

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplombiologe Markus Islinger
aus: Mannheim

Tag der mündlichen Prüfung: 31.05.2001

**Nachweis Estrogen-induzierter Genexpression
in Fischen und Hepatocytenprimärkulturen
als Marker für
endokrin wirksame Substanzen in der Umwelt**

Gutachter: HD Dr. Thomas Braunbeck
Zoologisches Institut, Universität Heidelberg
Prof. Dr. Dr. Alfred Völkl
Institut für Anatomie und Zellbiologie II, Universität Heidelberg

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Zoologischen Institut der Universität Heidelberg im Zeitraum von August 1997 bis Januar 2001 erstellt und vom Umweltbundesamt unter der Projektnummer 216 02 001/01 gefördert.

Mehr als drei Jahre sind eine zu lange Zeit, um allen Personen, die aktiv oder passiv zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben gebührend zu danken. Trotzdem will ich versuchen all den Personen, die mir in den letzten Jahren mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben, mein Dankeschön auszusprechen; und sollte ich jemanden vergessen haben, so möge er mir das bitte nachsehen, denn es war sicherlich nicht böse gemeint.

Zuerst möchte ich mich bei meinem Betreuer Herrn HD Dr. Thomas Braunbeck für die Möglichkeit bedanken, diese Arbeit hier am Zoologischen Institut in Heidelberg anzufertigen. Er hat mir immer den nötigen Freiraum dafür gelassen, die vorliegende Arbeit nach meinen Vorstellungen durchzuführen, war mir aber immer wenn es möglich war mit Rat und Tat zur Seite gestanden.

Herrn Prof. Dr. Dr. Alfred Völkl danke ich nicht nur für die Übernahme des Korreferats, sondern ganz besonders für die stetige Diskussionsbereitschaft, die Hilfe bei der Erstellung zahlreicher Manuskripte und die Möglichkeit in seinem Labor zu arbeiten und zu lernen.

Bei Frau HD Dr. Monika Hassel möchte ich mich für die unkomplizierte Bereitstellung ihrer Räumlichkeiten für viele der S1-Experimente aus dieser Dissertation bedanken.

Mein besondere Dank gilt meinen drei eifrigen Korrekturlesern Susanne Knörr, Sabine Buschhorn und Thorsten Uhde; sie waren nicht nur bei dieser Gelegenheit, sondern immer wenn man sie brauchte, bereit sich für diese Arbeit einzusetzen; kurz – drei, auf die man sich verlassen kann.

Allen anderen, die mich tatkräftig auf dem Weg zu dieser Dissertation unterstützt haben, bin ich zu Dank verpflichtet, namentlich Daniel Willimski, Sascha Pawlowski, Bernhard Wetterauer, Andreas Schnurstein, Kathrin Bartels, Maria Strmać, Thomas Berbner und nicht zuletzt auch Sabine Tittes.

Eric Leist werde ich ganz bestimmt nicht vergessen, denn ohne seinen Fachverstand in Fragen der Fischkultur wären viele Versuche nicht möglich gewesen.

Frau Adam gilt mein Dank für ihren Einsatz bei den Fotoarbeiten.

Last but not least, allen anderen die einen Teil ihres Lebens am Zoologischen Institut verbringen oder verbracht haben, besonders Anne Sagner, denn ohne ihren ehrlichen Sinn für Humor wären die letzten Monate nur halb so witzig gewesen; aber vergessen werde ich sicherlich auch niemals Ute Bieberstein, Jens Konrad, Henner Hollert, Uta Paulsen, Andy Rastall, Alex Froschauer, Beate Kehmink, Thomas Wehe, Marcus Bowhuis, Dirk Brandis, Ute Karaus, Astrid Soeth und Günter Klein.

Und natürlich auch eine Dankeschön an meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 <i>In vivo</i> - und <i>In vitro</i> -Detektionsmethoden für Estrogen-wirksame Substanzen	4
1.2 Physiologische und molekulare Charakteristika der Estrogen-regulierten Gene Vitellogenin, Estrogenrezeptor und Choriogenin/Zona Pellucida Protein	6
1.3 Ausrichtung und Ziele der Arbeit	12
2. Material und Methoden	15
2.1 Versuchstierhaltung und Exposition gegenüber (Xeno-)estrogenen	15
2.1.1 Fischarten und Hälterungsbedingungen	15
2.1.2 Testsubstanzen	17
2.1.3 Systeme zur <i>In vivo</i> -Exposition von (Xeno-)estrogenen	19
2.1.4 <i>In-vitro</i> -Exposition gegenüber (Xeno-)estrogenen: Hepatocytenprimärkulturen aus der Regenbogenforelle (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	21
2.1.5 Abschätzung der Zytotoxizität von untersuchten Abwässern an Hepatocyten	23
2.2 Probenaufbereitung und Lagerung	24
2.2.1 Plasmapräparation	24
2.2.2 RNA-Isolation	24
2.3 Identifikation, Klonierung und <i>In-vitro</i> -Transkription Estrogen-regulierter Gene	25
2.3.1 Identifikation eines Medaka-Vitellogenin-cDNA-Fragments	25
2.3.2 Identifikation einer Estrogenrezeptor α -cDNA des Zebraärbblings	26
2.3.3 Konstruktion zweier Vitellogenin-cDNAs des Zebraärbblings aus Expressed Sequence-Tags	26
2.3.4 Klonierung von PCR-Produkten in pCR [®] IITOP0-Vektoren	27
2.3.5 Klonierung von Vg1.1 in den Expressionsvektor pGem Zf7(-)	28
2.3.6 Hitzetransformation und Kultur der <i>E. coli</i> Stämme AG1, JM109 und TOP10F'	29
2.3.7 Transkription von Digoxigenin (DIG) -markierten cRNA-Sonden	29
2.4 Detektionssysteme	30
2.4.1 ELISA für die Detektion von Vitellogenin im Kulturüberstand von Hepatocyten aus der Regenbogenforelle	30

2.4.2	Quantifikation von 17 β -Estradiol im Zellkulturüberstand	32
2.4.3	Northern-Dot-Blot/Ribonuclease-Protection-Assay	32
2.4.4	Northern Blot	33
2.4.5	Semiquantitative RT-PCR	34
2.5	Elektronenmikroskopie	36
2.6	Anhang zu Material und Methoden	37
2.6.1	Lösungen.....	37
2.6.2	Agarosegelelektrophorese	38
2.6.3	Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA	39
2.6.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	39
2.6.5	Einsatz von Restriktionsenzymen	40
3.	Ergebnisse	43
3.1	Entwicklung und Validierung von Methoden zur Detektion der Expression Estrogen-regulierter Gene	43
3.1.1	Spezifität von pSG5Vg1.1 für Vitellogenin-mRNA der Regenbogenforelle in Northern-Blot-Experimenten	43
3.1.2	Quantifizierung der Vitellogenin-mRNA der Regenbogenforelle durch Verwendung des Vg1.1-sense-Transkripts als Standard in der Dot-Blot-Hybridisierung	44
3.1.3	Semiquantitativer Nachweis der Vitellogenin-mRNA der Regenbogenforelle durch RT-PCR – Sensitivierung durch Verwendung von Enhancersubstanzen	45
3.1.4	Klonierung einer Teilsequenz des Medaka-Vitellogenins	47
3.1.5	Klonierung einer partiellen Sequenz des Estrogenrezeptor α des Zebraärbhlings	50
3.1.6	Konstruktion zweier Vitellogeninsequenzen des Zebraärbhlings aus Expressed Sequence Tags (ESTs)	52
3.2	<i>In vitro</i>-Untersuchungen an isolierten Hepatocyten aus der Regenbogenforelle (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	55
3.2.1	Zeitlicher Verlauf der Vitellogenin-mRNA-Expression in Hepatocytenprimärkulturen aus der männlichen Regenbogenforelle nach Stimulation mit 1 μ M 17 β -Estradiol	55
3.2.2	Zusatz von Mediensupplementen	56
3.2.3	Einfluss von Temperatur und Zeit auf die Vitellogeninexpression	57
3.2.4	Interassay-Variabilität	62
3.2.5	Induktion der Vitellogeninsynthese in Kontrollkulturen	63
3.2.6	Einfluss der Regenerationszeit von Hepatocyten aus der Regenbogenforelle auf die Induzierbarkeit der Vitellogeninsynthese	64
3.2.7	Bestimmung des estrogenen Potentials von umweltrelevanten Verbindungen in Dot Blot RPA und RT-PCR	65

3.2.8	Verwendung des Vitellogenin-mRNA-Assay für das Screening auf endokrin wirksame Abwässer	68
3.3	<i>In vivo</i>-Untersuchungen zur estrogenen Aktivität von umweltrelevanten Chemikalien	72
3.3.1	<i>In vivo</i> -Untersuchungen an der Regenbogenforelle - Ein Vergleich zwischen der Expression von Vitellogenin- und Estrogenrezeptor-mRNA und der Sekretion von Vitellogenin in das Blutplasma männlicher Regenbogenforellen nach einmaliger Injektion von 1 mg/kg 17 β -Estradiol	73
3.3.2	<i>In vivo</i> -Untersuchungen am Medaka (<i>Oryzias latipes</i>) – Exposition von (Xeno-)estrogenen unter semistatischen und Durchflussbedingungen	75
3.3.3	<i>In vivo</i> -Untersuchungen am Zebrafisch (<i>Danio rerio</i>) – Auswirkung der Exposition von (Xeno-)estrogenen auf Genexpression und Ultrastruktur von Leber und Hoden	78
3.3.4	Expression und Induzierbarkeit von Vitellogenin, ER α , ER β und ZP2 während der Larval- und Juvenilentwicklung des Zebrafisches	87
4.	Diskussion	91
4.1	Entwicklung von Nachweismethoden für Estrogen-regulierte Gene	91
4.2	Induktion von Vitellogenin und Estrogenrezeptor in isolierten Hepatocyten aus der Regenbogenforelle	96
4.2.1	Allgemeine Kulturbedingungen	96
4.2.2	Temperatureffekte bei der Vitellogeninexpression	97
4.2.3	Sensitivität der Vitellogeninexpression gegenüber den ausgewählten Monosubstanzen	98
4.3	<i>In vivo</i> -Expression der estrogen-regulierten Gene von Estrogenrezeptor, Vitellogenin und Choriogenin H	102
4.3.1	Kinetik der Estradiol-induzierten mRNA- und Proteinsynthese von Vitellogenin <i>in vivo</i> in der Regenbogenforelle	102
4.3.2	Estrogene Sensibilität von Medaka und Zebrafisch <i>in vivo</i> gegenüber (Xeno-)estrogenen	103
4.3.3	Wirkung von 17 α -Ethinylestradiol auf den Hoden adulter Zebrafische	112
4.3.4	Expression und Induzierbarkeit reproduktionsrelevanter Gene im Verlauf der Entwicklung des Zebrafisches	113
5.	Ausblick auf weiteren Forschungsbedarf	115

6. Zusammenfassung	119
7. Literatur	121
8. Publikationen und Tagungsbeiträge	147
9. Abkürzungen	149

1. Einleitung

Proteine aus der Superfamilie der nukleären Rezeptoren greifen regulierend in nahezu alle fundamentalen biologischen Prozesse wie Entwicklung und Homöostase aber auch Zellproliferation und Gewebedifferenzierung ein. Ihre Funktion als Regulatoren der transkriptionellen Aktivität ihrer Zielgene üben nukleäre Rezeptoren in der Regel nach Bindung eines meist aus Isoprenuntereinheiten aufgebauten Moleküls aus, indem sie an spezifische "Hormon-Responsive" Elemente der DNA binden und so die Interaktion zwischen der RNA-Polymerase II und dem Zielgen ermöglichen (Whitfield et al. 1999). Eine korrekte Steuerung der Aktivität der Zielgene setzt folglich ein störungsfreies Zusammenspiel zwischen Hormon und Rezeptor im Rahmen endogen kontrollierter, enger Konzentrationsbereiche voraus. Aus diesen Gründen wächst mit der zunehmenden Zahl anthropogen freigesetzter Substanzen (mehr als 100.000 chemische Verbindungen sind im europäischen Verzeichnis existierender chemischer Substanzen verzeichnet, Zeemann et al. 1995) das Potential der Existenz sogenannter endokriner Disruptoren in der Umwelt, die auf direktem oder indirektem Weg schädigend in diese Regulationsgefüge eingreifen. Ausgehend von dieser Hypothese wurde von der US Environmental Protection Agency 1996 folgende Definition für Substanzen mit Einfluss auf die Hormonsysteme von Organismen, sogenannter endokriner Disruptoren, eingeführt:

"Endocrine disrupting chemicals are exogenous agents that interfere with production, release, transport, metabolism, binding, action, or elimination of the natural hormones in the body responsible for the maintenance of homeostasis and the regulation of developmental processes (Kavlock et al. 1996, US EPA sponsored-workshop)."

Während die Existenz einer negativen Einwirkung anthropogener Substanzen für die meisten Mitglieder der Superfamilie der Steroidrezeptoren aufgrund ihrer Beteiligung an der Regulation sehr komplexer biologischer Prozesse, z.B. der Einhaltung der Homöostase oder Steuerung von Differenzierungsvorgängen, bisher spekulativ ist, liegen für die Beeinflussbarkeit des Estrogen- bzw. Androgenregulierten Reproduktionssystems durch exogene hormonähnliche Verbindungen – sogenannte Xenöstrogene - konkrete Hinweise vor. Im natürlichen System bestehen für die Reproduktionssysteme eindeutige Unterschiede zwischen männlicher und weiblicher Physiologie und sind folglich leicht messbar. Neben ihrer Funktion als Signalsubstanzen bei der Differenzierung der Geschlechtsorgane und bei Steuerung der weiblichen Reproduktionsphysiologie wurden Einflüsse von Östrogenen auch auf neuronale Entwicklung (McEwen und Alves 1999, Tena-Sempere et al. 2000), Thymusentwicklung (Forsberg 2000, Yellayi et al. 2000) sowie die Osteoblasten-Differenzierung (Bodine et al. 1998, Migliaccio et al. 2000) nachgewiesen. Bei der Gehirnentwicklung wurden neben der Beteiligung von Östrogenrezeptoren bei der sexuellen Differenzierung der Hypothalamusregion (Kuhnemann et al. 1994, Simerly et al. 1997) auch neurotrophe Wirkung auf die Differenzierung des Vorderhirns, der Hippocampusregion und den Bereich der Raphe Nuclei gefunden (Toran-Allerand et al. 1996, McEwen und Alves 1999), so dass eine Beteiligung an grundlegenden biologischen Funktionen zu vermuten ist.

Bereits in den 1930er Jahren wurde im Zuge der Suche nach wirksamen Kontrazeptiva das estrogene Potential zahlreicher synthetischer Substanzen, darunter auch Diethylstilbestrol und Alkylphenole,

erkannt (Dodds und Lawson 1936, 1938). Aufgrund der Zunahme von Veröffentlichungen über Reproduktionsstörungen bei Wildtieren und Menschen im Verlauf der 1980er und 1990er Jahre wurde folglich die Hypothese der Estrogen-wirksamen anthropogenen Substanzen in der Umwelt formuliert. Anzeichen für eine Störung der endokrinen Reproduktionssysteme liegen dabei für alle Vertebratenklassen, einschließlich des Menschen, vor: In mehreren unabhängigen epidemiologischen Studien zur Fertilität von Männern wurde ein Rückgang von Spermienqualität und -volumen beobachtet (Carlson et al. 1992, Auger et al. 1995, Irvine et al. 1996, Younglai et al. 1998, Swan und Elkin 1999), wobei die statistische Absicherung derartiger Daten umstritten ist (Bromwich et al. 1994, Parazzini et al. 1998, Saidi et al. 1999). Für die Xenoestrogen-Hypothese sprechen jedoch auch die in den letzten Jahrzehnten gestiegene Rate von Hodenkrebs und Kryptorchismus (Toppari et al. 1996, McLachlan et al. 1998, Weidner et al. 1998, Juberg 2000, Ohlsen und Hardell 2000). Als weitere Vertreter für die Klasse der Säugetiere wurden auch bei baltischen Grau- und Ringelrobben in zunehmenden Maße Reproduktionsstörungen und Sterilität beobachtet, die mit hohen PCB-Konzentrationen – einer Stoffgruppe mit schwach Estrogen-wirksamen Substanzen – in Verbindung gebracht wurden, die in ihrem Gewebe gemessen werden konnten (Bergman and Olsson 1985; Roos et al. 1998). Ebenso wurde eine Parallelität zwischen dem Zusammenbruch von Otterpopulationen innerhalb Europas und hohen PCB-Konzentrationen beobachtet (Keymer et al. 1988, Leonards 1996).

Diesen Beobachtungen entsprechend konnte auch bei baltischen Seeadlern eine negative Korrelation zwischen Reproduktionserfolg und PCB-Konzentrationen in den Eiern gefunden werden (Helander et al. 1982; Falandysz et al. 1994). Bereits Ende der 1970er Jahre wurde eine DDT-induzierte Feminisierung bei Möwen-Embryonen beobachtet (Fry und Toone 1981). Die Nachkommen von Alligatorpopulationen im Lake Apopka, Florida, der in den 1980er Jahren stark mit Pestiziden, unter anderem auch DDT, verschmutzt war, zeigten Abnormalitäten in ihrer Gonadenmorphologie, der gonadalen Steroidogenese, und der Steroidkonzentrationen im Blutkreislauf (Guillette et al. 1994, 1995, 1996). Bei männlichen Fischen wurde eine Induktion von Vitellogenin, dem Vorläuferprotein der Dotterproteine, entdeckt, die in Käfigexperimenten gegenüber Kläranlagenausläufen exponiert waren oder der Umwelt entnommen wurden (Purdom et al. 1994, Folmar et al. 1996, Harries et al. 1997, Mellanen et al. 1999). Ebenso wurde bei Fischen von einem Rückgang des Hodenwachstums (Jobling et al. 1996), dem Auftreten von Mischgonaden (Lye et al. 1997, Jobling et al. 1998a, b) und Inhibierung des Laichverhaltens (Waring et al. 1996) berichtet.

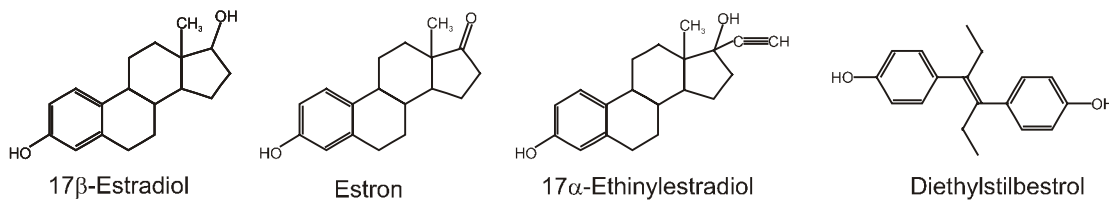
Estrogen wirksame Verbindungen sind mittlerweile aus zahlreiche Substanzklassen bekannt. Neben den natürlichen Estrogenen 17β -Estradiol und Estron, die in konjugierter Form von Mensch und Tier ausgeschieden werden, stellen als Kontrazeptiva eingesetzte synthetische Estrogene wie 17α -Ethinylestradiol oder Diethylstilbestrol eine weitere Quelle hochaktiver Substanzen dar, die vor allem in kommunalen Abwässern nachweisbar sind (Abb. 1.1). Aus dem Bereich der Industriechemikalien kommen eher schwach estrogene Substanzen, die jedoch in weit höheren Mengen produziert werden. Hierzu gehören Kunststoffmonomere wie Bisphenol-A, Weichmacher in Kunststoffen wie Phthalat-ester, nichtionische Tenside wie Alkylphenole und ihre Derivate, Schmier- und Dispergierungsmittel wie PCBs, sowie zahlreiche Fungi-, Herbi- oder Insektizide. Zu den Substanzen mit estrogener Wirkung aus den letztgenannten Substanzklassen gehören beispielsweise *o,p*-DDT, Methoxychlor, Atrazin, Dieldrin, Chlordekon oder Mirex (siehe Toppari et al. 1996, Tyler et al. 1998).

Ferner wurden auch zahlreiche sekundäre Pflanzenstoffe mit estrogener Wirkung identifiziert. Die häufigsten Phyto- oder auch Mykoestrogene stammen aus den Substanzklassen der Flavonoide (Na-

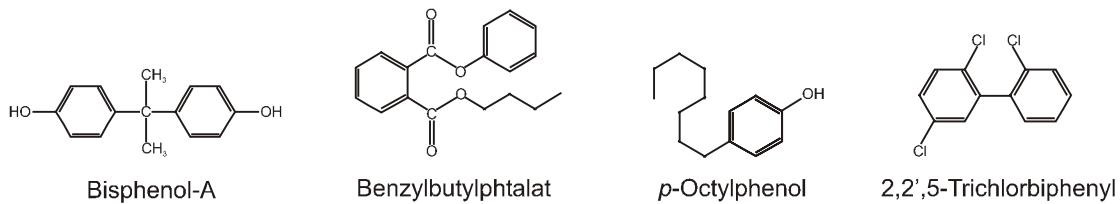
renenin, Biochanin A, Coumestrol, Daidzein, Genistein) und Lignane (Enterdiol, Enterolacton), die in vielen Nahrungsmittel- und Futterpflanzen wie Soja, Hülsenfrüchten oder verschiedenen Kleesorten anzutreffen sind (siehe Reviews von Mazur 1998, Mazur und Adlercreutz 2000). Neben diesen nicht-steroidalen Verbindungen existieren auch Substanzen mit Steroidgerüst wie β -Sitosterol, das in vielen Pflanzen zu finden ist und bei der Verarbeitung von Holz zu Papier freigesetzt wird (Mellanen et al. 1996).

Der Hauptteil der bisher identifizierten Xenoestrogene entfaltet seine Wirkung als Rezeptoragonist, wobei der Estrogenrezeptor eine erhebliche Strukturtoleranz bei seinen Liganden zulässt (Anstead et al. 1997). Vor allem eine *para*-substituierte phenolische aber auch andere Wasserstoffbrücken bildende Gruppen scheinen für eine Interaktion mit dem Estrogenrezeptor ausschlaggebend zu sein (Oostenbrink et al. 2000). Hierbei wirkt sich die Substitution von Elektronendonoren am aromatischen Ringsystem verstärkend auf die Affinität aus (Bradbury et al. 1998).

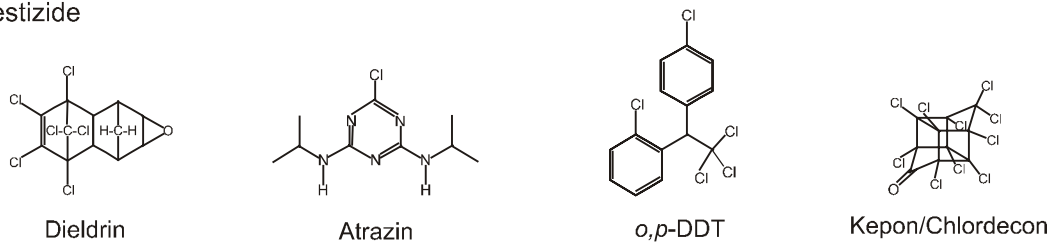
Natürliche und synthetische Estrogene



Industriechemikalien



Pestizide



Phytoestrogene

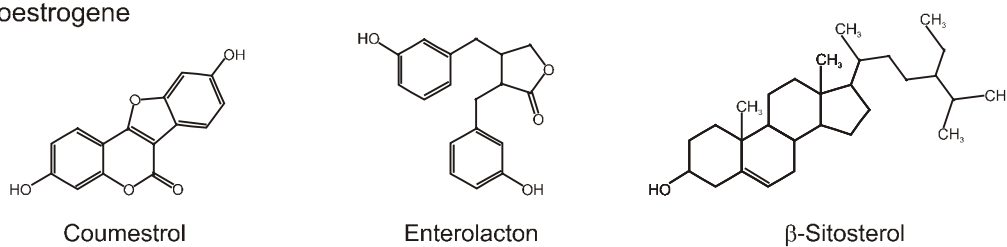


Abb. 1.1: Strukturformeln bekannter oder verdächtiger Stoffe mit estrogener Wirksamkeit

Über die dreidimensionale Struktur des Estrogenrezeptors liegen bisher nur unvollständige Daten vor. Daher ist es beim bisherigen Forschungsstand nicht möglich, genaue "Structure Activity Relationships" (SARs) zwischen Rezeptor und Liganden anzugeben, da die für eine Aktivierung des Rezeptors notwendigen Konformationsänderungen nach Ligandenkopplung unbekannt sind (Katzenellenbogen et al. 1996). Somit ist beim heutigen Kenntnisstand unmöglich strukturell zwischen Rezeptoragonisten und -antagonisten zu unterscheiden, wodurch für die Abschätzung des östrogenen Potentials umweltrelevanter Chemikalien biologische Verfahren notwendig sind. Hierfür sowie für das Screening nach Estrogen-aktiven Abwässern wurden im Verlauf der letzten Jahre zahlreiche *In vivo*- und *In vitro*-Detektionsmethoden entwickelt, auf die im folgenden Kapitel näher eingegangen werden soll.

1.1 *In vivo*- und *In vitro*-Detektionsmethoden für Estrogen wirksame Substanzen

In vivo-Nachweisverfahren

In vivo-Verfahren für den Nachweis von estrogen wirksamen Substanzen beziehen sich meist auf die Erfassung reproduktionsbiologischer Gewebeveränderungen, die für die Aktivität von Estrogenen in unterschiedlichen Vertebratenklassen charakteristisch sind. Bei Säugetieren gilt die Verhornung des Vaginalepithels als klassischer Marker für Estrogen-aktive Substanzen. Bei diesen bereits 1923 entwickelten Verfahren (Allen und Doisy 1923) werden ovariektomierten Ratten oder Mäusen mehrmalig Injektionen der estrogenen Aktivität verdächtigter Substanzen verabreicht. Nach 2 – 3 Tagen wird die Präsenz von verhornten Zellen in Vaginalabstrichen bestimmt. Der Uterusgewicht-Test beruht ebenfalls auf den proliferationsfördernden Eigenschaften von Estrogenen im weiblichen Genitaltrakt. Einige Tage nach Verabreichung der Testsubstanz werden hierbei die verwendeten Mäuse oder Ratten getötet und das Gewicht des Uterus bestimmt. Weitere Marker für eine estrogene Belastung stellen bei Säugetieren die Zunahme des Glykogengehalts im Uterus (Bitman et al. 1968, Bitman und Cecil 1970), die Erhöhung der Ornithindecarboxylaseaktivität im Uterus (Kupfer 1975, Sheehan et al. 1984) oder die Induktion der Synthese von Progesteronrezeptoren (Whitten und Naftolin 1992) dar.

