten zwei Gruppen keine Verweiblichungseffekte. 10<sup>-6</sup> M BPA bewirkte ein Männchen:Weibchen-Verhältnis von 47:53, während dieses Verhältnis bei 49:51 nach 10<sup>-8</sup> M BPA-Behandlung betrug. Die zwischen diesen beiden Konzentrationen liegende BPA-Konzentration (10<sup>-7</sup> M) verursachte wie in bisherigen Untersuchungen (vgl. Kloas *et al.*, 1999) einen signifikant erhöhten Weibchenanteil von 70 % (Abb. 3.1).

Das durchschnittliche Gewicht der Frösche aus den einzelnen Behandlungsgruppen unterschied sich im statistischen Vergleich nicht signifikant voneinander. Tiere der Kontroll- und der E2-Behandlungsgruppen wiesen ein ähnliches durchschnittliches Körpergewicht nach der Metamorphose auf (334 mg bzw. 340 mg). Alle drei BPA-Behandlungsgruppen (10<sup>-6</sup> M, 10<sup>-7</sup> M

und  $10^{-8}$  M) zeigten ein leicht erhöhtes durchschnittliches Körpergewicht der Tiere (363 mg, 372 mg und 382 mg) verglichen mit den Kontroll- und E2-Gruppen (Abb. 3.2).



**Abb. 3.2:** Mittleres Körpergewicht der juvenilen Frösche unmittelbar nach Abschluss der Metamorphose. Die unterschiedliche Anzahl der Stichproben (n) erklärt sich aus der unterschiedlich hohen Sterbe- und Entwicklungsrate in den einzelnen Becken. Die Standardabweichungen sind angegeben.

### 3.1.2. Wirkungen von BPA auf die Gonadenentwicklung

Durch das Fixieren der Gonaden wurde die morphologische Struktur der Hoden oder Ovarien deutlich sichtbar gemacht, sodass Entwicklungsstörungen des gesamten Organs beobachtet werden können. In keinem der untersuchten Tiere wurde eine solche Fehlentwicklung festgestellt. Sämtliche Tiere wiesen die typischen morphologischen Merkmale der entsprechenden Gonaden auf. Die Hoden lagen bei ventraler Betrachtung dem kopfnahen Drittel der Nieren auf und zeigten sich nach Fixierung als einheitliches weißes Gewebe, das am unteren Ende spitz zulief (Abb. 3.3). Die Ovarien zeigten sich als schwammartiges, gelapptes Gebilde, das sich über den gesamten Nierenbereich ausbreitete und mit schwarzen Punkten (Melanocyten) durchsetzt war, die ausschließlich in Ovarien zu finden sind (Abb. 3.3).



Die Betrachtung der Gonaden hinsichtlich morphologischer Auffälligkeiten ließ keine Rückschlüsse auf fehlerhafte Entwicklungen auf zellulärer Ebene zu. Eine Untersuchung der Zellstrukturen in den Geweben sollte hierüber Auskunft geben. Auf Grund der Tatsache, dass die Testsubstanz BPA verweiblichend wirkt, wurden systematisch die Hoden der männlichen Tiere des Expositionsansatzes histologisch untersucht. Bis auf zwei der untersuchten histologischen Präparate zeigten alle anderen Schnitte eine einheitliche Struktur. Dabei konnten die typischen zellulären Bestandteile eines Hodens identifiziert werden (*Tubuli seminiferi* mit Sertoli-Zellen und verschiedenen Entwicklungsstadien der Keimzellen, glatte Muskelzellen und Leydigische Zellen in den interstitiellen Räumen), wobei teilweise Unterschiede im Entwicklungszustand vorlagen (Abb. 3.4).

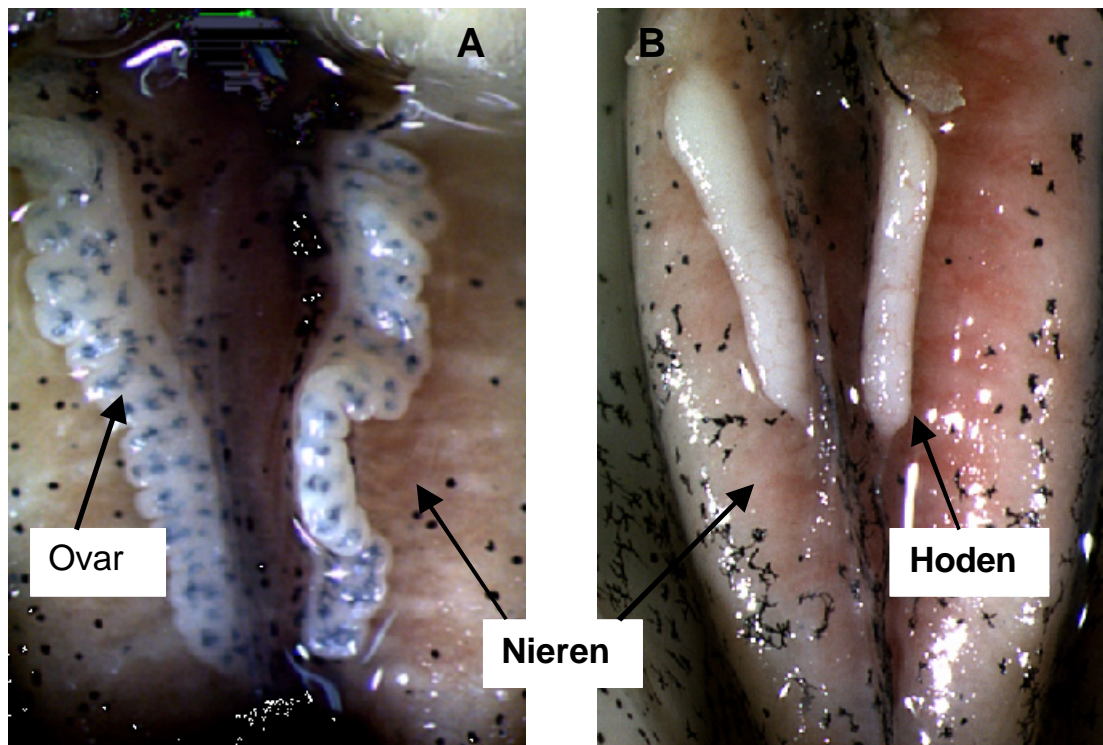
Bei den beiden Ausnahmen handelte es sich um Tiere aus den  $10^{-8}$  M BPA-Behandlungsbecken. Es wurden jeweils Oocyten im Hodengewebe entdeckt. Diese Fehlentwicklung ließ sich auf Grund der geringen Häufigkeit nicht statistisch mit der Behandlung korrelieren, so dass im vorliegenden Fall von zufälligem Auftreten ausgegangen werden muss (Abb. 3.4).

Es wurden stichprobenhaft histologische Präparate von Ovarien angefertigt, um eine normale zelluläre Entwicklung zu überprüfen. In den untersuchten Schnitten der weiblichen Geschlechtsorgane waren keine Fehlentwicklungen festzustellen und alle Exemplare zeigten die typischen Zellen eines Ovars (verschiedene Entwicklungsstadien der Ovarialfollikel, Bindegewebe mit endokrinen Zellen, Abb. 3.4).

### **3.1.3. Nachweis der ER-mRNA-Expression *in vivo* nach kurzzeitiger Behandlung mit BPA**

Die Feststellung, dass BPA die Ausbildung weiblicher Geschlechtsorgane induzieren kann, lässt noch keine Aussage über den Wirkmechanismus dieser Substanz zu, da sowohl östrogene wie antiandrogene Substanzen Verweiblichungs-Phänomene bewirken. Aus diesem Grund wurden Kaulquappen während der für die Sexualdifferenzierung sensiblen Entwicklungsphase (ab Stadium 50) zwei Wochen lang sowohl mit der wirksamsten BPA-Konzentration ( $10^{-7}$  M) als auch in einem Positivkontrollbecken mit der entsprechenden E2-Konzentration behandelt. Diesem Versuchsansatz lag die Vermutung zu Grunde, dass BPA seine Wirkung über eine Bindung an den ER vermittelt. Die Untersuchung dieser Hypothese erfolgte, indem gezeigt wurde, dass BPA die Genexpression des östrogenen Biomarkers, ER-mRNA, induzieren kann.

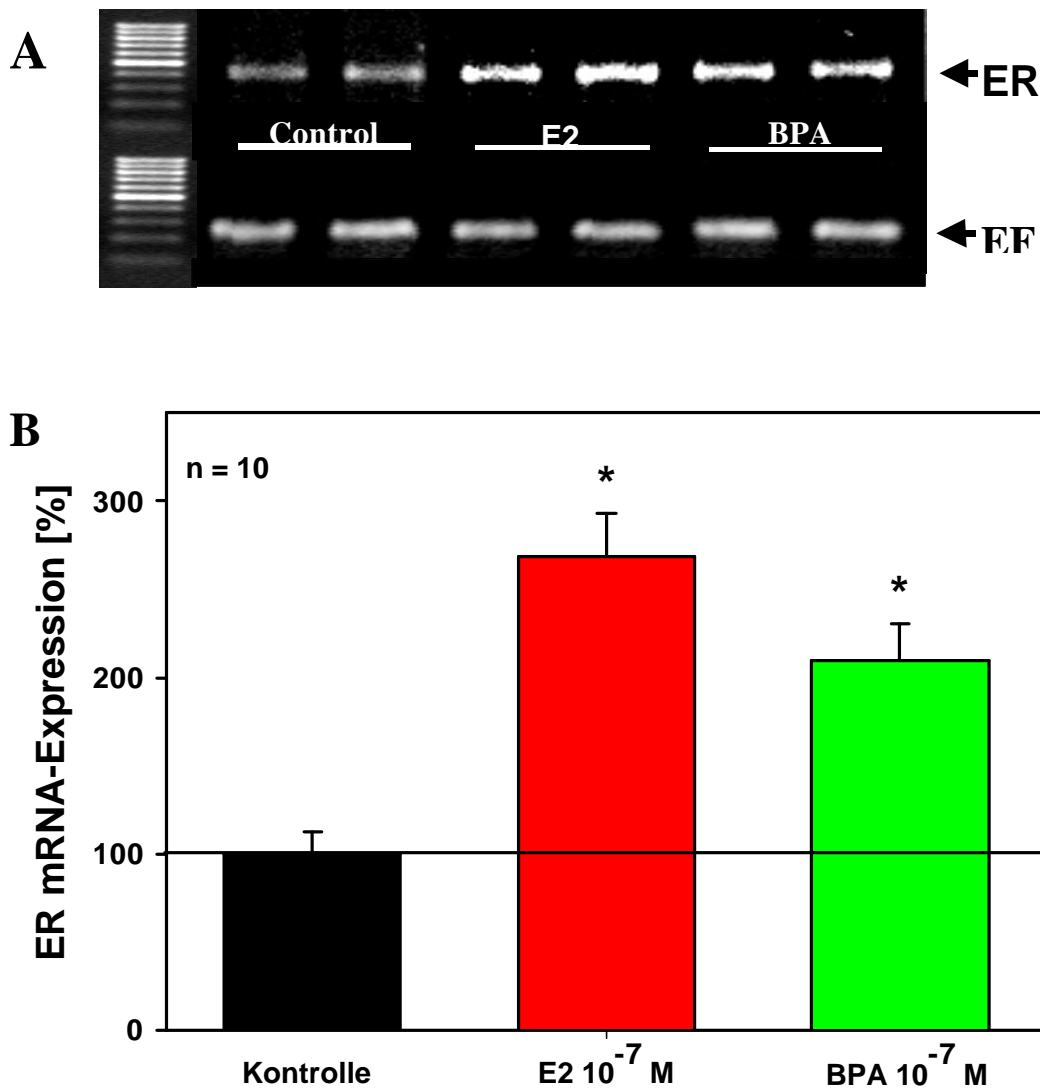
Im Vergleich mit der Expression in der Lösungsmittelkontrollgruppe wurde die mRNA-Expression des ER durch E2 um das 2,7-fache und durch BPA um das 2,1-fache erhöht. Diese Erhöhung erwies sich jeweils als statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ). Abbildung 3.5, A zeigt einen Ausschnitt eines Agarosegels mit den entsprechenden PCR-Produkten des ER und des internen Standards EF. Die Darstellung der Ergebnisse der semiquantitativen Analyse der PCR-Produkte erfolgte in Relativwerten. (Abb. 3.5, B).



**Abb. 3.3:** Histologische Schnitte von Gonaden der juvenilen Frösche. Bild A zeigt ein typisches Beispiel eines Ovarien-Nieren-Komplexes, Bild B stellt einen typischen Hoden-Nieren-Komplex dar. Die Fixierung erfolgte mit Bouin-Lösung, die Vergrößerung ist 60x.



**Abb. 3.4:** Drei histologische Präparate unterschiedlicher Gonaden. A Schnitt durch ein Ovar. Die unterschiedlichen Reifestadien der Follikel sind zu erkennen. B: Schnitt durch eine Zwittergonade. Im Hodengewebe liegen deutlich sichtbar zwei Oocyten. C: Schnitt durch einen Hoden. Tubuli seminiferi sowie Muskel- und Leydigsche Zellen sind erkennbar. Die Färbung erfolgte mit Mayers Hämatoxylin-Eosin, die Vergrößerung ist 200x.

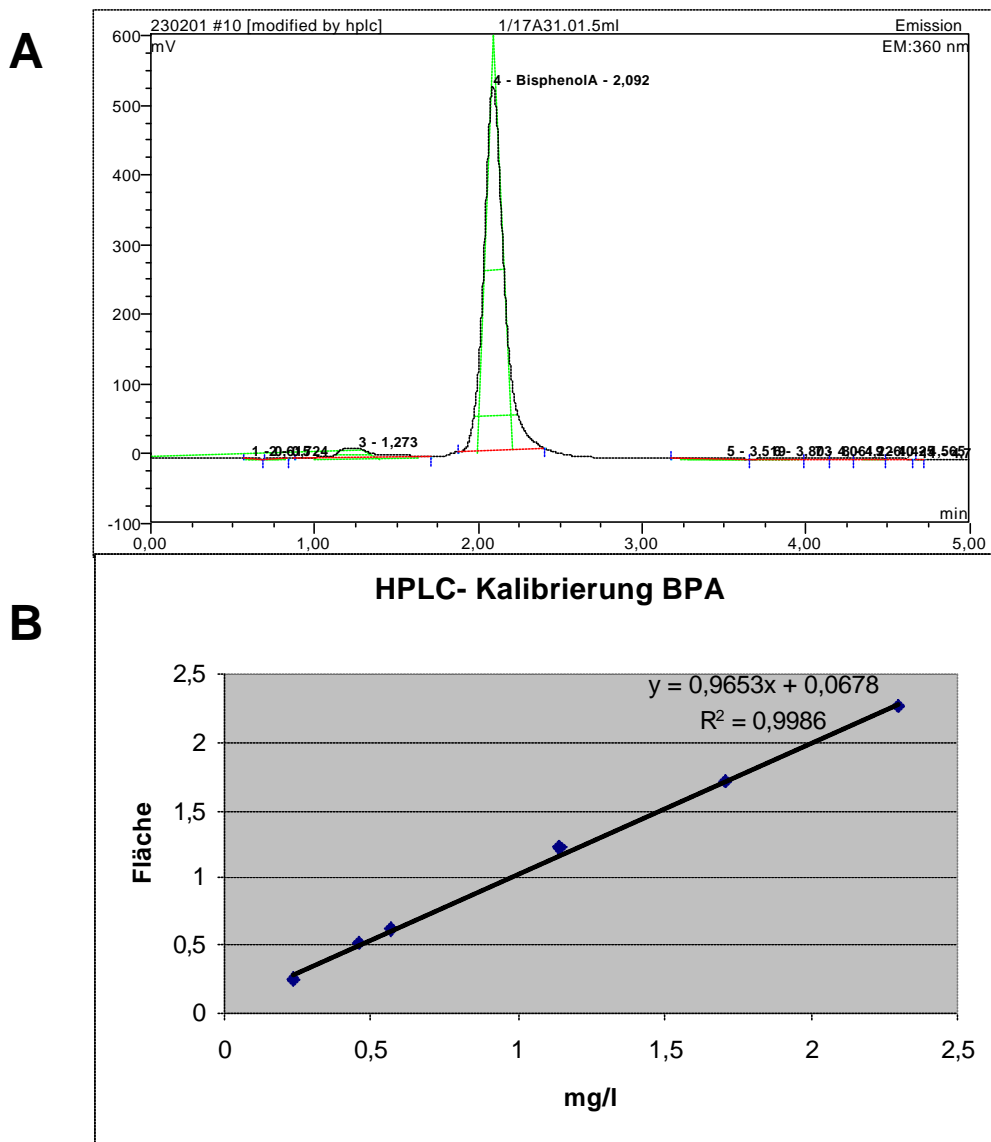


**Abb. 3.5:** ER mRNA-Expression in Kaulquappen nach kurzzeitiger Behandlung (14 Tage) mit BPA und E2 (jeweils  $10^{-7}$  M). **A:** Exemplarische Darstellung der cDNA-Banden im Agarosegel von Kontrollen, E2 und BPA behandelten Tieren. **B:** Sterne markieren signifikante Unterschiede der semiquantitativen Auswertung im Vergleich zur Kontrolle (\*,  $p < 0,05$ ), Standardabweichungen sind angegeben.

#### 3.1.4. Analytischer Nachweis von BPA in den Expositionsversuchen

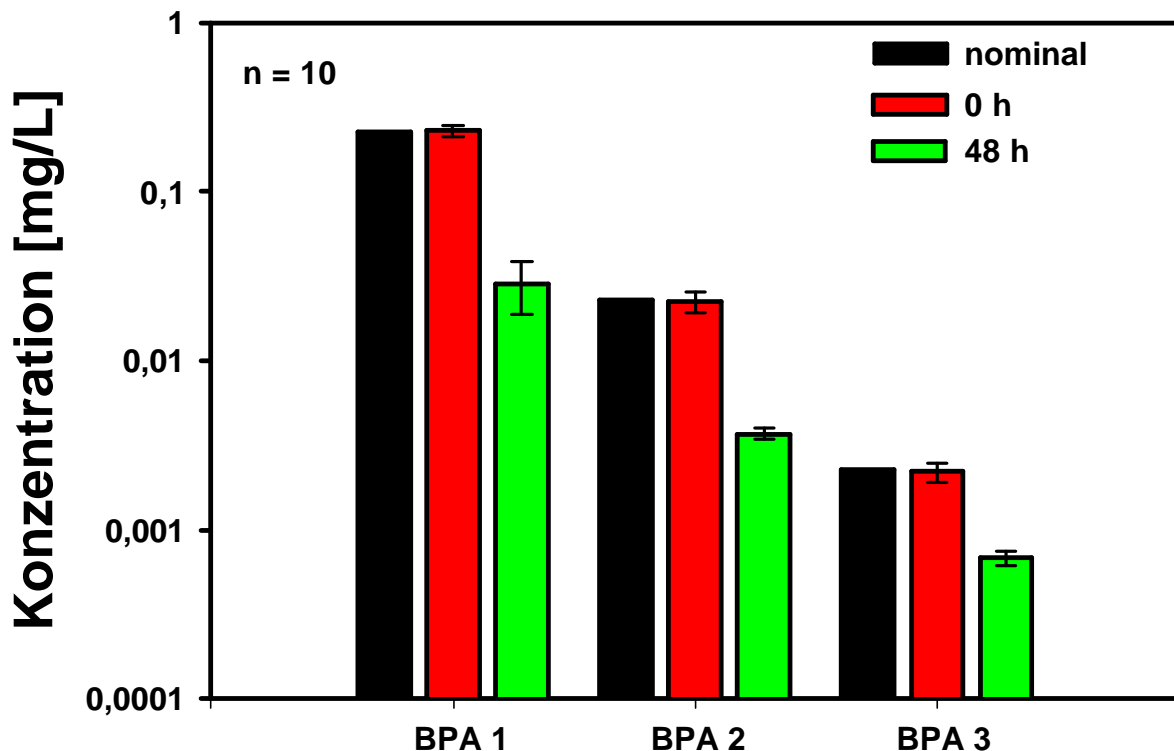
BPA wurde in drei Konzentrationen eingesetzt ( $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M und  $10^{-8}$  M). Mit Hilfe von Wasserproben, die direkt nach der Chemikalienzugabe bzw. vor dem Wasserwechsel (48 h später) genommen wurden, sollte zum einen gezeigt werden, ob sich die Nominalkonzentration in den Testbecken wiederfinden ließ und zum anderen, wie viel BPA nach zwei Tagen noch in den Becken zu finden war.

Als Grundlage zum analytischen Nachweis von BPA wurde eine chemische Analyse­methode, die auf HPLC-Trennung beruhte, entwickelt. Es wurde eine Kalibrierkurve erstellt, um die Quantifizierung des BPA-Gehaltes in den Wasserproben zu gewährleisten (Abb. 3.6). Weiterhin wurden die Wiederfindungsrate und die Nachweisgrenze von BPA bestimmt. Die durchschnittliche Wiederfindungsrate von BPA lag bei 92 % und die Nachweisgrenze bei  $2 \times 10^{-4}$  mg/L.



**Abb. 3.6:** Ausgewählter BPA-Peak als Ergebnis einer BPA-Analyse mittels HPLC (A) und eine Kalibrierkurve zur BPA-Quantifizierung (B). Geradengleichung und Korrelationskoeffizient ( $R^2$ ) sind angegeben.

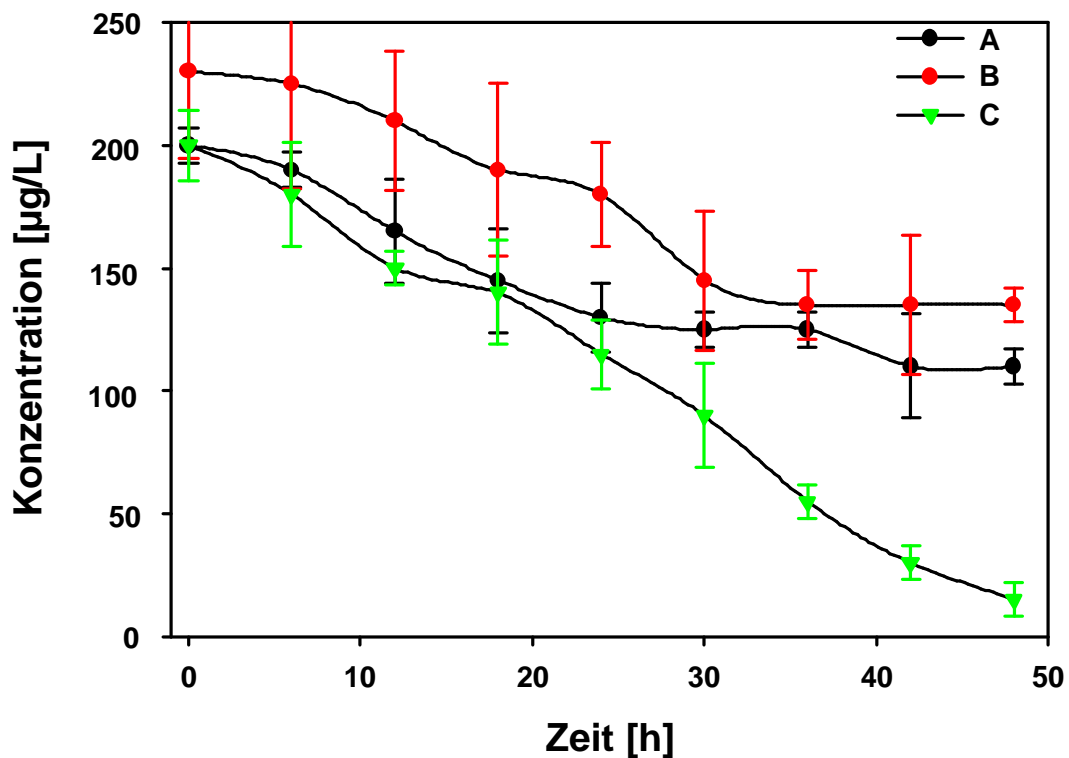
In Wasser aus den Kontroll- bzw. Positivkontrollbecken konnte kein BPA nachgewiesen werden. Die Untersuchungen der Wasserproben aus den BPA-Becken ergaben bei jeder Konzentration zu Beginn der Behandlung, dass 90 – 105 % der Nominalkonzentration vorhanden waren. Nach 48 h ließen sich jeweils 15 – 30 % der eingesetzten BPA-Konzentration nachweisen (Abb. 3.7).