Ähnlich wie bei Säugetieren führen Estrogene auch bei juvenilen Vögeln zur Proliferation des Oviduktgewebes. Dies ist Grundlage des Oviduktgewicht-Tests, der mit Hühner- oder Wachtelküken nach oraler Applikation der Testsubstanz durchgeführt wird (Dorfman und Dorfman 1953, Foster 1973). Des Weiteren führen Estrogene bei Vögeln zur Erhöhung des Ovidukt-Glykogengehalts und der Induktion von Ovalbumin und Conalbumin, die bei der Untersuchung der Estrogenwirkung von Kepon als Endpunkt verwendet wurden (Eroschenko und Palmiter 1980).

Bei Fischen, Reptilien und Amphibien ist das Dottervorläuferprotein Vitellogenin, dessen Synthese in der Leber Estrogen-abhängig induziert wird, der bevorzugte Biomarker für Estrogen-wirksame Substanzen. Sowohl Plasmavitellogeningehalt als auch Vitellogenin-mRNA wurden für den Nachweis Estrogen-wirksamer Substanzen in der Umwelt sowie zur Potentialbewertung von Monosubstanzen verwendet (Purdom et al. 1994, Palmer und Palmer 1995, Lech et al. 1996, Ren et al. 1996a, Harries et al. 1997, Palmer et al. 1998). Neben Vitellogenin wurde die Induktion weiterer Estrogen-kontrollierter Leberproteine wie der Zona radiata-Proteine oder der Estrogenrezeptoren als Biomarker verwendet

(Ren et al. 1996c, Arukwe et al. 1998). Als weitere Indikatoren für Xenoestrogene bei Fischen gelten Plasmasteroidkonzentrationen (Folmar et al. 1996, Kramer et al. 1998) und Veränderungen in den sekundären Geschlechtsmerkmalen (Howell et al. 1980, Kramer et al. 1998).

In Ergänzung dieser Biomarkersysteme wurden Langzeittests durchgeführt, die einen bestimmten Lebensabschnitt oder die gesamte Lebensspanne eines Organismus umfassen. Hierbei wird vor allem auf die Geschlechtsdifferenzierung während der Juvenilentwicklung unter Estrogenbelastung geachtet. Bei Säugetieren kommt es hierbei zu Ovulationsstörungen oder dauerhafter Verhornung des Vaginalepithels (Gellert et al. 1974), bei männlichen Vögeln zur Reduktion der rechten Gonade (Fry und Toone 1981), bei Fischen, Reptilien und Amphibien traten Mischgonaden, Reproduktionsstörungen oder Geschlechterverschiebungen auf (Arnold et al. 1997, Gray und Metcalfe 1997, Portelli et al. 1999, Scholz und Gutzeit 2000).

***In vitro*-Nachweisverfahren**

Die bisher dargestellten *In vivo*-Testmethoden sind in der Lage, den gesamten Expositionsweg einer Chemikalie von der Aufnahme über die Metabolisierung bis zur Exkretion darzustellen. Aufgrund der Kosten, ihrer Zeitaufwendigkeit und Arbeitintensität eignen sich die meisten *In vivo*-Testsysteme jedoch nur bedingt für das Screening einer großen Zahl von Testsubstanzen oder Umweltproben. Aus diesem Grund wurden während der letzten Jahre zahlreiche *In vitro*-Systeme entwickelt, die den Anforderungen eines Schnelltestsystems Genüge leisten. Hierbei entsteht jedoch meist ein Konflikt zwischen hoher Praktikabilität und der Bewahrung möglichst physiologischer Verhältnisse, so dass die Anwendung verschiedener Testsysteme teilweise zu unterschiedlichen Ergebnissen führt.

(1) *Rezeptorbindungsaffinität* – Über die Bestimmung der relativen Bindungsaffinität an den Estrogenrezeptor kann das estrogene Potential von Xenobiotika über kompetitive Liganden-Bindungstechniken abgeschätzt werden (Eroschenko und Palmiter 1980, Thomas und Smith 1993, Vonier et al. 1996, Lutz und Kloas 1999, Sun et al. 1999, Kloas et al. 2000). Mit Rezeptorbindungsassays ist es jedoch nicht möglich, zwischen Rezeptoragonisten und -antagonisten zu unterscheiden.

(2) *Reportergenassays* – Zur Durchführung der sogenannten rekombinanten Yeast Screen Assays wurden mehrere Hefezelllinien mit Genen des menschlichen Estrogenrezeptor α sowie estrogen responsiven Elementen (EREs) transfiziert. An die EREs schließen sich Reportergene wie β -Galactosidase, Luciferase oder Chloramphenicolacetyltransferase an, die ihre Substrate unter Farb- oder Lichtreaktionen umsetzen (Klein et al. 1994, Arnold et al. 1996a, 1996b, Routledge and Sumpter 1996, Sohoni und Sumpter 1998). Reportergenassays mit transfizierten Hefezelllinien gehören zu den schnellsten und sensitivsten Testsystemen, die zur Zeit für das Screening auf Xenoestrogene existieren. Leider besitzen Hefezellen, als evolutionär sehr ursprüngliche Eukaryoten, nicht die komplexen Biotransformations- und nukleären Rezeptorsysteme der höheren Vertebraten (Aoyama et al. 1996, Escriva et al. 1997), so dass ein Cross Talk zwischen verschiedenen Signalwegen und die Auswirkung der Bildung von verschiedenen Metaboliten der applizierten Xenobiotika nicht untersucht werden kann. Reportergenassays wurden jedoch auch für einige Säugetiercarcinomzelllinien wie zum Beispiel MCF-7, ZR-75-1 und T-47D (Mayr et al. 1992, Makela et al. 1994, Jobling et al. 1995, Klotz et al.

1996, Balaguer et al. 1999, Legler et al. 1999) sowie für die Hepatomzelllinie RTH-149 aus der Regenbogenforelle entwickelt (Flouriot et al. 1995).

(3) *Zellproliferationsassays* – Die Säugetierbrustkrebszelllinien MCF-7 und ZR-75-1 wurden in Zellproliferationsassays für die Abschätzung des endokrinen Potentials verschiedener Estrogen-wirksamer Substanzen verwendet (Soto et al. 1991, 1992, Krishnan et al. 1993, Mellanen et al. 1996, Blom et al. 1998, Körner et al. 1999). Obwohl Proliferationsassays hochsensitiv und leicht zu handhaben sind, zeigen sie hinsichtlich schwankender Sensitivitäten bei unterschiedlichen Kulturbedingungen Nachteile, die in einer hohen Interlaborvariabilität resultieren (Ankley et al. 1998).

(4) *Induktion von Genexpression/Proteinsynthese* – Zahlreiche estrogen-sensitive Genprodukte wurden *in vitro* als Biomarker für die Messung des estrogenen Potentials von Xenoestrogenen verwendet. In Mammacarcinomzelllinien wurden die Induktion der Progesteron- and Estrogenrezeptoren sowie Cathepsin D, pS2, Muc1 und "Proliferating Cell Nuclear Antigen" (PCNA) auf dem Protein- oder Transkriptionslevel untersucht (Villalobos et al. 1995, Zava et al. 1997, Ren et al. 1997, Jørgensen et al. 1998). Bei den übrigen Vertebraten wurde, wie *in vivo*, die Induktion von Vitellogenin, Estrogenrezeptor und Zona radiata-Proteinen, die sowohl als Protein als auch als mRNA gemessen wurden, zur Quantifizierung estrogen- und antiestrogen- Effekte von Xenobiotica verwendet (Pelissero et al. 1993, White et al. 1994, Flouriot et al. 1995, Petit et al. 1997, Celius et al. 1999, Smeets et al. 1999a,b). Aufgrund des Fehlens einer estrogen-sensitiven permanenten Zelllinie außerhalb der Säugetiere wurde bei allen derartigen Studien auf Hepatocytenprimärkulturen zurückgegriffen, die aus Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*), Lachs (*Salmo salar*) oder Karpfen (*Cyprinus carpio*) isoliert wurden.

Im Gegensatz zu Proliferations- oder Reporterassays bietet die Messung der Expression endogener Gene die Möglichkeit zur vergleichenden Messung in *In vivo*- und *In vitro*-Systemen. Dadurch ist es möglich, Ergebnisse aus den artifiziellen *In vitro*-Zellkultursystemen über parallele Untersuchungen an intakten Organismen zu validieren, um eine genauere Kenntnis über potentiell abweichende Reaktivitäten gegenüber Xenoestrogen zu erlangen. In diesen Sinn ist es Teilziel dieser Dissertationsarbeit, die Expression endogener estrogen-regulierter Gene in Fischen als klassischen Monitororganismen für eine endokrine Kontamination aquatischer Lebensräume mit einem auf Hepatocytenprimärkulturen basierenden *In vitro*-System zu vergleichen. Als Estrogen-regulierte Gene, die als Biomarker für eine estrogenartige Präsenz dienen können, wurden hierfür Vitellogenin, Estrogenrezeptor und Choriogenin/ Zona pellucida-Proteine (ZP) ausgewählt.

1.2 Physiologische und molekulare Charakteristika der Estrogen-regulierten Gene Vitellogenin, Estrogenrezeptor und Choriogenin/ Zona Pellucida Protein

Estrogenrezeptoren

Der Estrogen-Rezeptor (ER) bildet mit dem Glucocorticoidrezeptor, dem Androgenrezeptor, dem Progesteronrezeptor und dem Mineralcorticoidrezeptor die Gruppe der Steroidrezeptoren, welche u.a. mit

dem Thyroidrezeptor, dem Vitamin-D-Rezeptor, dem Retinolsäurerezeptor (RAR) sowie vielen anderen Rezeptoren wie Retinoid-X-Rezeptor (RXR) und “Peroxisome Proliferator Activating Receptor” (PPAR) zur Superfamilie der nukleären Rezeptoren gehören (Escriva et al. 2000). Allen diesen Rezeptoren ist gemeinsam, dass sie nach Bindung einer niedermolekularen, lipophilen Verbindung als Dimerie mit sogenannten responsiven Elementen der DNA in Kontakt treten und so die Transkription spezifischer Gene aktivieren oder verhindern. Eine Ausnahme bilden hier einige sogenannte “orphan receptors”, die als Monomere ohne Ligandenbindung mit der DNA in Wechselwirkung treten (Laudet 1997, Gustafsson 1999). Steroidrezeptoren bilden vor ihrer Interaktion mit der DNA im Gegensatz zu den meisten übrigen nukleären Rezeptoren Homodimere, die mit palindromen, invertierten Sequenzen in Kontakt treten, die durch drei Nukleotide getrennt sind (Whitfield et al. 1999). Als Konsensussequenz eines Halbelements gilt hierbei das Hexanukleotid AGGTCA.

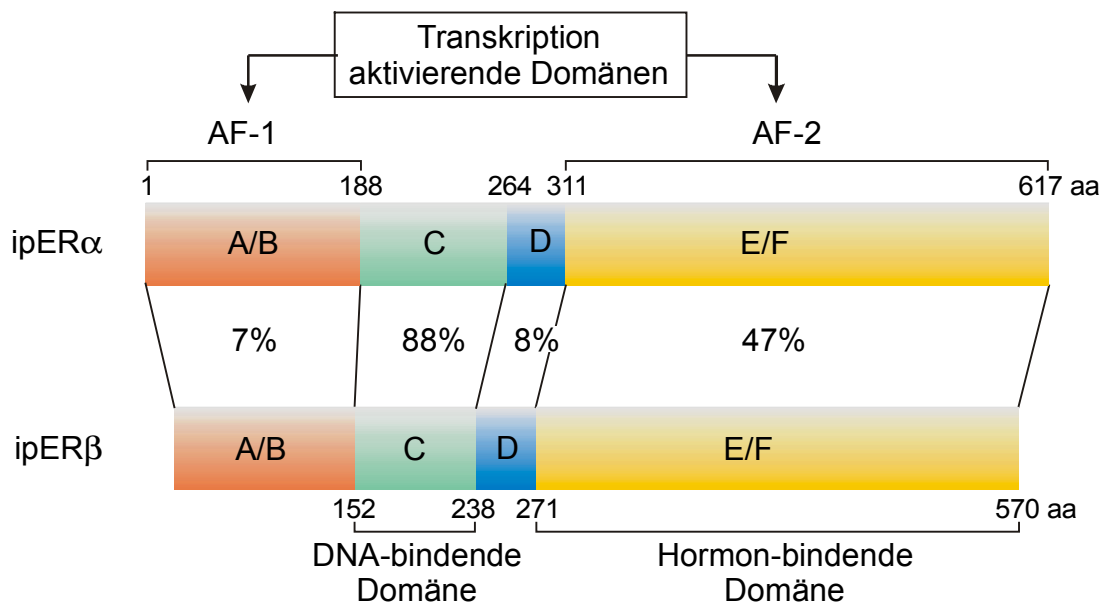


Abb. 1.2: Aminosäurehomologien zwischen Estrogenrezeptor α (ipER α , lange Splicevariante) und Estrogenrezeptor β (ipER β) des getüpfelten Zwergwels (*Ictalurus punctatus*) nach ClustalW-Alignment. Die Prozentzahlen stellen den Homologiegrad zwischen beiden Rezeptoren dar. Während die DNA-bindende Domäne (C) hochkonserviert ist, bestehen in der Hormon-bindenden Domäne signifikante Unterschiede.

Bis zur Mitte der 1990er Jahre war für die Regulation estrogener Hormonfunktion nur ein Rezeptor bekannt. Im Jahr 1996 wurde jedoch von Kuiper und Mitarbeitern aus einer Ratten-cDNA-Bibliothek ein zweiter Estrogenrezeptor-Typus isoliert und als ER β bezeichnet. Der klassische Estrogenrezeptor wird seitdem als ER α bezeichnet. Neben zahlreichen Säugetieren ist der ER β mittlerweile auch in einigen Fischarten wie dem Goldfisch (*Carassius auratus*), einer Tilapia-Art (*Oreochromis niloticus*), dem getüpfelten Gabelwels (*Ictalurus punctatus*) und auch dem Zebraärblich (*Danio rerio*) nachgewiesen (Tchoudakova et al. 1999, Chang et al. 1999, Xia et al. 2000, Legler et al. 2000), so dass von einer universellen Verbreitung unter Vertebraten ausgegangen werden kann. Während über die funktionellen Unterschiede dieser Rezeptoren noch weitgehend Unklarheit besteht, konnte für beide Rezeptoren eine distinkte Verteilung in unterschiedlichen Geweben beobachtet werden (Couse

et al. 1997, Gustafsson 1999, Muramatsu und Inoue 2000). Nach ihrer molekularen Funktion wird die Aminosäuresequenz der Estrogenrezeptoren in 4 - 6 Domänen gegliedert (siehe Abb. 1.2). Während die DNA-bindende C-Domäne zwischen ER α und ER β hoch konserviert ist, bestehen in der Liganden-bindenden E/F-Domäne signifikante Unterschiede in der Aminosäuresequenz (47 % Homologie bei *Ictalurus punctatus*), was zu leicht unterschiedlichen Bindungsspezifitäten gegenüber den Liganden führt (Barkhem et al. 1998, Kuiper et al. 1998).

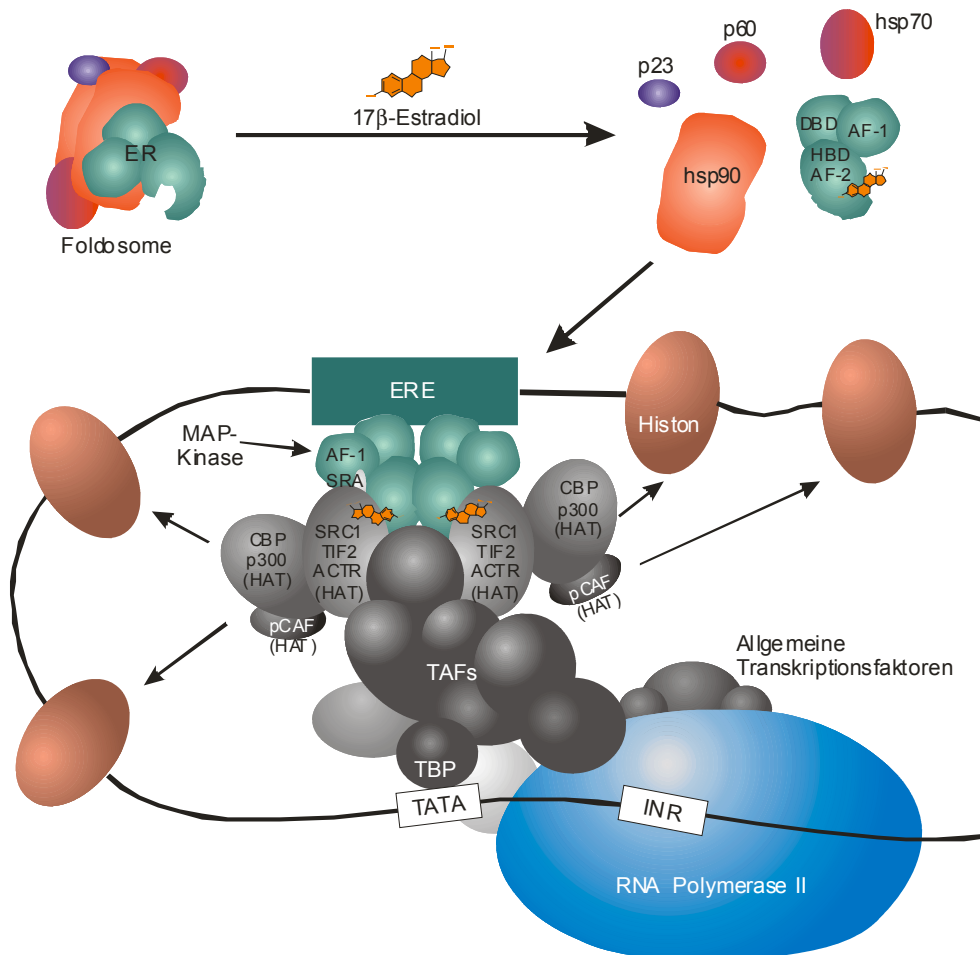


Abb. 1.3: Initiierung der Transkription von Genen durch Estrogenrezeptoren (ER) modifiziert nach Muramatsu und Inoue 2000. Ohne gebundenen Liganden liegt der ER in einem Multiproteinkomplex, dem Foldosome vor, der ihn in einer Konformation mit hoher Ligandenaffinität hält. Nach Ligandenbindung dissoziieren die akzessorischen Proteine und der ER kann als Dimer an Estrogenresponsive Elemente der DNA koppeln (nähere Erklärungen im Fließtext).

Im Nukleus liegen Steroidrezeptoren in ungebundener Form als Monomere in einem Multiproteinkomplex mit einem hsp90 Dimer, hsp70 und p60, dem sogenannten Foldosome vor (Dittmar et al. 1998); durch Assoziation eines p23 Moleküls wird dieser zunächst instabile, aktivierte Rezeptorkomplex mit hoher Estrogenaffinität stabilisiert (Knoblauch und Garabedian 1999). Nach Bindung des Liganden erfolgt die Dimerisierung des Rezeptors unter Auflösung des Multiproteinkomplexes. Über die Zinkfinger-Elemente des Rezeptorhomodimers erfolgt schließlich der Kontakt zu den Estrogen-

responsiven Elementen der DNA. Mit den AF-1 und AF-2 Regionen des ER assoziieren daraufhin mehrere Coaktivatoren des p160/SRC-1 sowie des CBP/p300-Typus mit Histon-Acetyltransferase-Aktivität (Abb.1.3), wobei ein hoher Acetylungsgrad der Histone die transkriptionelle Aktivität eines Chromatinbereichs verstärkt (Freedman 1999, Muramatsu und Inoue 2000). Wie bei anderen nukleären Rezeptoren wird auch für den ER eine Interaktion mit einem DRIP/TRAP-ähnlichen Coaktivatorkomplex postuliert, der das RNA Polymerase II Holoenzym an der Promotorstelle des Estrogen-regulierten Gens bindet und somit dessen Transkription initiiert.

Dieses komplexe Transaktivierungsszenario ermöglicht eine differenzierte Kontrolle Estrogen-regulierter Genfunktionen, worauf die synergistische Wirkung der "orphan receptors" COUP-TF und ARP-1 bei Estrogen-aktivierter Transkription hinweist (Lazennec et al. 1997). Außerdem ist bisher ungeklärt, ob auch ER α /ER β Heterodimere, deren Existenz *in vivo* und *in vitro* nachgewiesen wurde (Cowley et al. 1997, Pace et al. 1997), an der transkriptionellen Kontrolle estrogen-esponsiver Gene beteiligt sind oder inwieweit andere nukleäre Rezeptoren wie z.B. PPAR/RXR-Dimere (Nuñez et al. 1997) unter physiologischen Bedingungen mit EREs wechselwirken. Zahlreiche MAP-Kinase-Phosphorylierungsstellen an den AF-1- und AF-2-Domänen des ER weisen auf einen intensiven Cross Talk mit membranständigen Rezeptoren hin, die zu einer Estrogen-unabhängigen Aktivierung des ER führen können (Weigel 1996, Freedman 1999). Die Beobachtung, dass verschiedene Xenoestrogene zu unterschiedlichen Verhältnissen in der Expression Estradiol-induzierbarer Proteine führen, stützt diese These differenzierter Interaktion (Korach et al. 1987), so dass in Zukunft mit einem zunehmend komplexeren Bild für die hormonelle Kontrolle Estrogen-responsiver Gene zu rechnen ist.

Vitellogenin

Vitellogenin ist das Vorläuferprotein der meisten Dotterproteine in eierlegenden Vertebraten und Invertebraten. Trotz der so unterschiedlichen Morphologie, die Embryonen im Tierreich besitzen, weisen ihre Vitellogenine unerwartet hohe Verwandtschaft in Struktur und Funktion auf, so dass das Ursprungprotein bereits im Präkambrium, also vor mehr als 550 Mio Jahren existiert haben muss (Byrne et al. 1989a). Der Name Vitellogenin wurde zuerst von Pan et al. (1969) verwendet, um die für Weibchen spezifischen Haemolymphproteine von Insekten zu benennen, die alle gemeinsame funktionelle Charakteristiken zeigten und in ihrer Zusammensetzung große Ähnlichkeit mit den Dotterproteinen besaßen. Nach der Isolation eines Lipophosphoproteins aus dem Blut von *Xenopus* wurde der Name auch für die Dottervorläuferproteine der Vertebraten benutzt (Wallace 1970). Vitellogenin ist ein Phospholipoglycoprotein, das nativ als Homodimer auftritt (Hara und Hirai 1982, Wiegand 1982). Das Molekulargewicht beträgt bei der Regenbogenforelle je nach Meßmethode zwischen 390 - 600 kD (Hara und Hirai 1978, Campbell und Idler 1980, Sumpter 1985, Norberg und Haux 1985, Waagboe und Sandnes 1988). Für das Monomer werden Molekulargewichte zwischen 170 und 175 kD angegeben (Chen 1983, Babin 1987, Frémont und Riazi 1988, Silversand et al. 1993). Der Phosphor- und Lipidgehalt des Proteins liegt in Teleostern bei 0,58 - 1,8 % bzw. 13 - 22 % (Redshaw und Follet 1971, Hori et al. 1979, Campbell und Idler 1980, de Vlaming et al. 1980, Hara et al. 1980, Norberg und Haux 1985, Komatsu et al. 1996).

Die Vitellogenese wird primär durch die Abgabe von "Gonadotropin Releasing Factors" aus dem Hypothalamus eingeleitet, hierauf werden von der Adenohypophyse Gonadotropin 1 und 2, die zu den

Hormonen FSH und LH in Säugetieren homolog sind, sezerniert, wodurch die Oogenese in den Ovarien induziert wird (Abb. 1.4, Arcand-Hoy und Benson 1998). Bei allen oviparen Vertebraten wird hierbei die für die Eireifung benötigte Vitellogeninsynthese in der Leber unter natürlichen Bedingungen durch die Abgabe von Estrogenen aus den die Oocyte umgebenden Follikelzellen induziert (Wallace 1985); die stärkste Wirkung zeigt dabei 17β -Estradiol (Redshaw et al. 1969, Nath und Sundaraj 1981, van Bohemen et al. 1982). Nach der Estrogenrezeptor-kontrollierten Transkription der Vitellogenin-mRNA wird ein post-transkriptionaler Estradiol-abhängiger Regulationsprozess postuliert (Flouriot et al. 1996), bei dem stabilisierende Proteine an das 3'-untranslatierte Ende der Vitellogenin-mRNA binden (Dodson und Shapiro 1997, Kanamori et al. 1998, Cunningham et al. 2000); bereits in unreifen Männchen konnte die Existenz einer Vitellogenin-Vorläufer-mRNA nachgewiesen werden, die bei Estradiol- oder Nonylphenolbehandlung der Fische verschwindet (Ren et al. 1996b).

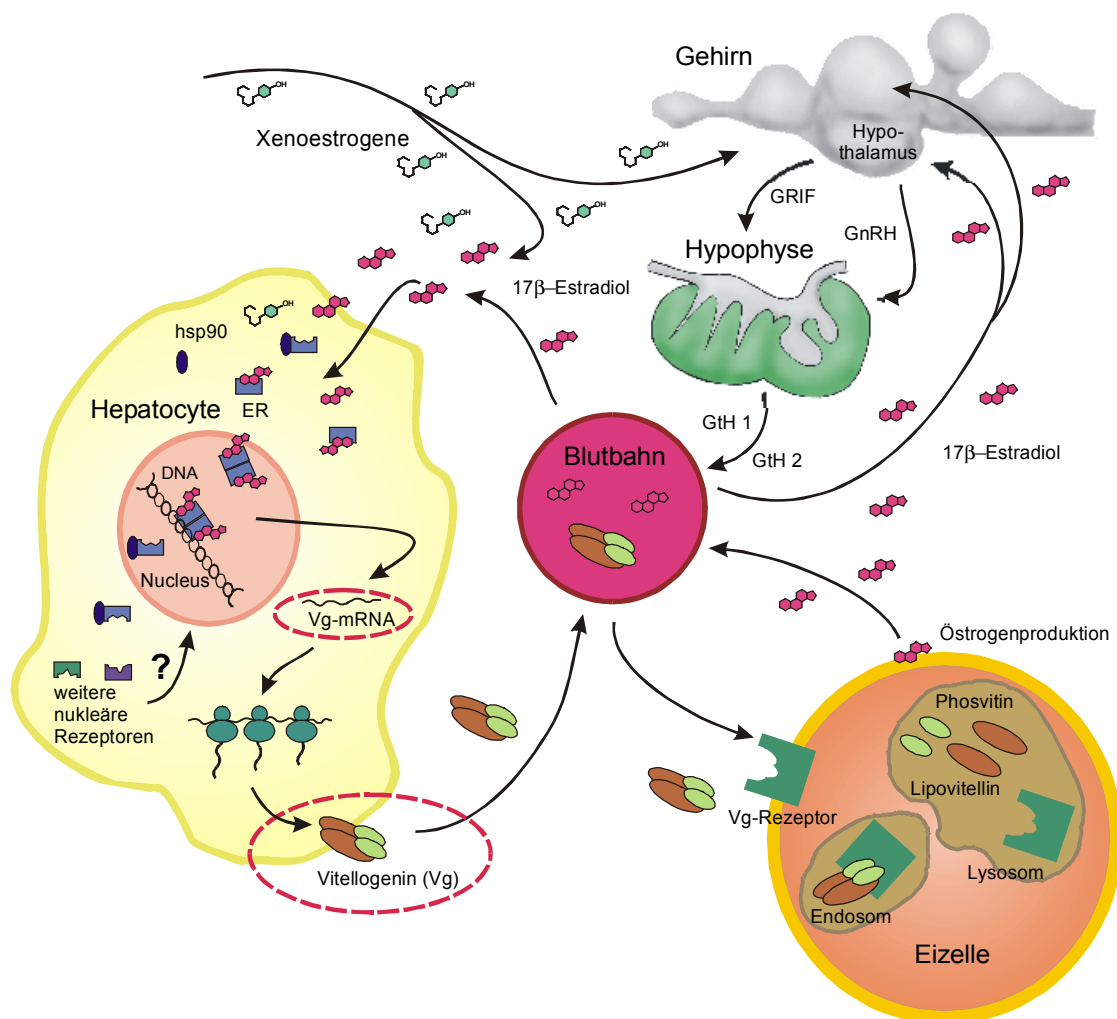


Abb. 1.4: Regulation der Vitellogenese über die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse. Auf Einwirkung des Hypothalamus werden von der Hypophyse gonadotrope Hormone ausgeschüttet (GtH1 + 2), die die Oogenese induzieren. Als eine Reaktion wird von den Follikelzellen der Ovarien 17β -Estradiol ausgeschüttet, die in der Leber die Produktion von Vitellogenin induzieren. Estrogenrezeptoren im Hypothalamus gewährleisten die reziproke Kontrolle des Regulationsystems. Abkürzungen: ER - Estradiolrezeptor, GRIF – Gonadotropin Releasing Hormone Inhibiting Factor, GnRH - Gonadotropin Releasing Hormone, Vg-mRNA - Vitellogenin-mRNA

Für den Krallenfrosch *Xenopus laevis* und das Haushuhn ist die Existenz mehrerer Vitellogenin-Gene nachgewiesen (Wahli et al. 1981, Evans et al., 1988, Byrne 1989b). Während für die Regenbogenforelle konnte nur ein Vitellogenin-Gen identifiziert werden konnte (Mouchel et al. 1996), wird für einige Fischarten jedoch von einer Existenz mehrerer Vitellogeninisoformenten berichtet, die allerdings überwiegend auf unterschiedliche posttranskriptionale Modifikationen zurückgeführt werden, so beim Goldfisch (*Carassius auratus*; de Vlaming et al. 1980), Karpfen (*Cyprinus carpio*; Carnevali und Belverdere 1991), Tilapia (*Oreochromis aureus*; Lim et al. 1991; *Oreochromis mossambicus*; Kishida und Specker 1993), und Dorsch (*Gadus morhua*; Silversand et al. 1993). Während der Translation der Vitellogenin-mRNA wird die wachsende Peptidkette ins Lumen des rauen endoplasmatischen Retikulums aufgenommen, wo es zunächst zu ihrer partiellen Phosphorylierung kommt. Zu weiteren Phosphorylierungen im Serin-reichen COOH-terminalen Bereich kommt es in den Transportvesikeln auf dem Weg zum Golgi-Apparat; zusätzlich wird mit der Glykosylierung begonnen. Im Golgi-Apparat wird die Glykosylierung abgeschlossen und das Vitellogenin in sekretorische Vesikel verpackt, die darauf ins Blut abgegeben werden (Zusammenfassung bei Wallace 1985).

Über den Mechanismus der Lipidkopplung des Vitellogenins ist bisher wenig bekannt. Eine Speicherung der sekretorischen Vesikel innerhalb der Hepatocyten scheint *in vivo* nicht stattzufinden (Ng und Idler 1983; Copeland 1986); wegen der großen Bedeutung dieser Frage für die Bestimmung der Vitellogeninsynthese in isolierten Hepatocyten ist ein Vergleich zwischen Vitellogeninmengen in Leber und Blut durchzuführen. Zur Aufnahme in die Oocyten dringt das Vitellogenin entweder passiv durch das Endothel in den interstitiellen Raum ein und gelangt so durch die Eithea bis zur Oocyte oder wird zum geringeren Teil aktiv von Endothelzellen aufgenommen und zur Eizelle weitergeleitet (Selman und Wallace 1982). Die Vitellogeninresorption in die Eizelle erfolgt schließlich durch rezeptorvermittelte Endocytose von coated pits (Tyler et al. 1988, 1990); dort kommt es in sogenannten lysosomalen Multi-Vesicular-Bodys zum proteolytischen Abbau in Lipovitelline, Phosvitine und Phosvetten sowie möglicherweise einiger weiterer Proteine (Sire et al. 1994). 80 - 90 % der Proteine einer befruchtungsfähigen Eizelle können bei *Xenopus* auf eine Herkunft aus Vitellogenin zurückgeführt werden (Benbow et al. 1975); für die Eizellen der Regenbogenforelle werden ähnliche Werte vermutet (Tyler et al. 1988).

Choriogenine und Zona Pellucida-Proteine

Choriogenine oder Zona pellucida-Proteine sind am Aufbau der bei Fischen als Chorion, Zona radiata oder Vitellinhülle bezeichneten extrazellulären Eihülle beteiligt (Murata et al. 1997). In Säugetieren besteht die Eihülle vornehmlich aus den Proteinen ZP1, ZP2 und ZP3. Während ZP1 als Strukturprotein die Stabilität der Eihülle gewährleistet, erfüllen ZP2 und ZP3 Funktionen als sogenannte "Spermienrezeptoren", die an der artspezifischen Kopplung zwischen Spermium und Oocyte beteiligt sind (Hinsch und Hinsch 1999). Die Nomenklatur der Choriogenine oder Zona pellucida-Proteine bei Fischen ist in der Literatur uneinheitlich. So wurden die Hauptbestandteile der Eihülle zunächst als Vitelline (Hyllner et al. 1991), später jedoch auch als Zona radiata-Proteine, Choriogenine und Zona pellucida-Proteine bezeichnet (Oppen-Berntsen et al. 1994, Chang et al. 1996, Murata et al. 1997, Wang und Gong 1999). Der Syntheseort für diese Eihüllenproteine ist innerhalb unterschiedlicher

Fischarten verschieden. Bei Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*), Dorsch (*Gadus morhua*), Flunder (*Pseudopleuronectes americanus*), Medaka (*Oryzias latipes*) und Taimen (*Hucho peryi*) werden die hier Choriogenine oder Zona Radiata-Proteine genannten Eiproteine in der Leber synthetisiert (Oppen-Berntsen et al. 1992a, 1992b, Lyons et al. 1993, Murata et al. 1997, Shimizu et al. 2000). Die als Zona pellucida-Proteine bezeichneten Proteine in Seenadel (*Syngnathus acus*), Karpfen (*Cyprinus carpio*), Goldfisch (*Carassius auratus*) und dem Zebraärbling (*Danio rerio*) (Begovac und Wallace 1989, Chang et al. 1996, 1997, Wang und Gong 1999) werden dagegen, wie auch bei Säugetieren (Bleil und Wassermann 1980), direkt in den Ovarien produziert. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen für die Proteine beider Synthesorte zeigt jedoch hohen Grad an Übereinstimmung, so dass sie als homologe Proteine betrachtet werden (Wang und Gong 1999). Hierbei wird ZP2 mit Choriogenin H und ZP3 mit Choriogenin L homologisiert; auch die Sequenzen eines Zona radiata-Proteins (GenBank Acc.N° CAA04221) des Atlantischen Lachses (*Salmo salar*) zeigt große Homologien zu ZP2. Für die Leber-synthetisierten Choriogenine ist eine Kontrolle der Zonagenese durch Estrogene nachgewiesen (Oppen-Berntsen 1992a, Shimizu et al. 2000), für die Ovarien-synthetisierten Zona pellucida-Proteine sind derzeit dagegen keine Informationen zur hormonellen Kontrolle zu finden. Dementsprechend wurde Zona Radiata-Proteine bereits für die Detektion von Xenoestrogenen verwendet (Arukwe et al. 1997b), während zur estrogen-kontrollierten Induktion von Zona Pellucida-Proteinen als Marker für eine Verweiblichung des Gonadengewebes noch keine Daten vorliegen. Aufgrund ihrer Sequenzhomologie wurden Choriogenin H und ZP2 für die Expressionstudien in den Fischarten Medaka und Zebraärbling ausgewählt.

1.3 Ausrichtung und Ziele der Arbeit

Während in den letzten Jahren zahlreiche Untersuchungen zum Einfluss von Xenoestrogenen auf die Reproduktionsphysiologie von Fischen unternommen wurden (Christiansen et al. 1998b, c, Kramer et al. 1998, Gronen et al. 1999, Miles-Richardson et al. 1999a, b, Kinnberg et al. 2000), liegen bisher nur lückenhafte Daten über inter- und intraspezifische Variabilitäten bei der Expression Estrogen-regulierter Gene vor. Ebenso existieren nur wenige vergleichende Studien über Estrogen-induzierte Sensitivitätsunterschiede zwischen den häufig verwendeten auf Hepatocytenprimärkulturen aus Fischen basierenden *In vitro*-Testsystemen (Jobling et al. 1993, Pelissero et al. 1993, Petit et al. 1999, Smeets et al. 1999a) und der tatsächlichen Nachweisgrenze estrogener Aktivität in einem intakten Organismus. Aus diesen Gründen war es Zielsetzung der vorliegenden Dissertation, zunächst die Arbeitsgrundlagen für derartige vergleichende Studien zu schaffen und eine erste Einsicht in die potentiell auftretenden Reaktionsunterschiede gegenüber Estrogen-wirksamen Substanzen zu erlangen.

Aufgrund ihrer häufigen Verwendung als Modellorganismen in der Forschung wurden die drei Fischarten Medaka (*Oryzias latipes*), Zebraärbling (*Danio rerio*) und Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) als Versuchstiere ausgewählt.

Die Regenbogenforelle ist aufgrund ihrer Größe und Morphologie ihrer Leber als Spender gut für die Anfertigung von Hepatocytenprimärkulturen geeignet. Außerdem liegen für die Vitellogenininduktion in der Regenbogenforelle zahlreiche Vergleichsdaten vor, so dass dieser Organismus für die Etablierung eines *In vitro*-Detektionssystems für Vitellogenin- und Estrogenrezeptor-mRNA geeignet erscheint. Bei der Entwicklung des *In vitro*-Testsystems wurde eine einfache und zügige Durchführbar-

keit angestrebt um den Anforderungen eines Screening-Systems Genüge zu leisten. Vom Einsatz radioaktiv markierter cDNA-Sonden wurde aufgrund der aufwendigeren Entsorgungsmaßnahmen und der Umweltbelastung abgesehen, so dass zum einen ein auf der Immunodetektion der cRNA-Sonden basierendes quantitatives Dot-Blot-Verfahren, zum anderen ein semiquantitatives RT-PCR-Verfahren hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit validiert werden sollten.

Bei der Geschlechtsdifferenzierung wird bei Fischen zwischen Hermaphroditen und Gonochoristen unterschieden, bei denen das Geschlecht nach einer einmaligen Ausdifferenzierung eindeutig festgelegt ist (Baroiller et al. 1999). Alle drei ausgewählten Fischarten werden zu den Gonochoristen gezählt, jedoch bestehen Entwicklungsunterschiede in der Anlage ihrer Geschlechtsorgane. Der Medaka gehört zu den differenzierten Gonochoristen (Yamamoto 1975), bei denen eine direkte Differenzierung des Gonadenprimordiums entweder in Hoden oder Ovar stattfindet. Bei undifferenzierten Gonochoristen, zu denen der Zebrafisch (Takahashi 1977) und die Regenbogenforelle (Mršić 1923, van den Hurk und Slof 1981, Chan und Yenung 1983) gezählt werden, erreichen zunächst alle Fische ein Entwicklungsstadium mit einer morphologisch ovarienähnlichen Gonadenanlage, bevor ca. 50 % der Individuen diese Gewebe zu einem Hoden umstrukturieren. Zusätzlich besitzen Medaka und Zebrafisch nur einen geringen Verwandtschaftsgrad, da sich beide Familien bereits zu einem frühen Zeitpunkt der Evolution der Teleostei in verschiedene Entwicklungslinien aufgespalten haben. In diesem Sinn weisen beide Fischarten sowohl entwicklungsbiologisch als auch evolutionär Divergenzen auf, die sie für einen Vergleich hinsichtlich potentieller artspezifischer Reaktionsunterschiede geeignet erscheinen lassen.

Aufgrund ihrer geringen Größe und kurzen Generationsabfolge sind beide Fischarten einfach unter Laborbedingungen zu halten und können ohne hohen technischen Aufwand einer Durchflussexposition von Xenobiotica ausgesetzt werden, wobei auch die Exposition über längere Lebensabschnitte möglich ist. Zur Messung der Expression der in Abschnitt 1.3 beschriebenen Gene wurde wegen der geringen Organgröße bei beiden Fischarten die Entwicklung semiquantitative RT-PCR-Verfahren als hochsensitives Nachweissystem angestrebt. Hierfür wurden zunächst Informationen über die cDNA-Sequenzen von Medakavitellogenin sowie Estrogenrezeptor und Vitellogenin des Zebrafisches benötigt, so dass in einem ersten Arbeitsabschnitt die Identifikation und Klonierung der korrespondierenden cDNA-Fragmente im Vordergrund stand.

Nach Etablierung der semiquantitativen Nachweisverfahren sollte die estrogen-induzierbarkeit der drei Gene bei beiden Fischarten vergleichend bestimmt werden. Hierbei sollten vor allem potentielle Unterschiede der drei Gene hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber (Xeno-)estrogenen innerhalb einer Art sowie mögliche generelle Reaktionsunterschiede zwischen beiden Testspezies erforscht werden. Aus Vergleich von *In vivo*- und *In vitro*-Daten sollte eine abschließende Bewertung der Aussagekraft des Primärkultursystems ermöglicht werden.

Um Hinweise auf eine potentielle Sensibilität gegenüber Estrogenen während der Embryonal- und Juvenilentwicklung zu erhalten, wurde für den Zebrafisch zusätzlich die zeitabhängige Expression von ER α , ER β , Vitellogenin und ZP2 im Verlauf von der Befruchtung des Eis bis zu einem Alter von 29 Tagen verfolgt. Hierbei lag das Augenmerk einerseits auf der Expression der beiden Rezeptoren, um mögliche estrogen-sensitive Phasen zu identifizieren, andererseits sollte über die beginnende Expression der reproduktionskontrollierten Gene ZP2 und Vitellogenin Aufschluss über den Zeitpunkt der endgültigen Geschlechtsdifferenzierung bei dieser Fischart gewonnen werden. Die Exposition gegenüber Estrogenen während einer frühen Entwicklungsphase sollte in Ergänzung zur Exposition

der adulten Tiere einen Eindruck von der estrogenen Sensitivität des populationsbiologisch bedeuten- den Nachwuchses geben.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstierhaltung und Exposition gegenüber (Xeno-)estrogenen

2.1.1 Fischarten und Hälterungsbedingungen

Regenbogenforellen

Die aus dem westlichen Nordamerika stammende Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) aus der Familie der Salmonidae wurde um 1880 in Europa eingeführt. Dennoch ist eine natürliche Vermehrung innerhalb Europas bisher nur von lokal äußerst begrenzten Populationen bekannt. Bei der Regenbogenforelle handelt es sich um einen Saisonlaicher, der die Laichreife je nach Zuchtstamm zwischen November und Mai erreicht. Aufgrund des periodischen Laichzyklus schwankt der hormonelle Status der adulten Tiere saisonal stark (Zohar et al. 1982). Durch ihre durchschnittliche Größe von 25 – 50 cm und der kompakten Leberanatomie besitzt die Regenbogenforelle jedoch gute Voraussetzungen für die Anlage von Hepatocytenprimärkulturen. Die für die Herstellung von Hepatocytenprimärkulturen und die Isolation von Vitellogenin verwendeten Regenbogenforellen wurden von einem kommerziellen Fischzuchtbetrieb (Juraquell Forellenzucht, Gerstner G.b.R., Wellheim) bezogen. Die Tiere mit einem Durchschnittsgewicht von 300 g (150 g - 500 g) wurden in Basins von 600 bzw. 1000 L unter Durchfluß von 3 L/min bei 12 ± 2 °C gehalten. Die Fütterung erfolgte 5 x pro Woche mit einem kommerziell erhältlichen Forellenfutter ad libitum (Raiffeisen Ringfutter: 49 % Rohprotein, 2,9 % Lysin, 10,5 % Rohfett, 2,0 % Rohfaser, 9,3 % Rohasche, 4 mm Korngröße; Fa. Raiffeisen eG). Nach einer Adaptionphase von 2 Monaten wurden die Tiere für die Versuche herangezogen.



Abb. 2.1: Laichreife männliche Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) mit ausgeprägtem Laichhaken.

Zebraabärblinge

Der zur Familie der Cyprinidae gehörende Zebraabärbling (*Danio rerio*) ist ein kleiner (4 – 5 cm), schnellwüchsiger Schwarmfisch, der im östlichen Vorderindien verbreitet ist. Der Zebraabärbling besitzt keine saisonale Laichzeit, sondern ist während des gesamten Jahres bei einem durchschnittlich 2 – 5 Tage währenden Laichzyklus fertil (Eaton und Farley 1974, Goolish et al. 1998). Durch seine hohe Reproduktionsrate (300 – 500 Eier pro Laichakt) und dem kurzen Generationszyklus (3 – 4 Mo-

nate von der Befruchtung bis zur Laichreife, Hisaoka und Battle 1954) ist der Zebraärbling ein weit verbreiteter Standardorganismus in der Entwicklungsbiologie und Toxikologie. Die verwendeten Zebraärblinge entstammen dem am Zoologischen Institut gehaltenen Wildtyp-Zuchtstamm. Der Stamm geht auf handelsübliche Nachzuchten von Wildfängen zurück (Fa. Klöckner, Ludwigshafen). Die Fütterung der Tiere erfolgte einmal täglich mit Tetramin Flockenfutter (Tetra, Melle) und Artemien (*Artemia spec.*). Die erwachsenen Tiere wurden gemischtgeschlechtlich in 60 – 120 L-Aquarien bei 25 °C, pH 7,7 und 320 mg/L CaCO₃ gehalten.

Zur Einstellung von pH-Wert und Wasserhärte wurden Grundwasser und deionisiertes Wasser in einer automatischen Mischanlage aufbereitet. Zur kontrollierten Eiablage bei den Versuchen zur Larval- und Juvenilentwicklung wurden je vier männliche und zwei weibliche Tiere zu Zuchtgruppen zusammengestellt. Das Laichverhalten wird beim Zebraärbling durch einsetzende Beleuchtung nach einer Dunkelphase angeregt. Folglich wurden die Tiere am Vorabend der Eiablage in Laichaquarien gesetzt, bei denen die Auffangschale für die Eier und der Schwimmraum für die adulten Tiere durch ein grobmaschiges Stahlnetz getrennt waren, so dass die Elterntiere die Eier nach der Befruchtung nicht mehr erreichen konnten. Die Aufzucht der Jungfische erfolgte bei 27 °C bis zum Freischwimmen in Aquarienkunsthwasser (200 µM CaCl₂, 75 µM NaHCO₃, 50 µM MgSO₄, 3,7 µM KCl, pH 7,6). Als Aufzuchtfutter wurden handelsübliches Staubfutter und frisch geschlüpfte Artemiennauplien verwendet. Die Sauerstoffsättigung des Aquarienwassers wurde durch Belüftung mit Druckluft auf über 97 % gehalten.

Medakas

Der Medaka (*Oryzias latipes*) aus der Familie der Adrianichthyidae, die in die Unterordnung der Beloniformes eingeordnet wird, ist ein in Ostasien (China, Korea, Taiwan, Japan) beheimateter, kleinwüchsiger (~ 3,5 cm) Süßwasserbewohner. Wie der Zebraärbling besitzt der Medaka einen kurzen Lebenszyklus bei einer hohen Fortpflanzungsrate. Medakas laichen täglich bei Tagesanbruch zwischen 10 und 30 Eier, die zunächst durch ihre Chorionbehaarung an das Abdomen des Weibchens geheftet sind, von wo sie zur Zucht abgesammelt abgesammelt werden können (Yamamoto 1975).



Abb. 2.2: Zebraärblinge (*Danio rerio*) beim Laichakt. Das Männchen ist durch seinen schlanken Habitus und der größeren, intensiver gefärbten Afterflosse gekennzeichnet.

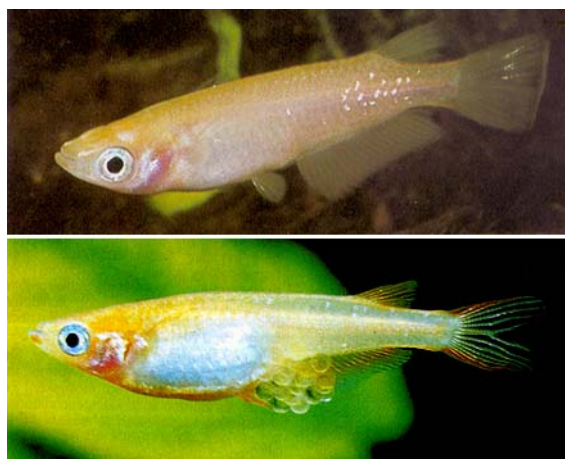


Abb. 2.3: Männlicher (oben) und weiblicher Medaka (unten). Das Männchen ist durch die stärker entwickelte After- und Rückenflosse gekennzeichnet.

Obwohl der Medaka in gemäßigttem Klima verbreitet ist, kann die Laichbereitschaft der Tiere durch Hälterung bei einer Temperatur von 25 °C kontinuierlich aufrecht erhalten werden. Die am Zoologischen Institut kultivierten Medakas entstammen dem Wildtyp-Zuchtstamm des Max-Planck-Instituts für Biophysik, Göttingen. Die Hälterung und Aufzucht der Tiere erfolgte wie im obigen Abschnitt für die Zebraärblinge beschrieben. Zur Supplementation des Futters wurde das Aquarienwasser zusätzlich mit Grünalgen beimpft.

2.1.2 Testsubstanzen

17 β -Estradiol

17 β -Estradiol ist das potenteste natürliche Estrogen, das bei Vertebraten vorwiegend in den weiblichen Gonaden synthetisiert wird. Durch Urin von Mensch und Tier gelangen natürliche Estrogene in die Umwelt (Markin 1984); die für den Menschen bekannten Werte liegen bei 25 – 100 μ g pro Tag (Stumpf et al. 1996). 17 β -Estradiol wird bei Frauen in der Menopause medikamentös in Mengen von 2 – 8 mg/Tag eingesetzt. In Kläranlagen werden Estrogene während des Klärprozesse nicht vollständig abgebaut und konnten in Abläufen von Kläranlagen und Fließgewässern nachgewiesen werden (Stumpf et al. 1996, Shore et al. 1993, Desbrow et al. 1998). Das in den Experimenten verwendete 17 β -Estradiol (Reinheit > 98 %) wurde von Sigma (Deisenhofen) bezogen.

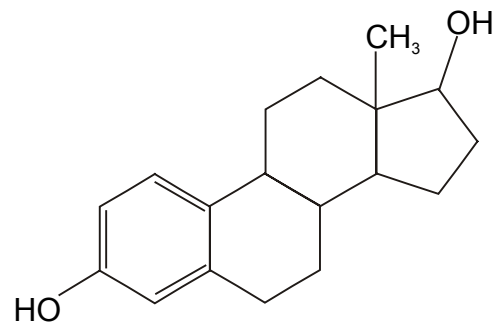


Abb. 2.4: 17 β -Estradiol, MW: 272,37

17 α -Ethinylestradiol

17 α -Ethinylestradiol ist ein in Kontrazeptiva und Medikamenten zur Hormonbehandlung weit verbreitetes synthetisches Estrogen. Die bei der Kontrazeption verabreichten Dosen liegen je nach Applikationsstrategie zwischen 10 und 50 μ g/Tag. Aufgrund des oralen Applikationsweges ist Ethinylestradiol durch Einführung der Ethinylgruppe am C₁₇-Atom vor Oxidation geschützt und wird daher wesentlich langsamer metabolisiert als das natürliche Hormon (Ranney 1977). Dementsprechend wird Ethinylestradiol auch in Kläranlagen langsamer abgebaut als natürliche Estrogene (Ternes et al. 1999). 17 α -Ethinylestradiol wurde in Deutschland und England im Bereich von ng/L in Abflüssen von Kläranlagen und zum Teil in

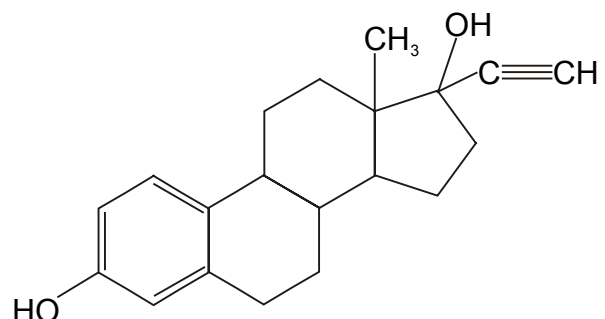


Abb. 2.5: 17 α -Ethinylestradiol, MW: 296,39

Fließgewässern nachgewiesen (Stumpf et al. 1996, Desbrow et al. 1998). 17 α -Ethinylestradiol (Reinheit > 98 %) wurde bei Sigma bezogen.