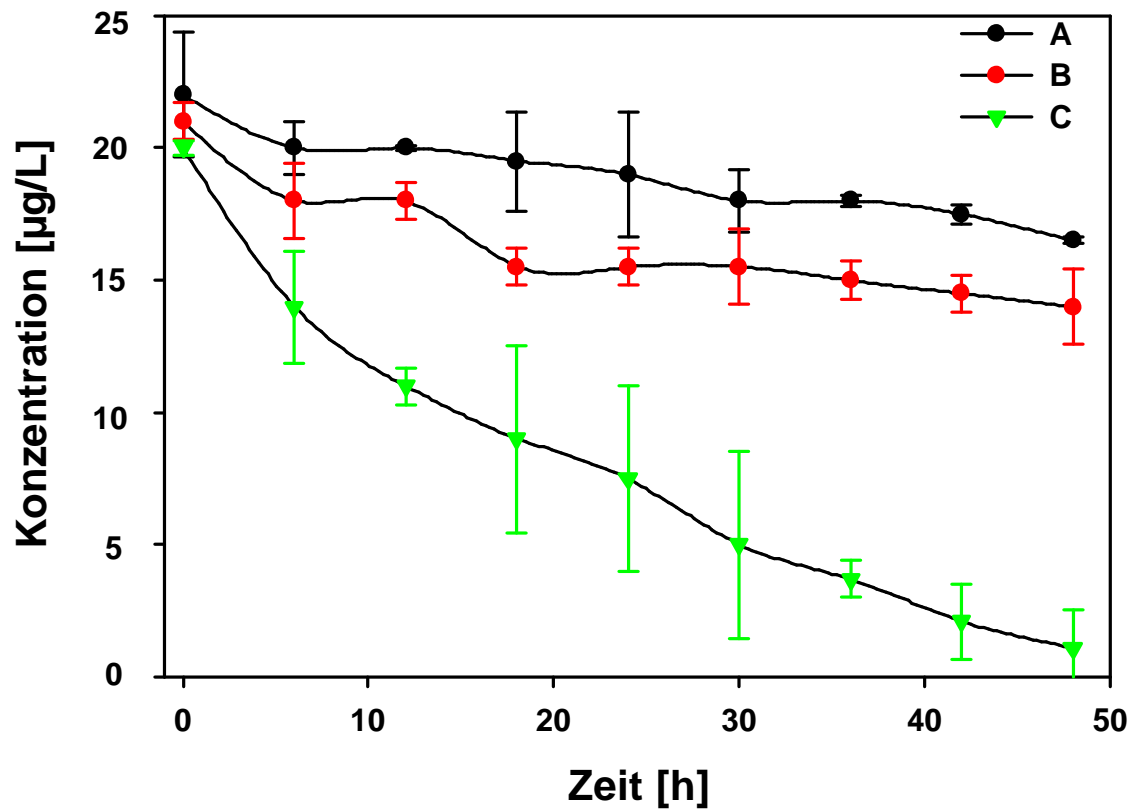
**Abb. 3.7:** Analyse der BPA-Konzentration zu Beginn der Behandlung und nach 48 h. Zum Vergleich ist die Nominalkonzentration dargestellt. BPA 1 =  $10^{-8}$  M, BPA 2 =  $10^{-7}$  M, BPA 3 =  $10^{-6}$  M. Stichprobenanzahl (n) und Standardabweichungen sind angegeben.

Weiterhin wurden Messungen der BPA-Konzentration in Intervallen von 6 Stunden durchgeführt, im Zeitraum (48 h) zwischen zwei aufeinanderfolgenden Wasserwechseln. Dabei wurde die Beschickung des beprobten Wassers variiert, sodass letztlich drei verschiedene Analysen bei Probenahmen von Wasser, das unterschiedlich beschickt worden war, vorlagen. Dadurch sollten Erkenntnisse über die potenzielle Aufnahme von BPA in die Kaulquappen gewonnen werden. Alle drei Ausgangskonzentrationen von BPA ( $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M und  $10^{-8}$  M)

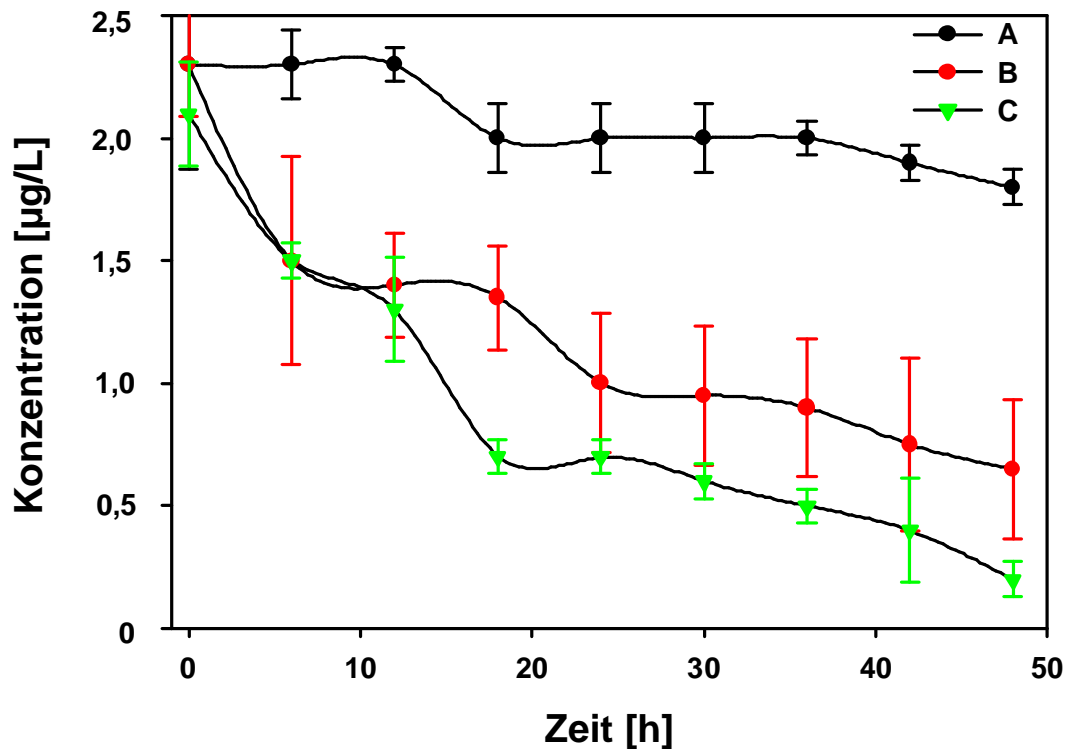
wurden eingesetzt. Wasserbeschickung A bestand aus Standardmedium und der jeweiligen BPA-Konzentration, B aus Standardmedium, Futter und BPA ( $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M und  $10^{-8}$  M) und C enthielt alle Bestandteile des vollständigen Versuchsansatzes wie Standardmedium, Futter, BPA ( $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M und  $10^{-8}$  M) und Kaulquappen. Die Messungen der BPA-Konzentrationen in den einzelnen Ansätzen ergab, dass BPA im reinen Standardmedium (A) nach 48 h noch mit mindestens 70 % der Nominalkonzentration nachgewiesen werden konnte. Ähnlich verhielt es sich mit der Beschickung B, in der ebenfalls 70 % der Nominalkonzentration gefunden wurde. Lediglich bei  $10^{-8}$  M BPA sank die Konzentration auf unter 50 % der Nominalkonzentration. Wie erwartet und aus den vorläufigen Analysen schon bekannt, enthielten die Wasserproben aus Becken mit der tatsächlichen Expositionszusammensetzung nach 48 h nur noch ca. 15 – 30% der zugegebenen BPA-Mengen (Abb. 3.8, 3.9, 3.10).



**Abb. 3.8:** Zeitverlauf der BPA-Konzentrationen bei drei verschiedenen Beschickungen des Standardmediums. Nominalkonzentration  $10^{-6}$  M. Zusammensetzung A: Standardmedium und BPA. Zusammensetzung B: Standardmedium, Futter und BPA. Zusammensetzung C: Standardmedium, Futter, Kaulquappen und BPA. Die Linien stellen den gleitenden Durchschnitt der Messwerte dar. Standardabweichungen sind angegeben, die Werte repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Analysen.



**Abb. 3.9:** Zeitverlauf der BPA-Konzentration in drei verschiedenen Beschickungen des Standardmediums. Nominalkonzentration  $10^{-7}$  M. Zusammensetzung A: Standardmedium und BPA. Zusammensetzung B: Standardmedium, Futter und BPA. Zusammensetzung C: Standardmedium, Futter, Kaulquappen und BPA. Die Linien stellen den gleitenden Durchschnitt der Messwerte dar. Standardabweichungen sind angegeben, die Werte repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Analysen.



**Abb. 3.10:** Zeitverlauf der BPA-Konzentration in drei verschiedenen Beschickungen des Standardmediums. Nominalkonzentration  $10^{-8}$  M. Zusammensetzung A: Standardmedium und BPA. Zusammensetzung B: Standardmedium, Futter und BPA. Zusammensetzung C: Standardmedium, Futter, Kaulquappen und BPA. Die Linien stellen den gleitenden Durchschnitt der Messwerte dar. Standardabweichungen sind angegeben, die Werte repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Analysen.

## 3.2. ED in Gewässerproben der Alb

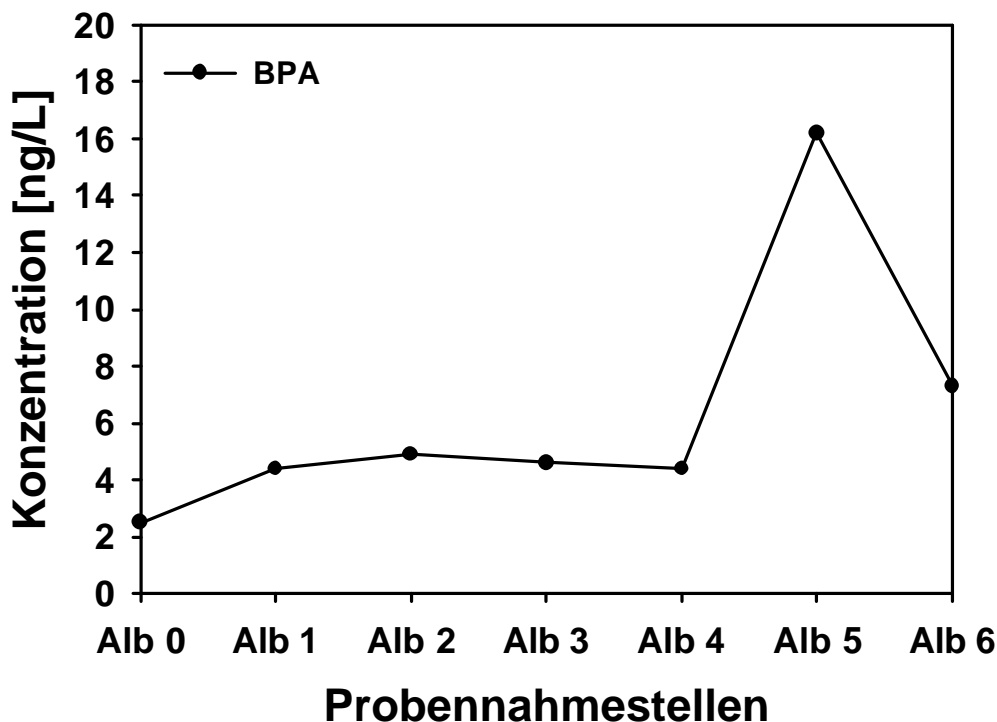
### 3.2.1. Chemischer Nachweis von BPA in den Gewässerextrakten der Alb

Der sensible BPA-Nachweis mithilfe einer auf HPLC-Technik basierenden Methode erwies sich als unbrauchbar für die Bestimmung von BPA in Umweltproben. Es wurde eine alternative Analyseverfahren entwickelt, die auf der Trennung und Konzentrationsbestimmung mittels GC-MS beruhte. Dazu war es erforderlich, die Wiederfindungsrate, die Standardabweichung, sowie die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für BPA zu bestimmen. Die Ergebnisse beruhten auf Mittelwerten aus drei Messungen. Die Wiederfindungsrate betrug 105 %, die Standardabweichung der Messungen im Durchschnitt  $0,6 \mu\text{g/L}$ . Die Nachweisgrenze lag bei  $1,9 \mu\text{g/L}$  und die Bestimmungsgrenze bei  $5,37 \mu\text{g/L}$ .



Da die Herstellung von Extrakten aus den Gewässerproben viele Schritte der Probenvorbereitung und Aufarbeitung umfasste, wurde die komplette Vorgehensweise mit destilliertem Wasser durchgeführt, um die Hintergrundsignale von den Probensignalen subtrahieren zu können. Dadurch wurde gewährleistet, dass in den Gewässerextrakten keine methodischen Artefakte gemessen wurden.

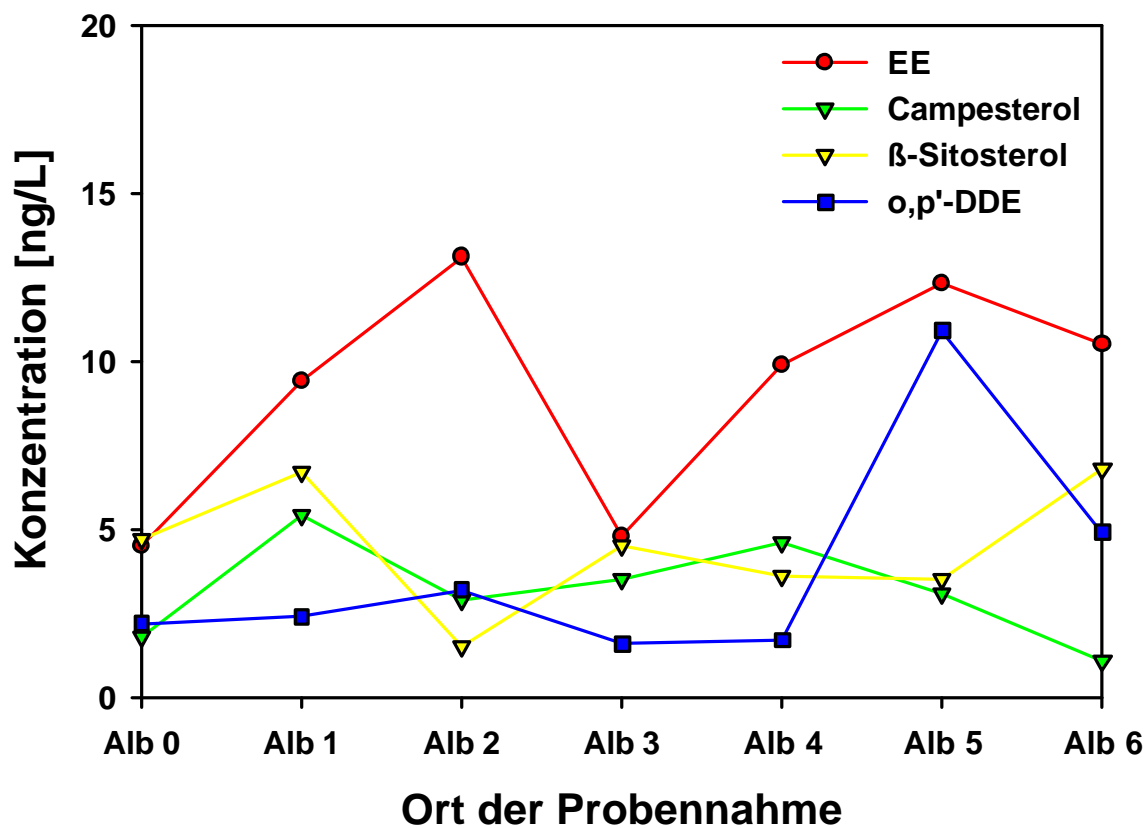
BPA wurde im Flussverlauf in Proben aller Entnahmestellen gefunden. Abb. 3.11 zeigt die gemessenen BPA-Konzentrationen in der Alb bzw. in den Kläranlagenausläufen. Dabei fällt auf, dass BPA bereits in meßbaren Mengen (2,5 ng/L) in der Nähe der Albquelle (Alb 0) auftrat. Diese Konzentration stieg auf mehr als 4 ng/L bis zur nächsten Probennahmestelle (Alb 1). Im Kläranlagenauslaufwasser der Kläranlage Neurod (Alb 2) wurde keine relevante Erhöhung der BPA-Menge festgestellt und auch bei Alb 3 und Alb 4 blieb der Wert in etwa konstant. Eine starke Erhöhung um das 4-fache erlangte der Messwert im Auslaufwasser der Kläranlage Neureut (16,2 ng/L). Im Fluss selbst nahm der Wert nach dem Klärwasser-Einleitkanal wieder ab (Alb 6), allerdings blieb er fast doppelt so hoch (7,3 ng/L) wie vor der Kläranlage (Alb 4). Eine statistische Auswertung dieser Messergebnisse konnte nicht erfolgen, da es sich um Einzelbestimmungen eines bestimmten Probennahmezeitraumes (Juli 2001) handelte.



**Abb. 3.11:** BPA-Nachweis und -Quantifizierung im Flussverlauf der Alb. Die einzelnen Probennahmestellen sind in Kapitel 2.3.2. beschrieben. Die Werte stammen aus einer Einzelbestimmung eines Probennahmezeitraumes (Juli 2001).

### 3.2.2. Chemischer Nachweis weiterer ED in den Gewässerextrakten der Alb

Neben den in Abb. 3.11 dargestellten Messungen von BPA wurden als weitere Östrogene EE und die Sterole, Campesterol und  $\beta$ -Sitosterol sowie der schwach antiandrogene DDT-Metabolit  $o,p'$ -DDE nachgewiesen (Abb. 3.12). Die Werte für EE (ca. 14 ng/L) und  $o,p'$ -DDE (3 bzw. 10 ng/L) sind am höchsten in den Kläranlagenausläufen und belegen die ansteigende Belastung während des gesamten Verlaufs der Alb bis hin zur Mündung mit Werten von ca. 10 ng/L für EE und 5 ng/L für  $o,p'$ -DDE. Die Belastung durch die Sterole Campesterol sowie  $\beta$ -Sitosterol liegt relativ gleichmäßig bei Werten zwischen ca. 2 und 6 ng/L im gesamten Flußverlauf und deutet so auf keine punktuelle Einleitung durch Kläranlagenausläufe hin.

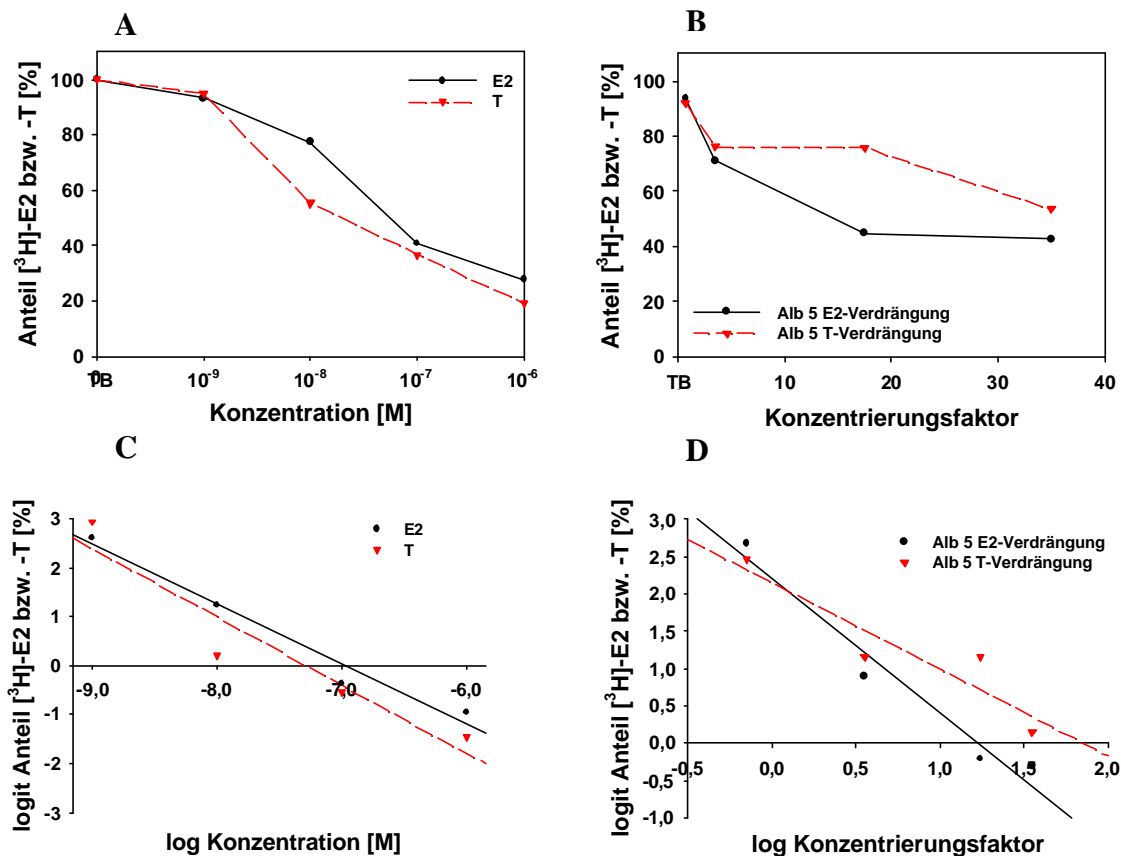


**Abb. 3.12:** Nachweis und Quantifizierung von EE, Campesterol,  $\beta$ -Sitosterol und  $o,p'$ -DDE im Flussverlauf der Alb. Die einzelnen Probenahmestellen sind in Kapitel 2.3.2. beschrieben. Die Werte stammen wie die BPA-Nachweise (Abb. 3.11) aus einer Einzelbestimmung eines Probenahmezeitraumes (Juli 2001).

### 3.3. Bioassays zum Nachweis von ED in den Gewässerextrakten der Alb

#### 3.3.1. Rezeptorbindungsstudien mit Gewässerextrakten

Die Bindung von Wasserinhaltsstoffen an den ER oder AR lieferte einen Hinweis darauf, ob ED im Albwasser vorhanden waren, die den natürlichen Liganden vom Rezeptor verdrängen können. Dazu wurden die Fraktionen der 1000-fach konzentrierten Gewässerextrakte (vgl. Kapitel 2.3.) in Rezeptorbindungsstudien getestet. Die Bestimmung des Bindungspotenzials erfolgte in zwei Wiederholungen. Die Rezeptoren wurden aus Lebern von männlichen adulten *Xenopus laevis* gewonnen. Beispielhaft soll anhand Abb. 3.13 erläutert werden, wie die Verdrängungskurven und die anschließende mathematische Transformation schließlich zu Werten für das Verdrängungspotenzial von Gewässerinhaltsstoffen aus den Extrakten führt.