Genistein

Das Isoflavon Genistein gilt als Phytoestrogen und kommt in beträchtlichen Konzentrationen in Soja und Sojaprodukten vor. Es wird jedoch auch von verschiedenen Kleesorten und anderen Pflanzen sowie von Pilzen und Bakterien produziert. Bei der Fütterung von Stören mit Sojamehl traten in den männlichen Tieren erhöhte Vitellogeninwerte im Blutplasma auf (Pelissero et al. 1991), was darauf hindeutet, dass Genistein bei oraler Aufnahme eine estrogene Wirkung entfaltet. Synthetisches Genistein (Reinheit > 98 %) wurde bei Sigma bezogen

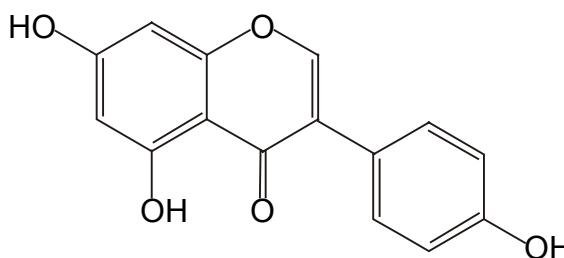


Abb. 2.6: Genistein, MW: 270,23

Nonylphenol

Neben der Verwendung zur Herstellung von Phenolharzen sowie als Kunststoffadditiv wird Nonylphenol überwiegend zur Produktion von nichtionischen Tensiden, den Nonylphenolpolyethoxylaten verwendet; hierbei wird technisches 4-Nonylphenol, ein Gemisch verschiedener Isomere, benutzt. Nonylphenolpolyethoxylate kommen in Haushaltsreinigern und Waschmitteln vor, werden aber auch industriell eingesetzt (u.a. Vorbehandlung von Wolle, Hilfsmittel bei der Leder- und Papierherstellung, industrielle Reiniger, Herstellung von Latexfarben, Emulgatoren in Pestiziden).

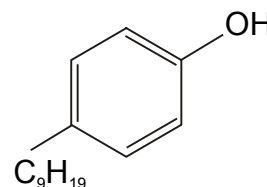


Abb. 2.7: *p*-Nonylphenol, MW: 220,36

Das in Oberflächengewässern nachweisbare Nonylphenol stammt überwiegend aus dem biologischen Abbau der Polyethoxylate (BUA 1988). Nonylphenol ist in Wasser bis zu einer Konzentration von 5,4 mg/L (20,5 °C) löslich (Ahel und Giger 1993a); bei einem P_{ow} von 4,48 ist Nonylphenol jedoch recht lipophil, so dass es an Schwebstoffe und Sedimente gebunden wird (Ahel und Giger 1993b), aber auch die Möglichkeit der Bioakkumulation besteht. In den Experimenten wurde techn. 4-Nonylphenol von Aldrich (Taufkirchen, FRG) verwendet.

Methoxychlor

Methoxychlor wurde 1944 von Ciba eingeführt und wird, seitdem DDT in vielen Ländern nicht mehr zugelassen ist, verstärkt als Insektizid mit breitem Wirkungsspektrum eingesetzt. Zwischen 1969 und 1989 wurden in Deutschland mehrere Insektizide mit Methoxychlor als Wirkstoff zugelassen; seither

ist keine Neuzulassung mehr erfolgt. Methoxychlor ist nur zu geringem Maße wasserlöslich (0,045 mg/L bei 25 °C) und weist einen P_{OW} von 4,8 – 5,08 auf. Damit kommt Methoxychlor im aquatischen Milieu hauptsächlich Sediment- und Schwebstoffgebunden vor. Im Gegensatz zu allen anderen Testsubstanzen ist Methoxychlor nicht selbst das hormonell aktive Agens, sondern ein Proestrogen, das in der Leber von Vertebraten zu 2,2-Bis(p-hydroxyphenyl)-1,1,1-trichlorethan (HPTE) als estrogene Substanz metabolisiert wird (Cummings 1997). Methoxychlor wurde bei Sigma (Reinheit ~ 95 %) bezogen.

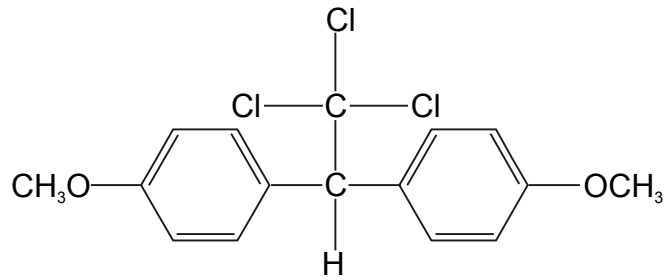


Abb. 2.9: Methoxychlor, MW: 345,65

Bisphenol-A

Bisphenol-A wird als Monomer bei der Herstellung von Polycarbonaten und Epoxidharzen benötigt. Es gehört zu den weltweit meistproduzierten Grundchemikalien (Deutschland 1995: 210.000 Tonnen). Ferner wird Bisphenol-A als Antioxidans in Kunststoffen zur Produktion des Flammenschutzmittels Tetrabrombisphenol A und als farbentwickelndes Additiv in Thermopapier eingesetzt. Bisphenol-A ist bis zu einer Konzentration von 120 mg/L wasserlöslich und ist mit einem P_{OW} von 3,32 mäßig lipophil. Bisphenol-A (Reinheit > 99 %) wurde bei Aldrich bezogen.

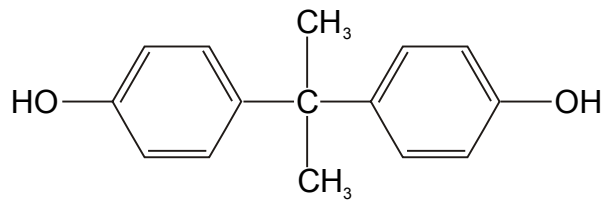


Abb. 2.8: Bisphenol-A, MW: 228,28

2.1.3 Systeme zur *In vivo*-Exposition von (Xeno-)estrogenen

Intraperitoneale Applikation

Zum Vergleich der zeitabhängigen Expression von Vitellogenin-mRNA und Proteinen wurden männliche Regenbogenforellen einmalig mit 1 mg/kg 17 β -Estradiol injiziert. Für die intraperitoneal craniat vorgenommene Injektion wurde eine Estradiolstammllösung in Ethanol vorbereitet (2,5 mg/mL) und direkt vor der Applikation im Verhältnis 1 : 5 in 0,9 % NaCl-Lösung aufgenommen.

Exposition im semistatischen System

Für die 7-Tage-Exposition von Medakas in Nonylphenol und 17α -Ethinylestradiol wurde ein semistatisches Expositionssystem verwendet. sechs männliche Medakas wurden pro Substanzkonzentration in einem 2 L-Aquarium exponiert; jeden Tag wurde 1 L des Aquarienwassers erneuert. Entstehender Mulm wurde bei jedem Wasserwechsel abgesaugt. Die Exposition erfolgte bei einer konstanten Temperatur von 25 °C, durch Belüftung wurde ein Sauerstoffsättigung von ≥ 97 % sichergestellt. Nonylphenol wurde in Konzentrationen von 2, 20 und 50 $\mu\text{g/L}$, 17α -Ethinylestradiol in Konzentrationen von 1, 10, 100 ng/L exponiert. Für die Anfertigung der Stammlösungen wurde DMSO als Lösungsvermittler verwendet; die Endkonzentration im Versuch wurde bei 0,001 % gehalten. Als Kontrolle dienten mit 0,001 % DMSO belastete Tiere.

Für die Exposition von Zebrabärblingen gegenüber 17α -Ethinylestradiol während der Embryonal- und Larvalentwicklung wurde ebenfalls ein semistatisches System verwendet. Die Exposition erfolgte in Aquarienkunsthwasser (siehe oben) bei 27 °C für 4 bzw. 6 d. 17α -Ethinylestradiol wurde in den Konzentrationen von 0,25, 0,85, 2,5, 8,5, 25, 85 sowie 100 ng/L eingesetzt, wobei DMSO in einer Endkonzentration von 0,001 % als Lösungsvermittler eingesetzt wurde. Es wurde täglich ein vollständiger Wasserwechsel vorgenommen.

Exposition unter Durchflussbedingungen

Die vergleichende Exposition von männlichen, adulten Zebrabärblingen und Medakas wurde in einem Durchflusssystem vorgenommen (Abb. 2.10). Die Durchflussgeschwindigkeit wurde bei 4 L/h gehalten, so dass bei der Aquariengröße von 60 L alle 15 h ein vollständiger Austausch der Schadstofflösung gewährleistet wurde. Für die Erfassung des zeitlichen Verlaufs der Expression der Estrogen-regulierten Gene Vitellogenin, Estrogenrezeptor, Choriogenin H (nur Medaka) und ZP2 (nur Zebrabärbling) erfolgte die Exposition der Versuchstiere mit 50 ng/L 17α -Ethinylestradiol über 1 – 17 Tage. Für die Erfassung von Dosis-Wirkungsbeziehungen bei verschiedenen (Xeno-)estrogenen wurden Nonylphenol und Methoxychlor in Konzentrationen von 2,5, 8,5, 25, 85 und 250 $\mu\text{g/L}$, 17α -Ethinylestradiol in Konzentrationen von 0,25, 0,85, 2,5, 8,5, 25 und 85 ng/L eingesetzt; die Exposition erfolgte für vier (Zebrabärblinge) bzw. fünf Tage (Medakas). Zur Erfassung von Langzeiteffekten wurden Zebrabärblinge für 21 Tage bei den gleichen Konzentrationen von 17α -Ethinylestradiol gehalten. Für jede Testgruppe wurden je acht Zebrabärblinge und sieben Medakas verwendet. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden Medakas und Zebrabärblinge immer parallel in den gleichen Aquarien exponiert. Wie bereits in den semistatischen Versuchen wurde DMSO als Lösungsvermittler für die Anfertigung der Stammlösungen verwendet, die Endkonzentrationen lag wiederum bei 0,001 %. Es wurden sowohl Lösungsmittel- als auch Wasserkontrollen mitgeführt. Die Versuchsdurchführung erfolgte bei einer Temperatur von 25 °C, einem pH-Wert von 7,7 und einer Sauerstoffsättigung von ≥ 97 %.

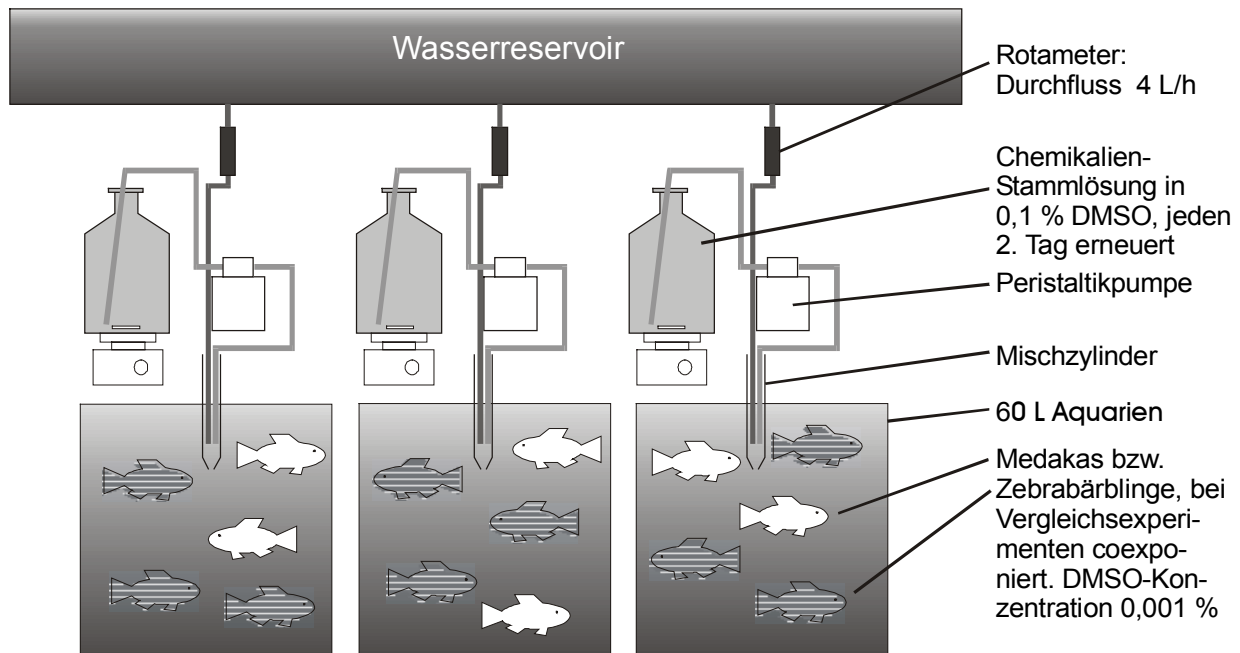


Abb. 2.10: Durchflusssystem für die Exposition gegenüber (Xeno-)estrogenen

2.1.4 *In-vitro*-Exposition gegenüber (Xeno-)estrogenen: Hepatocytenprimärkulturen aus der Regenbogenforelle

Für die Herstellung der Hepatocytenprimärkulturen wurden männliche Regenbogenforellen in einer gesättigten Benzocain-Lösung (Ethyl-*p*-aminobenzoat, Sigma, Deisenhofen) betäubt, anschließend gewogen, getrocknet und äußerlich mit 70 % Ethanol desinfiziert. Die folgenden Schritte der Präparation wurden an der Sterilwerkbank vorgenommen. Die Fische wurden ventral von den Bauchflossen bis zu den Brustflossen und lateral bis auf die Höhe der Niere eröffnet und der Eintritt der Vena porta freigelegt. Der Sinus venosus des Herzens wurde durch einen Schnitt eröffnet und unmittelbar danach eine Flügelkanüle (Durchmesser 0,8 mm) in die Vena porta eingeführt und mit zwei Arterienklemmen fixiert. Zur Destabilisierung von Zelladhäsionen wurde die Leber mit EDTA-haltigem sterilem Dulbeccos PBS (2 g/L NaHCO₃, 0,548 g/L Na₂EDTA, pH 7,5) durch eine peristaltische Pumpe (Reglo M8, Ismatec, Zürich, CH) über einen Kunststoffschlauch mit ca. 7 mL/min für maximal 8 Minuten präperfundiert. Während des Pumpvorganges wurde die Leber vollständig aus dem Tier herauspräpariert und an einem Stativ hängend fixiert. Im folgenden Perfusionsschritt wurde die Leber mit 0,5 mg/mL Collagenase (Roche Diagnostics, Mannheim) in phenolrotfreiem M199 (Sigma) bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 6 mL/min behandelt. Nach 15 min wurde die Perfusionsgeschwindigkeit auf 7 mL/min erhöht. Nach Abschluß der Perfusion wurde die Leber vom Stativ abgenommen und in eine Petrischale, die mit 10 mL M199 benetzt wurde, überführt. Die Bindegewebskapsel des Organs wurde mit einer sterilen Rasierklinge angeschnitten. Entstehende Leberfragmente wurden mit

einer Pinzette zerzupft und die Hepatocyten in das Medium freigesetzt. Die so erhaltene Zellsuspension wurde über eine Filtrierglocke mit einem Nylongazernetz (200 μm Maschenweite) gefiltert, um grobe Bindegewebsbestandteile zu entfernen. Zur Beseitigung feinerer Bindegewebspartikel bzw. zur Vereinzelung der Hepatocyten erfolgte ein weiterer Filtrierschritt über ein Nylongazernetz mit 70 μm Maschenweite. Das Filtrat der Zellsuspension (ca. 20 mL) wurde in zwei 50 mL Falcon-Röhrchen (Greiner, Solingen) überführt und dreimal bei $110 \times g$ für 7 Minuten bei 14 bzw. 18 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden nach jeder Zentrifugation verworfen, die Pellets erneut in 25 mL Medium suspendiert. Nach dem letzten Zentrifugationschritt wurden die Pellets in 100 mL M199 mit 1% Streptomycin/Penicillin aufgenommen. Der Zelltitert wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Vitalität der Zellen wurde mit einer Trypanblaufärbung (0,5 % Trypanblau in 0,9 % NaCl) überprüft (Verhältnis Färbelösung : Zellsuspension 1:1, je 200 μL ; Blaufärbung toter Zellen nach 5 Minuten Inkubation). Nach Einstellung des Zelltiters wurden die Hepatocyten in einer Dichte von 2×10^6 Zellen/mL ausgesät. Die isolierten Zellen wurden bei einer Temperatur von 14 °C bzw. 18 °C kultiviert.

24 Stunden nach der Isolation hatten die Hepatocyten einen festsitzenden Monolayer gebildet. Für die Hormonapplikation wurden Versuche mit 24 und 72 h Regenerationszeit durchgeführt. Die Hälfte des Zellkulturüberstandes wurde durch je 1 mL der doppelt konzentrierten Testsubstanz in M199 ersetzt. Im Rhythmus von 48 h wurden 1 mL des Kulturmediums erneuert. Für die Vitellogenindetektion im ELISA wurde je 1 mL Kulturüberstand/pro Well entnommen und bis zur Quantifizierung des Vitellogeningehalts im ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Für die Isolation der Gesamt-RNA aus den Primärhepatocyten wurde der schwach adhärenzte Zellrasen zunächst mechanisch von den Kulturplatten gelöst, bei $300 \times g$ pelletiert (5 min, 15 °C) und sofort der RNA-Isolation unterzogen.

Aktivkohle-Reinigung des Kälberserums (charcoal stripped FKS)

Für die Versuche zum Einfluss von verschiedenen Mediensupplementen auf die Expression von Vitellogenin in Hepatocytenprimärkulturen wurde steroidfreies FKS durch sogenanntes charcoal stripping hergestellt. Zur Aktivierung der Aktivkohle wurde 1 g Aktivkohle (Sigma) über Nacht bei 4 °C in 0,1 % Dextran-70-Lösung inkubiert und durch Zentrifugation bei $10.000 \times g$ pelletiert. Zur Entfernung von Steroiden wurden 100 mL FKS (Sigma) mit aktivierter Aktivkohle 10 – 15 min bei 4 °C inkubiert. Nach Abzentrifugation der Aktivkohle ($10.000 \times g$, 4 °C) und Sterilfiltration wurde das "charcoal stripped" FKS bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.1.5 Abschätzung der Zytotoxizität von untersuchten Abwässern an Hepatocyten

MTT-Färbung

Der MTT-Assay (Mosman 1983) wurde bei zahlreichen *In vitro*-Cytotoxizitätsuntersuchungen als Endpunkt benutzt (Barile 1994, Borenfreund et al. 1988, Braunbeck 1993, Carmichael et al. 1987, Denizot und Lang 1986). Ein großer Vorteil dieses Assays liegt darin, dass die Messung der Vitalität ohne zwischengeschaltete Waschschriffe möglich ist, so dass auch die Vitalität von schlecht am Plastik der Mikrotiterplatten haftenden Primärzellen bestimmt werden kann. Dieser Endpunkt beruht auf der Reduktion des löslichen gelben MTT-Tetrazoliumsalses (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-[tetra]-zoliombromid, Sigma, Deisenhofen) zu einem blauen, unlöslichen Formazanprodukt durch das mitochondriale succinatabhängige Dehydrogenase-System; diese Umwandlung findet nur in lebenden Zellen statt, und die Menge des Formazans korreliert streng mit der Anzahl der vorhandenen Zellen (Denizot und Lang 1986).

Die Durchführung des MTT- Assays orientiert sich an den Vorschriften von Denizot und Lang (1986): Die Zellen werden mit Fremdstoffen inkubiert, das Inkubationsmedium abdekantiert und 100 μL MTT-Färbemedium (1:10-Verdünnung einer sterilen MTT-Stammlösung mit 5 mg MTT pro 1 mL Aqua bidest. in Medium, ohne FKS, mit Antibiotika) in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte gefüllt. Nach einer Inkubation über 4 h bei 20 °C werden 100 μL der MTT-Extraktionslösung in die Wells pipettiert, um das Formazan aus den Zellen zu lösen. Nach einer Rücklösedauer von etwa 30 min wird die Intensität der Färbung über die Extinktion bei 540 nm gegen eine Referenz von 690 nm im Mikrotiterplattenreader (SLT, Spectra™) bestimmt.

Laktatdehydrogenase-Freisetzung ins Medium

Das Enzym Laktatdehydrogenase ist in intakten Zellen im Cytoplasma lokalisiert. Obwohl sein Austritt aus den Zellen durch intakte Zellmembranen unterbunden wird, findet sich eine gewisse Grundaktivität des Enzyms auch im Medium der Kontrollzellen. Eine Membranschädigung der Zellen, wie sie durch Schadstoffe induziert werden kann, führt jedoch zu einer verstärkten Freisetzung cytoplasmatischer Bestandteile und somit zu einer Anreicherung des relativ stabilen Enzyms LDH im umgebenden Nährmedium (Mitchel et al. 1980, Weishaar et al. 1975). Die Messung der LDH gilt als ein etablierter Endpunkt der Cytotoxizität (Ahne 1985, Barile 1994, Braunbeck 1993, Legrand et al. 1992, Mitchel et al. 1980, Weishaar et al. 1975). Die LDH-Aktivität kann direkt über die Konzentrationsabnahme von NADH oder indirekt über Farbstoffe als ein Endpunkt bestimmt werden (Weishaar et al. 1975).

Für die Bestimmung der Laktatdehydrogenaseaktivität im Kulturüberstand der Hepatocytenprimärkulturen wurden 50 μL des Überstandes einer mit Schadstoff inkubierten 96-Well-Platte mit einer Mehrkanalpipette in eine unsterile Mikrotiterplatte auf Eis überführt, so dass sechs Ansätze pro Konzentration zur Verfügung standen. Als Referenz wurde eine Reihe mit 50 μL 50 mM Tris-HCl-Puffer benutzt. Zu allen Wells wurden 250 μL eines auf 25 ± 3 °C temperierten Reaktionsmixes (60 mM Tris-

HCl-Puffer, pH 7,4; 0,2 mM NADH) dazugegeben. Nachdem die Reaktion durch Zugabe von 25 μ L 10 mM Na-Pyruvat als Substrat gestartet wurde, wurde die Abnahme der Extinktion bei 340 nm im Mikrotiterplattenreader über 3 min verfolgt.

2.2 Probenaufbereitung und Lagerung

2.2.1 Plasmapräparation

Zur Entblutung wurden die Versuchstiere (Regenbogenforellen) in einer gesättigten Benzocainlösung (4-Ethylaminobenzoat) betäubt. Die Entnahme des Blutes erfolgte nach Punktion der Schwanzvene. Zur Hemmung der Blutgerinnung wurde eine Azid-Citrat-Dextrose-Lösung (ACD-A, Fa. Greiner, Solingen) verwendet, die in einem Mischungsverhältnis von 900 μ L Vollblut auf 150 μ L ACD-A (1 : 1,17) eingesetzt wurde. Zur Vermeidung einer Proteindegradation wurde der ACD-A-Lösung Aprotinin (Sigma) in einer Endkonzentration von 1 mg/mL zugesetzt. Bis zur Plasmapräparation wurden alle Präparationsschritte unter Eiskühlung durchgeführt. Die Präparation des Plasmas erfolgte mit $1500 \times g$ für 20 min bei 4 °C. Der bei der Zentrifugation erzeugte Plasmaüberstand wurde aliquotiert und in flüssigem N₂ schockgefroren. Die Lagerung des Plasmas erfolgte bei -80 °C.

2.2.2 RNA-Isolation

Für die Isolation der Gesamt-RNA aus größeren Gewebemengen wie der Leber von Regenbogenforellen sowie den zur Identifikation der cDNAs von Vitellogenin und Estrogenrezeptor verwendeten Leberpools von Medaka und Zebrafisch wurde ein auf Phenolextraktion basierender RNeasy-Quick-Kit (Qiagen, Crawley, UK) verwendet. 0,2 g Gewebe wurde in gefrorenem Zustand über 1 min bei 300 U/min im Homogenisator Potter S (Fa. Braun Melsungen AG) in Lösung RNeasy-Quick 1 unter Eiskühlung homogenisiert. Die weitere RNA-Aufbereitung erfolgte entsprechend dem mitgelieferten Protokoll.

Hepatocytenprimärkulturen und einzelne Organe von Zebrafischen und Medakas wurden aufgrund der geringen RNA-Mengen mit dem RNeasy Total RNA-System (Qiagen, Hilden) durchgeführt; es handelt sich hierbei um ein adsorptionschromatographisches, auf Silica-Gel-Membranen basierendes Trennverfahren, das durch kurze Isolationszeit die Aufarbeitung einer großen Probenzahl ermöglicht. Einzelne Organe wurden mit einem Rotor-Stator-Homogenisator (Polytron, Kinematica, Littau/Luzern, CH) im Guanidinoisothiocyanat-haltigen Lysepuffer des Herstellers homogenisiert, ohne die bei -80 °C gelagerten Gewebeproben aufzutauen. Für die Isolation von RNA aus Primärhepatocyten wurde der schwach adherierende Zellrasen zunächst mechanisch von den Kulturplatten gelöst, bei $300 \times g$ pelletiert (5 min, 15 °C) und schließlich in Lysepuffer über Zentrifugation (2 min, RT, $13.000 \times g$) durch sogenannte Shredder-Säulen (Qiagen) homogenisiert. Die weitere Präparation erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Reinheit und RNA-Gehalt aller RNA-Proben wurden photometrisch bei 280/260 nm bestimmt. Bei der RNA-Präparation von Hodengewebe wurde wegen des hohen DNA-Gehalts in diesem Gewebe ein zusätzlicher DNase-Verdau durchgeführt. Hierzu wurde 1 µg RNA für 15 min bei 25 °C mit 0,1 U/µL Deoxyribonuclease I (amplification grade; Gibco Life Technologies, Karlsruhe) behandelt. Für die weitere Anwendung wurde die DNase durch Zugabe von 0,1 Volumen 25 mM EDTA und 10 min Hitzebehandlung bei 65 °C inaktiviert.

2.3 Identifikation, Klonierung und *In-vitro*-Transkription Estrogen-regulierter Gene

2.3.1 Identifikation eines Medaka-Vitellogenin-cDNA-Fragments

Für die Amplifikation einer Medaka-Vitellogenin cDNA wurde unter Verwendung des Programms Blast 2.0 ein Alignment der bisher bekannten Fischvitellogeninsequenzen durchgeführt. Daraufhin wurden mit Hilfe der Software Primer3 spezifische Primer gegenüber zwei konservierten Regionen konstruiert, die ca. 1,2 kb weit auseinanderlagen und bei MWG-Biotech (Ebersberg, FRG; M-Vg1.2+: 5'-GCT GAA CAT CAA GAA GAC CCA-3', M-Vg1.2-: 5'-ACA ATG CAG GAC AGC ATA CG-3') synthetisiert. Für die RT-PCR wurde das Gene Amp[®] RNA-PCR-Kit (PE-Biosystems, Branchburg, USA) verwendet, wobei 1 µg Gesamt-RNA für eine Reaktion mit 100 µL Volumen eingesetzt wurden. Die reverse Transkription (50 mM KCl, 10 mM Tris, 5 mM MgCl₂, 2,5 U/µl MuLV, 1 mM dNTPs, 1 U/µl RNase Inhibitor, 2,5 µM Oligo-dT₁₆) wurde nach einem Annealing-Schritt (10 min, Raumtemperatur) bei 42 °C durchgeführt. Zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase wurde das Reaktionsgemisch 5 min bei 99 °C denaturiert.

Die PCR-Amplifikation wurde über 30 Zyklen durchgeführt (1,5 mM MgCl₂, 1 µM Primer Konzentration, 200 µM dNTPs, 0,25 U/50 µl AmpliTaq[®]-Polymerase), wobei folgendes Programm verwendet wurde: Anfänglicher Denaturierungsschritt über 2 min bei 95 °C, 30 sec bei 95 °C, 30 sec bei 60 °C, 1 min bei 72 °C und ein terminaler Verlängerungsschritt über 10 min bei 70 °C. Das resultierende PCR-Produkt mit einer Länge von 1,2 kb wurde aus einem 1,0 % Agarosegel ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) extrahiert. Die Aufklärung der in Richtung 5'-Ende gerichteten Sequenz erfolgte mit Hilfe einer 5'-RACE-PCR (5' RACE System Version 2.0, Gibco Life Technologies, Karlsruhe, FRG). Die Synthese des cDNA-Primärstranges wurde mit 500 ng Gesamt-RNA aus der Leber nach dem Protokoll des Herstellers vorgenommen. Die hierzu verwendete Sequenz des 1. genspezifischen Primers (GSP1) lautete 5'-TCT GAT TGG CAG AGA TGC AG-3'. Das resultierende cDNA-Produkt wurde mit GlassMAX spin cartridges (Gibco) isoliert und in 50 µl sterilem Aqua bidest. aufgenommen. Das TdT-Tailing erfolgte mit 10 µl der aufgereinigten cDNA-Probe. Die Amplifikation der Ziel-cDNA wurde mit einem 2. genspezifischen Primer (GSP2: 5'-CCG TAA CGC TCA GAC ACA GG-3') und dem im Kit mitgelieferten Abridged Anchor Primers durchgeführt. Folgende Parameter wurden für den PCR-Zyklus verwendet: 2 min bei 94 °C (einmalig), 30 sec bei 94°C, 30 sec bei 62 °C, 1 min bei 72 °C, sowie 7 min bei 72 °C (einmalig) über 35 Zyklen. Nach

Nachweis des PCR-Produkts in einem Ethidiumbromid-gefärbtem Agarosegel wurde die in Frage kommende Bande ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) aufgereinigt. Sowohl Vg1.2 als auch das 5'RACE Produkt wurden bei Seqlab Laboratories (Göttingen) sequenziert.

2.3.2 Identifikation einer Estrogenrezeptor α -cDNA des Zebrahärlings

Zur Amplifikation eines cDNA-Fragments des Estrogenrezeptor α des Zebrahärlings wurden Primer konstruiert, die gegen konservierte Regionen des Estrogenrezeptor α des getüpfelten Gabelwelses (*Ictalurus punctatus*) gerichtet waren. Da die DNA-bindende C-Domäne und die Hormon-bindende E-Domäne des Rezeptors hohe Homologien unter Vertebraten aufweisen, wurden die Primer so gewählt, dass sie einen 0.65 kb langen Abschnitt zwischen beiden Domänen überspannten. Hierzu wurden die Programme Blast 2.0 und Primer3 verwendet; die Primer wurden bei MWG-Biolabs synthetisiert (Upstream Primer: 5'-CCA CTA CGG AGT CTG GTC GT-3'; Downstream Primer: 5'-CCC TCC ACA CAC TCT CCT TC-3'). Die reverse Transkription der RNA wurde mit 1 μ g Gesamt-RNA in 10 μ l RT-Buffer ausgeführt (50 mM KCl, 10 mM Tris, 5 mM MgCl₂, 2,5 U/ μ l MuLV, 1 mM dNTPs, 1 U/ μ l RNase Inhibitor, 2.5 μ M Oligo-d(T)₁₆; GeneAmp[®] RNA PCR Kit, PE-Biosystems). Die Reaktionsbedingungen waren 10 min bei Raumtemperatur, 25 min bei 42 °C und 5 min bei 99 °C.

Die PCR-Amplifikation wurde über 30 Zyklen mit 2 mM MgCl₂, 1 μ M Primer-Konzentration, 200 μ M dNTPs, 0,25 U/50 μ l AmpliTaq[®]-Polymerase ausgeführt, wobei folgendes Programm zur Anwendung kam: 2 min bei 95 °C (einmalig), 30 s bei 95 °C, 30 s bei 55 °C, 1 min bei 72 °C sowie 10 min bei 70 °C (einmalig). Die PCR wurde in Agarosegelen überprüft und die resultierende 0,65 kb-Bande ausgeschnitten und aufgereinigt (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen) Das PCR-Fragment wurde bei Seqlab Laboratories sequenziert.

2.3.3 Konstruktion zweier Vitellogenin-cDNAs des Zebrahärlings aus Expressed Sequence-Tags

Die in Abschnitt 2.3.1 beschriebenen Primer wurden ebenfalls für die RT-PCR mit Leber-Gesamt-RNA des Zebrahärlings verwendet. Die Reaktionsbedingungen wurden, wie im Abschnitt 2.3.1 beschrieben, eingestellt, wobei für die PCR-Amplifikation eine 2 mM MgCl₂-Konzentration verwendet wurde. Hierbei wurde neben zwei weiteren cDNAs ein 0.9 kb cDNA-Fragment nur mit RNA aus weiblichen Lebern erzeugt. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in 1 % Agarosegelen, und die 0.9 kb-Bande wurde ausgeschnitten und extrahiert (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen). Die cDNA wurde in einen TOPO-Vektor inseriert und zur Sequenzierung (Seqlab Laboratories) gegeben, da eine direkte Sequenzierung des Fragments nicht möglich war. Mit der so erhaltenen Sequenz wurde in den GenBank Databases of Expressed Sequence Tags (dbEST) nach überlappenden Sequenzen gesucht. Die Blast2.0-Analyse (Altschul et al., 1997) erzeugte zwei kontinuierliche Sequenzen von 3.6 kb und 4.5 kb mit hoher Homologie zu anderen Fischvitellogeninen. Beide cDNAs zeigten signifikante Unterschiede bei gegenseitigem Alignment; daher wurden zwei unterschiedliche Primer-Paare für die

weitere Analyse konstruiert. Die Verifizierung beider Genprodukte erfolgte durch Sequenzierung der von den Primer-Paaren erzeugten cDNAs.

2.3.4 Klonierung von PCR-Produkten in pCR[®]II-TOPO-Vektoren

Für die Verwendung in Hybridisierungsexperimenten wurden die PCR-Fragmente M-Vg1.2 und Z-ER α 0.6 in prokaryotische Expressionsvektoren inkloniert. Hierfür wurde ein TA-Klonierungssystem verwendet (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen, Carlsbad, USA), das auf der Ligation des durch die Taq-Polymerase an den 3'-Terminus angefügten Desoxyadenosin mit einem überhängenden Desoxythymidin des linearisierten Vektors basiert (Abb. 2.11). Zunächst wurden die entsprechenden cDNA-Fragmente aus der RT-PCR in einer zweiten PCR reamplifiziert, um die Präsenz überhängender Desoxyadenosin zu gewährleisten. Für die PCR (10 – 30 ng/50 μ L cDNA Template, 2,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 125 μ M dNTPs, 1 μ M Primer), wurden die Reaktionsbedingungen des Amplifikationsschritts aus der RT-PCR verwendet.

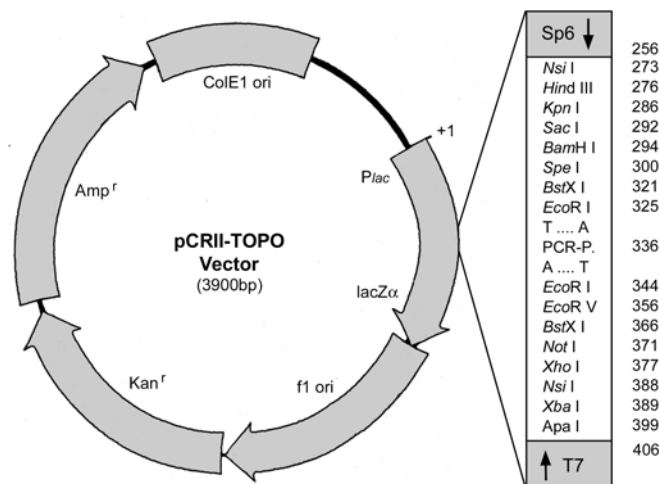


Abb. 2.11: Vektorkarte des pCRII-TOPO Vektors (Invitrogen)

Die Reinheit der PCR-Produkte wurde anschließend auf einem Agarosegel überprüft; bei genügender Reinheit wurde die Ligation direkt im Anschluss ausgeführt. Beim Auftreten von Verunreinigungen wurde das gesuchte PCR-Produkt zunächst aus einem Agarosegel ausgeschnitten und extrahiert (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen). Für die Ligrationsreaktion wurden ca. 10 – 30 ng des PCR-Produkts mit 10 ng pCR[®]II-TOPO Vektor bei einem Reaktionsvolumen von 5 μ L für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert (10 % Glycerol, 0,02 % Triton X-100, 20 μ g/mL BSA, 200 μ M EDTA, 200 μ M DTT, 10 mM Tris-HCl, pH 7,4); die schnelle Ligation wird durch zwei kovalent an die Vektorenden gebundene Topoisomerasen gewährleistet. Bis zur direkt angefügten Transformation wurden die Ligationen auf Eis gelagert.

2.3.5 Klonierung von Vg1.1 in den Expressionsvektor pGem Zf7(-)

Zur Transkription der Vg1.1-sense-mRNA als Standard für eine Vg-mRNA-Quantifizierung war eine Umklonierung der Vg1.1-cDNA in einen bidirektionalen prokaryotischen Expressionsvektor wie den pGemZf7(-)-Vektor (Promega, Mannheim) notwendig.

Zur Exzision von Vg1.1 aus dem pSG5-Vektor (Abb. 2.12) wurden 15 µg pSG5Vg1.1 Plasmid-DNA (Ren et al. 1996a) mit BamH I geschnitten; durch Ethanolpräzipitation wurde die DNA für die Weiterverarbeitung gefällt und in 20 µL TE-Puffer, pH 8.0 aufgenommen. Die resultierenden DNA-Fragmente wurden anschließend im 0,8 % Agarosegel aufgetrennt, die Vg1.1-Bande ausgeschnitten und mittels QiaQuick-Gel Extracion Kit resolvasiert.

3 µg des pGem-Vektors wurden ebenfalls mit BamH I linearisiert und über Phenol-Chloroformextraktion aufgereinigt. Um eine Religation der beiden Vektorenden zu vermeiden, wurde das 3'-Ende des Vektor mit "calf intestinal alkaline phosphatase" (CIAP, Promega, Mannheim) dephosphoryliert: 2 µg/50 µL Vektor, 0,03 U/50 µL CIAP, 1 mM MgCl₂, 0,1 mM ZnCl₂, 1 mM Spermidin, 0,05 M Tris-HCl, pH 9,3. Nach Inkubation bei 37 °C für 30 min, wurden weitere 0,03 U CIAP zugegeben. Die Reaktion wurde mit 30 µL CIAP-Stop-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 200 mM NaCl, 0,5 % SDS, pH 7,5) beendet. Die DNA wurde durch Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt und in 10 µL DEPC-H₂O aufgenommen und die Konzentration im Agarosegel abgeschätzt. Zur Ligation wurden 2 Ansätze im Verhältnis Vektor : Insert 1 : 1 (100 ng Vektor + 37 ng Vg1.1) und 1 : 3 (100 ng Vektor + 110 ng Vg1.1) sowie eine Negativkontrolle ohne Insert hergestellt. Die Ligationsansätze (0,09 U/µL T4 DNA Ligase, 1 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0,1 mM ATP, 3 mM Tris-HCl, pH 7,8) wurden für 3 h bei Raumtemperatur inkubiert und direkt für die Transformation weiterverwendet.

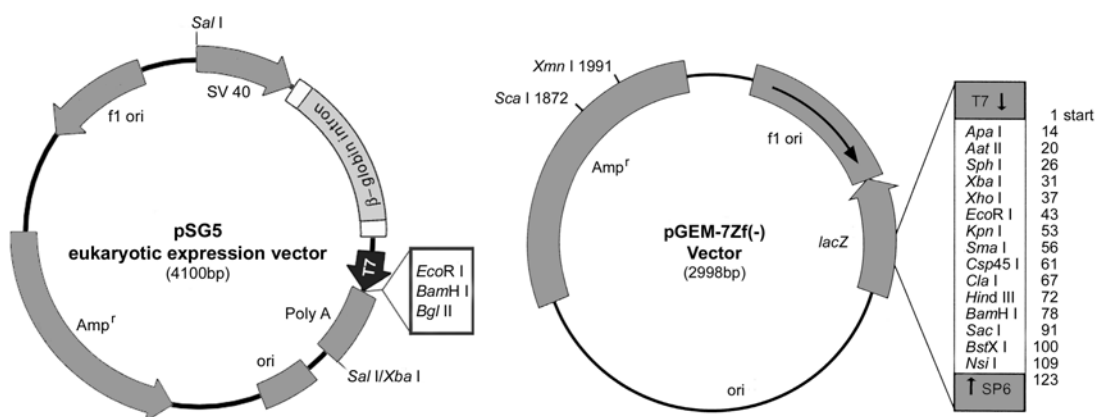


Abb. 2.12: Vektorkarten der psG5 und PGEM-7Zf(-) Vektoren

2.3.6 Hitzetransformation und Kultur der *E. coli* Stämme AG1, JM109 und TOP10F'

Für die Plasmidtransfektionen wurden 20 μL (AG1, JM109) bzw. 50 μL (TOP10F') der kompetenten Bakterienstämme in Polypropylenröhrchen auf Eis aufgetaut; bei TOP10F' Zellen wurde zusätzlich 0,02 M Mercaptoethanol zugefügt. Bei Ligationen wurden jeweils 2 μL des Ligationsansatzes zu den Bakterien gegeben, für die Plasmidamplifikation wurden je 100 und 10 ng des entsprechenden Plasmids zugefügt. Nach einer 30minütigen Inkubationsphase auf Eis wurden die Bakterien einem Hitzeschock von 40 sec bei 42 °C ausgesetzt und anschließend wieder sofort auf Eis gelagert. Jedem Ansatz wurden 100 μL gekühltes LB- (AG1, JM109) bzw. 250 μL SOC-Medium (TOP10F') ohne Antibiotika zugesetzt. Die Transfektionsansätze wurden für 1 h bei 37 °C und 250 U/min inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze auf LB-Platten mit der für die Bakterienstämme entsprechenden Ampicillinkonzentration (siehe Tab. 2.1) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C gelagert. Für das Blue/White-Screening der transformierter Kolonien wurden LB-Agarplatten mit 4 μmol IPTG (Isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranosid) und 1,6 mg X-Gal (5-Bromo-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid) beschichtet.

Nach der Über-Nacht-Inkubation wurde eine geringe Anzahl von Klonen gepickt und hiermit je 4 mL LB-Medium (Ampicillinkonzentration 100 bzw. 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) beimpft; die Inkubation der Bakterien erfolgte wiederum über Nacht bei 37 °C und 250 U/min kultiviert.

Für die Plasmidisolierung wurden die transfizierten Bakterienkulturen bei $1.500 \times g$, 4 °C abzentrifugiert und der Kulturüberstand verworfen. Die weitere Isolation erfolgte mit dem QIAPrep Spin-MiniPrep-Kit (Qiagen, Hilden) gemäß dem Protokoll des Herstellers. Anschließend wurden die Plasmidlösungen in 0,8 % Agarosegelen überprüft. Bei Erstklonierungen wurde zusätzlich eine Restriktionsanalyse mit EcoRI vorgenommen, das bei allen verwendeten Vektoren zur Exzision des Inserts führt.

Tab. 2.1: Verwendete Vektoren und Bakterienstämme

<i>E. coli</i> -Stamm	Vektor	Ampicillinkonzentration	Hersteller
AG1	pSG5	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Stratagene, Heidelberg, FRG
JM109	pGemZf7(-)	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Promega, Mannheim, FRG
TOP10F'	pCR®II-TOPO	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Invitrogen, Carlsbad, USA

2.3.7 Transkription von Digoxigenin (DIG) -markierten cRNA-Sonden

Zur Linerarisierung wurden die Plasmide wie in Tabelle 2.4 (S. 39) über Nacht geschnitten. Am folgenden Tag wurde die Vollständigkeit und Korrektheit des Restriktionsschnitts auf einem Agarosegel überprüft, darauf der Gesamtansatz durch eine Phenol-Chloroformextraktion aufgereinigt und in 10 μL DEPC-H₂O aufgenommen. In einem anschließenden Agarosegel wurde die Plasmidkonzentration

anhand der Bandenintensität im Vergleich mit dem Standard abgeschätzt. Für die Sondentranskription wurde 1 µg des linearisierten Plasmids eingesetzt. Für die Transkription der Sonden wurde das DIG-RNA-Labeling Kit (Sp6 / T7) der Fa. Boehringer (Mannheim) verwendet (2 U/µL Sp6/T7 Polymerase, 1 U/µL RNase Inhibitor, 1 mM ATP, CTP, GTP, 0,65 mM UTP, 0,35 mM DIG-11-UTP, 6 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 2 mM Spermidin, 40 mM Tris-HCl). Die Transkriptionsansätze wurden für 2 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die cRNA durch Ethanolpräzipitation über Nacht bei -20 °C gefällt (75 % Ethanol, 0,5 M LiCl, 20 mM EDTA, pH 8,0). Die Präzipitate wurden durch Zentrifugation (15 min, 10.000 × g, 4 °C) pelletiert und der Überstand verworfen; das Pellet wurde mit 50 µL 70 % Ethanol in DEPC-H₂O gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (15 min, 10.000 × g, 4 °C) wurde die Ethanollösung entfernt und das Pellet 15 min unter der sterilen Werkbank getrocknet. Nach Aufnahme des RNA-Pellets in 50 µL DEPC-H₂O (30 min Inkubation bei 37 °C im Wasserbad) wurde die Sondenkonzentration und der Reinheitsgrad photometrisch ermittelt. Die Lagerung der Sonden erfolgte bei -20 °C.

2.4 Detektionssysteme

2.4.1 ELISA für die Detektion von Vitellogenin im Kulturüberstand von Hepatocyten aus der Regenbogenforelle

Für die Quantifizierung von Vitellogenin im Serum von induzierten männlichen Regenbogenforellen wurde ein kompetitives ELISA-System verwendet. Die für die Durchführung notwendigen Antisera wurden im Rahmen des FuE-Vorhabens "Östrogene Wirkung von Umweltchemikalien" (Islinger und Braunbeck 1998) am Zoologischen Institut hergestellt.

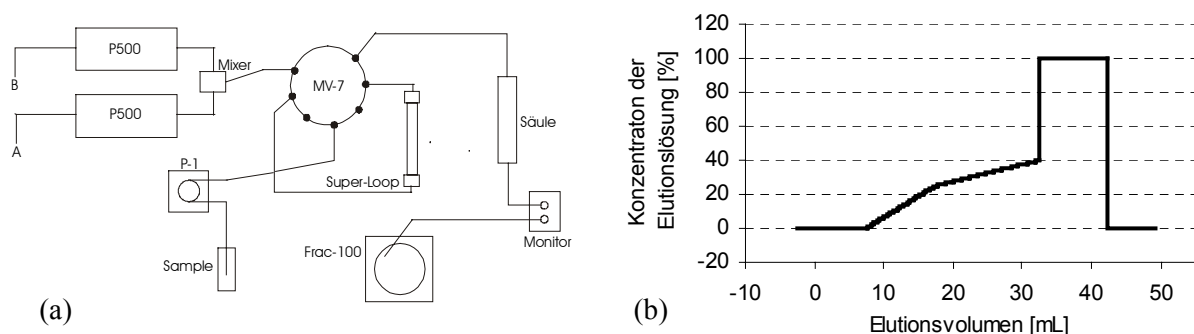


Abb. 2.13: (a) Schematischer Aufbau des zur Vitellogeninaufreinigung verwendeten FPLC-Systems. (b) Elutionsprofil des verwendeten NaCl-Gradienten

Für die Anfertigung des Vitellogeninstandards wurde aufgereinigtes Vitellogenin aus mit 17β-Estradiol injizierten Regenbogenforellen verwendet. Den Versuchstieren wurden viermal im Abstand von je 5 Tagen 10 mg/kg Körpergewicht 17β-Estradiol i.p. injiziert. Fünf Tage nach der letzten Injektion erfolgte die Entblutung der Tiere. Die Vitellogeninisolation verlief in einem 1-Schritt-

Trennverfahren auf einem FPLC-System (Pharmacia, Freiburg, FRG) unter Verwendung einer MonoQ HR 5/5 Anionenaustauschromatographiesäule (Abb. 2.13a). Die Aufreinigung erfolgte in einem Tris-HCl-Puffersystem (20 mM Tris, pH 8,0). Als Elutionspuffer wurde 1 M NaCl in 20 mM Tris verwendet. Die Elution erfolgte mit einer Geschwindigkeit von 1 mL/min mittels eines diskontinuierlichen NaCl-Gradienten mit einer Steigung von 10 mM NaCl pro min im Bereich des Vitellogeninpeaks (Abb. 2.13b). Die Reinheit der Trennung wurde in SDS-Polyacrylamid-Gelen (Laemmli 1970) überprüft. Für den Vitellogeninstandard wurden die Fraktionen der Vitellogeninpeaks mehrerer Trennungsgänge vereinigt und der Proteingehalt nach Bradford (1976) bestimmt.

Für den kompetitiven ELISA wurden die inneren sechzig Wells der 96-Well-ELISA-Platten (Costar 96 Well Flat Bottom EIA Plate, Bio-Rad Laboratories, München) mit je 100 µL Vitellogeninlösung zur Vorbeschichtung (100 ng/ml in Beschichtungspuffer, 50 mM Na₂CO₃, pH 9,6) befüllt und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Parallel wurde das anti-Vitellogenin-Kaninchenantiserum mit Plasmaproben bzw. Vitellogeninstandard in Dulbecco's PBS (8 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 0,2 g/L KH₂PO₄, 1,15 g/L NaH₂PO₄, pH 7,2; DPBS) vorinkubiert. Der Vitellogenin-Standard wurde von 0,45 ng/mL bis 1000 ng/mL in einer 1:3-Verdünnungsreihe angesetzt. Die Plasmaproben der Regenbogenforellen-Männchen wurden in einer 1:3-Verdünnungsreihe von 1:9 bis 1:243 in der Antiserumlösung (Kaninchenantiserum gegen Vitellogenin der Regenbogenforelle, 1:25.000 in PBS) verdünnt und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Platten 3 × mit 200 µL DPBS, 0,1 % Tween gewaschen. Der 3. Waschschrift wurde als "Soaking step" genutzt, d.h. die Waschlösung wurde 5 min in den Wells belassen. Zur Absättigung verbleibender Proteinbindungsstellen wurden die Kavitäten der 96-Well-Platten mit 200 µL Blocking-Lösung (2 % BSA in DPBS) befüllt und in einer feuchten Kammer für 90 min bei 37 °C inkubiert. Die Proben- und Standardverdünnungen wurden nach der Inkubation über Nacht für weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Beendigung des Blocking-Schrittes wurden die ELISA-Platten erneut 3 × wie oben beschrieben gewaschen und anschließend mit 200 µL der Proben- und Standardverdünnungen aus der Antiserumvorinkubation in je drei Replika befüllt. Die Inkubation erfolgte für 90 min bei 37 °C in einer feuchten Kammer. Nach drei weiteren Waschsritten wurden 100 µL/Well der sekundären Antikörper-Lösung (Ziege anti Kaninchen-IgG H+L Peroxidase-konjugiert, Bio-Rad Laboratories, München), 1:3000 in DPBS in die ELISA-Platte pipettiert und in einer feuchten Kammer bei 37 °C für 45 min inkubiert. Vor der Durchführung der Substratreaktion wurden die Platten erneut gewaschen. Anschließend wurden pro Well der Färbelösung (250 mg/L 2,2'-Azino-di[ethylbenzthiazolinsulfonat (6)], Ammoniumsalz (ABTS), 10 mM Na-Acetat-3-Hydrat, 10 mM Na₂HPO₄, pH 4,2 + 1 mL/L 30 % H₂O₂ unmittelbar vor Färbebeginn) zugesetzt und für 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorptionmessung erfolgte bei einer Wellenlänge von 415 nm im Mikrotiterplattenreader (Spectra III, SLT-Labinstruments, Crailsheim). Auf ein Abstoppen der Substratreaktion wurde verzichtet. Die Weiterverarbeitung der Rohdaten erfolgte unter Verwendung des Tabellenkalkulationsprogrammes Microsoft Excel. Die Berechnung der Vitellogeninkonzentrationen aus den Absorptionswerten der Proben erfolgte durch Einsatz der Variationsfunktion für logarithmische Trends in Bezug zur Standardkurve.

2.4.2 Quantifikation von 17 β -Estradiol im Zellkulturüberstand

Für die Experimente zur Estrogenkontamination von Mediensupplementen wurde ein Enhanced Chemiluminescent Immunosorbent Assay (ECLIA) verwendet. Die Detektion von 17 β -Estradiol erfolgte auf einem automatisierten Elecsys[®] System 2010 (Roche, Mannheim) unter Benutzung des Elecsys[®] Estradiol Immunoassay Kits. Die analytische Nachweisgrenze für das Testsystem liegt bei 36,7 pmol/L.