**Abb. 3.13:** Beispielkurven der kompetitiven Verdrängung von  $^3\text{H}$ -E2 vom ER durch E2 (A) sowie Verdrängungskurven eines Alb-Extraktes (B, Mittelwerte, n = 2). Die entsprechenden Geraden nach logit/log -Umformung zeigen die Teilabbildungen C und D. Durch diese Umformung lässt sich das Bindungspotential der Alb- und Kläranlagenauslaufextrakte in E2 – Äquivalenten berechnen (Beschreibung im Text).

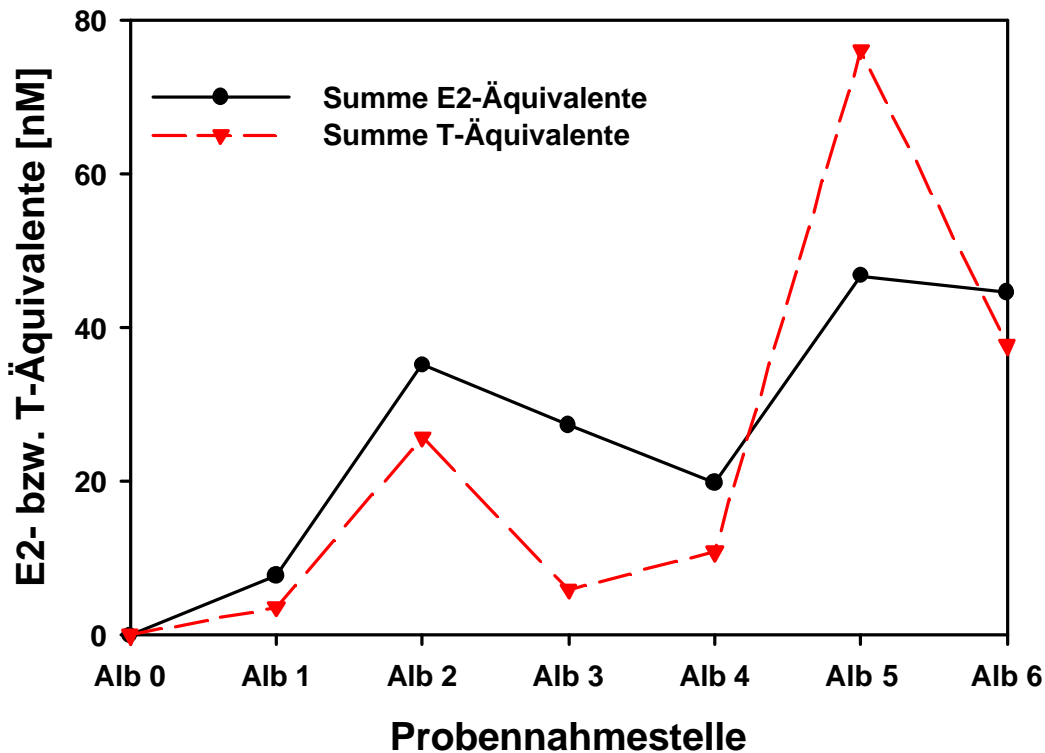
Die in den Rezeptorbindungsstudien erhaltenen Kompetitionskurven wurden durch logit / log – Transformation linearisiert. Die Geradengleichung ( $y = ax + b$ ) der Regressionsgeraden ergab den  $\text{logit} = 0$ . Mit diesem Wert konnte nach Invertierung des Logarithmus der  $\text{IC}_{50}$ -Wert (Inhibiting Concentration 50 %) der natürlichen Liganden und der Probenextrakte berechnet werden. Bei jedem neuen Versuchsansatz wurde eine Verdrängungskurve des entsprechenden natürlichen Liganden erstellt und der  $\text{IC}_{50}$ -Wert bestimmt, um die entsprechenden getesteten Proben mit diesem Wert korrelieren zu können. Im Mittel betrug der  $\text{IC}_{50}$  für E2  $2,59 \times 10^{-7}$  M und für T  $3,53 \times 10^{-6}$  M. Die Verdrängungsdaten der Gewässerextrakte wurden über Konzentrierungsstufen ermittelt, da absolute Konzentrationsangaben zu Inhaltsstoffen in komplexen Gemischen nicht möglich sind. Folglich musste die Verdrängungskapazität der Albproben durch die Berechnung von E2- bzw. T-Äquivalenten angegeben werden. Die entsprechenden Werte für die einzelnen Probennahmestellen werden in Tabelle 3.1 aufgelistet.

**Tab. 3.1:** E2- und T-Äquivalente [nM] der Gewässerextrakte im Flussverlauf der Alb. F: Fraktion; n.d.: nicht detektierbar.

<b>Alb</b>	<b>F1 E2</b>	<b>F2 E2</b>	<b>F3 E2</b>	<b>F1 T</b>	<b>F2 T</b>	<b>F3 T</b>
<b>0</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>1</b>	n.d.	n.d.	7,72	0,87	2,72	n.d.
<b>2</b>	0,35	24,64	10,19	8,29	10,82	6,69
<b>3</b>	9,84	13,98	3,54	1,57	1,62	2,70
<b>4</b>	7,40	6,33	6,11	9,31	1,57	n.d.
<b>5</b>	9,90	26,36	10,51	26,81	42,01	7,31
<b>6</b>	1,43	19,99	23,18	2,69	31,71	3,33

Es fällt auf, dass die fraktionierten Extrakte von Alb 0 im Radiorezeptorassay weder E2 noch T vom Rezeptor verdrängen konnten und somit keine E2- bzw. T-Äquivalente enthalten. Im weiteren Flussverlauf ließen sich einige Regelmäßigkeiten bezüglich des Bindungspotenzials von Extraktinhaltsstoffen an den ER oder AR feststellen. Prinzipiell waren die höchsten Konzentrationen an Hormonäquivalenten in den Kläranlagenauslaufwasserextrakten zu finden (Alb 2, Alb 5). Mit den einzelnen Extraktfraktionen wurden uneinheitliche Ergebnisse im Hinblick auf die Hormonäquivalentkonzentration aus Proben vor und nach den Kläranlagenausläufen (Alb 1, 3, 4, 6) erzielt. Zur besseren Übersichtlichkeit wurde deshalb die Summe der Äquivalentkonzentrationen gebildet und in Abb 3.14 dargestellt. Beide Verlaufskurven zeigen, dass die Konzentrationen an rezeptorbindenden Stoffen vor dem Kläranlagenauslauf immer geringer als nach dem Zufluss des Auslaufwassers ist, sodass der Verdünnungseffekt durch das Flusswasser deutlich sichtbar wird. Es ist weiterhin zu sehen, dass sich die Konzentrationen der Hormonäquivalente im Flussverlauf erhöhen. Dies wiederum

deutet auf eine Aufkonzentrierung der in Frage kommenden Substanzen im Flussverlauf hin, die dadurch Verdünnungseffekte überlagern.



**Abb. 3.14:** Summenkurven der E2- bzw. T-Äquivalente im Albverlauf. Die Werte setzen sich aus den Einzelwerten der drei Fraktionen jeder Probennahmestelle zusammen.

### 3.3.2. Induktion von Biomarkern durch Behandlung der Zellkulturen mit Gewässerextrakten

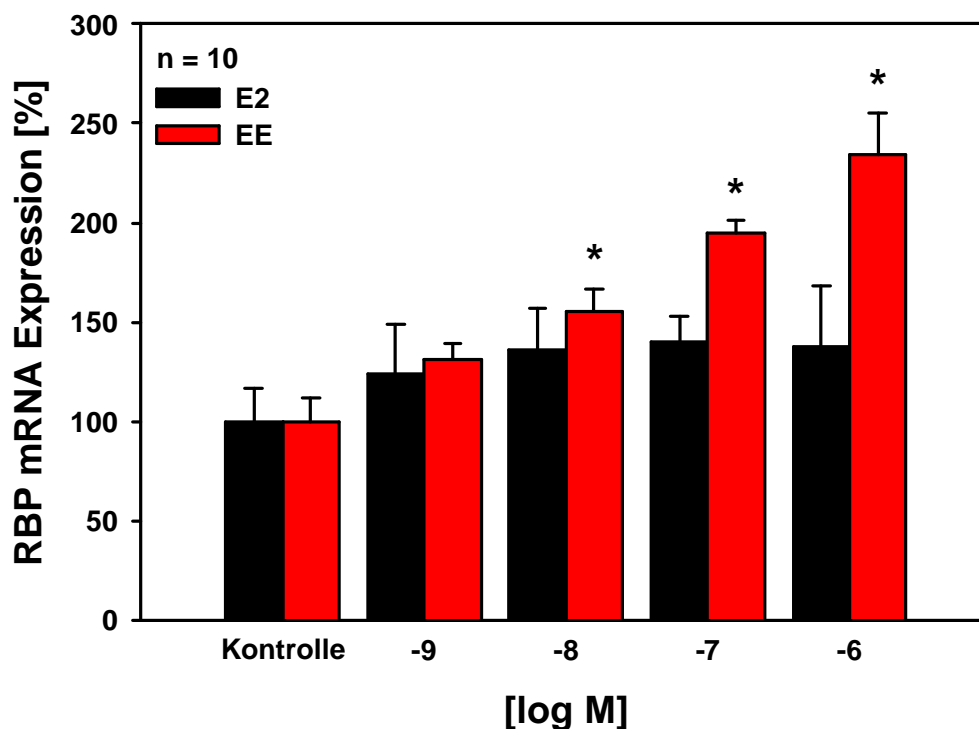
Die Kultivierung von Leberzellen aus *Xenopus laevis* und die Behandlung der Zellen mit den Gewässerextrakten diente der Feststellung, inwieweit die Inhaltsstoffe der Extrakte zur Induktion bzw. Repression bestimmter hormonregulierter Biomarkergene beitragen können. Eine Reihe von Vorversuchen ergab ein modifiziertes Durchführungsprotokoll zur Erstellung von Primärkulturen, die in 24-Well-Platten kultiviert werden konnten. Dies ermöglichte einen relativ hohen Probenumsatz pro präparierten Frosch (s. unten). Es zeigte sich, dass 12-Stunden Intervalle zwischen Mediumwechsel und Substanzzugabe für eine Gesamtdauer von 36 Stunden die sensitivste Behandlungsmethode war.

Die Vitalität der kultivierten Leberzellen wurde durch die Behandlung mit den Testsubstanzen nicht beeinträchtigt. Die Vitalität der Zellen wurde mit Hilfe einer Trypanblau-Färbung der

Zellmembranen festgestellt. Durchschnittlich waren 10 % der Zellen in den Kulturschalen tot, es konnte jedoch kein statistisch relevanter Zusammenhang zwischen Sterberate der Zellen und Behandlung mit den Chemikalien ermittelt werden. Außerdem gingen ungefähr weitere 10 % der Zellen während des Behandlungsprozesses verloren, da eine geringe mechanische Belastung durch den Mediumswechsel und die Substanzzugabe nicht vermieden werden konnte. Jede Präparation einer *X. laevis* Leber ergab 20-40 Millionen Zellen, sodass mindestens 40 Kavitäten der Kulturschalen mit Zellen befüllt werden konnten.

### 3.3.2.1. Etablierung von RBP-mRNA als neuem Biomarker

Neben den östrogenartigen Substanzen befinden sich in Umweltproben auch Stoffe, die andere Wirkmechanismen aufweisen (antiöstrogen, (anti)androgen). Um diese Wirkmechanismen mit einem Summenparameter abschätzen zu können, wurde das RBP als neuer Biomarker etabliert, da er von Androgenen und Östrogenen antagonistisch reguliert wird (McKearin *et al.*, 1987).



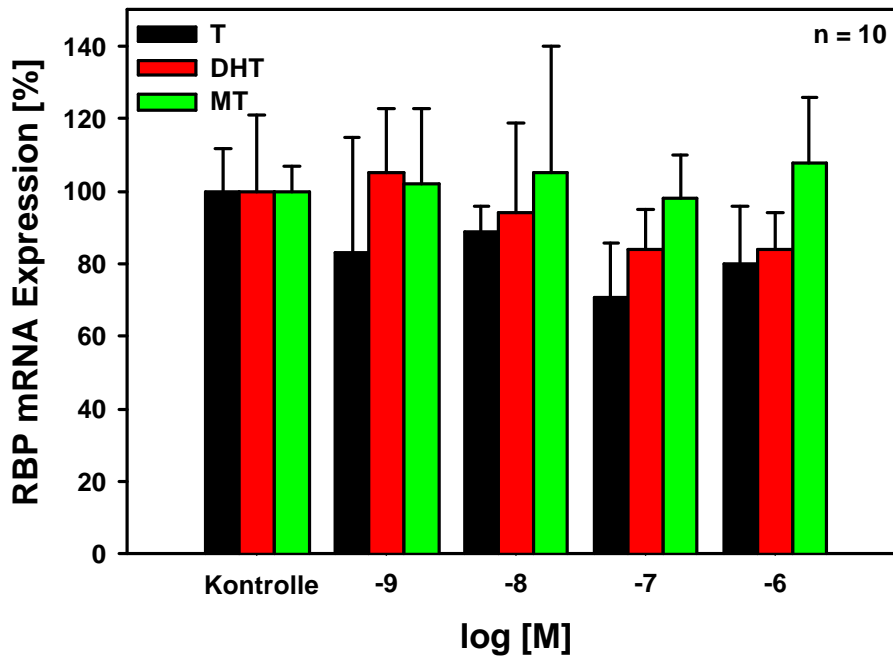
**Abb. 3.15:** RBP-mRNA Expression in Leberzellen, die jeweils mit 4 Konzentrationen der Östrogene E2 und EE behandelt wurden ( $10^{-9}$  bis  $10^{-6}$  M). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte in Relation zu den mittleren Lösungsmittelkontrollwerten (100 %) dargestellt. Standardabweichungen und Stichprobenanzahl sind angegeben. Die Sterne weisen auf signifikante Unterschiede im Vergleich mit der Kontrolle hin (\*,  $p < 0.05$ ).

Die Expression der RBP mRNA wurde nach Behandlung der Zellen mit E2 und EE ( $10^{-9}$  bis  $10^{-6}$  M) gemessen. Steigende Konzentrationen beider Substanzen erhöhten proportional die RBP-mRNA-Expression. In Zellen, die mit E2 behandelt wurden, konnte allerdings nur eine geringere, nicht-signifikante Erhöhung der RBP-mRNA-Transkription gezeigt werden, im Gegensatz zu den EE behandelten Zellen. Diese wiesen bei drei Konzentrationen ( $10^{-8}$  bis  $10^{-6}$  M) eine signifikante Induktion der Transkription auf, die bei  $10^{-6}$  M ungefähr 2,5 mal über dem Kontrollniveau lag. (Abb. 3.15). Auf Grund dieses Ergebnisses wurde in den folgenden Experimenten EE  $10^{-6}$  M als Konzentration der östrogenen Positivkontrolle verwendet.

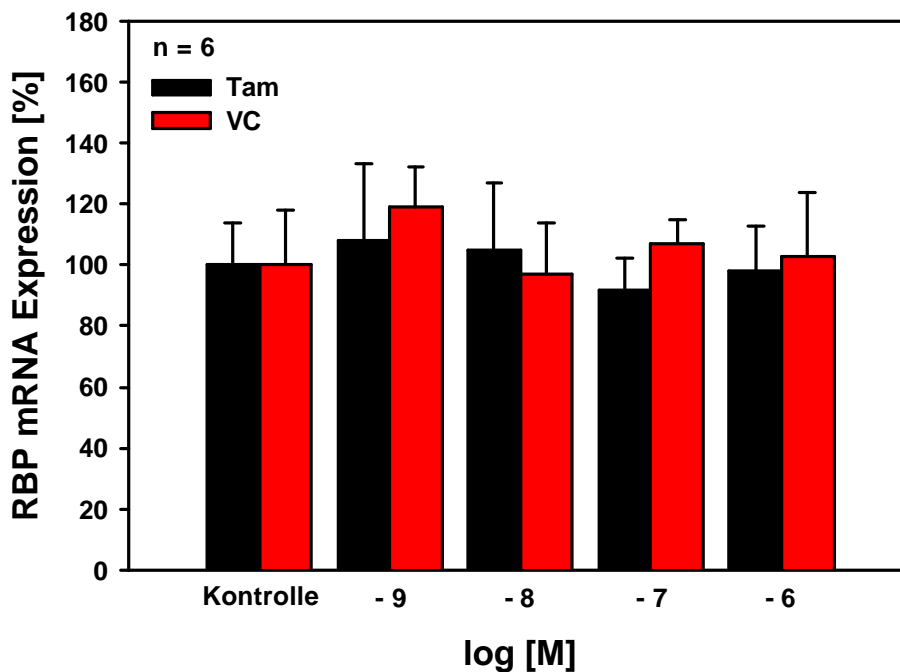
Der Nachweis des RBP-mRNA Expressionsmusters nach Zugabe von Androgenen (T, DHT, MT) zu den Zellen ergab eine erkennbare Tendenz zur reduzierten Synthese von RBP-mRNA vor allem durch T und DHT. Dennoch war die Reduktion des RBP-mRNA-Gehaltes durch beide Androgene nicht signifikant. MT zeigte keine Wirkung auf die RBP-mRNA-Transkription, da die RBP-mRNA-Messwerte aus den mit MT behandelten Zellen den Kontrollwerten aus unbehandelten Zellen ähnelten (Abb. 3.16). Diese Ergebnisse führten zur weiteren Verwendung von DHT  $10^{-6}$  M als Konzentration der androgenen Positivkontrolle.

Ein weiteres Experiment wurde durchgeführt, das die Wirkungen des Antiöstrogens Tamoxifen (TAM) und des Antiandrogens Vinclozolin (VC) auf die RBP-mRNA-Expression in den Leberzellen von *Xenopus laevis* untersuchte. Beide Chemikalien zeigten in keiner der zugesetzten Konzentrationen ( $10^{-9}$  bis  $10^{-6}$  M) eine Veränderung der Transkription der RBP-mRNA im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 3.17).

Nachdem durch die in den Abb. 3.15-17 wiedergegebenen Effekte von (anti)östrogenen und (anti)androgenen Substanzen auf die RBP-mRNA-Transkription untersucht wurden, sollten weiterführende Experimente zeigen, welche Wirkungen auf die RBP-mRNA-Synthese durch kombinierte Zugabe von Chemikalien mit entgegengesetzten Wirkmechanismen in den Zellen erzielt werden konnte. Zuerst wurden T, DHT und MT in einer Konzentrationsreihe ( $10^{-9}$  bis  $10^{-6}$  M) mit EE  $10^{-6}$  M kombiniert. Dabei diente die erhöhte Expression der RBP-mRNA durch EE  $10^{-6}$  M als Positivkontrolle. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl alle Konzentrationen von T als auch von DHT den RBP-mRNA-Gehalt im Vergleich zur Positivkontrolle signifikant senken konnten. Die höchste Konzentration der beiden Androgene ( $10^{-6}$  M) bewirkte ein Absinken der RBP-mRNA-Expression unter das Kontrollniveau. MT zeigte wiederum andere Effekte: Es konnte zwar auch die EE-stimulierte Erhöhung der Transkription signifikant hemmen (außer bei  $10^{-8}$  M), zeigte insgesamt aber eine geringere Reduzierung der RBP-mRNA-Synthese als T und DHT (Abb. 3.18).

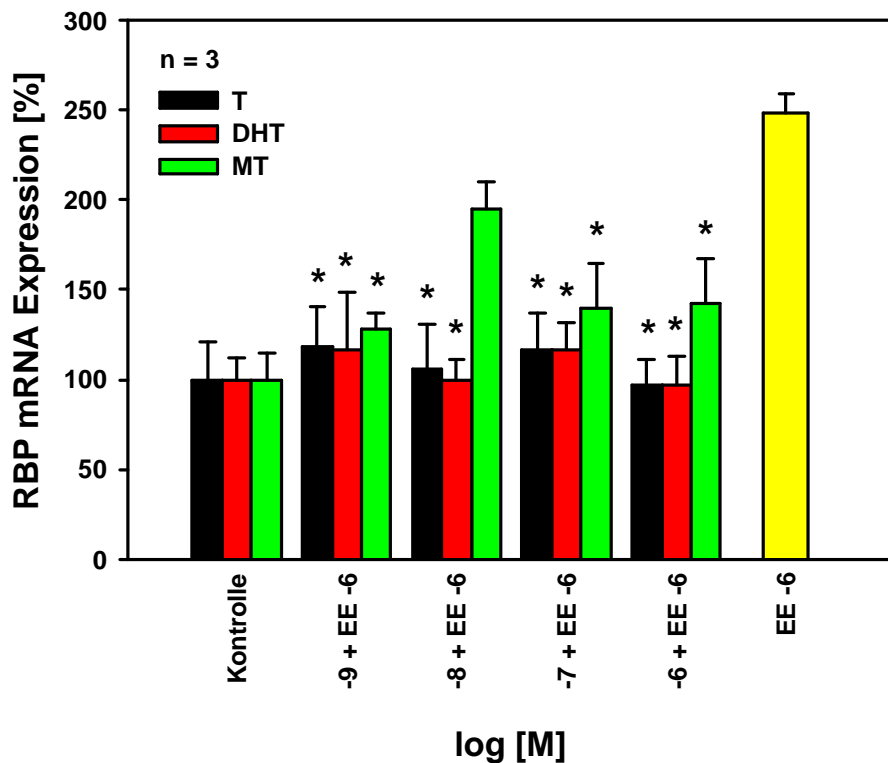


**Abb. 3.16:** RBP-mRNA-Expression in Leberzellen, die mit jeweils 4 Konzentrationen ( $10^{-9}$  bis  $10^{-6}$  M) drei verschiedener Androgene (T, DHT, MT) behandelt wurden. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte in Relation zu den mittleren Kontrollwerten (100 %) dargestellt. Standardabweichungen und Stichprobenanzahl sind angegeben.



**Abb. 3.17:** RBP-mRNA-Expression in Leberzellen, die mit jeweils 4 Konzentrationen des Antiöstrogens Tamoxifen (TAM) und des Antiandrogens Vinclozolin (VC) behandelt wurden. Mittelwerte, Standardabweichungen und Stichprobenanzahl sind angegeben.