2.4.3 Northern Dot Blot/Ribonuclease-Protection-Assay

Zur Probenimmobilisierung wurde 1 μ g Gesamt-RNA auf Nylon⁺-Membranen (Qiagen, Hilden) aufgetropft. Nach dem Trocknen der Membran erfolgte ein beidseitiges UV-Crosslinking der aufgetragenen RNA an die Membran (UV-Stratalinker 1800, Stratagene, Heidelberg). Zur Quantifikation der Vitellogenin-mRNA-Menge in den Proben wurde auf jede Membran ein Vitellogeninstandard mit aufgetragen. Hierfür wurde das sense-Transkript von pGem Zf7(-)Vg1.1 verwendet. Die Herstellung erfolgte wie unter 2.3.7 beschrieben, jedoch wurden anstatt der Kombination aus DIG-11-UTP und UTP nur das unmarkierte Nukleotid in 1 mM Konzentration verwendet. Nach photometrischer Quantifizierung des sense-Transkripts wurde ein Vitellogeninstandard in einer 1:3-Verdünnungsreihe von 500 bis 0,123 ng in drei Replika auf jeden Blot aufgetragen. Aus dem Längenverhältnis der Vg1.1-cRNA zur vollständigen Vitellogenin-mRNA von 4,64 wurde die in den Proben vorhandene Vitellogenin-mRNA-Menge errechnet. Für die Prähybridisierung wurden die Blots in sterile 15 mL- bzw. 50 mL-Zentrifugenröhrchen gegeben (Sarstedt, Nürnberg) und mit 3 mL bzw. 7 mL vorgewärmten Hybridisierungspuffer (50 % deionisiertes Formamid, 5 \times SSC, 0,1 % Na-Laurylsarcosinat, 0,02 % SDS, 2 % Blockreagenz (Roche) befüllt. Die Prähybridisierung erfolgte über 2 h bei 68 °C. Für die Hybridisierung wurden 100 ng der cRNA-Sonde pro mL Hybridisierungspuffer verwendet. Zur Linearisierung wurde die cRNA-Sonde zunächst in 100 μ l TE-Puffer 5 min bei 95 °C erhitzt. Die Inkubation der Röhrchen erfolgte über Nacht bei 68 °C im Hybridisierungssofen (Thermo Dux, Wertheim). Am folgenden Tag wurden Stringenzwaschschritte für 2 \times 5 min mit 2 \times SSC/0,1 % SDS bei Raumtemperatur durchgeführt. Anschließend wurden die Membranen 3 \times 10 min mit 0,1 \times SSC/0,1 % SDS bei 68°C gewaschen. Zur Durchführung des RNase-Verdau wurden die Membranen 10 min mit Puffer R (10 mM Tris, 0,3 M NaCl, 5 mM EDTA, pH 7,5), 10 min mit Puffer R + RNase A (Konz. 8 μ g/ μ L zum Gebrauch: 1,25 μ L / 10 mL), sowie 2 \times 10 min mit Puffer R inkubiert. Nach einem 30-minütigen Waschschrift in 2 \times SSC/0,1 % SDS erfolgte die Antikörperdetektion mit anti-Digoxigenin Maus-Fab-Fragmenten, die mit alkalische Phosphatase gekoppelt waren (Roche). Hierzu wurden die Membranen zunächst 1 min in Maleatpuffer (0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, pH 7,5) äquilibriert und 30 min in 1 % Blockreagenz (Roche) in Maleatpuffer inkubiert. Die Antikörper-Detektion erfolgte ebenfalls für 30 min in einer 1 : 10.000-Verdünnung in 1 % Blockingreagenz in Maleatpuffer. Nach zwei Waschschriften von 15 min in Maleatpuffer wurden die Membranen für 1 min mit Detektionspuffer (100 mM MgCl₂, 200 mM NaCl, 200 mM Tris-HCl, pH 9,5) äquilibriert und anschließend 5 min in 2 mL Detektionslösung (1980 μ L Detektionspuffer + 20 μ L CDP-Star, Roche) belas-

sen. Nach Entfernung der Detektionslösung wurde 15 min gewartet. Zur Detektion der Chemilumineszenz wurden BioMax ML Filme verwendet, die zwischen 10 s und 45 min exponiert wurden. Die densitometrische Auswertung der erfassbaren Dots wurde mit dem Dokumentationssystem E.A.S.Y. Win 32 (Herolab, Wiesloch, FRG) durchgeführt.

2.4.4 Northern Blot

Für den Northern Blot wurden die RNA-Proben (0,004 % (w/v) Ethidiumbromid) in 1 %igen denaturierenden Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Existenz und Lage der 28 s und 18 s rRNA wurden bei UV-Bestrahlung (366 nm) photographisch dokumentiert und auf dem Gel markiert. Zur Größenbestimmung detektierter RNA-Banden wurde ein Digoxigenin-markierter RNA-Standard aufgetragen (Roche). Darauf wurden Nylon⁺-Membran, sowie drei Lagen Whatman-Papier 3 MMTM für 2 min in 6 × SSC inkubiert. Die Anordnung des Blotaufbaus folgte dem in Abb. 2.14 dargestellten Schema; dabei wurde auf ein luftblasenfreies Auflegen der am Transfer beteiligten Blot-Schichten geachtet. Der Nukleinsäuretransfer wurde über Nacht (18 - 20 h) durchgeführt. Nach Abbau des Blots wurden die Markierungen für die 28 s und 18 s rRNA auf die Nylonmembran übertragen und die Membran für 5 min in 6 × SSC gewaschen. Nach kurzem Trocknen der Nylonmembran erfolgte das UV-Crosslinking zur Immobilisierung der RNA-Banden. Hybridisierung und Antikörperdetektion wurden gemäß der in Kapitel 2.15 geschilderten Arbeitsschritte durchgeführt, wobei der RNase-Verdau bei Verwendung eines RNA-Standards ausgelassen wurde.

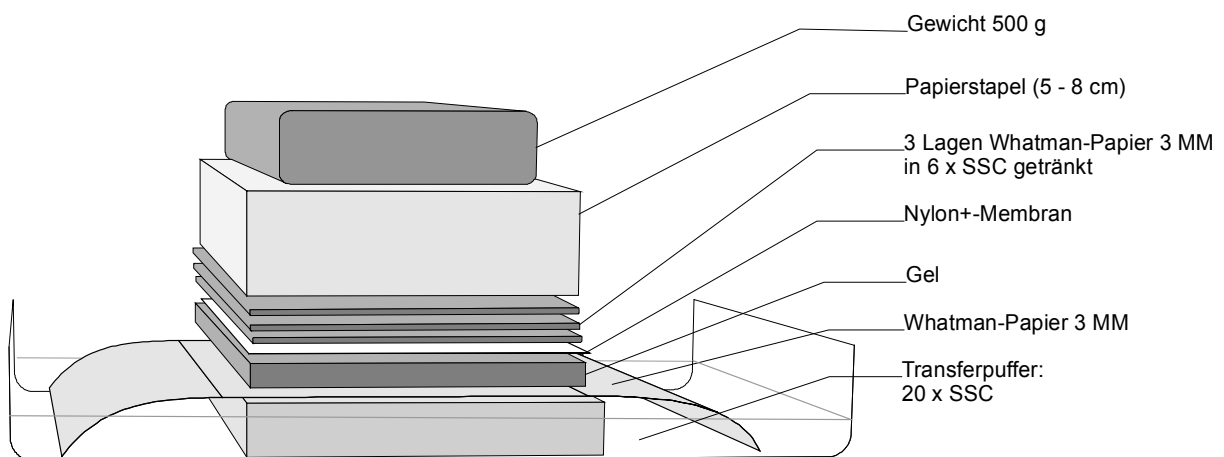


Abb. 2.14: Blotaufbau für den Northern-Transfer von Ribonukleinsäuren

2.4.5 Semiquantitative RT-PCR

Regenbogenforelle

Für die Bestimmung der Expression von Vitellogenin und Estrogenrezeptor der Regenbogenforelle wurden Primer verwendet, deren Sequenz Lech et al. (1996) publizierte. Als interner Standard wurde β -Actin verwendet. Die Sequenzen aller für die semiquantitative RT-PCR verwendeten Primer können Tabelle 2.2. entnommen werden. Unter Verwendung des Gene Amp[®] RNA PCR Kit (PE Biosystems, Branchburg, USA) wurde die RT-PCR mit folgenden Parametern durchgeführt: Nach einer 10 min Oligo-dT₁₆-Primer Annealing-Phase bei Raumtemperatur wurde die reverse Transkription (50 mM KCl, 10 mM Tris, 5 mM MgCl₂, 2,5 U/ μ L MuLV, 1 mM dNTPs, 1 U/ μ L RNase Inhibitor, 2,5 μ M Oligo-d(T)₁₆, 50 ng/ μ L Gesamt-RNA) für Estrogenrezeptor und β -Actin 15 min bei 42 °C ausgeführt. Im Falle von Vitellogenin wurde dieser Schritt auf eine Inkubationszeit von 45 min verlängert. Zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase wurden die Proben für 5 min auf 95 °C erhitzt.

Für die Amplifikation der Vitellogenin-cDNA (2 mM MgCl₂, 200 μ M dNTPs, 1 μ M Primer, 5 % deionisiertes Formamid, 10 % Glycerin, 0,025 U/ μ L Taq Polymerase) wurden Inkubationsschritte von 2 min bei 95 °C, 30 sec bei 95 °C, 30 sec bei 59 °C und 1 min für 30 Zyklen eingehalten; zur Amplifikation von Estrogenrezeptor und β -Actin (2 mM MgCl₂, 200 μ M dNTPs, 1 μ M Primer, 0,025 U/ μ L Taq Polymerase) wurden die zyklischen Inkubationsschritte, wie für Vitellogenin beschrieben, beibehalten; für den Estrogenrezeptor wurden 30, für β -Actin 23 Amplifikationszyklen verwendet. Nach Beendigung des letzten Zyklus wurde ein zusätzlicher Syntheseschritt von 10 min bei 70 °C angefügt, um die vollständige Amplifikation aller cDNAs zu garantieren.

Tab. 2.2: Primersequenzen, die für die Genexpressionsmessungen verwendet wurden. Die Länge der amplifizierten cDNAs ist in der zweiten Spalte angegeben.

Genprodukt, Abkürzung	Größe	Upstream primer	Downstream primer
Vitellogenin, <i>RT-VG</i>	0.8 kb	5' -GGTTGCCACATCTGAAAGGAC-3'	5' -AGGCAGACAACGCAGCACAG-3'
Estrogenrezeptor α , <i>RT-ER</i>	1.0 kb	5' -TGCCTCTGGGTACCACTACG-3'	5' -AGGTGCTCCATGCCTTTGTTG-3'
β -Actin, <i>RT-ACT</i>	0.5 kb	5' -CCTGACCCTGAAGTACCCCA-3'	5' -CGTCATGCAGCTCATAGCTC-3'
Estrogenrezeptor α , <i>M-ER</i>	0.7 kb	5' -GGAGCCACTTCACAACAGC-3'	5' -GGGACGCAACCTTACAATCT-3'
Vitellogenin, <i>M-VG</i>	0.5 kb	5' -GACCTGGAAGCATTCTGGAG-3'	5' -TCTGATTGGCAGAGATGCAG-3'
Choriogenin H, <i>M-CHG</i>	0.9 kb	5' -TCCAGGCAAGAACCCAAATA-3'	5' -TTGAACAGGAAGCGACTGTG-3'
Elongation factor 1 α , <i>M-ELF</i>	0.3 kb	5' -AGCGACAAGATGAGCTGGTT-3'	5' -GGGCACAGCTTCTGGTAAAG-3'
Estrogenrezeptor α , <i>Z-ERα</i>	0.3 kb	5' -CCCACAGGACAAGAGGAAGA-3'	5' -CCTGGTCATGCAGAGACAGA-3'
Estrogenrezeptor β , <i>Z-ERβ</i>	0.6 kb	5' -CGTAACCCCAATCAGAGACA GC-3'	5' -ATCCTCAGGAGTCTGTGGCAA CT-3'
Vitellogenin 1, <i>Z-VG1</i>	0.8 kb	5' -GCTGCTGCATCTGTCAATGT-3'	5' -CTGCTGCTGCTTTTCAGAAGA-3'
Vitellogenin 2, <i>Z-VG2</i>	0.8 kb	5' -GTTTGGTATCCGTGCAGATG-3'	5' -TCAGGCATCATGGGTGTAT-3'
Elongation factor 1 α , <i>Z-ELF</i>	0.3 kb	5' -CTTCGTCCCAATTCAGGAT-3'	5' -CAGAGACTCGTGGTGCATCT-3'

Medaka

Die Expression von Medaka Vitellogenin wurde unter Verwendung des Gene Amp[®] RNA PCR Kits (PE-Biosystems, Weiterstadt) gemessen. Für die reverse Transkription (50 mM KCl, 10 mM Tris, 5 mM MgCl₂, 2,5 U/μl MuLV, 1 mM dNTPs, 1 U/μl RNase Inhibitor, 2,5 μM Oligo-d(T)₁₆, 50 ng/μL Gesamt-RNA) wurde ein Primer Annealing-Schritt von 10 min bei Raumtemperatur, ein Transkriptionsschritt von 25 min bei 42 °C und ein Enzym-Denaturierungsschritt von 5 min 95 °C durchgeführt. Die Amplifikation der Vitellogenin-cDNA M-Vg0.5 erfolgte mit 30 Zyklen mit 95 °C/30 sec für die Denaturierung, 57 °C/30 sec für die Primeranlagerung sowie 72 °C/L min zur Replikation der DNA (1,5 mM MgCl₂, 1 μM Primer Konzentration, 200 μM dNTPs, 0,25 U/50 μl AmpliTaq[®]-Polymerase). Für den Nachweis von Estrogenrezeptor- (Gene Bank accession number D28954), Choriogenin H- (Murata et al. 1997; D89609) und Elongation factor 1α-mRNA (AB013606), die als interner Standard diente, wurden Primer mit Hilfe der Primer 3-Software (Rozen und Skaletsky 1998) konstruiert. Die Amplifikation dieser cDNAs wurde in einem Ein-Schritt-RT-PCR-System mit dem Gene Amp[®] Gold RNA PCR Kit (PE Biosystems) durchgeführt, wobei folgendes Reaktionsgemisch verwendet wurde: 4 ng/μL Gesamt-RNA, 50 mM KCl, 30 mM Tris, 1,75 mM MgCl₂, 200 μM dNTPs, 5 mM DTT, 0,4 U/μL Reverse Transkriptase, 0,5 μM Oligo-d(T)₁₆, 1 μM sequenzspezifische Primer, 0,2 U/μL RNase-Inhibitor, 0,04 U/μL DNA-Polymerase. Die Reaktionsparameter für die reverse Transkription der mRNAs betragen 25 °C/10 min, 42 °C/12 min, 95 °C/ 10 min. Die Amplifikation der korrespondierenden cDNAs wurde mit Hilfe folgender Parameter erreicht: Choriogenin H - 95 °C/20 sec, 62 °C/20 sec, 72 °C/50 sec für 26 Zyklen; Estrogenrezeptor – 95 °C/20 sec, 58 °C/20 sec, 72 °C/50 sec für 32 Zyklen, Elongationsfaktor 1α – 95 °C/20 sec, 58 °C/20 sec, 72 °C/50 sec für 33 Zyklen. An den letzten Amplifikationszyklus wurde ein Syntheseschritt von 7 min bei 72 °C angefügt, um die Vervollständigung von nur partiell synthetisierten Amplifikaten zu gewährleisten.

Zebrabärbling

Für die RT-PCR von Z-Vg1 und Z-Vg2, Estrogenrezeptor α sowie Elongationsfaktor 1α (GenBank L23807) wurde wiederum das Gene Amp[®] Gold RNA PCR Kit verwendet. Zur Durchführung der RT-PCR wurde das gleiche Reaktionsgemisch, wie im obigen Abschnitt für den Medaka beschrieben, verwendet, die Reaktionsbedingungen für die reverse Transkription waren ebenfalls identisch. Die Amplifikation der cDNAs in der Leber wurde unter Verwendung folgender Zyklusparameter ausgeführt: Elongationsfaktor 1α - 20 sec bei 94 °C, 20 sec bei 58 °C, 50 sec bei 72 °C für 33 Zyklen; Z-Vg1 - 20 sec bei 94°C, 20 sec bei 62°C, 50 sec bei 72 °C für 28 Zyklen; Z-Vg2 - 20 sec bei 94 °C, 20 sec bei 58 °C, 50 sec bei 72 °C; Estrogenrezeptor α - 20 sec bei 94 °C, 20 sec bei 58 °C, 40 sec bei 72 °C für 31 Zyklen. Wiederum wurde ein siebenminütiger Syntheseschritt bei 72 °C angefügt. Im Hoden wurden Estrogenrezeptor α und Elongationsfaktor 1α unter Verwendung der gleichen Parameter amplifiziert, für ZP2 wurde eine Amplifikation mit 20 sec bei 94 °C, 20 sec bei 62 °C, 50 sec bei 72 °C für 28 Zyklen vorgenommen. Für die Amplifikation der entsprechenden cDNAs in Ganzkörperhomogenaten bei verschiedenen Zebrabärblingsentwicklungsstufen wurden je 10 ng/μL Gesamt-RNA ein-

gesetzt; die Zahl der Amplifikationszyklen wurden wie folgt verändert: Elongationsfaktor 1α – 20 Zyklen, Z-Vg1 – 32 Zyklen, Estrogenrezeptor α – 36 Zyklen, ZP2 – 32 Zyklen. Für den Nachweis des Estrogenrezeptor β in juvenilen Zebrabärblingen wurde die Zeit für die reverse Transkription auf 25 min erhöht, anschließend wurden 35 Zyklen mit 20 sec bei 94 °C, 20 sec bei 62 °C und 50 sec bei 72 °C durchgeführt.

Semiquantitative Analyse der Amplicons

Die in der RT-PCR produzierten cDNAs wurden in 1,5 bzw. 1,6 % Agarosegelen in TBE-Puffer (45 mM Tris, 45 mM Borsäure, 1 mM EDTA, pH 8,0) nachgewiesen. Die Ethidiumbromid-gefärbten Gele wurden fotografiert und densitometrisch mit der Software E.A.S.Y. Win 32 (Herolab, Wiesloch) ausgewertet. Die Ergebnisse wurden als Ratio zwischen den House Keeping Proteinen (Elongationsfaktor 1α oder β -Actin) und dem Estrogen-regulierten Genprodukt dargestellt. Statistische Signifikanzanalysen wurden mit One Way ANOVA und Tukey Test durchgeführt (Sigma Stat 2.01, Jandel Scientific, Erkrath, FRG).

2.5 Elektronenmikroskopie

Zur Erfassung cytologischer Veränderungen in Leber und Hoden durch Einfluss von Estrogenen wurden männliche Zebrabärblinge 21 Tage mit 10 ng/L 17α -Ethinylestradiol im Durchflusssystem exponiert. Nach Betäubung in gesättigter Benzocainlösung wurden die Tiere ventral eröffnet und das Herz freigelegt. Zur Perfusionsfixierung wurde eine Microinjektionsnadel in den Ventrikel des Herzes eingeführt und der Sinus venosus eröffnet. Die Perfusion wurde unter Benutzung der Peristaltikpumpe Ismatec IP12 (Ismatec, Zürich, Ch) zunächst zur Entfernung des Blutes mit 0,9% NaCl, 2,5 % Polyvinylpyrrolidon, 0,5 % Procain, dann für 3 – 5 min mit eisgekühltem Perfusionsfixans 1 (1,5 % Glutaraldehyd, 1,5 % Paraformaldehyd, 2,5 % Polyvinylpyrrolidon, 0,2 M Na_2HPO_4 , pH 7,6) durchgeführt. Direkt im Anschluss an die Perfusion wurden Leber und Hoden entnommen und für weitere 2 h bei 4 °C in Perfusionsfixans 1 immersionsfixiert. Für die weitere Bearbeitung der Proben wurde das Gewebe in 1 mm³ große Teile zerschnitten und über Nacht bei 4 °C in Perfusionsfixans 2 (2,5 % Glutaraldehyd, 0,1 M Natriumcacodylat, 4 % Polyvinylpyrrolidon, 0,05 % Calciumchlorid (pH 7,6) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in kaltem 0,1 M Cacodylatpuffer, pH 7,6 wurden die Proben für die Darstellung der Peroxisomen nach Le Hir (1979) 2×10 min mit 0,01 M Theorell-Stenhagen-Puffer (TS-Puffer; pH 10) äquilibriert. Die Färbung wurde mit 0,2 % Diaminobenzidin, 0,05 % H_2O_2 in 0,01 M TS-Puffer bei 37 °C für 90 min durchgeführt. Anschließend wurden die Proben 2×10 min in TS-Puffer sowie 2×10 min in 0,1 M Cacodylatpuffer (pH 7,6) gewaschen. Zur Fixierung von Lipidmembranen wurden die Proben 120 min in 1 % reduziertem OsO_4 bei 4 °C inkubiert (Karnovsky 1971). Darauffolgend wurde 2×10 min in 0,1 M Cacodylatpuffer sowie 3×10 min in 0,05 M Maleatpuffer (pH 5,2) gewaschen. Die Kontrastierung der Proben wurde mit 1 % Uranylacetat in 0,05 M Maleatpuffer bei 4 °C über Nacht durchgeführt. Nach 3×10 min Spülen mit 0,05 M Maleatpuffer

wurden die Gewebeteile für die Einbettung je 3×10 min in 50, 75, 85, 95, 100 % Ethanol entwässert. Anschließend wurde das Gewebe für 1 h in einem 1 : 1-Gemisch aus Ethanol und Spurr's Medium (Spurr 1969), 6 h in einem 1 : 3 Gemisch aus Ethanol und Spurr's Medium sowie 24 h in reinem Spurr's Medium bei 4 °C belassen. Nach Aushärtung der Proben in reinem Spurr's Medium bei 65 °C wurden 60 – 80 nM dicke Ultradünnschnitte hergestellt. Zur Hervorhebung von Membranstrukturen wurden die Ultradünnschnitte vor der elektronenmikroskopischen Auswertung für 1 – 2 min mit alkalischer Bleicitratlösung (Reynolds 1963) nachkontrastiert.

2.6 Anhang zu Material und Methoden

2.6.1 Lösungen:

TE-Puffer, pH 8,0

10 mM Tris-HCl
1 mM EDTA

20 × SSC, pH 7,0

3 M NaCl
0,3 M Na₃-Citrat

5 × MOPS

0,1 M (3-[N-Morpholino]propansulfonsäure)
0,025 M NaCl
0,01 M EDTA

10 × TBE

0,45 M Tris
0,45 M Borsäure
0,01 M EDTA

LB-Medium

10 g/L Bacto-Trypton
5 g/L Hefe-Extrakt
10 g/L NaCl

SOC-Medium

20 g/L Bacto-Trypton
5 g/L Hefe-Extrakt
0,5 g/L NaCl
20 mM Glukose
25 mM KCl
100 mM MgCl₂

LB-Agar

1 L LB-Medium + 15 g/L Bacto-Agar

10 × Gel Loading Buffer

0,25 % Bromphenolblau
0,25 % Xylencyanol FF
50 % Glycerol

Bemerkung: Alle Materialien und Lösungen wurden vor der Benutzung hitzesterilisiert. Für die Bearbeitung von RNA wurde zusätzlich allen Lösungen 0,1 % DEPC [Diethylpyrocarbonat] zugesetzt.

2.6.2 Agarosegelelektrophorese

Nukleinsäure-Standards:

- λ -DNA, restriktionsverdaut mit EcoRI/HindIII (Roche, Mannheim), 13 Fragmente: 125, 564, 831, 947, 1.375, 1.584, 1.904, 2.027, 3.530, 4.268, 4.973, 5.148, 2.1226 bp
- peqGold 100 bp DNA-Leiter (peqLab, Erlangen), 10 Fragmente von 100 bis 1.000 bp, sowie 80 bp
- peqGold 1 kb DNA-Leiter (peqLab), 14 Fragmente: 10.000, 8.000, 6.000, 5.000, 4.000, 3.500, 3.000, 2.500, 2.000, 1.500, 1.000, 750, 500, 250 bp
- 100 bp DNA Ladder (Gibco Life Technologies, Karlsruhe), 15 Fragmente zwischen 100 und 1.500 bp, sowie 2072 bp
- Low DNA Mass Ladder (Gibco Life Technologies), 6 Fragmente: 2.000 bp (50 ng/ μ L), 1.200 bp (30 ng/ μ L), 800 bp (20 ng/ μ L), 400 bp (10 ng/ μ L), 200 bp (5 ng/ μ L), 100 bp (2,5 ng/ μ L)
- High DNA Mass Ladder (Gibco Life Technologies), 6 Fragmente: 10.000 bp (50 ng/ μ L), 6.000 bp (30 ng/ μ L), 4.000 bp (20 ng/ μ L), 3.000 bp (15 ng/ μ L), 2.000 bp (10 ng/ μ L), 1.000 bp (5 ng/ μ L)
- RNA-Längenstandards I, Digoxigenin-markiert (Roche), 9 Fragmente: 7.400, 5.300, 2.800, 1.900, 1.600, 1.000, 600, 400, 300 bp

Native Agarosegele

Die benötigte Agarosemenge wurde nach Tabelle 2.12 in 1 x TBE gelöst. Die bearbeitete DNA-Lösung wurde in Probenpuffer bis zu einer 1:10-Verdünnung aufgenommen. Es wurden jedoch immer mindestens 2 μ L/Probe verwendet, um die Sichtbarkeit der Farbmarker zu gewährleisten. Zur Vermeidung von pH-Unterschieden, wurden die Proben mit TE-Puffer äquilibriert. Die Elektrophorese wurde in 1 x TBE-Puffer bei 70 – 90 mV durchgeführt.

Tab. 2.3: Trennbereiche in Agarosegelen

Agarosekonzentration des Gels [% (w/v)]	Effizienter Bereich für die Trennung linearer DNA-Moleküle
0,3	5 – 60 kb
0,6	1 – 20 kb
0,7	0,8 – 10 kb
0,9	0,5 – 7 kb
1,2	0,4 – 6 kb
1,5	0,2 – 3 kb
2,0	0,1 – 2 kb

Denaturierende Agarosegele

Denaturierende Agarosegele wurden in 1 %iger Konzentration zur Darstellung von 28 s und 18 s RNA sowie für Northern Blots verwendet. Nach Lösen der Agarose in DEPC-H₂O durch Hitzebehandlung wurde die Agaroselösung auf ca. 65 °C abgekühlt und 12,3 M Formaldehydlösung bis zur Endkonzentration von 2,2 M sowie 5 × MOPS-Puffer bis zur 1 × Konzentration zugegeben.

Die RNA-Proben wurden in Probenpuffer (50 % Formamid, 2,2 M Formaldehyd, 1 × MOPS, 0,05 µg/mL Ethidiumbromid, 10 % Glycerol, 0,05 % Bromphenoblau, 0,05 % Xylencyanol) aufgenommen und zur Linearisierung 15 min bei 65 °C inkubiert. Bis zur Beladung des Gels wurden die Proben auf Eis gelagert. Die Elektrophorese wurde mit 1 × MOPS als Laufpuffer bei 70 mV durchgeführt.

2.6.3 Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA

Zur DNA-Extraktion wurde 1 Volumen DNA-Lösung mit 1 Volumen TE-Puffer-gesättigtem Phenol, pH 7,5 - 8,0 (Roth, Karlsruhe) versetzt, 1 min gemischt und bei 10.000 × g für 10 min zentrifugiert. Die wässrige obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 0,5 Volumen Phenol sowie 0,5 Volumen Chloroform versetzt, 1 min auf dem Vortex gemischt und wiederum zentrifugiert. Erneut wurde die wässrige Phase abgenommen und mit 1 Volumen Chloroform versetzt, 1 min gemischt und wieder zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde zur DNA-Fällung mit 2,5 Volumen auf -20 °C gekühltes Ethanol und 0,1 Volumen 3 M Na-Acetat versetzt und 30 min bei -80 °C inkubiert. Das Präzipitat wurde bei 10.000 × g für 10 min abzentrifugiert und der resultierende Überstand verworfen. Das Pellet wurde zuletzt mit 70 % Ethanol gewaschen und nach vollständiger Trocknung in TE-Puffer oder DEPC-H₂O aufgenommen.

2.6.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von RNA oder DNA in Lösungen wurde spektralphotometrisch bestimmt (Ultraspec 3000, Pharmacia Biotech, Freiburg). Bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht ein OD-Wert von 1 = 40 µg/mL einzelsträngiger DNA und RNA bzw. 50 µg/mL für DNA im Doppelstrang. Das Verhältnis der Absorption zwischen 260 nm und 280 nm (OD_{260}/OD_{280}) läßt eine Abschätzung des Reinheitsgrades der Proben zu: Reine Präparationen von RNA und DNA besitzen ein OD_{260}/OD_{280} -Verhältnis von 2,0 bzw. 1,8. Gibt es Kontaminationen mit Protein oder Phenol liegt das Verhältnis signifikant unter den angegebenen Werten, eine exakte Quantifizierung der Nukleinsäure-Mengen ist dann nur näherungsweise möglich.

2.6.5 Einsatz von Restriktionsenzymen

Für die Restriktionsanalysen wurden 20 µL-Ansätze verwendet, wobei für ca. 250 ng DNA 0,5 – 1 µL des Restriktionsenzym verwendet wurden. Die Inkubation erfolgte für 1,5 h unter den in Tab. 2.4 angegebenen Reaktionsbedingungen. Für den präparativen Restriktionsverdau bei der Klonierungs- und Transkriptionsvorbereitung wurden Ansätze mit 500 µL Gesamtvolumen verwendet: Für 3 – 10 µg DNA wurden 20 – 40 U Restriktionsenzym eingesetzt. Der Restriktionsverdau erfolgte über Nacht.

Tab. 2.4: Verwendete Restriktionsenzyme

Enzym	Aktivität	Puffer	Temp.	Hersteller	Spezifität
<i>Bam</i> H I	20 U/µL	150 mM NaCl 10 mM Tris 10 mM MgCl ₂ 1 mM DTT 10 µg/mL BSA pH 7,9	37 °C	New England Biolabs, Schwalbach	5' GGATCC 3' 3' CCTAGG 5'
<i>Bgl</i> II	10 U/µL	50 mM NaCl 10 mM Tris 10 mM MgCl ₂ 1 mM DTT 10 µg/mL BSA pH 7,5	37 °C	Roche, Mann- heim	5' AGATCT 3' 3' TCTAGA 5'
<i>Bst</i> X I	2 - 12 U/µL	150 mM NaCl 10 mM Tris 10 mM MgCl ₂ 1 mM DTT 10 µg/mL BSA pH 7,7	55 °C	Stratagene, Heidelberg	5' CCANNNNNTGG 3' 3' GGTNNNNNNACC 5'
<i>Eco</i> R V	20 U/µL	50 mM NaCl 10 mM Tris 10 mM MgCl ₂ 1 mM DTT 10 µg/mL BSA pH 7,9	37 °C	New England Biolabs, Schwalbach	5' GATATC 3' 3' CTATAG 5'
<i>Eco</i> R I	20 U/µL	50 mM NaCl 100 mM Tris 10 mM MgCl ₂ 0,025 % Triton X-100 10 µg/mL BSA pH 7,5	37 °C	New England Biolabs, Schwalbach	5' GAATTC 3' 3' CTTAAG 5'

Fortsetzung Tabelle 2.4

Enzym	Aktivität	Puffer	Temp.	Hersteller	Spezifität
<i>Xba</i> I	20 U/ μ L	50 mM NaCl 10 mM Tris 10 mM MgCl ₂ 1 mM DTT 10 μ g/mL BSA pH 7,9	37 °C	New England Biolabs, Schwalbach	5' TCTAGA 3' 3' AGATCT 5'
<i>Nsi</i> I	20 U/ μ L	100 mM NaCl 50 mM Tris 10 mM MgCl ₂ 1 mM DTT 10 μ g/mL BSA pH 7,5	37 °C	Stratagene, Heidelberg	5' ATGCAT 3' 3' TACGTA 5'

3. Ergebnisse

3.1 Entwicklung und Validierung von Methoden zur Detektion der Expression Estrogen-regulierter Gene

Zusammenfassung

Zum Nachweis der Expression Estrogen-regulierter Gene von Vitellogenin, Estrogenrezeptor und Choriogenin/ZP2 in Regenbogenforelle, Medaka oder Zebrafisch wurden Northern-Hybridisierungs- und RT-PCR-Verfahren entwickelt. Für die Detektion von Vitellogenin-mRNA in der Regenbogenforelle wurde hierbei ein quantitativer, nicht radioaktiver Dot Blot/Ribonuklease Protection Assay und ein semiquantitativer RT-PCR-Nachweis etabliert. Zur Maximierung der Nachweisgrenze des hochsensitiven RT-PCR-Verfahrens wurde ergänzend die Verwendung der PCR-Enhancer Formamid und Glycerin erprobt. Für den Nachweis der mRNAs von Vitellogenin des Medakas sowie von Estrogenrezeptor und Vitellogenin des Zebrafisches war zunächst die Identifikation und Sequenzierung entsprechender cDNA-Fragmente notwendig. Auf Basis dieser Sequenzen wurden auf Grund der geringen zu erwartenden RNA-Mengen, die aus den Organen dieser kleinwüchsigen Fischarten isoliert werden können, ausschließlich Nachweisverfahren auf der Basis der sensitiveren, jedoch nur semiquantitativen RT-PCR entwickelt.

3.1.1 Spezifität von pSG5Vg1.1 für Vitellogenin-mRNA der Regenbogenforelle in Northern-Blot-Experimenten

Zur Überprüfung der Spezifität der Hybridisierung zwischen der cRNA von pSG5Vg1.1 und der Vitellogenin-mRNA aus Regenbogenforellen wurde ein Northern-Blot mit je 1 µg Gesamt-RNA einer unbehandelten und einer mit 17β-Estradiol (1 mg/kg Körpergewicht, i.p.) induzierten männlichen Regenbogenforelle durchgeführt; zur besseren Beurteilung der Hybridisierungseigenschaften der cRNA-Sonde wurde hierbei auf eine RNase-A Behandlung der Blots verzichtet. Die Vg1.1-cRNA zeigt kein Hybridisierungssignal mit der RNA der Negativ-Kontrolle (Abb. 3.1, Bahn 2), jedoch eine hohe spezifische Affinität zu einer einzelnen RNA-Bande in der mit 17β-Estradiol behandelten Probe (Bahn 1). Ein Größenvergleich mit den durch Ethidiumbromid angefärbten 28 s- und 18 s-rRNAs (in Abb. 3.1 graphisch dargestellt) zeigt eine Größe der markierten Bande, die mit den von LeGuellec (1988) angegebenen Werten für die Vitellogenin-mRNA der Regenbogenforelle übereinstimmt.

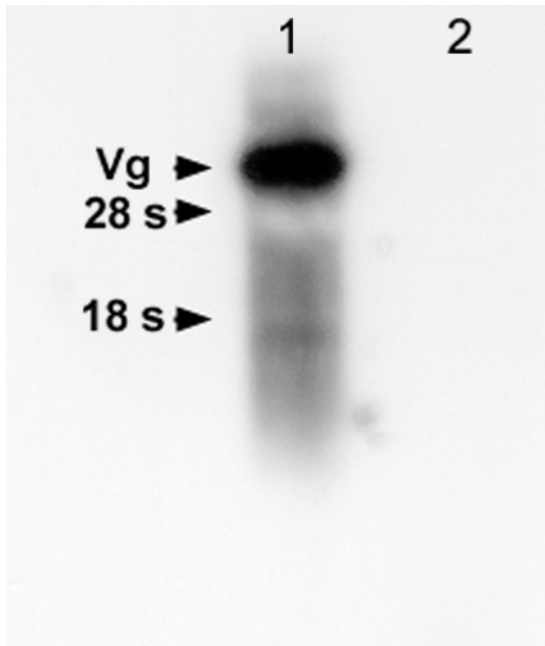


Abb. 3.1: Northern-Blot zur Überprüfung der Spezifität der Vg1.1-cRNA-Sonde. Bahn 1: 1 μ g RNA aus der Leber einer mit 1 mg/kg 17 β -Estradiol behandelten Regenbogenforelle, Bahn 2: 1 μ g RNA eines unbehandelten Kontrolltieres. Abk.: Vg - Vitellogenin-mRNA, 28 s, 18 s - 28 s bzw. 18 s rRNA

3.1.2 Quantifizierung der Vitellogenin-mRNA der Regenbogenforelle durch Verwendung des Vg1.1-sense-Transkripts als Standard in der Dot-Blot-Hybridisierung

Zur Anfertigung des für die Vitellogenin-mRNA-Quantifizierung benötigten Vg1.1-sense-Transkripts mußte eine Umklonierung der Vg1.1-cDNA aus dem pSG5-Plasmid in einen Vektor mit bidirektionalen Promotoren vorgenommen werden. Hierzu wurde die Vg1.1-cDNA in einen handelsüblichen pGemZf7(-)-Vektor inseriert. Nach Restriktionsverdau mit BamH I konnte aus allen Plasmiden ein mit der Vg1.1-cDNA größenkonformes DNA-Insert ausgeschnitten werden, so dass von einem Klonierungserfolg in allen Klonen auszugehen war.

Zur Quantifizierung der unbekanntem Vitellogenin-mRNA-Mengen im Dot Blot/RNase Protection Assay aus *In vitro*- oder *In vivo*-Induktionsversuchen wurde das sense-Transkript von pGemZf7(-)-Vg1.1 als Standard verwendet. Um den für die Chemilumineszenzdetektion sensiblen Bereich zu ermitteln, wurden zunächst 1 : 2-Verdünnungsreihen von 1.000 - 0,49 pg mit der unmarkierten Vg1.1-sense-cRNA auf Nylonmembranen aufgetragen und mit der Digoxigenin-markierten antisense-Vg1.1-cRNA hybridisiert. Wie in Abb. 3.2 dargestellt, lassen sich auf den exponierten Röntgenfilmen mit variierender Belichtungszeit unterschiedliche konzentrationsabhängige Bereiche linearer Schwärzung bestimmen. Dies führt zu einem insgesamt quantifizierbaren Detektionsbereich von ca. 0,49 - 500pg Vg1.1-sense-Transkript auf BioMax MR-1 (Kodak), was einer Vitellogenin-mRNA-Menge von 2,3 - 2300 pg entspricht (Größe der Vg-mRNA nach Mouchel et al. (1996) 5,1 kb gegenüber 1,1 kb für Vg1.1). Bei Verwendung von BioMax Light-1 Filmmaterial konnte der Detektionsbereich auf 0,6 - 1400 pg ausgeweitet werden. Durch Vg1.1-sense-Standard-Verdünnungsreihen in diesem Bereich, die parallel zu der unbekanntem Proben-RNA auf die Blots aufgetragen wurden, war die Ermittlung der im folgenden angegebenen Vitellogenin-mRNA-Gehalte der Hepatocytenprimärkulturen aus der Regenbogenforelle möglich.

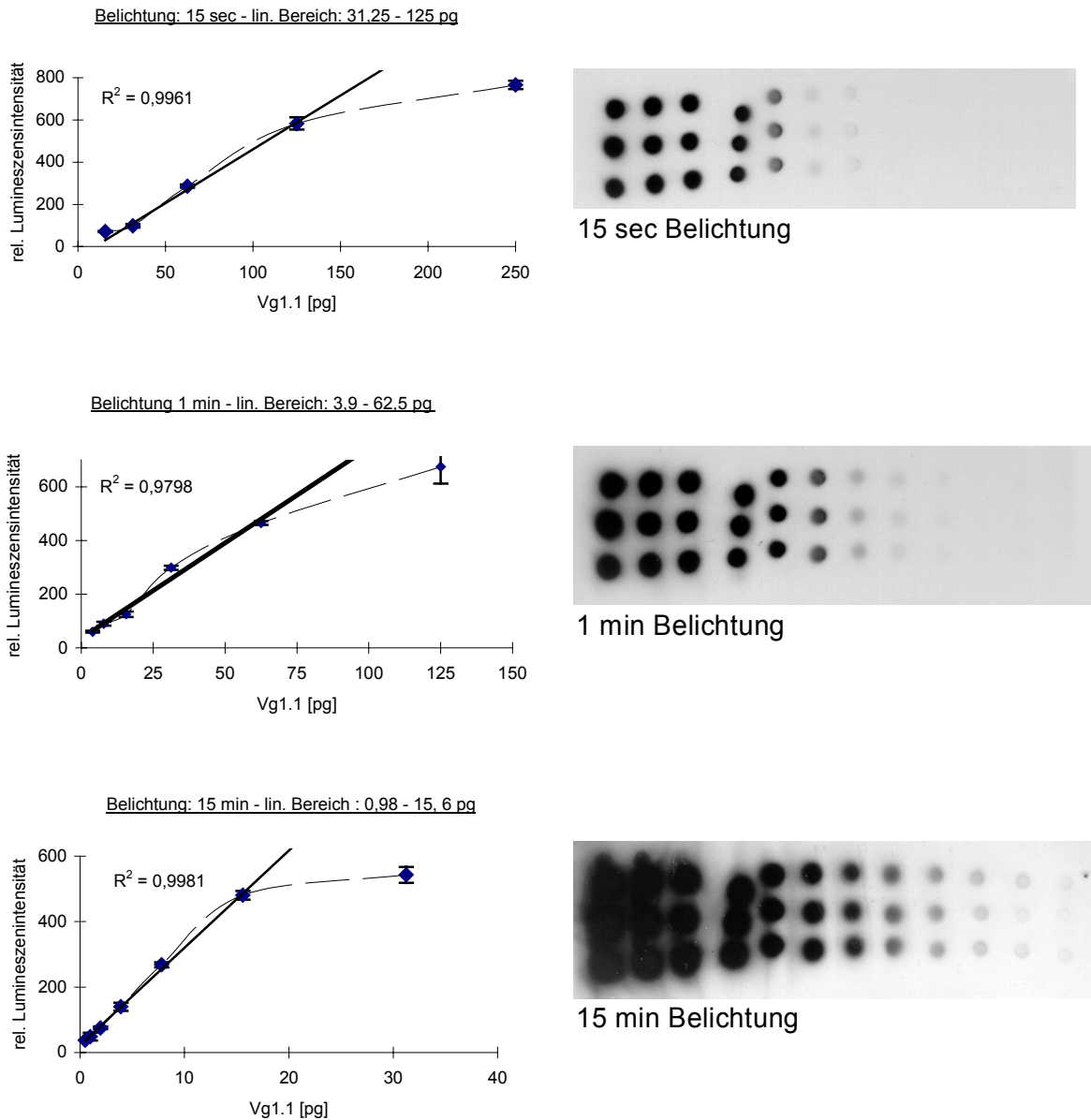


Abb. 3.2: Nachweis von 1:2-Verdünnungsreihen der unmarkierten Vg1.1-sense-cRNA (1000 - 0,49 pg) mit der komplementären Digoxigenin-markierten antisense-cRNA. Die rechte Bildhälfte zeigt die unterschiedlich exponierten Röntgenfilme (BioMax MR-1, Kodak), links ist der zugehörige lineare Detektionsbereich graphisch dargestellt.

3.1.3 Semiquantitativer Nachweis der Vitellogenin-mRNA der Regenbogenforelle durch RT-PCR – Sensitivierung durch Verwendung von Enhancernsubstanzen

Neben dem Dot Blot/RNase Protection Assay wurden als weiteres Nachweisverfahren zur Erfassung der Expression von Estrogenrezeptor und Vitellogenin in der Regenbogenforelle semiquantitative RT-PCR-Techniken angewandt, wobei hierfür von Lech et al. (1996) publizierte Primersequenzen verwendet wurden. Trotz der nur eingeschränkten Möglichkeit der Quantifizierung der amplifizierten cDNAs bietet die RT-PCR im Vergleich zum Dot Blot Assay Vorteile in Bezug auf den Einsatz klei-

ner Probenmengen und den Nachweis schwach exprimierter Gene. Für die Amplifikation der cDNAs von Estrogenrezeptor und Vitellogenin konnten deutliche Unterschiede zwischen unbehandelten und mit 10 nM 17 β -Estradiol exponierten isolierten Hepatocyten aus männlichen Regenbogenforellen beobachtet werden (Abb. 3.3).

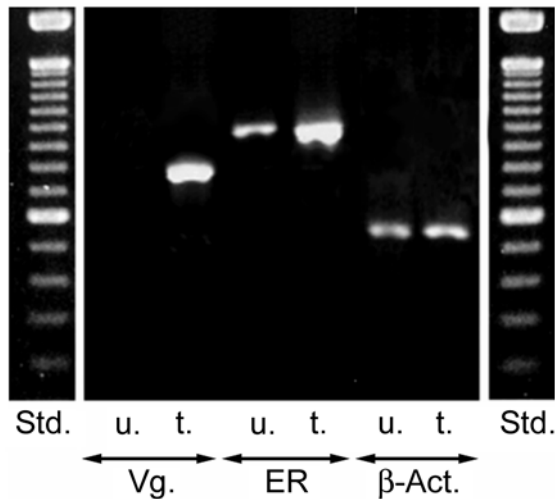


Abb. 3.3: Amplifikation der cDNAs von Vitellogenin (Vg.), Estrogenrezeptor (ER) und β -Actin (β -Act.) durch RT-PCR. Für die RT-PCR wurde die Gesamt-RNA aus unbehandelten (u.) und mit 10 nM 17 β -Estradiol behandelten (t.) Hepatocytenprimärkulturen aus einer männlichen Regenbogenforelle verwendet. Während Vitellogenin und Estrogenrezeptor durch 17 β -Estradiol induziert werden, wird die Expression des House Keeping Proteins β -Actin nicht beeinflusst. Std. Gibco 100 bp DNA ladder (600 und 1.500 bp-Bande hervorgehoben).

Während zur Amplifikation der Estrogenrezeptor-cDNA keine Modifikationen vorgenommen wurden, konnte für den Nachweis der Vitellogenin-mRNA zunächst keine Sensitivitätsverbesserung im Vergleich zum Dot Blot-Assay erreicht werden. Daher wurden verschiedene Modifikationen zu den von Lech et al. (1996) veröffentlichten Protokollen vorgenommen.

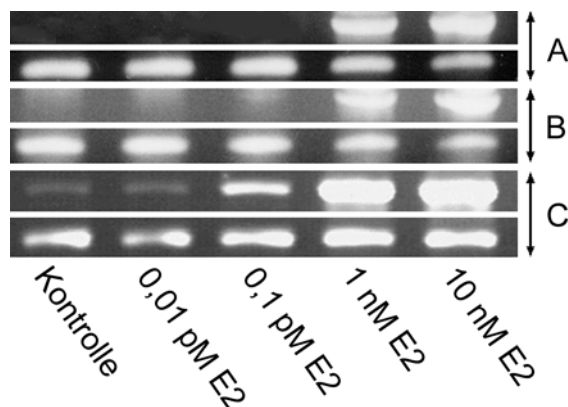


Abb. 3.4: Nachweis der Vitellogeninexpression in Hepatocytenprimärkulturen durch RT-PCR nach Exposition gegenüber 17 β -Estradiol (E2).

(A) 24 h Exposition, Amplifikation ohne Enhancer
(B) 48 h Exposition, Amplifikation ohne Enhancer
(C) 24 h Exposition, Amplifikation mit 5 % Formamid, 10 % Glycerin.

Dargestellt sind jeweils Vitellogenin- (oben) und β -Actin-cDNA (unten).

Zur Validierung der RT-PCR-Bedingungen wurde Gesamt-RNA aus Hepatocytenprimärkulturen verwendet, die 24 h und 48 h mit 17 β -Estradiol in Konzentrationen von 10 pM bis 10 nM behandelt wurden (Abb. 3.4). Für die Einstellung optimaler Amplifikationsbedingungen wurden die Art der verwendeten Primer und die Konzentration der Reversen Transkriptase im RT-Schritt sowie die Verwendung der PCR-Enhancer Glycerin und Formamid im Amplifikationspuffer getestet. Bis zu einer Konzentration von 1 nM 17 β -Estradiol wurde mit allen Pufferzusammensetzungen eine deutliche Amplifikation der Vitellogenin-cDNA beobachtet. Für die Amplifikation von Vitellogenin-cDNA in der 100 pM Estradiol-Probe zeigten sich jedoch signifikante Unterschiede in Abhängigkeit von den eingesetzten Enhancern und der Konzentration der Reversen Transkriptase.

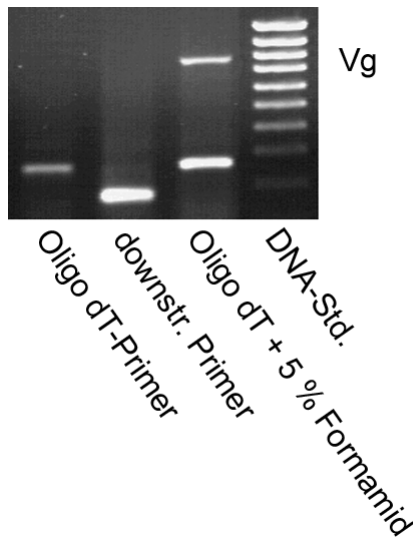


Abb. 3.5: Amplifikation der Vitellogenin-cDNA bei Verwendung von Formamid und unterschiedlichen Primern im RT-Schritt. MuLV Konz.: 5 U/ μ L. DNA-Std. – peqlab 100 bp DNA ladder (sichtbar von 200 – 1000 bp)

Mit einer Reversen Transkriptase-Konzentration von 5 U/ μ L konnte bei den 48 h exponierten Hepatocyten unter Verwendung von 5 % Formamid im Amplifikationspuffer die Expression von Vitellogenin-mRNA nachgewiesen werden (Abb. 3.5).

Bei einer Reduktion der Reversen Transkriptase-Konzentration auf 2,5 U/ μ L konnte die Vitellogenin-mRNA nicht mehr amplifiziert werden, jedoch wurde durch Zugabe von 10 % Glycerin eine Erhöhung der Reaktionssensitivität erreicht, die zu einer Amplifikation von Vitellogenin-cDNA in allen getesteten Proben in unterschiedlichen Mengen führte (Abb. 3.6). Während bei den 48h exponierten Hepatocyten nur geringe Intensitätsunterschiede zwischen Kontrollen und 100 pM 17 β -Estradiol Proben erkennbar waren, wurde in den 24 h exponierten Zellen deutliche Amplifikationsunterschiede zwischen beiden Proben erzielt. Die relativ starke Vitellogenin-Bande weist hierbei auf eine in Abhängigkeit zur Kulturzeit vermehrte Vitellogenin-Expression in den Kontrollen hin.

Zu diesem Phänomen wird in Kapitel 3.2.5 ausführlicher Stellung bezogen. Durch die kombinierte Verwendung der PCR-Enhancer Formamid und Glycerin konnte somit die Effektivität der Amplifikation gesteigert werden, was eine Verkürzung der Hormon-expositionszeiten und somit der Gesamt-Testdauer erlaubt.

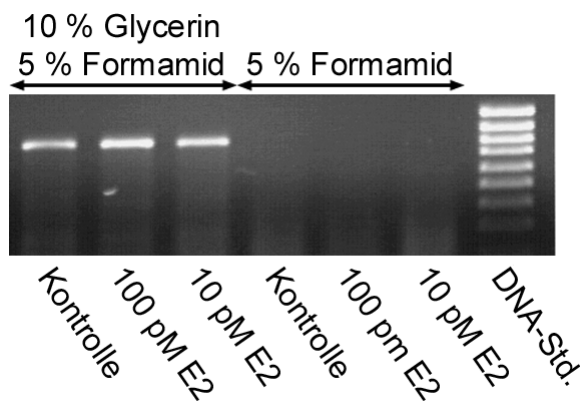


Abb. 3.6: Einfluss von Glycerin auf den Amplifikationsprozess der Vitellogenin-cDNA. Die Verwendung von 10 % Glycerin im Master Mix der PCR-Amplifikation führt zu einer drastischen Erhöhung der RT-PCR-Sensitivität für Vitellogenin. MuLV-Konzentration 2,5 U/ μ L; E2 – 17 β -Estradiol, DNA-Std. peqlab 100 bp ladder (300 – 1.000 bp sichtbar)

3.1.4 Klonierung einer Teilsequenz des Medaka-Vitellogenins

Zur Etablierung eines Nachweissystems für die Expression von Vitellogenin im Medaka (*Oryzias latipes*) war es zunächst nötig, einen Teil der unbekanntes Vitellogeninsequenz aufzuklären. Hierzu wurde unter Verwendung von Primern, die gegen zwei bei Fischvitellogeninen vergleichsweise konservierte Regionen gerichtet waren, eine cDNA aus Leber-RNA weiblicher Medakas mittels RT-PCR hergestellt (Abb. 3.7). Bei der Aufreinigung des PCR-Produkts im Agarosegel ergab sich eine einzelne Bande von 1218 bp, die bei Verwendung von Leber-RNA aus männlichen Fischen nicht produziert

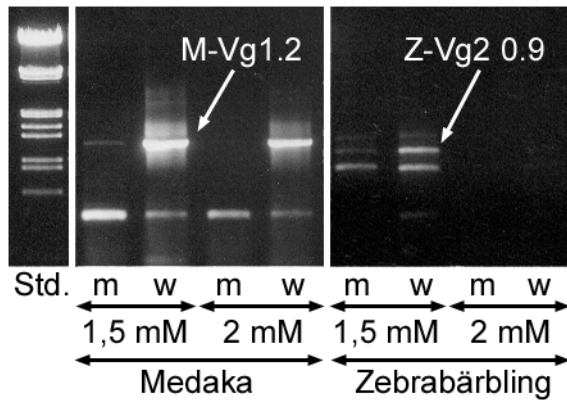


Abb 3.7: Amplifikation geschlechtsspezifischer cDNAs durch die M-Vg1.2 Primer in Medaka und Zebrafärbliug bei einer $MgCl_2$ -Konzentration von 1,5 bzw. 2 mM. m – Männchen, w – Weibchen, Std. – λ -DNA EcoR I/Hind III Digest (0,56; 0,83; 0,95; 1,38; 1,58; 1,9 und 2,03 kb von unten nach oben aufgetrennt).