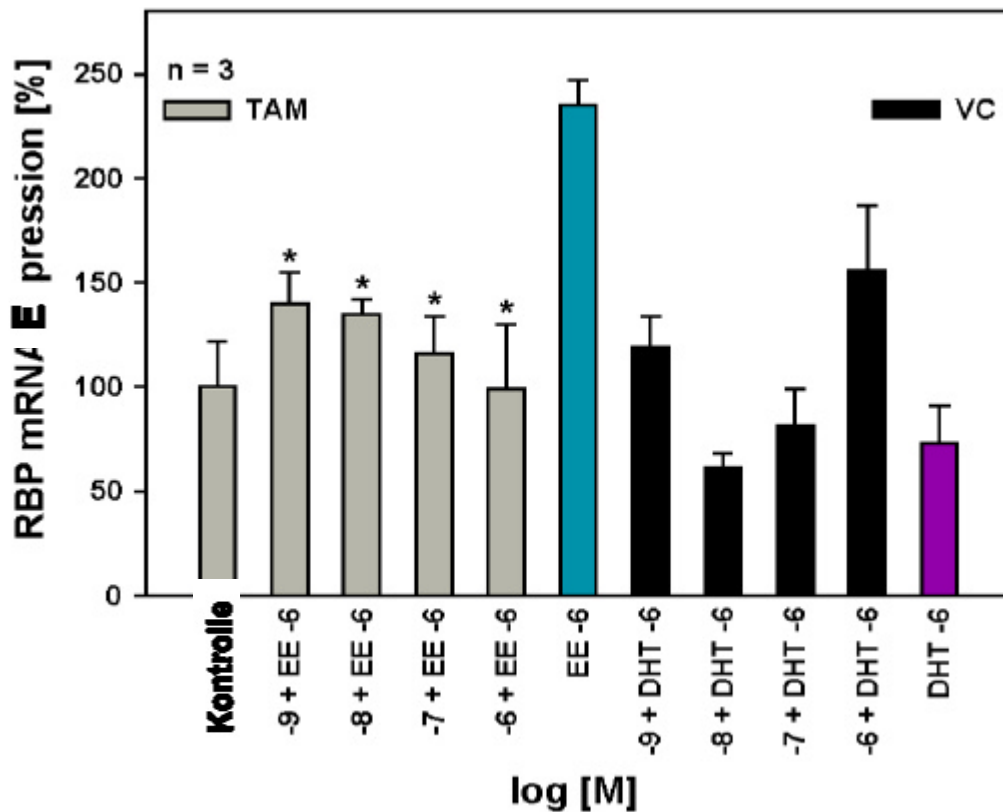




**Abb. 3.18:** Relative RBP-mRNA Expression in Leberzellen, die mit 4 Konzentrationen ( $10^{-9}$  bis  $10^{-6}$  M) von T, DHT und MT in Kombination mit einer wirksamen Konzentration von EE ( $10^{-6}$  M) behandelt wurden. Die Ergebnisse werden in Relation zu den Lösungsmittelkontrollwerten dargestellt. EE  $10^{-6}$  M dient als Positivkontrolle. Standardabweichungen und Stichprobenanzahl sind angegeben. Die Sterne markieren signifikante Unterschiede im Vergleich zur Positivkontrolle (\*,  $p < 0.05$ ).

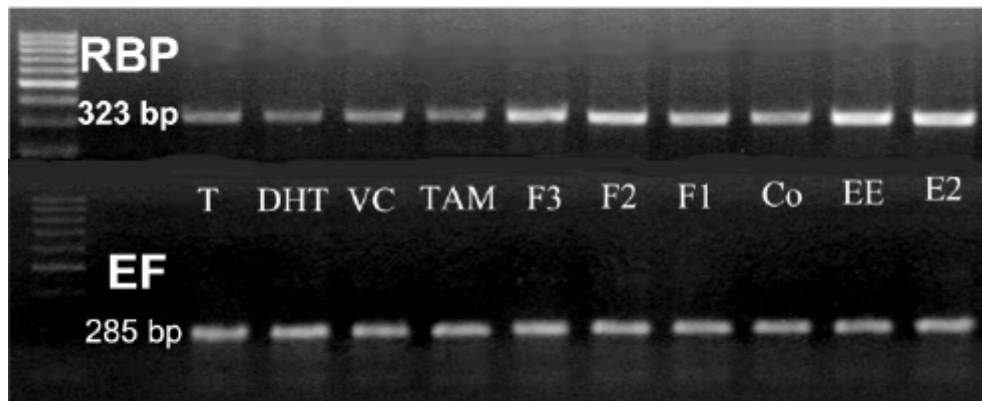
In einem weiteren Versuchsansatz wurden die Zellen mit TAM in einer Konzentrationsreihe von  $10^{-9}$  bis  $10^{-6}$  M zusammen mit EE  $10^{-6}$  M behandelt, um die stimulierenden Effekte von EE auf die RBP-mRNA-Expression mit einem Antiöstrogen zu beeinflussen. Die Ergebnisse zeigten, dass TAM die durch EE hervorgerufenen Induktion der RBP-mRNA-Transkription bei jeder Konzentration signifikant unterbinden konnte. Die EE bedingte Induktion der Transkription wurde komplett gehemmt, wenn die zugegebenen EE- und TAM-Konzentrationen gleich groß waren (Abb. 3.19).

Schließlich wurde das Antiandrogen VC in vier Konzentrationen ( $10^{-9}$  M bis  $10^{-6}$  M) mit dem Androgen DHT ( $10^{-6}$  M) kombiniert den Zellen zugegeben. VC erniedrigte die transkriptionshemmende Wirkung von DHT in einer konzentrationsabhängigen Weise. Die statistische Analyse ergab allerdings keinen signifikanten Effekt, da die Androgen induzierte Hemmung schon relativ gering im Unterschied zu den Kontrollen war. Die RBP-mRNA-Expression erreichte Kontrollniveau, wenn beide Substanzen in gleicher Konzentration eingesetzt wurden ( $10^{-6}$  M). DHT ( $10^{-6}$  M) wurde als Konzentration der Positivkontrollzellen verwendet (Abb. 3.19).



**Abb. 3.19:** Relative RBP-mRNA Expression in Leberzellen, die mit 4 Konzentrationen ( $10^{-9}$  bis  $10^{-6}$  M) von TAM und VC in Kombination mit einer wirksamen Konzentration von EE bzw. DHT ( $10^{-6}$  M) behandelt wurden. Die Ergebnisse sind in Relation zu den Lösungsmittelkontrollwerten dargestellt. EE bzw. DHT  $10^{-6}$  M dienten als Positivkontrolle. Standardabweichungen und Stichprobenanzahl sind angegeben. Die Sterne markieren signifikante Unterschiede im Vergleich zur entsprechenden Positivkontrolle \*, ( $p < 0,05$ ).

In Abb. 3.20 werden Ausschnitte aus einem typischen Agarosegel gezeigt, das die amplifizierten PCR-Produkte des RBP und des korrespondierenden internen Standardgens EF darstellt. Die densitometrischen Auswertungen der Gele ergaben keine signifikanten Expressionsunterschiede der EF mRNA in den einzelnen Behandlungsgruppen. Damit konnte die Anwendbarkeit des EF als internes Standardgen (housekeeping gen) für die semiquantitative RT-PCR erneut gezeigt werden. Zusätzlich sind in Abb. 3.20 PCR-Produkte abgebildet, welche die RBP-mRNA-Expression nach Behandlung der Zellen mit Gewässerextrakten zeigen. Im folgenden Abschnitt wird auf die Ergebnisse dieser Untersuchungen näher eingegangen.

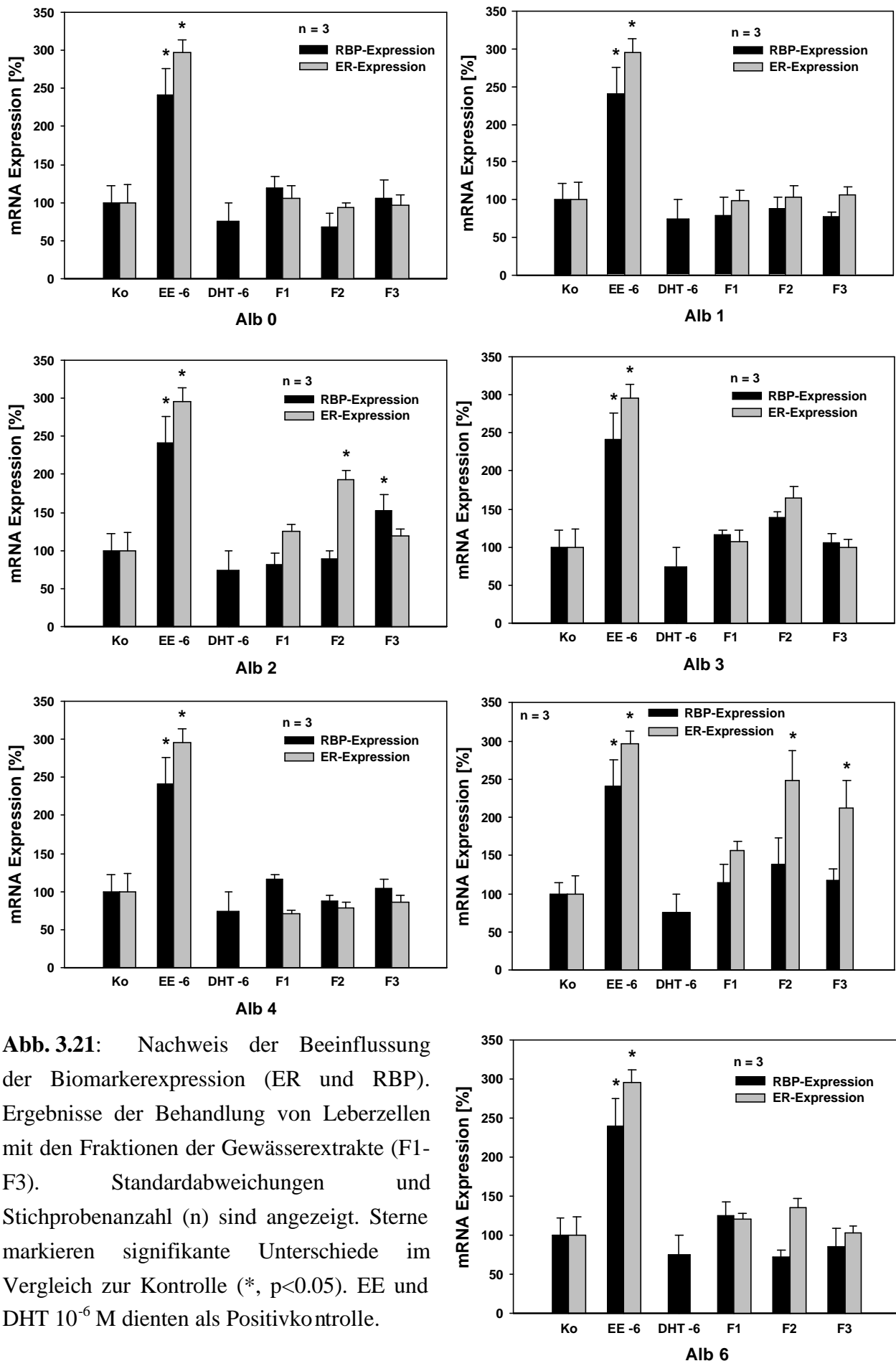


**Abb. 3.20:** Ein typisches Bild eines Agarosegels, das die RT-PCR-Produkte des RBP (323 bp) und des EF (285 bp) wiedergibt. Behandlungen erfolgten mit  $10^{-6}$  M durch die Androgene, T (Testosteron) und DHT (Dihydrotestosteron), dem Antiandrogen VC (Vinclozolin), dem Antiöstrogen TAM (Tamoxifen) und den Östrogenen EE (Ethinylöstradiol) und E2 (Östradiol) sowie den Fraktionen F1 – F3 eines Gewässerextraktes; Co (Kontrolle).

### 3.3.2.2. Biomarkerexpression in Zellkulturen nach Behandlung mit Extrakten von Gewässerproben

Die Behandlung von Zellkulturen mit Extraktfraktionen aus den Gewässerproben der Alb sollte zeigen, wie ein komplexes Stoffgemisch in einer Umweltprobe auf die Expression bestimmter Biomarkergene im Vergleich wirkt. Als östrogenen Biomarker diente der Nachweis von ER-mRNA und als (anti-)androgenen Biomarker bzw. als summarischer Biomarker für (anti)östrogene und (anti)androgene Wirkungen der Nachweis von RBP-mRNA. Die Zellen wurden jeweils mit den drei Fraktionen, die aus den Gesamtextrakten der Albproben gewonnen wurden, behandelt. Da die 1000-fach aufkonzentrierten Fraktionen verwendet wurden, erfolgten auch in diesem Versuchsansatz regelmäßige Vitalitätstests der Zellen, die durchweg zeigten, dass die Fraktionen die Vitalität der Zellen nicht beeinflussten.

Abb. 3.21 zeigt die Ergebnisse aus jeweils drei unabhängigen Experimenten, in denen die Extraktfraktionen der entsprechenden Probennahmestellen der Alb getestet wurden. Im Folgenden soll das Ergebnis für jede Stelle kurz zusammengefasst werden, wobei die Ergebnisse von Alb 5 detaillierter dargestellt werden.



**Abb. 3.21:** Nachweis der Beeinflussung der Biomarkerexpression (ER und RBP). Ergebnisse der Behandlung von Leberzellen mit den Fraktionen der Gewässerextrakte (F1-F3). Standardabweichungen und Stichprobenanzahl (n) sind angezeigt. Sterne markieren signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle (\*,  $p < 0.05$ ). EE und DHT  $10^{-6}$  M dienten als Positivkontrolle.

Alb 0: Fraktion 1 und Fraktion 3 zeigten eine leicht erhöhte RBP-mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrolle. Fraktion 2 erniedrigte die RBP-mRNA-Synthese auf das Niveau der Positivkontrolle (DHT  $10^{-6}$  M). Die Expression der ER-mRNA wurde nicht beeinflusst.

Alb 1: Alle drei Fraktionen erniedrigten die RBP-mRNA-Transkription im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle. Die ER-mRNA-Synthese erreichte ungefähr das Niveau der Lösungsmittelkontrolle.

Alb 2: Die RBP-mRNA-Expression wurde von allen drei Fraktionen erhöht, wobei Fraktion 3 eine signifikante Erhöhung (1,5-fach) der Expression bewirkte. Eine signifikante Erhöhung der ER-mRNA-Transkription ergab sich für die Fraktion 2 (1,9-fach). Auch die anderen Fraktionen (F1 und F3) induzierten die ER-mRNA-Synthese.

Alb 3: Die Fraktionen der Probennahmestelle Alb3 induzierten ebenfalls eine leichte Erhöhung der RBP-mRNA-Synthese, wobei Fraktion 2 eine ungefähr 1,4fache Erhöhung bewirkte. Eine signifikante Erhöhung der ER-mRNA-Expression wurde mit Fraktion 2 erzielt (1,6-fach). Die anderen beiden Fraktionen (F1 und F3) ergaben keine Induktion der ER-mRNA-Synthese.

Alb 4: Eine eindeutige Tendenz der Beeinflussung der RBP-mRNA-Transkription konnte nicht festgestellt werden, die Werte befinden sich im Bereich des Kontrollniveaus. Interessanterweise wurde die Expression des östrogenen Biomarkers ER-mRNA unter das Kontrollniveau reguliert, wobei Fraktion 1 eine ungefähr 30 %ige Reduktion bewirkte.

Alb 6: Die Fraktionen aus Proben der Stelle Alb 6 verursachten durchweg eine Induktion der ER-mRNA-Expression (ungefähr 1,2 bis 1,4fach). RBP zeigte ein differenziertes Ergebnis, da Fraktion 1 die RBP-Expression im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle erhöhte, die Fraktionen 2 und 3 erniedrigten die RBP-mRNA-Synthese, Fraktion 2 sogar um etwa 30 % auf das Niveau der DHT-Positivkontrolle.

Die aussagekräftigsten Ergebnisse lieferten, wie bereits in den Rezeptorbindungsstudien, die Fraktionen der Stelle Alb 5 (Kläranlagenauslaufwasser). Alle Fraktionen bewirkten eine 1,5- bis 2,5fache Induktion der ER-mRNA-Transkription. Die statistische Analyse ergab eine signifikante Erhöhung für die Fraktionen 2 und 3. Der RBP-mRNA-Gehalt stieg nicht signifikant um das 1,3- bis 1,5fache an. Beide Biomarker gaben Hinweise darauf, dass östrogene ED im Kläranlagenauslauf vorkommen. Die Unterschiede in der Höhe der Induktion zwischen einem rein östrogenen Biomarker (ER) und einem zusammenfassenden (anti)östrogenen und (antiandrogenen) Biomarker (RBP) zeigten, dass neben Substanzen mit östrogenen Effekten auch Substanzen mit androgenen bzw. antiöstrogenen Effekten in den fraktionierten Extrakten vorhanden sein müssen.

## **4. Diskussion**

Die Belastung der Umwelt mit endokrin wirksamen Substanzen, welche die Fortpflanzungsbiologie der Lebewesen stören, ist ein aktuelles Problem in der ökotoxikologischen Forschung. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei mögliche Ansätze durchgeführt, die zur Feststellung der Belastung und Gefährdung von aquatischen Lebewesen durch ED beitragen können.

Der erste Ansatz ging von der umfassenden Untersuchung eines Einzelstoffes (BPA) aus, der zum einen hinsichtlich seiner biologischen Aktivität, zum anderen hinsichtlich seiner chemischen Nachweisbarkeit im Labor und in der Umwelt erfasst wurde. Es wurde berücksichtigt, dass Wirkungen von ED auf die Reproduktionsbiologie der Lebewesen in erster Linie sichtbar werden, wenn der Gesamtorganismus diesen Substanzen ausgesetzt wird. Bisher bestand häufig eine Diskrepanz zwischen artifiziellen molekularbiologischen Testverfahren und der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf das intakte Lebewesen. Eine umfassende Betrachtung der Effekte bestimmter ED muss von der Wirkung der jeweiligen Substanz auf den Gesamtorganismus ausgehen. Jedoch sind auch Laboruntersuchungen, die diesen Weg verfolgen, immer auf künstliche Testsysteme beschränkt.

Der zweite Ansatz untersuchte Gewässerproben aus einem Modellgewässer, die aus einem komplexen Gemisch von endokrin wirksamen Substanzen bestehen. Dieses Gemisch wurde in einem ersten Schritt fraktioniert und die einzelnen Fraktionen wurden molekularbiologischen Testmethoden unterzogen. Dadurch ließ sich die endokrine Wirksamkeit einer Gewässerprobe abschätzen. Dazu war es erforderlich, neben den Bioassays zur Feststellung östrogenen Wirkungen zusätzliche Methoden anzuwenden, die eine Aussage über andere Wirkmechanismen zuließen. Dies wurde im Rahmen dieses Projektes durch die Verwendung von Androgenrezeptorbindungsstudien und die Einführung des RBP als (anti)androgenen Biomarker bzw. als Summenparameter für sämtliche Wirkmechanismen durchgeführt. Begleitende gewässeranalytische Methoden sollten Hinweise auf die Belastung von Umweltproben mit komplexen ED-Gemischen liefern.

Die folgende Diskussion soll die erzielten Ergebnisse kritisch betrachten und abschließend eine Synthese aus beiden Ansätzen vorstellen.

### **4.1. Umweltbelastung mit ED – Einzelstoffansatz**

#### **4.1.1. *In vivo*-Labormethoden zur Untersuchung der Wirkungen von ED**

Kontrollierte Laboruntersuchungen mit geeigneten Testorganismen liefern nützliche Hinweise zu Dosis-Wirkungs-Beziehungen und molekularen Wirkmechanismen einzelner Substanzen. Ihre Aussagekraft ist jedoch hinsichtlich einer integrativen biologischen Antwort der

Organismen auf eine chronische Exposition mit realen Konzentrationen eines Gemisches von Umweltchemikalien limitiert (Fox, 2001). Nur mit *in vivo*-Experimenten lassen sich realistische Expositionsszenarien simulieren. Deshalb sollten unabhängig von den beobachteten *in vitro*-Effekten zwingend *in vivo*-Untersuchungen erfolgen, um zu klären, ob die verdächtigen Substanzen tatsächlich einen Einfluss auf die Reproduktionsbiologie haben. Dabei sollte beachtet werden, dass die zu untersuchenden Substanzen über das Wasser oder das Futter den Tieren verabreicht werden, da dies die normalen Aufnahmewege in der Natur sind. Ein weiterer kritischer Faktor ist der Expositionszeitraum, da viele niedere Wirbeltiere ihr Geschlecht während eines relativ kurzen Entwicklungszeitfensters entwickeln. Eine Exposition während dieses Zeitraumes hat irreversible Effekte zur Folge (Sumpter, 1997).

Weitergehend forderten Toft & Baatrup (2001), dass neben den vielen bestehenden molekularen Endpunktmethoden, die einen Hinweis auf die Aktivität verschiedener Umweltchemikalien geben können, Biomarker auf höheren Organisationsebenen entwickelt werden müssen. Dadurch können Informationen über die Effekte auf die Reproduktionsbiologie des Individuums und im idealen Fall auf die Population gewonnen werden. In ihren Untersuchungen mit Guppies (*Poecilia reticulata*) etablierten sie Biomarker auf fünf Organisationsebenen: Zuerst untersuchten sie die Vitellogeninsynthese nach ED-Exposition auf der molekularen Ebene. Auf zellulärer Ebene wählten sie die Veränderung der Spermienanzahl als Biomarker und auf der Organebene untersuchten sie das Gonadengewicht. Auf der Ebene des Organismus wurde das Paarungsverhalten und die sexuelle Reifung der Jungfische untersucht und schließlich spiegelte der Reproduktionserfolg unter ED-Einfluss Effekte auf der Populationsebene wider.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde im sogenannten Einzelstoffansatz eine umfassende Charakterisierung einer bestimmten Substanz (BPA) im Sinne der Forderungen der oben aufgeführten Autoren durchgeführt. Dabei wurden als Endpunkte die individuelle Sexualdifferenzierung, die Entwicklung der Gonaden und der Gonadengewebezellen sowie die Expression eines molekularen Biomarkers (ER) in Kaulquappen von *Xenopus laevis* gewählt und damit die Organismus-, Organ-, zelluläre und molekulare Ebene untersucht. Zusätzlich erfolgte die Exposition mit BPA *in vivo* über das Wasser und während der gesamten Larvalentwicklung oder während der für die Sexualdifferenzierung empfindlichen Entwicklungsphase.

#### **4.1.2. Amphibien als Modellorganismen zur Untersuchung von ED**

*Xenopus laevis* ist ein geeignetes Studienmodell zum Nachweis hormoneller Wirkungen von Umweltchemikalien, da zum einen sein endokrines System eine hohe Ähnlichkeit mit dem der landlebenden Vertebraten aufweist, was die Relevanz der Ergebnisse, die mit diesem Testsystem erzielt werden, erhöht. Zum anderen eignet sich die aquatische Lebensweise für Untersuchungen zur Wirkung von ED, da diese sich in Oberflächengewässern anreichern und von im Wasser

lebenden Tieren leicht aufgenommen werden können. Eine besondere Bedeutung kommt dabei der Larvalentwicklung zu, die bei Amphibien im Wasser verläuft und einen sensiblen Entwicklungsabschnitt für exogene Einflüsse darstellt.

Im Gegensatz zu Säugetieren besitzen die meisten Amphibien keine heteromorphen Geschlechtschromosomen. Bei *Xenopus laevis* wurde festgestellt, dass die Weibchen heterogametische Anlagen haben. Die Geschlechtschromosomen werden bei *Xenopus laevis* mit WZ/ZZ bezeichnet. Zusätzlich besitzen bis auf eine Art - *Xenopus tropicalis* - Frösche aus der Gattung *Xenopus* einen tetraploiden Chromosomensatz (36 Chromosomen), was zu mehrfachen Genexpressionen führen kann (Graf, 1989a). Dennoch kann *Xenopus laevis* als funktioneller diploider Organismus betrachtet werden, da während der Meiose nur Bivalente auftreten. Außerdem ist der Karyotyp von *Xenopus laevis* diploid-ähnlich organisiert und es wurde herausgefunden, dass die große Komplexität des *Xenopus laevis* Genoms ihre Ursache in einer Verdoppelung des Genoms und nicht in Tandem-Mutationen hat (Graf, 1989b). Dennoch ist bis jetzt kein Sexmarker zur genotypischen Geschlechtsbestimmung bei *Xenopus laevis* vorhanden, sodass Auswirkungen auf die Sexualdifferenzierung nur anhand statistischer Vergleiche der erhaltenen Phänotypen von behandelten und Kontroll-Tieren möglich sind.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse bestätigen die Verwendbarkeit des Modellorganismus *Xenopus laevis* zur Untersuchung der Wirkungen von ED (Kloas *et al.*, 1999; Lutz & Kloas, 1999; Kloas, 2002). Amphibien stellen eine unterrepräsentierte Tiergruppe im Bereich der ED-Forschung dar, obwohl sie als klassische Tiermodelle in der Entwicklungsbiologie und Endokrinologie bekannt sind. Der südafrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis* ist beispielsweise ein bevorzugter Testorganismus zur Untersuchung von Prozessen der Sexualentwicklung, womit er zum allgemeinen Verständnis der Gonadenentwicklung bei Wirbeltieren beitrug (Hayes, 1998). Gonadenentwicklung und Sexualdifferenzierung in *Xenopus laevis* sind verlässliche Endpunkte bei der Untersuchung von Wirkungen auf die Sexualdifferenzierung durch ED: Die primäre Geschlechtsdifferenzierung in den Kaulquappen wird durch eine indifferente Gonadenphase eingeleitet und endet in der Organdifferenzierung zu Ovarien und Hoden. Ovarien- und Hodengewebe sind mit bloßem Auge bzw. Binokular nicht zu unterscheiden, bevor die Kaulquappen Entwicklungsstadium 55 erreicht haben. Es konnte gezeigt werden, dass die sensitivste Phase zur Induktion einer Geschlechtsveränderung in *Xenopus laevis* zwischen den Stadien 50 und 52 liegt (Villalpando & Merchant-Larios, 1990; Miyata *et al.*, 1999). Eine Behandlung mit exogenen Sexualsteroiden in dieser Entwicklungsphase verändert die genetisch determinierte Ausprägung des Geschlechts der Tiere (Hayes, 1998; Kloas, 2002; Bögi *et al.*, 2003). Das Phänomen der Geschlechtsveränderung bei Kaulquappen von *Xenopus laevis* wurde entdeckt, als Witschi und Allison (1950) Kaulquappen während der Gonadendifferenzierungsphase mit E2 behandelten. Sie beobachteten, dass sich alle behandelten Kaulquappen zu fruchtbaren Weibchen entwickelten. Die Annahme, dass das genotypische Geschlechterverhältnis 1:1 sein müsste,



fürte zu der Schlussfolgerung, dass die Hälfte der phänotypischen Weibchen genotypische Männchen sein mussten. Folglich musste E2 dazu in der Lage sein, in genetischen Männchen einen weiblichen Phänotyp entstehen zu lassen. Schon diese frühen Ergebnisse führten zu der Vermutung, dass Veränderungen im Verhältnis der endogenen Sexualsteroiden das genetische Programm zur Geschlechtsbestimmung überlagern können (Kelley, 1996; Bögi *et al.*, 2002; Kloas, 2002).

#### **4.1.3. Einfluss von BPA auf die Sexualentwicklung von *Xenopus laevis***

Die Östrogenität von BPA ist bereits seit Beginn des 20. Jahrhunderts bekannt. Zu dieser Zeit veröffentlichten Dodds und Lawson (1936) eine Studie, in der sie Ratten mit BPA behandelten. Dabei stellten sie fest, dass BPA das Uteruswachstum in den Tieren stimulierte. Inzwischen wurde BPA intensiv als Testsubstanz in vielen *in vitro*- und *in vivo*-Studien eingesetzt und es wird allgemein anerkannt, dass BPA mit E2 um die Bindung an den ER konkurrieren kann, obwohl seine Struktur relativ wenig Ähnlichkeiten mit der von E2 hat (vgl. Abb. 2.1). Uneinigkeit herrscht allerdings in der Frage nach der Bioaktivität von BPA und dabei hauptsächlich in der Frage nach seinem Potenzial, in niedrigen Konzentrationen östrogenähnliche Wirkungen zu vermitteln (Ben-Jonathan & Steinmetz, 1998). Diese wissenschaftliche Kontroverse betraf auch unsere Arbeitsgruppe, denn in einer anderen Studie zu *in vivo*-Effekten von BPA auf die Geschlechtsdifferenzierung von *Xenopus laevis* Kaulquappen wurden keine Verweiblichungsphänomene festgestellt (Pickford *et al.*, 2003), im Gegensatz zu den ursprünglich von Kloas *et al.* (1999) veröffentlichten Ergebnissen, in denen BPA signifikant verweiblichend wirkte. Folglich konnte mit der Verwendung von BPA im Einzelstoffansatz dieser Arbeit sowohl eine umfassendere Untersuchung der Wirkungen einer umstrittenen Chemikalie als auch die Untersuchung der Umweltbelastung mit dieser Chemikalie durchgeführt werden.

Für die Expositionsversuche wurde ein semistatisches Behandlungsregime genutzt, das sich bereits Methode zur Untersuchung von ED und deren Einfluss auf die Geschlechtsdifferenzierung etabliert ist (Kloas *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu wurden die Untersuchungen von Pickford *et al.* (2003) mit einer Durchflussanlage durchgeführt, wobei keine Effekte durch BPA auf die Sexualentwicklung festgestellt wurden. Das Behandlungsregime scheint folglich eine wichtige Rolle für die Wirksamkeit einer Substanz zu haben, da im Durchflusssystem auch die Positivkontrolle mit  $10^{-8}$  M E2 unerwartet geringe Verweiblichungs-Phänomene bewirkte.

Auch bei diesem Ansatz hier wurde E2 als Positivkontrollsubstanz verwendet, da es in der Lage ist, einen signifikanten Weibchenüberschuss zu erzeugen. Die effektivste BPA-Konzentration lag bei  $10^{-7}$  M, wie bei zwei weiteren unabhängigen Experimenten (Kloas *et al.*, 1999; Levy *et al.*, 2004a). Die Wirkungen der nächsthöheren und nächstniedrigeren Konzentrationen ( $10^{-6}$  M

und  $10^{-8}$  M) waren weniger deutlich und uneinheitlich. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit neueren Ergebnissen zu Wirkungen von ED in geringen Konzentrationen, sogenannten "low dose effects", die zeigten, dass einige ED eine zweiphasige, U-förmige Dosis-Wirkungs-Beziehung hervorrufen (Calabrese, 2001), wird aber dennoch sehr kontrovers diskutiert. Die Bedeutung der U-förmigen Wirkungskurven konnte in weiteren Studien bestätigt werden. So wurde beispielsweise gezeigt, dass einige ED störende Effekte bei Konzentrationen bewirkten, die unterhalb der Wirkungsgrenze in toxikologischen Studien lag. Es ist daher angebracht beim Vorhersagen von Grenzwerten vorsichtig zu sein, denn es könnten ökologisch relevante hormonstörende Effekte in Konzentrationen auftreten, die nicht mehr untersucht oder als gefahrlos für Mensch und Umwelt definiert wurden (Welshons *et al.*, 1999).

Eine mögliche Ursache für das Auftreten zweiphasiger Dosis-Wirkungs-Beziehungen ist, dass in Lebewesen eine bestimmte Schwellenkonzentration überschritten werden muss, bevor eine physiologische Reaktion im Organismus auftritt. Beim Überschreiten der effektivsten Konzentration werden dann Metabolisierungs- und Ausscheidungsprozesse aktiviert, welche die Reaktionen wieder verlangsamen oder unterdrücken können. Im Falle von BPA zeigte eine jüngst veröffentlichte Studie, dass in Regenbogenforellen eine geringere Sensibilität für die östrogenen Wirkungen von BPA in hohen Konzentrationen als in niedrigen vorliegt. Dies könnte auf eine erhöhte Metabolisierungsrate von BPA zurückgeführt werden, nachdem die Aktivität von Entgiftungsenzymen gesteigert wurde (Lindholst *et al.*, 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde wiederholt ein Verweiblichungseffekt bei einer Konzentration von  $10^{-7}$  M BPA festgestellt. Die Wirkungen der höheren ( $10^{-6}$  M) und niedrigeren Konzentration ( $10^{-8}$  M) zeigten nur tendenziell eine Verweiblichung. Möglicherweise liegt auch hier das Überschreiten einer Schwellenkonzentration und das Einsetzen einer erhöhten Metabolisierungsaktivität vor. Allerdings liegen noch keine Informationen zum Metabolismus von BPA in *Xenopus laevis* Kaulquappen vor. Weiterführende Studien zur Klärung dieser Frage sind geplant.

Die Unterscheidung in Hoden und Ovarien nach einer Behandlung mit BPA sagt noch nichts über die tatsächliche Funktionsfähigkeit der Gonaden aus. Es besteht die Möglichkeit, dass ein morphologisch intakter Hoden nicht funktionsfähig ist, wenn er zum Beispiel zelluläre Fehlentwicklungen aufweist. Diese ED-induzierten Fehlentwicklungen sind inzwischen aus Hoden und Ovarien bekannt (Gray & Metcalfe, 1997; Yokota *et al.*, 2000). Bei der Betrachtung von Verweiblichungseffekten spielt der sogenannte Ovo-Testis-Zustand eine Rolle. Dieser Zustand beschreibt das Vorkommen von Oocyten bzw. Follikeln im Hodengewebe. Ovo-Testis wurden in einigen gonochoristischen Fischarten sowohl im Labor als auch im Freiland gefunden (Jobling *et al.*, 1998; Yokota *et al.*, 2000). In Amphibien ist der Ovo-Testis- oder Zwitterzustand nicht zwangsläufig eine Fehlentwicklung, da er in einigen Arten einen Zwischenzustand im Verlauf der Sexualentwicklung darstellt. So bildet der Grasfrosch *Rana temporaria* einen Zwitterzustand aus, bevor er Ovarien entwickelt (Wallace *et al.*, 1999). Das Auftreten von Ovo-Testes in *Xenopus laevis* ist sehr selten dokumentiert (Bögi *et al.*, 2003; Hayes *et al.*, 2003). In

der vorliegenden Arbeit wurde das Hodengewebe auf Abnormalitäten untersucht. Von 360 Hodenproben enthielten nur zwei im Gewebe Eier, sodass die Schlussfolgerung gezogen werden muss, dass dieser Zustand bei *Xenopus laevis* nur zufällig auftritt, da weniger als 1 % der untersuchten Gewebe betroffen waren. Diese Aussage wurde in einem Expositionsexperiment, das in einem anderen Labor durchgeführt wurde, bestätigt (Bögi *et al.*, 2003). Somit kann zusammenfassend gesagt werden, dass die Änderung des Geschlechts vom Männchen zum Weibchen vollständig und endgültig ist, was in Expositionsexperimenten mit *Xenopus laevis* Kaulquappen zu unmissverständlichen Ergebnissen führt, weshalb diese zur Untersuchung von Verweiblichungseffekten geeignet sind.

Von BPA ist bekannt, dass es an den *Xenopus laevis* ER bindet (Lutz *et al.*, 1999) und östrogene Aktivität in primären Leberzellkulturen zeigt (Kloas *et al.*, 1999). In der vorliegenden Arbeit konnte eine kurzzeitige Exposition (14 Tage) mit BPA demonstrieren, dass die ER-mRNA-Transkription in den Tieren erhöht wurde. Damit wurde gezeigt, dass BPA *in vivo* über eine ER-vermittelte Wirkungsweise auf die Sexualdifferenzierung einwirkt. Der ER kann in *Xenopus laevis* als östrogenen Biomarker verwendet werden, weil er durch positive Rückkopplungsmechanismen seine eigene Synthese reguliert. Diese Erkenntnis wurde gewonnen, indem in männlichen Lebern von *Xenopus laevis* gezeigt wurde, dass die Anzahl der Östrogenrezeptoren nach einer E2-Behandlung von 100-200 Molekülen pro Leberzelle auf ungefähr 1500 in den E2-stimulierten Zellen anstieg (Corthésy *et al.*, 1990). Varriale und Tata (1990) stellten fest, dass innerhalb von 48 Stunden in einer Ovarienzellkultur der ER-Gehalt nach Behandlung mit  $10^{-7}$  M E2 um das Vierfache anstieg. Zusätzlich ist bekannt, dass Östrogenrezeptoren schon in frühen Stadien (ab ca. 35) in Kaulquappen vorhanden sein müssen (Bögi *et al.*, 2002; Gray & Janssens, 1990). Im Gegensatz dazu kann in Kaulquappen Vitellogenin nur eingeschränkt als Biomarker benutzt werden, da die Vitellogenin-mRNA während der Larvalentwicklung nicht vor dem Entwicklungsstadium 62 nachzuweisen ist, also nachdem durch die Metamorphose eine Leber mit adulten Merkmalen entstanden ist (May & Knowland, 1981; Bögi *et al.*, 2003). Untersuchungen zum Einfluss von ED auf die frühen Entwicklungsstadien bei *Xenopus laevis* lassen sich deswegen besser mit dem ER als Biomarker realisieren.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Synthese von ER-mRNA um mehr als das Doppelte in behandelten Kaulquappen ansteigt, wenn die Tiere 2 Wochen mit  $10^{-7}$  M BPA während der sensitiven Gonadendifferenzierungsphase behandelt wurden. Dieses Ergebnis demonstriert, dass BPA *in vivo* ebenso eine Wirkung ausübt wie *in vitro* und die Induktion der Synthese des ER über eine Bindung an den ER erfolgt. Eine Bindung an den ER ist eine grundlegende Voraussetzung, da rezeptorvermittelte Effekte in geringeren Konzentrationen auftreten können als für direkte Wirkungen auf Organe, Zellen oder Enzyme erforderlich sind. Es muss kritisch bemerkt werden, dass eine Erhöhung der mRNA-Transkription nur bedingt mit einer Erhöhung der Synthese des funktionellen Proteins korreliert werden kann, da die

Regulation der Proteinexpression meist auf translationalem oder posttranslationalem Wege geschieht.

Die festgestellten geringen wirksamen Konzentrationen sind umweltrelevant, sodass diese Ergebnisse eine ernsthafte Grundlage für eine Risikoabschätzung der Gefahren für Mensch und Umwelt durch BPA ermöglichen. Bezogen auf freilebende Amphibienpopulationen stellt eine kurzzeitige Exposition während eines empfindlichen Entwicklungsstadiums ein realistisches Umweltszenario dar. Da viele Arten in verschiedenen Wasserhabitaten laichen, kommt es vor, dass diese Habitate von landwirtschaftlichen oder industriellen Abwässern belastet werden. Folglich können Kaulquappen während einer bestimmten Zeit ihrer Ontogenese den Abwasserinhaltsstoffen ausgesetzt sein. Einige dieser Substanzen sind schnell abbaubar, sodass eine kurzzeitige Exposition regelmäßig auftreten kann (Bridges, 2000). In Zeiten weltweit zurückgehender Amphibienpopulationen stellen komplexe Laborstudien über die Effekte von ED auf Amphibien wichtige Ergebnisse zur Verfügung, denn Substanzen mit hormonähnlichem Wirkpotenzial sollen wesentlich zum Populationsrückgang der Amphibien beitragen (Carey *et al.*, 2001).

In den vorangegangenen Abschnitten wurden die *in vivo*-Effekte von BPA auf *Xenopus laevis* Kaulquappen umfassend diskutiert. Um die Frage nach dem Vorkommen von BPA in der Umwelt beantworten zu können, musste für diese Chemikalie eine analytische Nachweismethode entwickelt werden. Dabei bot sich an, Wasserproben aus den Expositionsexperimenten zu analysieren. Zum einen war dadurch die Möglichkeit der Entwicklung einer chemisch-analytischen Methode im Labormaßstab gegeben, zum anderen konnte eine Überprüfung der BPA-Behandlung und der Abbaurate des BPA im semistatischen Versuchsansatz stattfinden. Die Analyse wurde mit Hilfe einer HPLC-Methode durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit wurde der BPA-Gehalt im Untersuchungswasser während eines Expositionsintervalls von 48 Stunden analysiert. Dabei zeigte sich, dass BPA nach 48 Stunden noch zu 15-30 % der Nominalkonzentration vorhanden war. Um weitergehende Informationen darüber zu erhalten, welches Abbauverhalten BPA in den 48 Stunden zeigt, wurde in Abständen von 6 Stunden in unterschiedlichen Ausgangsproben die BPA-Konzentration gemessen. Es wurde nur eine geringe Verringerung der BPA-Konzentration in Becken nachgewiesen, die nur das Standardmedium oder Standardmedium und Kaulquappenfutter enthielten. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass BPA generell nicht schnell durch Mikroorganismen metabolisiert wurden, die sich in den Becken ansiedelten oder möglicherweise das Futter als Nährstoffquelle benutzten. Die Meinungen zur mikrobiellen Abbaubarkeit von BPA gehen weit auseinander. Während einige Studien eine schnelle Degradierung von BPA mit Halbwertszeiten von weniger als 4 Tagen zeigten (Dorn *et al.*, 1987; Klecka *et al.*, 2001; West *et al.*, 2001), führten andere Untersuchungen wie auch hier zum Ergebnis, dass BPA eine gewisse Persistenz gegenüber Abbauprozessen hatte (Stone & Watkinson, 1983). Ein schneller BPA-Abbau benötigt genügend

adaptierte Mikroorganismen, wie sie zum Beispiel im Auslaufwasser von BPA produzierenden Firmen nachzuweisen sind (Fürhacker *et al.*, 2000).

Die Ergebnisse der chemischen Analyse zeigten außerdem, dass BPA aus dem Standardmedium von den Kaulquappen aufgenommen worden sein muss, da die BPA-Konzentration nur in Anwesenheit von Kaulquappen eindeutig erniedrigt wurde. Allerdings gibt es hierzu keine weiterführenden aktuellen Informationen zur Aufnahme, Metabolisierung und Exkretion von BPA.

## **4.2. Umweltbelastungen durch ED in Oberflächengewässern**

### **4.2.1. Nachweis von BPA in Gewässerproben der Alb**

Die im vorherigen Abschnitt angesprochene HPLC-Methode erwies sich als nicht brauchbar für das analytische BPA-Screening von Umweltgewässerproben. Die Ursache dafür war, dass trotz einer durchgeführten Fraktionierung der Albextrakte die Vielzahl der Inhaltsstoffe in den Extrakten die HPLC-Trennsäule verstopften und eine Auftrennung unmöglich machten. Aus diesem Grund musste eine weitere analytische Methode entwickelt werden, die sich auf eine GC-Auftrennung und eine MS-Detektion stützte. Diese Methode lieferte gute Ergebnisse bezüglich des Nachweises von BPA aus Gewässerproben, die den Flussverlauf der Alb wiedergeben. Die ermittelten BPA-Messwerte zeigten, dass BPA im Flussverlauf der Alb durchgehend vorhanden war. Die BPA-Konzentrationen bewegten sich zwischen 2 und 4 ng/L. Erst das Auslaufwasser der Kläranlage Neureut beinhaltetete 16 ng/L BPA und die Probennahmestelle flussabwärts des Auslaufkanals enthielt ebenfalls noch eine erhöhte BPA-Konzentration von 8 ng/L. Diese Ergebnisse stimmen im Wesentlichen mit Daten aus weltweit durchgeführten Untersuchungen des BPA-Gehalts in anthropogen belasteten Oberflächengewässern bzw. in Kläranlagenauslaufwasser überein und belegen eine moderate Belastung der Alb durch BPA..

So wurde zum Beispiel im Kläranlagenauslaufwasser in Berlin BPA-Konzentrationen zwischen 8 und 33 ng/L gefunden (Hansen, 1997). In der Elbe wurden neben anderen ED auch BPA (höchste Konzentration: 5 ng/L) nachgewiesen (Hecker *et al.*, 2002). Wenzel *et al.* (1998) fanden in deutschen Oberflächengewässern BPA-Mengen von 23 ng/L. In Kläranlagenausläufen wurden jedoch bis zu 702 ng/L detektiert. Wenzel *et al.* (1998) nehmen an, dass der Eintrag von BPA über Kläranlagenausläufe der Haupteintragspfad in Oberflächengewässer ist. Sehr hohe Konzentrationen von BPA werden auch durch die Abwässer von BPA synthetisierenden bzw. -verarbeitenden Firmen in Oberflächengewässer eingeleitet (bis zu 118 ng/L).

In Japan wurde in einer großangelegten Studie die Gewässerbelastung mit BPA untersucht. In 88 von 130 Probennahmestellen wurde BPA nachgewiesen und die höchste gefundene Konzentration betrug 940 ng/l (Hu *et al.*, 2002).

In der vorliegenden Arbeit betrug die in den Expositionsversuchen wirksamste BPA-Konzentration  $10^{-7}$  M, was 22,23  $\mu\text{g/L}$  entspricht. Somit sollten die aufgeführten Werte in Oberflächengewässern und auch die Werte, die im Flussverlauf der Alb gefunden wurden, nicht ausreichen, um vergleichbare Effekte auszulösen. Dabei darf nicht außer Acht gelassen werden, dass in der Umwelt additive oder synergistische Effekte von einem ED-Gemisch hervorgerufen werden, die sich aus für die Substanzen alleine unwirksamen Konzentrationen zusammensetzen. Dennoch sind die gemessenen BPA-Konzentrationen im Auslaufwasser der Kläranlage Neureut bzw. dem Auslaufwasser der zitierten Referenzmessungen nur noch ca. zwei Zehnerpotenzen geringer als die hier festgestellten NOEC-Werte (no observed effect level) bei  $10^{-8}$  M (ca. 2.23  $\mu\text{g/L}$ ). Eine Umweltbetrachtung, die nach dem Vorsorgeprinzip gilt, muß solche Konzentrationen per se schon als bedenklich erachten erst recht, wenn BPA nur einen von zahlreichen ED im Oberflächengewässer darstellt.

#### **4.2.2. ED in der Umwelt als komplexes Gemisch von Stoffen mit verschiedenen Wirkmechanismen**

Dass dies der realen Situation entspricht, belegen die Ergebnisse der chemischen Analytik, die neben BPA noch weitere ED messbar nachweisen (vgl. 3.2.2.). Hier zeigte sich, dass EE außer bei punktuellen Einleitungen über die Kläranlagenausläufe auch im Flußverlauf in Konzentrationen von einigen  $\text{ng/L}$  bis zu ca. 10  $\text{ng/L}$  im Mündungsbereich der Alb vorkommt, was aufgrund der extremen Persistenz und biologischen Effektivität von EE gegenüber E2 sogar schon sensitive biologische Wirkungen erwarten lässt. Weitere Beispiele sind die schwachen Xenööstrogene, Campesterol und  $\beta$ -Sitosterol, die eine mehr oder weniger gleichmäßige Belastung des Gewässers aufweisen ohne in den biologischen Effizienzbereich zu gelangen. Der DDT-Metabolit o,p'-DDE mit geringer antiandrogener Wirkung scheint ebenfalls über die Kläranlagen punktuell eingeleitet zu werden. Da dies nur ausgewählte Beispiele von ED sind, die mittels chemischer Analytik nachgewiesen werden konnten, steht hier außer Frage, dass die ED insgesamt sich zu einer Umweltbelastung mit deutlicher biologischer Wirkung addieren.

Die im Einzelstoffansatz untersuchte Chemikalie BPA wirkt ähnlich wie weibliche Sexualsteroiden. Eine Studie mit einer einzelnen Substanz erfasst die Situation in einem komplexen System wie einem Oberflächengewässer nur unzureichend. Da sich in der Umwelt ED nachweisen lassen, die über mehrere Wirkmechanismen auf die Reproduktionsbiologie von aquatischen Organismen einwirken können. Es handelt sich um vier prinzipielle Wirkmechanismen, mit denen östrogene, antiöstrogene, androgene und antiandrogene Effekte verursacht werden können (Döhler & New, 1989). Dabei führen östrogene Substanzen zur Verweiblichung, androgene zur Vermännlichung, antiöstrogene neutralisieren die sexuelle Differenzierung und antiandrogene Stoffe haben ebenfalls verweiblichende Effekte zur Folge.

Es ist zur Zeit eine kontrovers diskutierte Frage, ob diese generelle Einteilung auch bei Amphibien zutrifft, da es Untersuchungen gibt, die gegensätzliche Ergebnisse hinsichtlich der Geschlechtsdifferenzierung bei Amphibien zeigten (Hayes, 1998, Wallace *et al.*, 1999, Kloas, 2002, Bögi *et al.*, 2003). Nur Östrogene erzeugten immer eine eindeutige Verweiblichung, Vermännlichung aufgrund von Androgenen scheint abhängig von der Amphibienart bzw. -ordnung zu sein, wobei hier die widersprüchlichen Resultate größtenteils auf unvergleichbaren Expositionsansätzen beruhen. Bisher wurden Effekte von Antiöstrogenen und Antiandrogenen bei Amphibien sehr selten untersucht (Kloas, 2002), so dass ein Bedarf an weiteren Untersuchungen besteht, um eine generalisierte Aussage zu den Wirkmechanismen für Amphibien zu erlauben.

Die meisten Substanzen, von denen bekannt ist, dass sie die Reproduktionsbiologie beeinflussen, sind wie die Sexualsteroiden lipophil. In Oberflächengewässern wurden verschiedene Stoffklassen in relevanten Konzentrationen gefunden. Dazu gehören die natürlichen Sexualsteroiden, synthetische Steroide wie Kontrazeptiva, antiöstrogene Brustkrebswirkstoffe, Anabolika, Phytoöstrogene, Mycoöstrogene, Umweltchemikalien, Insektizide, Pestizide und Fungizide.

Diese Vielzahl an Substanzen in der Umwelt erlaubt es nicht, Wirkungen aufgrund der chemischen Struktur vorauszusagen, da die Struktur eines potenziellen ED nur bedingt Rückschlüsse auf seine Wirkung zulässt. Ein vielversprechenderer Ansatz ist die Unterscheidung zwischen den angesprochenen vier Wirkmechanismen, die durch adäquate biologische Testsysteme festgestellt werden können, und diese mit chemischen Analysemethoden zu verbinden.

Dieser Gedanke wurde mit dem Gemischansatz im Rahmen der vorliegenden Arbeit verfolgt. Dazu wurde in Rezeptorbindungsstudien (ER und AR) festgestellt, ob Inhaltsstoffe von Gewässerextrakten der Alb an die Rezeptoren binden. Weiterhin wurde durch Behandlung von *Xenopus laevis* Zellkulturen mit Gewässerextrakten und den Nachweis der Expression eines östrogenen Biomarkers (ER) und eines (anti)androgenen und (anti)östrogenen summarischen Biomarkers (RBP) untersucht, ob die entsprechende Biomarkerexpression beeinflusst wurde. Im Gegensatz zum Einzelstoffansatz handelte es sich um *in vitro*-Methoden. Die mit diesen Methoden erzielten Ergebnisse werden im Folgenden diskutiert.

#### **4.2.3. Untersuchungen von Gewässerproben der Alb mit Bioassays**

Wie in vorherigen Abschnitten beschrieben (vgl. Kapitel 2.), wurden die Extrakte der Gewässerproben aufkonzentriert und fraktioniert in den Bioassays eingesetzt. Diese Vorgehensweise lässt sich folgendermaßen begründen: Bei der Auswahl der entsprechenden Umweltmatrix wurde der fließende Wasserkörper der Alb gewählt. Dadurch müssen alle ED unentdeckt bleiben, die sich in den Flusssedimenten befinden oder die assoziiert mit

pflanzlichem Material im Wasserkörper zu finden sind, denn dieses wurde herausgefiltert. Weiterhin beträgt der gesamte DOC-Gehalt (dissolved organic carbons) im Wasserkörper eines Gewässers meistens weniger als 10 mg/L (Thurman, 1985) und die Massenkonzentrationen der entsprechenden Schadstoffe liegen im Bereich von ng/L bis µg/L, was weniger als 1 Promille vom Gesamt-DOC ausmacht. Folglich ist eine Anreicherung der ED durch Aufkonzentrierung unerlässlich. Schließlich sind Fraktionierungen erforderlich, um die Komplexität des ursprünglichen Stoffgemisches zu verringern. Zur Fraktionierung werden im Allgemeinen verschiedene Substanzeigenschaften ausgenutzt, im vorliegenden Fall erfolgte eine Fraktionierung auf Grund der unterschiedlichen Lösungseigenschaften der ED in unterschiedlich polaren Lösungsmitteln. Eine alternative Fraktionierungsmethode ist die von Müller und Frimmel (2001) entwickelte Ultrafiltrationsfraktionierung, mit der die Bestandteile hinsichtlich ihrer Größe aufgetrennt werden. Es muss bei jeder gewählten Gewässerextraktions- und Fraktionierungsmethode generell berücksichtigt werden, dass nach der Probenaufarbeitung die Zusammensetzung der ED im Extrakt qualitativ und quantitativ nicht mehr exakt der Originalgewässerprobe entsprechen muss.

#### **4.2.3.1. Rezeptorbindungsstudien mit Alb-Extrakten**

In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass mit dem Modellorganismus *Xenopus laevis* erfolgreich Rezeptorbindungsstudien durchgeführt werden konnten. Dabei wurden definierte Substanzen in Konkurrenzexperimenten eingesetzt. Alle untersuchten östrogenartigen ED (Tetrachlorobiphenyl, Dibutylphthalat, Butylhydroxyanisol, Nonylphenol, BPA, DDT) zeigten eine relativ geringe Bindungsaffinität an die cytosolischen Östrogenrezeptoren. Einzig der natürliche Ligand E2, sowie EE und Tamoxifen konnten das radioaktiv markierte E2 mit vergleichbarer Affinität vom Rezeptor verdrängen. Im Gegensatz dazu hatten z.B. Nonylphenol und BPA eine 1000-fach geringere Bindungsaffinität an den ER als E2 (Lutz & Kloas, 1999).

Rezeptorbindungsstudien zur Untersuchung der Bindung bestimmter Substanzen an den AR wurden in Amphibien bisher kaum durchgeführt. In unserem Labor wurde im Rahmen dieses Projektes ein Radiorezeptorassay (RARA) für Androgenrezeptoren von *Xenopus laevis* entwickelt, in dem [<sup>3</sup>H]-T als markierter Ligand eingesetzt wurde. T, DHT und MT konnten diesen vom Rezeptor äquivalent verdrängen, die Antiandrogene VC und p,p-DDE zeigten kein Verdrängungspotenzial. Diese Substanzen sind dafür bekannt, den AR durch allosterische Hemmung zu blockieren und nicht als Ligand der Bindungstasche des AR aufzutreten (Kelce *et al.*, 1998).

Beide RARA-Ansätze kamen in dieser Arbeit zum Einsatz, um die Bindungsaffinität von Gewässerinhaltsstoffen an die Rezeptoren zu untersuchen. Es wurde festgestellt, dass das Bindungspotenzial der Extrakte im Flussverlauf der Alb ansteigt. Weiterhin konnte dokumentiert werden, dass in den Kläranlagenauslaufextrakten Inhaltsstoffe mit dem größten



Interaktionspotenzial mit den Rezeptoren zu finden sind. Im Fluss werden diese Stoffe entsprechend verdünnt, sodass nur geringere Bindungsaffinitäten an beide Rezeptoren nachgewiesen werden konnten. Im Vergleich der E2- mit den T-Äquivalenten fällt auf, dass das Auslaufwasser der Kläranlage Neurod (Alb 2) eine höhere Konzentration an E2-Äquivalenten als an T-Äquivalenten aufweist. Bei der Kläranlage Neureut (Alb 5) verhält es sich genau umgekehrt. Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass die Konzentrationen der entsprechenden Hormonäquivalente abhängig vom Abwasserzulauf der jeweiligen Kläranlagen sind. Da die Kläranlage Neurod nur kommunales Abwasser bearbeitet, verwundert es nicht, dass im Verhältnis mehr E2-Äquivalente zu finden sind. Kommunales Abwasser enthält einen großen Teil natürlicher weiblicher Sexualsteroiden sowie synthetische Östrogene wie EE, die als Bestandteil von Verhütungsmitteln verwendet werden.

Die durchgeführten Rezeptorbindungsstudien lassen keine Entscheidung darüber zu, ob eine Substanz, die an den Rezeptor bindet, auch tatsächlich ein Rezeptoragonist ist und damit eine direkte Wirkung über eine Rezeptorbindung vermittelt. Es könnten auch antagonistische ED an den Rezeptor binden, die diesen dann blockieren und dadurch einen Einfluss auf rezeptorgesteuerte Regulationsprozesse haben.

Neben den angesprochenen natürlichen Östrogenen können in Umweltproben auch sogenannte Phytoöstrogene vorkommen. Unter einem Phytoöstragen wird eine pflanzliche Substanz verstanden, die strukturell und/oder funktional den Eierstocks- oder Gebärmutteröstrogenen ähnelt. Die zwei Hauptklassen der Phytoöstrogene sind Lignine und Isoflavonoide. Viele Studien haben festgestellt, dass Lignine und Isoflavonoide erfolgreich mit E2 um die Bindung an den ER konkurrieren können. Weiterhin wurde gezeigt, dass durch Phytoöstrogene nicht nur Rezeptorbindungen stattfinden, sondern dass auch Gentranskriptionen eingeleitet werden können (Whitten & Patisaul, 2001).

Androgene Agonisten des AR in Umweltproben sind unter anderem die endogenen Hormone T und DHT sowie die Pharmazeutika Danazol, Methandriol und MT. Als Antiandrogene können verschiedene Pestizide wie VC und seine Metabolite M1 und M2, das DDT-Metabolit p,p-DDE, das Fungizid Procymidon sowie Flutamid auftreten (Euling & Kimmel, 2001). Antiandrogene binden ebenfalls an den AR und reduzieren oder verhindern dabei die Transaktivierung des AR. Für VC wurde gezeigt, dass die Metabolite M1 und M2 an Ratten- und Menschen-AR binden und als AR-Antagonisten wirken. M1 und M2 blockieren androgenabhängige Genexpression *in vivo* und *in vitro*, indem sie die androgenvermittelte AR-DNA-Bindung verhindern (Ostby *et al.*, 1999).

#### **4.2.3.2. Etablierung von RBP-mRNA als Biomarker**

RBP gehört zur Proteinfamilie der Lipocaline. Diese ist eine große Gruppe kleiner extrazellulärer Proteine. Die Mitglieder dieser Familie zeichnen sich dadurch aus, dass sie kleine

hydrophobe Moleküle binden, an spezifische Membranrezeptoren andocken und Komplexe mit löslichen Makromolekülen bilden können. Die Lipocaline wurden häufig als Transportproteine bezeichnet, es ist jedoch inzwischen bekannt, dass die Lipocaline eine große funktionelle Diversität besitzen und beispielsweise eine Rolle beim Retinoltransport, bei der Farbgebung von Invertebraten, beim Pheromontransport und bei der Prostaglandinsynthese besitzen. Weiterhin werden sie mit verschiedenen Regulationsprozessen in Verbindung gebracht, z.B. bei der Immunantwort, und als Carrierproteine spielen sie eine Rolle bei der Entsorgung exogener und endogener Substanzen (Flower, 1996).

Das RBP wird hauptsächlich in der Leber synthetisiert und ins Serum ausgeschieden. Sein spezifischer Ligand ist das Retinol (Vitamin A), das hydrophob ist und deswegen an ein Bindungsprotein gebunden zum Wirkungsort transportiert werden muss. Vitamin A spielt unter anderem eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung, im Zellwachstum und in der Zelldifferenzierung. Die RBP-Synthese wird durch Steroidhormone reguliert. Der Verwendung des RBP als Biomarker lag die Hypothese zu Grunde, dass diese Regulationsprozesse das RBP zu einem geeigneten Biomarker für den Nachweis von (anti)östrogenen und (anti)androgenen Effekten machen.

McKearin *et al.* (1987) fanden heraus, dass Steroidhormone die RBP-mRNA-Transkription regulieren und eine E2-Behandlung von männlichen *Xenopus laevis* stimulierte die Synthese von hepatischer RBP mRNA um das Zehnfache erhöhte. Es scheint jedoch, als sei die Erhöhung der RBP-Synthese durch Östrogene artabhängig, denn eine einzige Behandlung mit E2 verringerte die hepatischen RBP-mRNA-Gehalte im Meeresfisch *Sparus aurata* (Funkenstein, 2001).

Die steroidhormonabhängige Regulation des RBP lässt sich dadurch erklären, dass Retinol als ein Retinol-RBP-Komplex in den Oocyten von oviparen Wirbeltieren gespeichert wird. So kann Retinol bei Bedarf dem sich entwickelnden Embryo zur Verfügung stehen. Deswegen kann RBP mit dem Vitellogenin, einem anderen Eizellen-Vorläuferprotein, verglichen werden, das ebenfalls unter Regulation der Steroidhormone synthetisiert und in die Eier eingelagert wird. In der vorliegenden Arbeit konnte klar gezeigt werden, dass die RBP-mRNA-Expression durch E2 und EE in *Xenopus laevis* Leberzellen in einer linearen Dosisabhängigkeit erhöht wird, womit die Daten von McKearin *et al.* (1987) bestätigt wurden. Damit eignet sich RBP grundsätzlich als östrogenen Biomarker. Es muss aber einschränkend hinzugefügt werden, dass die Höhe der RBP mRNA-Induktion durch die beiden Östrogene uneinheitlich war. Nur das synthetische Östrogen EE erzeugte eine signifikante Erhöhung der RBP-mRNA-Expression. Das liegt hauptsächlich daran, dass EE im Gegensatz zu E2 sehr stabil ist und damit eine gewisse Abbauresistenz gegenüber Metabolisierungsprozessen zeigt. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit früheren Erkenntnissen, in denen eine Halbwertszeit von E2 in *Xenopus laevis* Hepatocyten von 120 min festgestellt wurde bei Behandlung mit  $10^{-6}$  M E2 (Tenniswood *et al.*, 1983). Dadurch erwies sich EE als die sinnvollere Positivkontrolle zur Erhöhung der RBP-mRNA-Synthese.

In einer weiteren Studie entdeckten McKearin & Shapiro (1988), dass T in der Lage war, RBP-Gehalte in weiblichen *Xenopus laevis* um das 12-fache zu erniedrigen, womit das Niveau erreicht wurde, das üblicherweise in männlichen Fröschen vorherrscht. Es konnte in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen keine signifikante Erniedrigung der RBP-mRNA-Synthese durch T in Leberzellen nachgewiesen werden. Es scheint jedoch möglich zu sein, dass T und auch DHT die RBP-mRNA-Expression unterdrücken, da eine klare Tendenz zur verminderten Synthese durch diese Substanzen beobachtet wurde. Die fehlende Signifikanz der Ergebnisse lässt sich möglicherweise auf die semiquantitative Erfassung der mRNA-Expression zurückführen. Dabei erfolgte die Analyse der Expressionsverringering in Bezug auf das Kontrollniveau, das selbst eine relativ geringe RBP-Expression aufwies. Dadurch war die Sensitivität der Analyse nicht immer gewährleistet und führte zu statistischen Auswertungsproblemen. Zellen, die mit MT behandelt wurden, zeigten keine Tendenz zur Unterdrückung der RBP-mRNA-Expression. MT gilt als potentes synthetisches Androgen, da es relativ abbauresistent und strukturstabil ist. Es sind allerdings keine Daten zum Metabolismus und der biologischen Effektivität von MT in Amphibien bekannt, sodass hier weiterer Klärungsbedarf besteht.

In einem weiteren Experiment wurden die Wirkung einer kombinierten Behandlung mit verschiedenen Androgenkonzentrationen (T, DHT, MT, jeweils  $10^{-9}$  M bis  $10^{-6}$  M) und einer wirksamen EE-Konzentration ( $10^{-6}$  M) auf die RBP-mRNA-Synthese untersucht. Die antagonistischen Effekte von Androgenen und Östrogenen konnten eindeutig demonstriert werden, denn sowohl T als auch DHT unterdrückten signifikant die EE-stimulierte Erhöhung der RBP-mRNA-Transkription. Die Androgene waren sogar in relativ niedrigen Konzentrationen ( $10^{-9}$  M und  $10^{-8}$  M) effektive Hemmstoffe. Hinsichtlich der Hemmung der RBP mRNA-Transkription war MT wiederum nicht so wirksam wie T und DHT.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse zur RBP-Regulation die Hypothese bestätigen, dass RBP-mRNA-Gehalte ein Gleichgewicht zwischen den antagonistischen Regulationseffekten von Östrogenen und Androgenen darstellen (McKearin & Shapiro, 1988). Im Bezug auf die Anwendung des RBP als Biomarker zur Untersuchung von Umweltproben bedeutet diese Erkenntnis, dass androgen wirksame ED dadurch erkannt werden können, dass sie die Fähigkeit besitzen, östrogen bedingte Erhöhungen der RBP-mRNA-Expression zu unterbinden.

Diese Aussage trifft auch für antiöstrogen wirksame ED zu. Bei der Behandlung von *Xenopus laevis* Leberzellkulturen mit EE in Kombination mit dem Antiöstrogen TAM, welches für sich keine Wirkung auf die RBP-mRNA-Synthese hat, erfolgte eine signifikante, dosisabhängige Inhibition der EE bedingten Stimulation der RBP-mRNA-Transkription. Die höchste inhibitorische Wirksamkeit zeigte TAM in äquivalenter Konzentration mit EE (beide  $10^{-6}$  M), wobei die RBP-mRNA-Gehalte nur noch das Kontrollniveau erreichten. Somit hatte TAM in Kombination mit EE ähnliche regulierende Fähigkeiten wie T und DHT. Im Gegensatz zu

diesen beiden Androgenen konnte TAM aber nicht die basale RBP-mRNA-Transkription unterdrücken, sodass es möglich ist, zwischen androgenen und antiöstrogenen Wirkungen von ED zu unterscheiden, indem RBP-mRNA als Biomarker genutzt wird. TAM ist nur ein partieller Antagonist des ER und erzielt dadurch in manchen Fällen keine antiöstrogenen Wirkungen (Wijayarathne *et al.*, 1999). Im Bezug auf die RBP-Regulation in Hepatocyten scheint TAM jedoch ein potentes Antiöstrogen zu sein.

Des Weiteren wurde das Antiandrogen VC den Leberzellen zugegeben. VC alleine erzielte keine Wirkungen auf die RBP-mRNA-Regulation. Eine Kombination von VC  $10^{-7}$  M und  $10^{-6}$  M mit DHT  $10^{-6}$  M hob die transkriptionshemmenden Effekte von DHT auf bzw. die RBP-mRNA-Gehalte erreichten das Kontrollniveau. VC ist dafür bekannt, antiandrogene Wirkungen zu vermitteln. So konnte es bei erwachsenen männlichen Guppies in Konzentrationen von 1-10 µg/L eine Entmännlichung hervorrufen (Baartrup & Junge, 2001) und in *Xenopus laevis* Kaulquappen verweiblichend wirken (Kloas, 2002). Von einigen Wissenschaftlern wird vermutet, dass nicht VC selbst das wirksame Antiandrogen ist. So konnten Kelce *et al.* (1994) nachweisen, dass die primären Metaboliten M1 und M2 mit den Androgenen um die Bindung an den AR konkurrieren (vgl. 4.2.3.1). Es existieren keine Angaben dazu, ob VC in *Xenopus laevis* Leberzellen metabolisiert wird. Zur Zeit laufende Experimente sollen den Verbleib von VC in unserem Zellsystem näher beleuchten und dadurch die verantwortlichen Mechanismen für die Antiandrogenität von VC bei der RBP-Regulation klären. Die vorgestellten klaren Ergebnisse belegen mit den diskutierten Einschränkungen die Anwendbarkeit von RBP als antiandrogenem Biomarker.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die RBP-mRNA-Expression von definierten Wirkmechanismen beeinflusst wird und Laborstudien zur Untersuchung von ED mit RBP als Biomarker gestaltet werden können, um (anti)östrogene und (anti)androgene ED-Effekte nachzuweisen. Gerade diese Reaktivität auf alle vier möglichen Wirkmechanismen ((anti)östrogene und (anti)androgene) belegen allerdings, dass RBP bei komplexen Stoffgemischen nur als summarischer Biomarker angewandt werden kann, der die resultierende biologische Wirkung all dieser Mechanismen darstellt.

#### **4.2.3.3 Biomarker-Expression in Leberzellkulturen nach Behandlung mit Gewässerextrakten der Alb**

Es stellte sich nun die Frage, ob RBP tatsächlich ein nützlicher Biomarker zur Untersuchung der Umweltbelastung mit ED ist. Da für östrogene Effekte gezeigt werden konnte, dass die Erhöhung des RBP-mRNA-Gehalts durch östrogene Substanzen geringer ausfiel als die des reinen östrogenen Biomarkers ER-mRNA, sollte auch aufgrund des eindimensionalen (anti)östrogenen Wirkmechanismus ER-mRNA als spezifischer östrogenen Biomarker bevorzugt werden. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die ER-mRNA ein nützlicher östrogenen Biomarker

ist, wenn nur das östrogene Potenzial der drei Kläranlagenauslauffractionen (Alb 5) betrachtet wurde. Es stellt keine Überraschung dar, dass Kläranlagenauslaufwasser östrogene ED enthält, denn es gibt eine Reihe von Studien, die als Hauptkomponenten im Abwasser hohe Konzentrationen von EE, E2, Östron und östrogenähnlichen Chemikalien wie Alkylphenolen und BPA (Körner *et al.*, 2001; Kirk *et al.*, 2002) nachwiesen.

Die Expression der RBP-mRNA in kultivierten Leberzellen, die mit den drei Gewässerextraktfraktionen behandelt wurden, stellt einen Summenparameter aller (anti)östrogenen und (anti)androgenen Substanzen in den Fraktionen dar. Der Nachweis der RBP-mRNA-Expression nach der Behandlung der Leberzellen mit Kläranlagenauslaufwasserfraktionen ergab für alle Fraktionen eine geringere bis ähnliche relative Erhöhung der Expression im Vergleich mit dem östrogenen Biomarker ER-mRNA. Die verminderte RBP-mRNA-Expression im Vergleich zu der stimulierten Expression der Positivkontrolle (EE  $10^{-6}$  M) legt die Vermutung nahe, dass auch androgene Substanzen, welche aufgrund der Resultate der RARAs in allen Fraktionen vorhanden sein müssen, die Synthese hemmen. Hypothetisch könnte dieses relative Absinken der Östrogenität auch zumindest teilweise auf dem Vorhandensein von antiöstrogenen Stoffen beruhen. Der vergleichende Ansatz im Bioassay mit RBP- und ER-mRNA deutet darauf hin, dass in der Summe die Effekte der (anti)östrogenen und (anti)androgenen Substanzen, die durch die RBP-mRNA-Expression dargestellt werden, östrogenen Art sind. Da die östrogenen Effekte im Vergleich zur ER-mRNA-Expression eindeutig reduziert auftreten, müssen andere ED in den Proben vorhanden sein, die androgene und eventuell auch antiöstrogene Komponenten im Gemisch repräsentieren. Kürzlich wurde in Großbritannien eine Studie angefertigt, die androgene Aktivität in Oberflächengewässern nachwies und damit die hier vorgestellten Ergebnisse unterstützt (Thomas *et al.*, 2002).

Es muss betont werden, dass die Probennahmestelle Alb 5 die endokrine Wirksamkeit eines Kläranlagenauslaufs widerspiegelt. Kläranlagenauslaufwasser wird normalerweise stark verdünnt, wenn es in den Vorfluter eingeleitet wird. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass die Konzentrationen einzelner ED unter die Nachweisgrenze bzw. unter die Grenze der niedrigsten wirksamen Konzentration in einem Bioassay fallen. Trotzdem ist es möglich, wie Beispiele aus Großbritannien zeigen, dass die Flüsse hauptsächlich aus Auslaufwasser bestehen und Schadstoffe in der Trockenzeit sogar akkumulieren können (Harries *et al.*, 1997).

Schließlich müssen noch einige offensichtliche Grenzen der Verwendbarkeit von RBP-mRNA als Biomarker zur Untersuchung der Wirkungen von ED genannt werden. Mit Hilfe der RBP-mRNA-Expression lässt sich nicht exakt zwischen antiandrogenen, androgenen, antiöstrogenen und östrogenen Wirkmechanismen unterscheiden. Der große Vorteil bei der Verwendung von RBP-mRNA liegt allerdings darin, dass RBP einen Summenparameter für alle vier Wirkmechanismen darstellt. Dadurch wird die Möglichkeit geboten, alle möglichen Wirkmechanismen von verschiedenen potenziellen ED im Nachweis eines Biomarkers zu

vereinen. Dadurch lässt sich eine Aussage darüber treffen, ob die endokrinen Effekte eines komplexen Gemisches eher in Richtung Verweiblichung oder Vermännlichung tendieren oder ob sie summarisch nur einen geringen Effekt zeigen. Durch zusätzliche Verwendung eines spezifischen (anti)östrogenen (wie hier der ER-mRNA) oder (anti)androgenen Biomarkers können die tatsächlich vorhandenen effizienten Wirkmechanismen charakterisiert und teilweise auch semiquantitativ erfasst werden. Zusätzlich kann durch die Verwendung von Reinsubstanzen in Kombination mit bekannten (anti)östrogenen oder (anti)androgenen Chemikalien der spezifische Wirkmechanismus einer bestimmten Substanz über den Nachweis der RBP-mRNA-Expression ermittelt werden. Zusammengefasst erbringen die Ergebnisse, die mit dem RBP als Biomarker gewonnen wurden, den Beweis, dass RBP-mRNA als Summenparameter für den Nachweis (anti)östrogenen und (anti)androgenen Wirkungen auf die Reproduktionsbiologie dienen und zusätzlich spezifische Wirkmechanismen eines vermuteten ED genauso wie summierte Einflüsse von komplexen Umweltgemischen nachweisen kann.

#### **4.2.4. Bewertung der Belastung der Alb mit ED**

Die Probenextrakte der Alb wurden auf ihr Potenzial, als ED wirken zu können, untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass im Oberlauf des Flusses (Alb 0 bis Alb 3) eine relativ geringe Reaktion in den verwendeten Bioassays zu beobachten ist. Eine Ausnahme war dabei die Stelle Alb 2, die einen Kläranlagenauslauf repräsentiert. Dieser zeigte sowohl im RARA als auch in den Biomarkernachweisen eine deutliche östrogene Tendenz, wobei auch Substanzen, die an den AR binden nachgewiesen wurden. Im Unterlauf der Alb (Alb 4 bis Alb 6) schien die Belastung des Flusses mit ED erhöht zu sein. Vor allem das Kläranlagenauslaufwasser der Kläranlage Neureut (Alb 5) zeigte in den Untersuchungen eine ausgeprägte resultierende Östrogenität in den Bioassays. Im weiteren Flussverlauf war dann trotz des Verdünnungseffektes des Flusswassers die Konzentration an potenziellen ED erhöht, denn auch Alb 6 ergab noch eindeutige Ergebnisse in den Versuchen. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass nur in den Kläranlagenauslaufwässern und im Extrakt der Probe von Alb 6 (Mündungsbereich) eindeutige östrogene Reaktionen in den entsprechenden Bioassays erzielt werden konnten, auch wenn die Ergebnisse der RBP-mRNA-Nachweise belegen, dass auch androgene und/oder antiöstrogene Substanzen in nicht unerheblicher Menge vorhanden sein müssen.

Welche Bedeutung haben diese Ergebnisse aber für die aquatischen Lebewesen in der Alb? Zur Beantwortung dieser Frage muss zuerst festgestellt werden, dass es sich bei den durchgeführten Untersuchungen um Momentaufnahmen von drei Probennahmezeiträumen handelt. Es ist fraglich, ob die Belastung der Alb mit ED im Jahresverlauf konstant ist. Eigene Beobachtungen während der Probennahmen zeigten, dass die Wasserstände der Alb um bis zu 1,50 m variierten, sodass alleine durch Verdünnungseffekte durch das Niederschlagswasser bzw. durch

Aufkonzentrierung der ED durch hohe Verdunstung Uneinheitlichkeiten der Belastung vorhanden sind. In Ländern mit hoher Bevölkerungsdichte wie in Deutschland, ist es nicht ungewöhnlich, dass Abwässer einen großen Anteil an der Gesamtwassermenge eines Oberflächengewässers haben. In Großbritannien wurden festgestellt, dass Flüsse zu durchschnittlich 50 % aus Abwässern bestehen, wobei der Anteil in einer Trockenperiode bis auf 90 % ansteigen kann (Sumpter, 1997).

Zusätzlich spielt der Expositionszeitraum in der Natur eine große Rolle. Sowohl die Dauer einer Exposition als auch der Entwicklungsstand der betroffenen Organismen sind wichtige Faktoren bei der Wirkung von ED. Eine Besonderheit kommt bei oviparen Vertebraten noch hinzu. Im Gegensatz zu Säugetieren sind die Eier der Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische eine isolierte, unabhängige metabolische Einheit. Daraus folgt, dass lipophile, persistente Substanzen mit den Eidotterlipoproteinen im Ei angereichert werden können und damit Teil des Umgebungsmilieus des Embryos bis zum Schlüpfen werden (Fox, 2001, Bögi *et al.*, 2002). Bei Oviparen kann also eine Belastung mit ED unabhängig von der tatsächlichen Gewässerbelastung auftreten. Bei Fischen wurde festgestellt, dass diese Art der Exposition häufig bedeutsamer ist als die Exposition durch ED im Wasserkörper. Zusätzlich sind in jungen Entwicklungsstadien die exkretorischen und metabolisierenden Enzyme nur eingeschränkt aktiv, so dass eine kritische Phase der Exposition besteht (Van der Kraak, 2001).

Weiterhin beleuchten die vorgestellten Ergebnisse hauptsächlich einen Angriffspunkt für ED, nämlich die Bindung an die Steroidrezeptoren bzw. die dadurch hervorgerufene Genexpression. Es gibt jedoch zusätzliche Angriffsmöglichkeiten für umweltrelevante ED in den Organismen. So können Enzyme, die im Syntheseweg der Steroidhormone eine Rolle spielen, Angriffspunkte für ED sein. Besonders Cytochrom-P450-Enzyme spielen dabei eine Rolle. Aromatase (CYP19) katalysiert zum Beispiel den letzten, limitierenden Schritt bei der Umwandlung von Androgenen in Östrogene. Es wurde gezeigt, dass Imidazol-ähnliche Fungizide die Aromatase in Mikrosomen von Regenbogenforellen hemmen und dadurch die natürlichen Östrogenantworten unterdrücken, wie z.B. die Vitellogenin-Synthese während der Fortpflanzung. Es wird begründet vermutet, dass östrogene und antiandrogene Effekte unter anderem durch eine Erhöhung der Aromataseaktivität zustande kommen, während bei antiöstrogenen und androgenen Effekten die Aktivitätsminderung der Aromatase eine Rolle spielt. VC scheint der effektivste Aktivator für die Aromatase zu sein. Somit könnte VC einen Teil seiner antiandrogenen Wirkungsweise statt über die Hemmung der AR-Transaktivierung über eine Erhöhung der Aromataseaktivität erzielen. Dasselbe wurde für p,p'-DDE gezeigt, das die Aromataseaktivität in Rattenlebern *in vivo* erhöhen konnte (Sanderson *et al.*, 2002).

Die Belastung von Oberflächengewässern mit ED wird in der Fachliteratur ebenfalls unterschiedlich bewertet. Eine Studie kam beispielsweise zu dem Ergebnis, dass lediglich das Phytoöstrogen  $\beta$ -Sitosterol in relevanten Konzentrationen von 20-56 ng/L gefunden wurde und dieses voraussichtlich natürlichen Quellen entspringt (Stumpf *et al.*, 1996). Wenzel *et al.* (1998)

fürten eine großangelegte Studie in Deutschland durch, in der sie natürliche und synthetische Östrogene fanden, die überwiegend durch die Abwässer der Kläranlagen und, je nach ihren Adsorptionseigenschaften, mit dem Klärschlamm in die Umwelt gelangten. Die Zufuhr von natürlichen Östrogenen erfolgt nach Meinung dieser Autoren über die natürlichen Exkretionsprozesse des Menschen. Der Mensch scheidet E2, Östriol und Östron bzw. ihre Konjugate (Sulfatester und Glucuronide) aus. Die metabolische Inaktivierung des E2 erfolgt im Körper durch Einbau von Hydroxy- und Ketogruppen an verschiedenen Ringpositionen und damit zur Entstehung von Östron und Östriol, welches das Hauptabbauprodukt darstellt. Zusätzlich können nach Berechnungen, welche die produzierte Menge an EE zur Grundlage haben, EE-Konzentrationen im Auslaufwasser erwartet werden, die im ng/L-Bereich liegen. E2 und seine Metabolite Östron und Östriol sowie EE besitzen eine biologische Aktivität, die gegenüber Industriechemikalien um ein Vielfaches erhöht ist. Eine hormonelle Wirkung des EE auf Regenbogenforellen wurde schon bei Konzentrationen von 0,3 ng/L beobachtet. Effekte im aquatischen System bei einem Wirkstoffgehalt von 0,1 ng/L werden nicht ausgeschlossen (Toft & Baartrup, 2001). Weitere ED, die in Kläranlagenauslaufwasser gefunden wurden, waren Phthalat-Derivate. Es ergaben sich DEHP (Diethylphthalat)-Konzentrationen in Kläranlagenausläufen von 1,5-81 µg/l. Bei DBP (Dibutylphthalat) lagen die Konzentrationen bei 0,2-10,4 µg/l. Die Autoren untersuchten ihre Gewässerextrakte im Hefetest und fanden in vier von sechs untersuchten Proben eine eindeutige östrogene Aktivität.

Schließlich spielt auch die Behandlung der den Kläranlagen zugeführten Abwässer eine Rolle in der Reduktion der Umweltbelastung mit ED. Endokrine Stoffe können sowohl durch kommunale als auch durch industrielle Abwässer in Kläranlagen gelangen. Sie kommen in der Regel in gelöster Form an und können teilweise in der mechanischen Reinigungsstufe durch Anlagerung an Feststoffe mechanisch aus dem Abwasser entfernt und in den Klärschlamm überführt werden. Die dann noch im Abwasser gelösten Stoffe gelangen in die aerobe biologische Reinigung. Dort werden sie hinsichtlich ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften getrennt. Einige sind leicht metabolisierbar (Steroidhormone, Phytohormone), andere sind besonders langlebig. Zu letzteren zählen vor allem Xenoöstrogene. Die Adsorption an eine Belebtschlammflocke ist ebenso möglich wie eine Deglucuronierung der konjugierten Östrogene und damit eine Mobilisierung, denn die Glucuronidbindung kann mikrobiologisch sehr schnell gespalten werden.

Kirk *et al.* (2001) zeigten, dass die androgene und östrogene Aktivität geringer wurde, nachdem das Abwasser durch die Kläranlage durchgelaufen war. Die höchste ED-Reduktionsrate wurde nach der zweiten (biologischen) Klärstufe erreicht. Die meisten Ausläufe enthielten sehr wenig oder nicht nachweisbare östrogene und androgene Aktivitäten (max. 13 ng/l E2-Äquivalente bzw. max. 143 ng/L DHT-Äquivalente). Im Vergleich zu den hier gefundenen Werten, die klar belegen, dass überwiegend östrogene aber ebenso nicht zu vernachlässigende andere Wirkmechanismen nicht nur in Kläranlagenausläufen vorhanden sind sondern auch im



Flußverlauf akkumulieren, erscheinen die bei diesen Studien angewandten Nachweismethoden als weniger sensitiv.

### 4.3. Vergleich der Untersuchungen von Einzelstoff- und Gemisch-Ansatz

Ein Vergleich zwischen Einzelstoff- und Gemischansatz führt zu der Aussage, dass beide Ansätze für bestimmte Fragestellungen Vorteile aufweisen. Letztlich ist es aber erforderlich, eine methodische Synthese zwischen den *in vitro*-Screeningmethoden und den *in vivo*-Expositionsversuchen zu erarbeiten. So können Ergebnisse aus *in vitro*-Experimenten mit Gewässerextrakten unvermeidlich nur begrenzte Informationen zur Aktivität der enthaltenen ED liefern. Sie können aber wertvolle Einsichten in die Störungsmechanismen geben. Allerdings müssen einzelne ED oder ED-Gemische ebenfalls *in vivo* getestet werden, um ein genaues Bild von der Wirkungsweise zu bekommen, besonders deswegen, weil viele Substanzen mehr als eine Art von Aktivität aufweisen können (Sohoni *et al.*, 2001). Prinzipiell scheinen *in vitro*-Assays nicht sinnvoll zu sein, um Vorhersagen zur Gefährdung der Umwelt durch ED zu machen. Sie sollten aus diesem Grund nur dazu dienen, die Wirkmechanismen von ED aufzuklären und können mit Abstrichen dem schnellen Screening von potentiellen ED oder von Umweltproben dienen (Segner *et al.*, 2002).

Eine bereits praktizierte Möglichkeit, wirksame Konzentrationen von ED in Gewässern zu untersuchen, stellen Experimente dar, bei denen in den Gewässern heimische Tiere in Käfigen in definierten Flussabschnitten den Belastungen ausgesetzt sind (sogenannte caging-Experimente). So wurden zum Beispiel in den Geweben von Fischen (*Catostomus commersoni*), die in Auslaufwasser von Papiermühlen gehalten wurden, Substanzen gefunden, die an den ER, AR und das SHBG binden konnten (Hewitt *et al.*, 2002).

Weiterhin werden bei beiden vorgestellten Ansätzen zusätzliche Faktoren unberücksichtigt bleiben müssen, die auf die Reproduktionsbiologie einen Einfluss haben können. Bei Fischpopulationen wurde beispielsweise festgestellt, dass Habitatszerstörung, Klimaveränderungen, Nahrungsressourcen, Konkurrenz, chemische Gifte, Prädatoren und ED gemeinsam auf die Reproduktionsbiologie Einfluss nehmen (Van der Kraak, 2001).

Schließlich muss noch die Übertragbarkeit der erzielten Ergebnisse auf andere Amphibien bzw. andere Wirbeltiere diskutiert werden. *Xenopus laevis* lebt nicht in mitteleuropäischen Gewässersystemen. Dabei muss festgehalten werden, dass es eine gute Übereinstimmung der Hormonsysteme von Amphibien und höheren Vertebraten bezüglich der Hormone, der Rezeptoren, der intrazellulären Signalübertragungswege und der Regulation des Hormonsystems gibt. Bögi *et al.* (2003) fanden heraus, dass grundsätzlich eine Korrelierbarkeit von Ergebnissen zwischen der freilebenden Art *Rana temporaria* und dem Modellorganismus *Xenopus laevis* in Bezug auf die Wirkungen von ED besteht.

Die hier vorgestellten Ergebnisse belegen, dass es prinzipiell möglich ist mit dem propagierten Versuchsansatz der Kombination chemischer Fraktionierung und begleitender Analytik sowie der Anwendung spezifischer Bioassays unter Einbeziehung von Reporterassays die Belastung von Gewässern durch ED zu charakterisieren und die wichtigsten ED zu identifizieren. Dennoch zeigte sich, dass die Etablierung von spezifischen Reporterassays für ER und AR, was mit dem hier verfolgten Ansatz nur unzureichend und damit unpraktikabel gelang, hierfür die unabdingbare Voraussetzung ist. Weiterführende Untersuchungen werden dies in naher Zukunft belegen. Eine weitere mögliche Alternative zum Einsatz von *Xenopus* spezifischen homologen Reporterassays für ER und AR wäre nach einer vergleichenden Untersuchung und Bewertung der jeweiligen Spezifität der *Xenopus*-Rezeptoren mit bereits etablierten Transaktivierungs-Assays basierend auf humanen ER und AR *in vitro*-Tests deren Anwendung bei Vorliegen vergleichbarer Spezifitäten, die vermutlich relativ hoch sein dürften. Gerade im Rahmen der BW-PLUS-Förderung sind hierzu einige Projekte durchgeführt worden, die anhand Säuger spezifischer *in vitro*-Transaktivierungsassays die Detektion (anti)östrogener wie (anti)androgener Wirkmechanismen in Umweltmatrices ermöglichen, um diese dann mit den biologischen Wirkungen bei *Xenopus in vitro* wie *in vivo* zu kombinieren. Zur Bestimmung (anti)östrogener Stoffe geeignet wären hierbei die Anwendung der proliferativen Östrogenwirkung bei MCF-7 Zellen (Körner *et al.*, 1998; Eisenbrand *et al.*, 1999), während die Detektion (anti)androgener Wirkmechanismen anhand transient bzw. stabil transfizierter Transaktivierungssysteme in AR defizienten Zelllinien (COS) (Eisenbrand *et al.*, 1999; Eisenbrand *et al.*, 2002) am erfolgversprechendsten erscheint. Der Vergleich dieser bereits standardisierten Säugerzell-Assays mit den noch zu etablierenden Reporterassays bei Amphibien wird wichtige Erkenntnisse liefern, in wieweit die gemeinsamen endokrinen Wirkprinzipien via ER und AR zwischen Mensch und Amphibien konserviert sind und ob so gerade durch die biologischen Wirkungen bei Amphibien auch die Risikobestimmung von (anti)östrogenen und (anti)androgenen ED für den Menschen extrapoliert werden kann.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Der ursprüngliche Ansatz des Projektes die Gewässerbelastung hinsichtlich ED und ihrer Wirkmechanismen auf die Reproduktionsbiologie am Beispiel eines anthropogen durchschnittlich belasteten Gewässers wie der Alb zu bestimmen sowie am Amphibien-Model *Xenopus laevis* die Methodik zu etablieren unbekannte ED zu identifizieren und deren Risikobewertung durchzuführen, konnte zumindest teilweise erfolgreich umgesetzt werden. Es zeigte sich, dass die Kombination von chemischer Analytik und spezifischer Bioassays bei Fraktionen von Gewässerextrakten aussagekräftig angewendet werden kann. Da die ED mit Wirkungen auf die Reproduktion überwiegend über die Rezeptoren, AR und ER, vermittelt werden und hierbei östrogene, antiöstrogene, androgene und antiandrogene Wirkmechanismen aufweisen, ist es die Voraussetzung zur Diskriminierung dieser Wirkmechanismen entsprechende Bioassays - in diesem Fall Reporterassays für die Transaktivierung von AR und ER - zu etablieren. Der in diesem Projekt angewandte Ansatz Hepatocyten-Primärzellkulturen, die sowohl ER wie auch AR enthalten und deren Signaltransduktion vermitteln, transient mit ARE bzw. HRE und daran gekoppeltem Luciferase-Reporter zu transfizieren, hat prinzipiell funktioniert, erwies sich allerdings als nicht praktikabel, da aufgrund der geringen Transfektionsrate je Zellkultur nur wenige Proben bestimmt werden konnten, was einen Einsatz als Screening-Methode unmöglich macht. Der alternative Weg die entsprechenden AR und ER von *Xenopus laevis* zu klonieren und in Rezeptor defiziente Säugerzelllinien zu transfizieren und so spezifische Reporterassays zu etablieren, scheint der zwar umständlichere aber nachhaltig erfolgreichere Weg zu sein, der aktuell beschritten wird.

Mit dem bekannten östrogenen ED BPA wurden als Positivkontrolle sowohl Untersuchungen im Labor zur Bestimmung der biologischen Wirkung auf Sexualdifferenzierung sowie auf die Induktion des östrogenen Biomarkers ER-mRNA bei Kaulquappen im sensiblen Stadium durchgeführt, um eine Risikobewertung über *in vivo*-Ansätze zu ermöglichen. Parallel wurde hierzu die chemische Analytik für BPA etabliert, um die tatsächlich vorhandenen BPA-Konzentrationen in Labor- und Freiland-Proben zu bestimmen. Hierbei zeigte sich, dass BPA in Gewässerextrakten der Alb in Konzentrationen vorhanden ist, die ca. zwei Größenordnungen unterhalb einer östrogenen Wirkung liegen, was nach dem precautionary principle als bedenklich gilt. Da es sich hier nur um eine Einzelsubstanz handelte und ergänzende chemische Analysen belegten, dass daneben noch weitere ED wie z.B. EE sogar in Mengen, die biologisch wirksam sind, vorhanden sind und auch Sterole wie Campesterol und  $\beta$ -Sitosterol sowie o,p'-DDE in gut messbaren Quantitäten die Alb belasten, muss davon ausgegangen werden, dass die Umweltbelastung der Alb durch die Gesamtheit an ED erhebliche biologische Wirkungen aufweist.

Zur Bestimmung der möglichen Wirkmechanismen ((anti)östrogen und (anti)androgen) in Extrakten der Alb wurden hier aufgrund der Unpraktikabilität der oben erwähnten

Reporterassays als Alternative konventionelle Radiorezeptorassays für den Nachweis der Bindung an AR und ER eingesetzt. Eine weitere Möglichkeit wäre der Einsatz von Transaktivierungsassays wie sie für humane ER und AR im Rahmen weiterer BW-PLUS-Projekte eingesetzt bzw. etabliert wurden (Körner *et al.*, 1998; Eisenbrand *et al.*, 1999; 2002), sofern die Spezifitäten der Rezeptoren mit denen bei *Xenopus* vergleichbar sind. Bei den im Rahmen dieses Projektes durchgeführten Untersuchungen zeigte sich, dass neben den erwarteten hohen Werten für Interaktionen mit dem ER unerwartet deutlich auch Inhaltsstoffe vorhanden sind, die an den AR binden und somit potenziell (anti)androgene ED anzeigen. Parallel wurden dieselben Proben-Extrakte auch auf ihre Fähigkeit untersucht in Primärzellkulturen Biomarker zu induzieren. Um Aussagen über die Wirkmechanismen zu erhalten, wurde zum einen der rein östrogene Biomarker ER-mRNA angewendet und zum anderen RBP-mRNA als "neuer" Biomarker, der sowohl (ant)östrogene als auch (anti)androgene Wirkmechanismen detektieren und somit als summarischer Biomarker für alle vier Wirkmechanismen angesehen werden kann, etabliert und bestimmt. Die Bestimmung beider Biomarker, ER- und RBP-mRNA, als biologische Wirkung der Gewässer-Extrakte auf die Primärzell-Kulturen ergab im Vergleich mit den Ergebnissen der Radiorezeptorassays, dass in der Alb überwiegend östrogenartige ED vorhanden sind, die vor allem über die Kläranlagenausläufe eingeleitet werden. Im Vergleich mit den Resultaten des rein östrogenen Biomarkers ER-mRNA, die eine relativ hohe östrogene Potenz der Gewässerbelastung anzeigen, ergeben die Werte für den summarischen Biomarker RBP-mRNA ein deutlich geringeres östrogenes Potenzial, was darauf schließen lässt, dass neben den östrogenen auch androgene Wirkmechanismen in nennenswertem Umfang vorhanden sind. Zur klaren Diskriminierung antiöstrogenen bzw. antiandrogenen ED ist die erfolgreiche Etablierung spezifischer Reporterassays die Voraussetzung, aber es ist zu vermuten, dass auch diese vorhanden sind.

Die innerhalb dieses Projektes durchgeführten Untersuchungen belegen anhand der Kombination von chemischer Analytik und verschiedener spezifischer Bioassays, dass in durchschnittlich anthropogen belasteten Oberflächengewässern wie der Alb ED mit verschiedenen Wirkmechanismen in nennenswertem Umfang vorhanden sind, sodass biologische Wirkungen auf die Reproduktionsbiologie von Wirbeltieren vorhanden sind. Besonders interessant erscheint die Tatsache, dass, wie am Vergleich des rein östrogenen ER-mRNA und des summarischen Biomarkers RBP-mRNA zu ersehen, die östrogenen Hauptwirkungen durch antagonistische androgene Wirkmechanismen wieder reduziert werden, so dass die Summe aus antagonistischen biologischen Wirkungen auf die Tierwelt geringer ausfallen dürfte als die Detektion der spezifischen Wirkmechanismen jeweils alleine erwarten ließe. Ob diese Hypothese, dass sich ED mit verschiedenen Wirkmechanismen tatsächlich zumindest teilweise ausgleichen, verifiziert werden kann und in wieweit dies geschieht, ist Gegenstand laufender und künftiger Untersuchungen.

## 6. Literatur

- Baartrup E, Junge M (2001): Antiandrogenic pesticides disrupt sexual characteristics in the adult male guppy (*Poecilia reticulata*), *Environ. Health Persp.* 109, 1063-1070
- Ben-Jonathan N, Steinmetz R (1998). Xenoestrogens: The emerging story of bisphenol A, *Trends Endocrinol. Metab.* 9, 124-128
- Bergeron RM, Thompson TB, Leonard LS, Pluta L, Gaido KW (1999): Estrogenicity of bisphenol A in a human endometrial carcinoma cell line, *Mol. Cell. Endocrinol.* 150, 179-187
- Blaustein A, Wake D (1990): Declining amphibian population, *Trend. Ecol. Evol.* 5, 203-204
- Blaustein AR, Hoffmann PD, Hokit DG, Kiesecker JF, Walls SC, Hays JB (1994): UV repair and resistance to solar UV-B in amphibian eggs: a link to population declines?, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 91, 1791-1795
- Bögi C, Levy G, Lutz I, Kloas W (2002): Functional genomics and sexual differentiation in amphibians, *Comp. Biochem. Physiol B Biochem. Mol. Biol.* 133, 559-570
- Bögi C, Schwaiger J, Ferling H, Mallow U, Steineck C, Kalbfus W, Negele RD, Lutz I, Kloas W (2003): Endocrine effects of environmental pollution on *Xenopus laevis* and *Rana temporaria*. *Environ. Res.* 93, 195-201.
- Bridges CM (2000): Long-term effects of pesticide exposure at various life stages of the southern leopard frog (*Rana sphenoccephala*), *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 39, 91-96
- Byrne BC, Li JJ, Sninsky J, Poiesz BJ (1988): Detection of HIV-1 RNA sequences by *in vitro* DNA amplification, *Nucleic Acids Res.* 16, 4165-4170
- Calabrese ED (2001): Estrogen and related compounds: biphasic dose responses, *Crit. Rev. Toxicol.* 31, 503-515
- Carey C, Heyer WR, Wilkinson J, Alford RA, Arntzen JW, Halliday T, Hungerford L, Lips KR, Middleton EM, Orchard SA, Rand AS (2001): Amphibian declines and environmental change: Use of remote-sensing data to identify environmental correlates, *Conserv. Biol.* 15, 903-913
- Carey C (2000): Infectious disease and worldwide declines of amphibian populations with comments on emerging in coral reef organisms and in humans, *Environ. Health Perspect.* 108, 143-149
- Carey C, Bryant C (1995): Possible interactions among environmental toxicants, amphibian development and decline of amphibian populations, *Environ. Health Perspect.* 103, 13-17
- Colborn T, Clement C (1992): Chemically induced alterations in sexual and functional development: the wildlife/human connection, Princeton Scientific Publishing, Princeton
- Colborn T, vom Saal FS, Soto AM (1993): Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans, *Environ. Health Perspect.* 101, 378-384
- Colborn T, Dumanowski D, Myers JP (1996): "Our Stolen Future." Little Brown & Co., London

- Corthésy B, Claret FX, Wahli W (1990): Estrogen receptor level determines sex-specific *in vitro* transcription from the *Xenopus* vitellogenin promotor, Proc. Natl. Acad. Sci. 87, 7878-7882
- Crisp TM, Clegg ED, Cooper RL, Wood WP, Anderson DG, Baetcke KP, Hoffmann JL, Morrow MS, Rodier DJ, Schaeffer JE, Touart LW, Zeeman MG, Patel YM (1998): Environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis. Environ. Health Perspect. 106, 11-56.
- De Guise S, Martineau D, Beland P, Fournier M (1995): Possible mechanisms of action of environmental contaminants on St. Lawrence beluga whales (*Delphinapterus leucas*), Environ. Health Perspect. 103, 73-77.
- Deuchar E (1975): *Xenopus* – The South african clawed frog, John Wiley & Sons, London
- Döhler KD, New MI (1989): Sexualentwicklung, in: Endokrinologie (Hesch RD, Ed.), pp. 501-512, Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore
- Dodds EC, Lawson W (1936): Synthetic oestrogenic agents without the phenanthrene nucleus, Nature 137, 996
- Dorn PB, Chou CS, Gentempo JJ (1987): Degradation of bisphenol A in natural waters, Chemosphere 16, 1501-1507
- Dosch R, Gawantka V, Delius H, Blumenstock C, Niehrs C (1997): Bmp4 acts as a morphogen in dorsoventral mesoderm patterning in *Xenopus*, Development 124, 2325-2334
- Dostal D, Rothblum K, Bahu K (1994): An improved method for absolute quantification of mRNA using multiplex polymerase chain reaction, Anal. Biochem. 223, 239-250
- Eisenbrand G, Seng D, Mußler B (1999). Erfassung der hormonellen Aktivität von Lebensmittelinhaltsstoffen und Umweltkontaminanten mittels funktioneller Reporterassays. Abschlußbericht BW-PLUS, <http://bwplus.fzk.de/berichte/SBer/PUGU96017SBer.pdf>
- Eisenbrand G, Guth S, Böhm S, Knerr C, Mußler B (2002). Identifizierung und Charakterisierung von antiandrogen aktiven Fremdstoffen mittels Transaktivierungsassays und molecular modeling Verfahren. Abschlußbericht BW-PLUS, <http://bwplus.fzk.de/berichte/ZBerbwb9902.pdf>
- Euling SY, Kimmel CA (2001): Developmental stage sensitivity and mode of action information for androgen agonists and antagonists, Sci.Total Environ. 274, 103-113
- European Commission (1996): European workshop on the impact of endocrine disruptors on human health and wildlife, Weybridge, 2-4 Dec. 1996, Report Eur 17549, Environment and Climate Research Programme, DG XII, European Commission
- Flower DR (1996): The lipocalin protein family: Structure and function, Biochemical Journal 318, 1-14
- Fox GA (2001): Wildlife as sentinels of human health effects in the Great Lakes-St. Lawrence basin, Environ. Health Perspect. 109(6), 853-861

- Fürhacker M, Scharf S, Weber H (2000): Bisphenol A: emissions from point sources, *Chemosphere* 41, 751-756
- Funk W, Dammann V, Donnevert G (1992): *Qualitätssicherung der Analytischen Chemie*, VCH, Weinheim
- Funkenstein B (2001): Developmental expression, tissue distribution and hormonal regulation of fish (*Sparus aurata*) serum retinol-binding protein, *Comp. Biochem. Physiol. B* 129, 613-622
- Gagné F, Blaise C, Salazar M, Salazar S, Hansen PD (2001): Evaluation of estrogenic effects of municipal effluents to the freshwater mussel *Elliptio complanata*, *Comp. Biochem. Physiol. C - Tox. & Pharm.* 128, 213-225
- Gallien L (1974): Intersexuality, in: *Physiology of the amphibia* (B. Lofts, Ed.), Vol 2, 523-549, Academic Press New York
- Gray KM, Janssens PA (1990): Gonadal hormones inhibit the induction of metamorphosis by thyroid hormones in *Xenopus laevis* tadpoles *in vivo*, but not *in vitro*, *Gen.Comp Endocrinol.* 77, 202-211
- Gray MA, Metcalfe CD (1997): Induction of testis-ova in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to p-nonylphenol, *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 1082-1086
- Gunderson MP, LeBlanc GA, Guillette LJ Jr. (2001): Alterations in sexually dimorphic biotransformation of testosterone in juvenile American alligators (*Alligator mississippiensis*) from contaminated lakes, *Environ. Health Perspect.* 109, 1257-1264
- Harris HA, Bapat AR, Gonder DS, Frail DE (2002): The ligand binding profiles of estrogen receptors alpha and beta are species dependent, *Steroids* 67, 379-384
- Hayes TB (1998): Sex determination and primary sex differentiation in amphibians: genetic and developmental mechanisms, *J. Experiment. Zool.* 281, 373-399
- Hecker M, Tyler CR, Hoffmann M, Maddix S, Karbe L (2002): Plasma biomarkers in fish provide evidence for endocrine modulation in the Elbe River, Germany, *Environ. Sci. Technol.* 36, 2311-2321
- Heemken OP, Reincke H, Stachel B, Theobald N (2001): The occurrence of xenoestrogens in the Elbe river and the North Sea, *Chemosphere* 45, 245-259
- Hewitt LM, Parrott JL, Wells KL, Calp MK, Biddiscombe S, McMaster ME, Munkittrick KR, Van der Kraak GJ (2000): Characteristics of ligands for the Ah receptor and sex steroid receptors in hepatic tissues of fish exposed to bleached kraft mill effluent, *Environ. Sci. Technol.* 34, 4327-4334
- Hilken G, Dimigen J, Iglauer F (1995): Growth of *Xenopus laevis* under different laboratory rearing conditions, *Laboratory Animals* 29, 152-162
- Hiort O, Holterhus PM (2000): The molecular basis of male sexual differentiation, *Eur. J. Endocrinol.* 142, 101-110
- Jobling S, Nolan M, Tyler CR, Brighty G, Sumpter JP (1998): Widespread sexual disruption in wild fish, *Environ. Sci. Technol.* 32, 2498-2506

- Jobling S, Sumpter J (1993): Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: an *in vitro* study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes, *Aquatic Toxicol.* 27, 361-372
- Kelce WR, Wilson EM (1997): Environmental antiandrogens: developmental effects, molecular mechanisms, and clinical implications. *J. Mol. Med.* 75(3), 198-207
- Kelley DB (1996): Sexual differentiation in *Xenopus laevis*, in: *The biology of Xenopus* (Tinsley RC, Kobel HR, Eds.), pp. 143-193, Clarendon Press, Oxford
- Kime D (1998): *Endocrine disruption in fish*, Kluwer Academic Publishers, Boston-Dordrecht-London
- Kirk LA, Tyler CR, Lye CM, Sumpter JP (2002): Changes in estrogenic and androgenic activities at different stages of treatment in wastewater treatment works, *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 972-979
- Klecka GM, Gonsior SJ, West RJ, Goodwin PA, Markham DA (2001): Biodegradation of bisphenol a in aquatic environments: River die-away, *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 2725-2735
- Kloas W (2002): Amphibians as a model to study endocrine disruptors, *Int. Rev. Cytol.* 216, 1-57
- Kloas W, Bögi C, Levy G, Engels B, Lutz I (2000): Amphibians as a model to study endocrine disruptors: an additional risk of environmental pollution in aquatic ecosystems?, *Berichte des IGB* 10, 131-140
- Kloas W, Einspanier R, Lutz I (1999): Amphibians as a model to study endocrine disruptors II: Estrogenic activity of environmental chemicals *in vitro* and *in vivo*, *Sci. Total Environ.* 225, 59-68
- Kloas W, Levy G, Opitz R, Bögi C, Würtz S, Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Van Ballegoy C, Urbatzka R, Jagnytsch O, Lutz I (2003): Wirkungen endokrin wirksamer Substanzen auf aquatische Tiere. In : *Hormonell wirksame Stoffe und Pharmaka in Gewässern - 40. Tutzing-Symposium*. VCH-Wiley, 185-196.
- Körner W, Schuller W, Hagenmaier H, Hanf V (1998): Entwicklung und praktische Durchführung eines einfachen Screeningsystems für estrogenartig wirkende Umweltchemikalien. Abschlußbericht BW-PLUS, <http://bwplus.fzk.de/berichte/SBer/PUG95004SBer.pdf>
- Kruskal WH, Wallis WA (1952): Use of ranks in one-criterion variance analysis, *J. Amer. Stat. Ass.* 47, 583-621
- Levy G, Lutz I, Opitz R, Krüger A, Kloas W (2004a): Bisphenol A induces feminization in *Xenopus laevis* tadpoles. *Environ. Res.* 94, 102-111.
- Levy G, Lutz I, Krüger A, von Tümpling W, Kloas W (2004b): Retinol binding protein as a biomarker to assess endocrine disrupting compounds in the environment. *Anal. Bioanal. Chemistry* 378, 676-683.



- Lindholst C, Pedersen KL, Pedersen SN (2000): Estrogenic response of bisphenol A in a rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Aquat. Toxicol.* 48, 87-94
- Lutz I, Kloas W (1999): Amphibians as a model to study endocrine disruptors I: Environmental pollution and estrogen receptor binding, *Sci. Total. Environ.* 225, 49-57
- McKearin DM, Shapiro DJ (1988): Persistent estrogen induction of hepatic *Xenopus laevis* serum retinol binding protein mRNA, *J. Biol. Chem.* 263, 3261-3265
- McKearin DM, Barton MC, Keller MJ, Shapiro DJ (1987): Estrogens induce transcription of the *Xenopus laevis* serum retinol binding protein gene, *J. Biol. Chem.* 11, 4939-4942
- McLachlan, J. A. (2001). Environmental signaling: What embryos and evolution teach us about endocrine disrupting chemicals. *Endocr. Rev.* 22, 319-341.
- Miyata S, Koike S, Kubo T (1999): Hormonal reversal and the genetic control of sex differentiation in *Xenopus*, *Zool. Sci.* 15, 335-340
- Nieuwkoop PD, Faber J (1994): Normal table of *Xenopus laevis* Daudin, North-Holland, Amsterdam
- Norris DO (1997): Vertebrate Endocrinology, Academic Press, San Diego
- Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Tillmann M, Markert B (2000): Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (*Mollusca: Gastropoda*) in the laboratory. Part I: Bisphenol A and octylphenol as xeno-estrogens, *Ecotoxicology* 9, 383-397
- Opitz R, Levy G, Bögi C, Lutz I, Kloas W (2002): Endocrine disruption in fish and amphibians, *Recent Res. Devel. Endocrinol.* 3, 127-170.
- Purdom C, Hardiman P, Bye V, Eno N, Tyler C, Sumpter J (1994): Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works, *Chem. Ecol.* 8, 275-285
- Rabelo EM, Tata JR (1993): Thyroid hormone potentiates estrogen activation of vitellogenin genes and autoinduction of estrogen receptor in adult *Xenopus* hepatocytes, *Mol. Cell Endocrinol.* 96, 37-44
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467
- Sheehan DM (2000): Activity of environmentally relevant low doses of endocrine disruptors and the bisphenol A controversy: initial results confirmed, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 224, 57-60
- Sonnenschein C, Soto AM (1998): An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists, *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 65 (1-6), 143-150
- Snyder ST, Keith TL, Verbrugge DA, Snyder EM, Gross TS, Kannan K, Giesy JP (1999): Analytical Methods for Detection of Selected Estrogenic Compounds in Aqueous Mixtures – *Environ. Sci. Technol.* 33, 2814-2820
- Sohoni P, Tyler CR, Hurd K, Caunter J, Hetheridge M, Williams T, Woods C, Evans M, Toy R, Gargas M, Sumpter JP (2001): Reproductive effects of long-term exposure to bisphenol A in the fathead minnow (*Pimephales promelas*), *Environ. Sci. Technol.* 35, 2917-2925

- Sperry TS, Thomas P (1999): Characterization of two nuclear androgen receptors in Atlantic croaker: Comparison of their biochemical properties and binding specificities, *Endocrinology* 140, 1602-1611
- Staples CA, Dorn PB, Klecka GM, O'Block ST, Harris LR (1998): A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A, *Chemosphere* 36, 2149-2173
- Stone CM, Watkinson RJ (1983): Diphenylol propane: An assessment of ready biodegradability, Report SBGR.83.425, Sittingbourne Research Centre, Kent, England
- Sumpter JP (1997): Environmental control of fish reproduction: a different perspective, *Fish Physiol. Biochem.* 17, 25-31
- Sumpter JP, Jobling S (1993): Male sexual development in "a sea of oestrogen" – *Lancet*, 342(8863), 124-125
- Toft G, Baatrup E (2001): Sexual characteristics are altered by 4-tert-octylphenol and 17 beta-estradiol in the adult male guppy (*Poecilia reticulata*), *Ecotox. Environ. Safety* 48, 76-84
- Tyler CR, Jobling S, Sumpter JP (1998): Endocrine disruption in wildlife: a critical review of the evidence, *Crit. Rev. Toxicol.* 28, 319-361
- Varriale B, Tata JR (1990): Autoinduction of estrogen receptor is associated with FOSP-1 mRNA induction by estrogen in primary cultures of *Xenopus* oviduct cells, *Mol. Cell. Endocrinol.* 71, R25-R31
- Villalpando I, Merchant-Larios H (1990): Determination of the sensitive stages for gonadal sex-reversal in *Xenopus laevis* tadpoles. *Int. J. Biol.* 34, 281-285.
- Vos J, Dybing E, Greim H, Ladefoged O, Lambré C, Tarazona J, Brandt I, Vethaak A (2000): Health effects of endocrine-disruption chemicals on wildlife, with special reference to the European situation, *Crit. Rev. Toxicol.* 30, 71-133
- Wallace H, Badawy G, Wallace B (1999): Amphibian sex determination and sex reversal, *Cell. Mol. Life. Sci.* 55, 901-909
- Wang AM, Doyle MV, Mark DF (1989): Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 9717-9721
- Weber E (1986): *Grundriß der biologischen Statistik*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- Weiler I, Lew D, Shapiro D (1987): The *Xenopus laevis* estrogen receptor: Sequence homology with human and avian receptors and identification of multiple estrogen receptor messenger ribonucleic acids, *Mol. Endocrinol.* 1, 355-362
- Welshons WV, Nagel SC, Thayer KA, Judy BM, Vom Saal FS (1999): Low-dose bioactivity of xenoestrogens in animals: fetal exposure to low doses of methoxychlor and other xenoestrogens increase adult prostate size in mice, *Toxicol. Ind. Health* 15, 12-25
- West RJ, Goodwin PA, Klecka GM (2001): Assessment of the ready biodegradability of bisphenol A, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 67, 106-112

- Wijayarathne AL, Nagel SC, Paige LA, Christensen DJ, Norris JD, Fowlkes DM, McDonnell DP (1999): Comparative analyses of mechanistic differences among antiestrogens, *Endocrinology* 140, 5828-5840
- Witschi E, Allison J (1950): Responses of *Xenopus* and *Alytes* to the administration of some steroid hormones, *Anat. Rec.* 108, 589-590
- Witschi E (1971): Mechanisms of sexual differentiation, in: *Hormones in Development* (Hamburg M, Barrington E, Eds.), pp. 601-618, Appleton Century Crofts, New York
- Yokota H, Tsuruda Y, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Nakazono A, Honjo T, Kobayashi K (2000): Effect of bisphenol A on the early life stage in Japanese medaka (*Oryzias latipes*), *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 1925-1930
- Zacharewski, T (1998). Identification and assessment of endocrine disruptors: limitations of *in vivo* and *in vitro* assays. *Environ. Health Perspect.* 106, 577-582.

## 7. Publikation der Ergebnisse

### Peer reviewed papers

- Bögi, C., Levy, G., Lutz, I., and Kloas, W. (2002): Functional genomics and sexual differentiation in amphibians. *Comp. Biochem. Physiol. B* 133 (4), 559-570.
- Kloas, W. (2002): Amphibians as model for the study of endocrine disruptors. *Int. Rev. Cytol.* 216, 1-57.
- Levy, G., Lutz, I., Opitz, R., Krüger, A., and Kloas, W. (2004a): Bisphenol A induces feminization in *Xenopus laevis* tadpoles. *Environ. Res.* 94, 102-111.
- Levy, G., Lutz, I., Krüger, A., von Tümpling, W., and Kloas, W. (2004b): Retinol binding protein as a biomarker to assess endocrine disrupting compounds in the environment. *Anal. Bioanal. Chemistry* 378, 676-683.
- Lutz, I., Blödt, S., and Kloas, W. (2004): Induction of estrogen receptor-mRNA in primary cultured hepatocytes of *Xenopus laevis* as estrogenic biomarker: Application in biomonitoring. *Gen. Comp. Endocrinol.* (submitted)
- Mosconi, G., Carnevali, O., Franzoni, M.F., Cottone, E., Kloas, W., Lutz, I., Yamamoto, K., Kikuyama, S., Polzonetti-Magni, A.M. (2002): Environmental estrogens and reproductive biology in amphibians. *Gen. Comp. Endocrinol.* 126, 125-129.

### Reviews

- Opitz, R., Levy, G., Bögi, C., Lutz, I., and Kloas, W. (2002): Endocrine disruption in fishes and amphibians. Transworld Research Network, *Recent Res. Devel. Endocrinol.* 3, 127-170.

### International papers/communications

- Kloas, W., Levy, G., Bögi, C., Opitz, R., and Lutz, I. (2002a): Effects of environmental chemicals on reproductive biology of amphibians. *Proceedings of 2nd Status Seminar Endocrine Disrupters 2nd - 4th April 2001, Berlin, Germany*, <http://www.status-umwelthormone.de>, 55-58.
- Kloas, W., Bögi, C., Levy, G., Würtz, S., and Lutz, I. (2002b): Sexual differentiation in amphibians. *Proceedings of the 21st Conference of the European Comparative Endocrinologists (Bonn, Germany, 26-30 August, 2002)*, Monduzzi Editore, 87-90.
- Levy, G., Bögi, C., Lutz, I., Opitz, R., and Kloas, W. (2002a): Amphibians as model to study endocrine disruptors: I. *In vivo* effects on reproductive biology. *Proceedings of 2nd Status-Seminar Endocrine Disrupters 2nd - 4th April 2001, Berlin, Germany*, <http://www.status-umwelthormone.de>, 99-102.

Levy, G., Lutz, I., Opitz, R., Krüger, A., and Kloas, W. (2002b): Bisphenol A induces feminization in *Xenopus laevis* tadpoles via estrogen-response systems. . *Proceedings of the 21st Conference of the European Comparative Endocrinologists (Bonn, Germany, 26-30 August, 2002)*, Monduzzi Editore, 91-94.

### **Buchbeiträge**

Kloas, W., and Lutz, I. (2001): „Endocrine Disruptors“: Umweltchemikalien mit endokriner Wirkung. In: Schutz und Ökologie von Seen (eds. Dokulil, M., Hamm, A., and Kohl, J. G.). UTB, 280-291.

Kloas, W., Levy, G., Opitz, R., Bögi, C., Würtz, S., Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Van Ballegoy, C., Urbatzka, R., Jagnytsch, O., and Lutz, I. (2003): Wirkungen endokrin wirksamer Substanzen auf aquatische Tiere. In : Hormonell wirksame Stoffe und Pharmaka in Gewässern 40. Tutzing-Symposium. VCH-Wiley, 185-196.

### **National referierte Artikel**

Kloas, W. (2001): Wirkungen von endokrin wirksamen Stoffen (endocrine disruptors) auf Fische und Amphibien. *Wasser und Boden*, 1+2, 16-21.