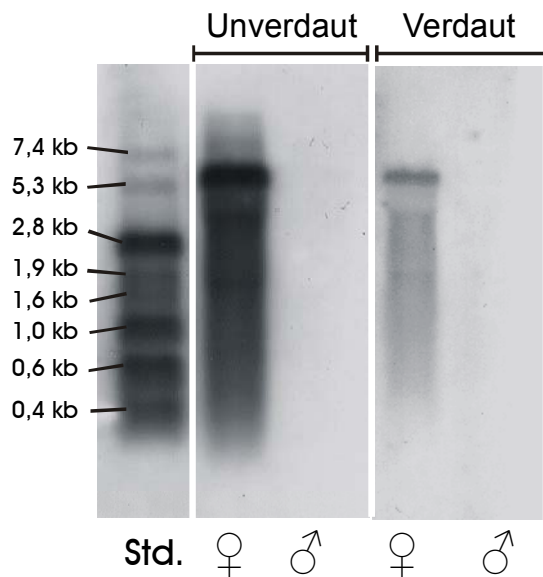


Abb. 3.8: Northern Blot von Leber RNA mit der DiG-markierten cRNA von M-Vg1.2. Nach Verdau mit RNase A ist eine distinkte Bande von 5,5 kb markiert. Std. – Roche RNA Molecular Weight Marker I, DIG labeled

zum afrikanischen Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) und 35 % zum Haushuhn, was näherungsweise die evolutionären Verwandtschaftsverhältnisse unter den Vertebraten dokumentiert.

wurde. Diese cDNA wurde daraufhin in eine DIG-markierte cRNA transkribiert, welche als Sonde in Northern Blot-Experimenten diente, in denen Leber-Gesamt-RNA aus männlichen und weiblichen, laichreifen Medakas analysiert wurde. Wie zu erwarten, wurde ein intensives Signal in der weiblichen Leber beobachtet, das im männlichen Gewebe nicht nachzuweisen war (Abb. 3.8). Die Größe der markierten Bande betrug ca. 5,5 kb.

Durch 5'-RACE-PCR wurde eine weitere 0,7 kb lange cDNA erzeugt, die nur in der Leber amplifiziert wurde. Das Alignment von M-Vg1.2 mit dieser cDNA ergab eine kontinuierliche Sequenz von einer Länge von 1620 bp (GenBank AccN^o: AF268284). Nach dem Ergebnis einer Prosite-Computer-Analyse trägt die Sequenz eine potentielle cAMP-/cGMP-abhängige Proteinkinase-Phosphorylierungsstelle, sieben potentielle Proteinkinase C-Phosphorylierungsstellen, drei potentielle Caseinkinase II-Phosphorylierungsstellen und eine potentielle N-Myristoylierungsstelle.

Die partielle Sequenz des Medakavitellogenins zeigte signifikante Ähnlichkeit zu den Vitellogeninen verschiedener anderer Vertebraten (Abb. 3.9): Unter Verwendung des ClustalW Multiple Sequence Alignment Programms (Thompson et al. 1994) wurden 72 % Sequenzhomologie zur korrespondierenden Region der Vitellogenin I-cDNA des Killifisches (*Fundulus heteroclitus*) und 62 % zur Vitellogenin-cDNA der Dickkopfritze (*Pimephales promelas*) gefunden. Ein Maxhom-Multiple Sequence Alignment der aus der Nukleotidsequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz ergab Homologien in folgender Reihenfolge: 60 % Identität zu *Fundulus heteroclitus*, 51 % zur Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*), 42 % zum weißen Stör (*Acipenser transmontanus*), 37 % zum

<i>Oryzias</i>	NTNGGGNGN-----CNANCATTGNNANTTTTTGCT--CGG-----NATTTT-----TTA-TGNTGNCAAAAACCTTTATGTGNNCN	70
<i>Fundulus</i>	ATGAAAGCGGTTGTGCTTGCCTGACTCTGGCTTCTGGCTGGACAA-----AATTTGCCCTGAATTTGCTGCTGGTAAGACC--TACGT--ATAT	90
<i>Pimephales</i>	ATGAGAGCTGTTGTGCTTGCCTGACTGTAGCCCTTGTGGGCTGTCAACAGATCAACCTTTTCTCTGAGTTTGGCCCTGATAAGACC--TATGT--GTAC	96
	* * * * *	
<i>Oryzias</i>	AAGTATGNAGGAGTCCATCATGATGCGGGTTTTGCNTGANTGAGGGTTTTGGCAAGGATTGNAANTCAACGCTCCAGCAANATCCCTATTAGTGCNTGT	170
<i>Fundulus</i>	AAGTATGAAGC-GCTCATCTGG-GCGG--TCTTCTGAGGAAG--TTTGGCAAGAGCTGGA-TTGAAAATCAGCACCAACTTCTACTCAGTGCAC-GC	182
<i>Pimephales</i>	AAGTATGAGGC-TCTGCTCTGG-GTGG--TCTTCTCAAGAAG--TCTGGCCAGAGCAGGA-ATAAAGTCAGCAGCAAGGTTACCTCAGTGCC-GT	188
	* * * * *	
<i>Oryzias</i>	ACATGANAATACATACATGTTGAAGCCTTTAGAACCTTATATCAATGAGTACAATGGTATTTGGCCAAAGGATCATCCAGAGCCAGTTGGCAAGCTGACT	270
<i>Fundulus</i>	TGACCAAAATFACTATATGCTGAAGCTTGTGGAACCTGAGCTCTCTGAGTACAGGGCATTGGCCAAAGGACCCAGCAGTGGCCACCAAGTTGACA	282
<i>Pimephales</i>	GACAGAGAACACCTTCTGATGAAGCTCATGGATCCTTACTCCAGGATGCTGGCATTGGCCAAAGGATCCATTTGTTCTGCCACTAAGCTCACC	288
	* * * * *	
<i>Oryzias</i>	GCTGCTATGACACCAGAGCTCAACATTTCCCATCAAGTTTGAATACAGCAATGGTGTT-GTAGGAAAAGTGTGGCCCGCAAGGAGTCTCAGATTTGGTC	369
<i>Fundulus</i>	GCAGCCCTT-CACCTCAGCTCGAATTTCCCATCAAGTTTGAATACCAATGGTGTTTGTGGTAAAGTCTTTGCTCCTGAGGAGTCTCGACTTTGGTG	381
<i>Pimephales</i>	TCAGCTCTGCTGCTCAGCTTCAGATTTCCCATCAAGTTTGAATGCTGATGCTAAGGTTGTTGGTAAAGTATTCGCCCTCGAGGATCTCCCTACAGTA	387
	* * * * *	
<i>Oryzias</i>	CTGAACCTTCTACAGAGGTTTCTTAAACATCCTTCAGCTTAAACATCAAGAAGACACANAACGTCTATGATCTGCAGGTGTCTTGACTGCAGANGCTGGAAC	469
<i>Fundulus</i>	CTGAACATCTACAGAGGCATCCTGAATTTCTCCAGCTGAACATCAAGAAGACCCACAAGTCTATGACTTGCAGG-----AGGTTGGAAC	467
<i>Pimephales</i>	CTGAATCTGCACAGAGGAATCCTCAACATCCTTCAGCTCAACCTCAAGAAGACCCAGAACATCTATGAGCTGCAAG-----AGGCTGGAGT	473
	* * * * *	
<i>Oryzias</i>	TCANG-TGTCTGCANG-CCCTCTACTCTGTCAATGAAGATGTAAGGTCAGCCATCCTCTGACTAAAACAGGGACATGAACCACTGTCACGAAAGG	567
<i>Fundulus</i>	TCAGGGTGTGTGAAGACCTCTATTCCATCAGTGAAGATGCAGAAATGAGAAATCCTTCTGACCAAGACCCAGGACCTGAGCAACTGCCAGGAAAGA	567
<i>Pimephales</i>	TCAGGAGTGTGCAGGACCTACGCCATCAATGAGGATGACCAAGGCAACCAATATTGTCACCAAGTCTAAGGATCTGAACCACTCAGGAGAGA	573
	* * * * *	
<i>Oryzias</i>	ATCTCTAGAGAAATTTGGTGTGGCATACTGAGAAATGTGACGAGTGCCAGAAGGAATCCAAGAATCTGAGAGGTTCTACATCATACAGATACATCTTGA	667
<i>Fundulus</i>	CTCAATAAGGACATCGGGTGTGGCATACTGAGAAATGCGACAAGTGGCAGGAGGAACTAAAACCTTGAAGGTTACCAAAATTAAGTACGCTCTTGA	667
<i>Pimephales</i>	ATCATGAGACGCTTGGTTTGGCGTACACTGAGAGTGTGCCGAATGAGGATGACAGAGGTCAGAGTCTGATTGAACCTCTTCAACTCATCATGA	673
	* * * * *	
<i>Oryzias</i>	AGCCAGTTCACAGCGGATTATGATC-CTGGAGGCAGATGTAGATGAGCTAATCCAGTTTTACCTGTGCTGAGCGTTACGGAGCTGCTCAACAGAGA	766
<i>Fundulus</i>	AACCAGTCGCGGATCGCCGTCATGATC-CTGAAGGGCTACGTTAATGAGTGTACAGTTTTCACCTTCTCTGAGGCTAACGGAGCTGCCAGATGAGGA	766
<i>Pimephales</i>	AACCATGCGCGGCTGACTGATCGCTGAAGCCACA- GTTGGAGAGTGCACAGTTTTCACCTTCAATGAGAGTCCATGAGGATCCATGAGGATGGAG	772
	* * * * *	
<i>Oryzias</i>	CCAGACAAACCTTTGGTCTTCTTGAAGATTGAGAAATCCCTATTGACCCGCTCTGTGCTGAGTA-TCATCATCGTGGATCTCTCAAGTATGAGTCTCAA	865
<i>Fundulus</i>	CCAAGCAGTCTTTGGAGTCTTGAATTTGAGAAGAACCCATTCCATCTGTCAAGGCTGAATA-TCGTACCCGTTGATCTCTCAAATACAGTCTCTCCG	865
<i>Pimephales</i>	CAAAACAACCTTTGGTCTTCTTGAAGATTGAGATGAGAAAGACCGCATTGTCCAAATCAAGCTGATTACTTGGC-CCGTGGATCTTGCACACTCATCAA	871
	* * * * *	
<i>Oryzias</i>	AAGAGTTTGAAGCTCTCAACACTTCAACTTGTCAAGTTACTGATGAAGCGGCCAGACCGAGGAGCTTCTGAATCATATAGTTACCCACAATGCCGAAAA	965
<i>Fundulus</i>	ATGAACCTTCTAGACACCCCTTCAAGTGTCAAGATCAGTGTGACACAGCCAGGTTGAGAGGTTCTGAAAGACCTGGCTACCTACAACATTTGAGGA	965
<i>Pimephales</i>	CTGAATTTCTAGACCCCATTCACCTCATGAAGATCAGTGTGACCGGCTCAGATTACTGAGGTTTAAAGCACATTTGTGAAAACAATGTGGCCAT	971
	* * * * *	
<i>Oryzias</i>	GGTCAATGATCATGCTCTGAGTATTTGGAATTTGATTCAGTTTTACGCTTGTCCCGCTTTGAAGACCTGGAAGCATCTTGGAGCAAGTACAAAAAT	1065
<i>Fundulus</i>	TGTTTCATGAAAATGACCTTTGAGTTTTGGAACTGGTACAATCTCTCCGATTTGCCCGCTATGAAGATTTGGAATGTTACTGGAAACAGTACAAAAAG	1065
<i>Pimephales</i>	GGTCCATGATGATGCTCCACTTAAGTTTGTGAGTCTATCCAGCTCTCGCTGCTGCCACCTGGAGAATACTGAGGCTATCTGGGCTCAGTTCAAAGC	1071
	* * * * *	
<i>Oryzias</i>	ATGCCTTCTCACAGATTCTGGCTCTTAGAGGCTATTCCCGCCTGGAACCTCTGCTGCTCAGATTTCATCAAGGAGAAATTCAGGCTGATGACATTA	1165
<i>Fundulus</i>	ATGCTCCCCACAGACACTGGTCTTGGACACTATTCCTGCCACTGTACTCTGCTGGTCTCAGATTTCATCAAGGAGAAATTCATGGCTGAGGAAATA	1165
<i>Pimephales</i>	AAACAGTTTACAGGCGCTGGCTTCTGGATGCTTCTCTGCTGTTGGCACACAGCTATTTGAAAATTCATCAAGGAGAAATTCCTGGCTGGTATCTTA	1171
	* * * * *	
<i>Oryzias</i>	GTGTTGCTGANGCAGTTAGAACCCTTGGTAGCANCTGNTACATGNTAAAGCAAATNCTGAATCCATCAAGCTGTTTGAAGCCTCACCGAAGACAA	1265
<i>Fundulus</i>	CCATCGCTGAGGACGCTCAGGCTTTCATTACAGCTGTGCACATGGTACTGCTGACCCGAGGTTATCAAGCTGTTTGAAGCCTGGTAGACAGCGACA	1265
<i>Pimephales</i>	CCATTCTGAGTTCATTACGCTCTTGTGGTCTGCTGCAAAATGGTCACTGCTGATTGGAGACCATCCAGTTGACAGCTAGTTTGGCTATGCACGAGAA	1271
	* * * * *	
<i>Oryzias</i>	AATCGATGCCAACCCAGTCTACGCGAGATCGTCTCCTCGGATACGGCACAATGATTTCCAAATATTGTGACAGTCCAGT---GTCTGCTCCCTCGAA	1362
<i>Fundulus</i>	AGTAGTGGAAAACCCACTTCTGCGTGAAGTTGCTTCTTGGATATGAAACAATGGTTAACAAATACGCAATAAGACAGTT---GATGTCCTGTTGAA	1362
<i>Pimephales</i>	AATCGCCACAATCCAGCTCTGCTGAAGTCTGATGCTGGATATGGTCCATGATTGCCAAACACTGCGTTG---CAGTTCACCTTTGCCCGCCGAG	1368
	* * * * *	
<i>Oryzias</i>	TATATAAAACCAATTCAGAA-GCGTCTCTCAGAGGCAGTTTCAAGGGCGAAACAGAAGAAATCATCTTGTATGTAAGGTTTTGGGAAATGCAGGAC	1461
<i>Fundulus</i>	CTCATAAAGCCTATTCAACA-ACGACTGTGACAGCCATTCGAAAGAACAGGAGGAGAAACATCATCTGTACATAAAGTTTTGGGAAATGCCGGCAT	1461
<i>Pimephales</i>	CTCCTCAGGCCATTCATGATATTGCTG-CAGAGGCCATTTCAAGAAATGACATTCCTGAAATCACTTTGGCTCTGAAAGTTCTGGGCAATGCTGGTCC	1467
	* * * * *	
<i>Oryzias</i>	CCCAGTAGCCTCAAGTCAATCACAAGATTATGCCATTACGGCACTGCTGCTGCATCTCTGCCAATCAGAGTCCATATTGAAGCCATCATGGCTCTGA	1561
<i>Fundulus</i>	CCATCTAGCTTCAAGTCACTCACTAAGATCATGCCATCCATGGCACTGCTGCTGATCTCTGCAATGACAATCCATGTTGAAGCCATCATGGCTCTGA	1561
<i>Pimephales</i>	CCTGCTAGTCTTAAACCATCATGAAGCTCCTACCTGGACTGAGAATCGAGCTACTTCTATGCTCTTAAAGTCCAGGTTGATGCCATCTTGGCTCTGA	1567
	* * * * *	
<i>Oryzias</i>	GGAACATTGCAAGAAGAAGCAAGAATGGTTGAGAACTGGCTCTCAGCTCTACAT-GGA-----	1622
<i>Fundulus</i>	GGAACATTGCAAGAAGGAGTCCAGAATGGTCCAGGAAGTGGCTCTCCAGCTCTACAT-GGACAAGGCTCTCCACCCAGAGCTCCGTATGCTGCTGCTGCA	1660
<i>Pimephales</i>	GGAACATTGCAAGAAGAGCACAACTGGTTGAGGAGTGGCCCTGCAGCT-TGATTTGGACAGGCTCTCCATCCTGAAGTGGCTATGGTGTCTGTA	1666
	* * * * *	

Abb. 3.9: Sequenz-Alignment von M-Vgl.2 (*Oryzias*) mit den korrespondierenden cDNA-Abschnitten der Vitellogenine des Killifisches *Fundulus heteroclitus* und der Dickkopfelritze (*Pimephales promelas*) durch ClustalW. Bei allen drei Fischarten übereinstimmende Nukleotidsequenzen sind mit einem Stern markiert.

Zur Analyse der Expression von Vitellogenin im Medaka wurden Primer konstruiert, die spezifisch einen 500 bp-Abschnitt der cDNA amplifizieren. Während in der RNA der Leber der Weibchen große Mengen an M-Vg0.5 cDNA amplifizierbar waren, konnten bei den Männchen nur Spuren oder keine Vitellogenin-mRNA nachgewiesen werden. Ebenso war mit den für den Nachweis von Choriogenin H (M-Chg0.9) und Estrogenrezeptor (M-ER0.7) verwendeten Primern eine eindeutige Unterscheidung zwischen Lebergewebe von Männchen und Weibchen möglich (Abb. 3.10). Die cDNA des House Keeping-Protein Elongationsfaktor 1 α (M-ELF0.3) wurde dagegen bei beiden Geschlechter in vergleichbaren Mengen exprimiert.

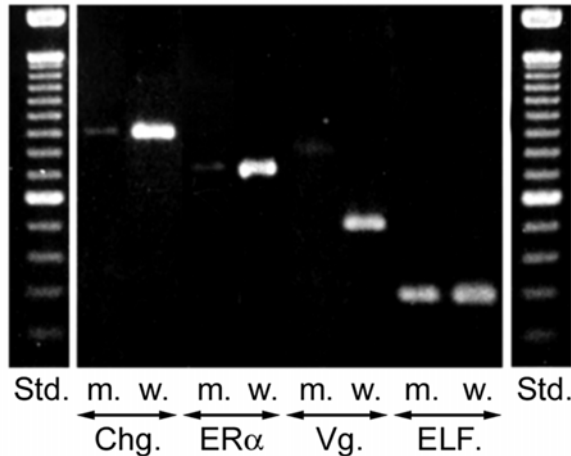


Abb. 3.10: Amplifikation der cDNAs Choriogenin H (0.9 kb), Estrogenrezeptor α (0,7 kb), Vitellogenin (0,5 kb) und Elongationsfaktor 1 α (0,3 kb) des Medakas aus Leber-RNA von weiblichen (w.) und männlichen (m.) Individuen. Std.: Gibco 100 bp DNA ladder (600 und 1.500 bp-Bande hervorgehoben)

3.1.5 Klonierung einer partiellen Sequenz des Estrogenrezeptor α des Zebraärblings

Die RT-PCR von Leber RNA mit den *Ictalurus* Primern erzeugte eine einzelne Bande mit einer Länge von \sim 0.65 kb (Z-ER α 0.6), die in großer Menge in Lebergewebe von Weibchen aber nur zu geringen

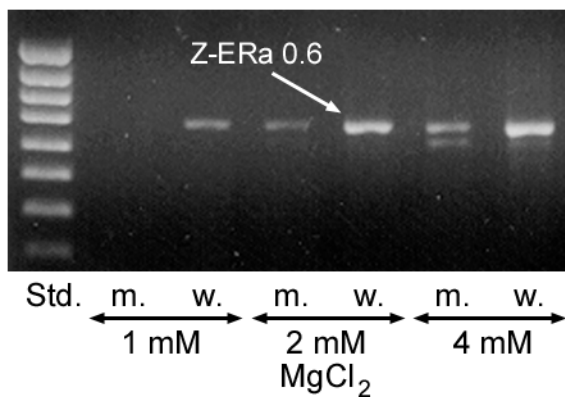


Abb. 3.11: Amplifikation des Estrogenrezeptor-cDNA-Fragments Z-ER α 0.6 aus Leber-RNA von männlichen (m.) und weiblichen (w.) Zebraärblingen. Std. – peqlab 100 bp DNA-ladder (sichtbar von 300 – 1.000 bp)

Mengen in Lebern von Männchen exprimiert wurde (Abb. 3.11). Die Sequenz der klonierten cDNA (GenBank AF268284, Abb. 3.13) zeigte starke Homologie zu ER α Sequenzen anderer Vertebraten. Über eine ClustalW Analyse (Thompson et al. 1994) wurde für den klonierten Sequenzabschnitt eine Sequenzübereinstimmung von 78 % gegenüber dem ER α des getüpfelten Gabelwelses (*Ictalurus punctatus*; GenBank AF061275) sowie 72 % gegenüber dem ER der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*; GenBank AJ242740) gefunden. In den Northern Blots wurden zwei Hauptbanden von 5,2 und 4,0 kb in den RNA-Proben aus weiblicher Leber und Ovarien sowie aus Hodengewebe markiert, die nicht in Ganzkörperhomogenaten von 2 d alten Embryonen zu finden waren (Abb. 3.12). Zwei weitere Banden mit einer Größe

von 2,4 und 1,4 kb sind außerdem bei der Leber-Probe aus Weibchen sichtbar. Bei der Verwendung von für den Zebrafisch spezifischen Primern konnte eine Expression des ER α in fast allen bearbeiteten Geweben festgestellt werden (Abb. 3.14). Die Expressionsmenge von ER α -mRNA lag in der RNA aus den Lebern von weiblichen Fischen im Vergleich zu allen untersuchten Geweben am höchsten, während in der korrespondierenden männlichen Probe fast keine Expression festzustellen war. Interessanterweise erscheint die ER α -Expression im Gehirn bei den Männchen im Vergleich zu den Weibchen erhöht zu sein. Zusätzlich ist in den Gehirnproben eine weitere Bande von geringfügig erhöhter Länge zu erkennen, deren Bedeutung jedoch noch nicht geklärt werden konnte.

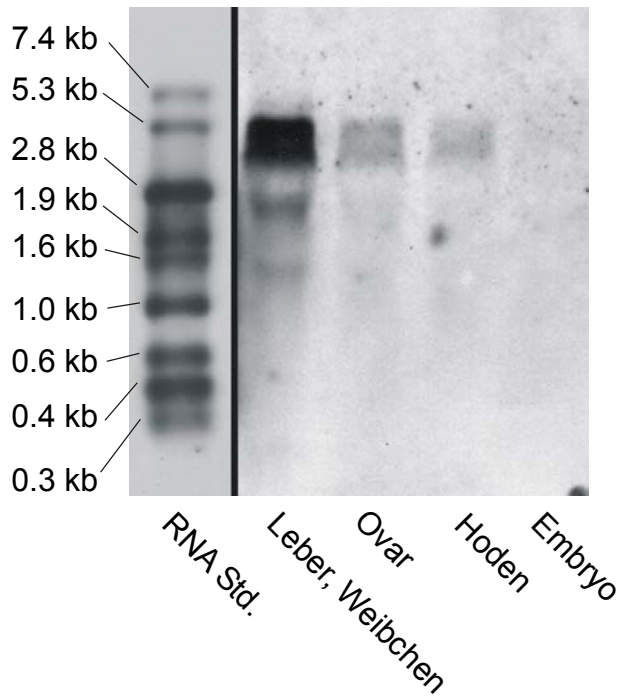


Abb. 3.12: Northern Blot von Gesamt-RNA verschiedener Gewebe des Zebrafischs nach Detektion mit DIG-markierter Z-ER α 0.6 cRNA. Neben zwei Hauptbanden mit einer Größe von 5,2 und 4,0 kb wurden zwei weitere Banden mit einer Größe von 2,4 und 1,4 kb bei der Leber-Probe aus Weibchen gefärbt. RNA Std.: RNA Molecular Weight Marker I, DIG labeled

```

CGAGTCTGGTCGTGTGAGGGATGCAAAGCTTTCTTCAAGAGAAGCATTTAAGGTCACAAT 60
GACTATGTTTTGTCCAGCGACCAACCAGTGCCTATTGACAGAAACCGTCGAAAGAGCTGC 120
CAAGCATGCAGACTGCGCAAGTGTATGAAGTAGGCATGATGAAAGGAGGTATTTCGTAAA 180
GATCGCGGCGGGCGTTCTGTGTCAGGCGTGAGAGAAGAAGAAGCAGTAATGAAGATCGAGAC 240
AAGAGCACCAGTGATCAGTGCAGCCGTGCTGGCGTGAGGACGACTGGCCCACAGGACAAG 300
AGGAAGAAGCGCAGTGGTGGGGTGGTCAGCACTTTATGCATGTGCGCTGACCAGGTGCTG 360
CTGCTGCTGCTGGGGCTGAGCCACCCGCTGTCTGCTCACGACAGAAACACAGTCGGCCCT 420
ACACCGAGATCACCATGATGTCCCTGCTCACCAACATGGCTGACAAAGAACTCGTCCACA 480
TGATCGCCTGGGCCAAGAAAGTGCCAGGATTCAGGATCTGTCTCTGCATGACCAGGTTTC 540
AGTTGTTGGAGAGCTCTTGGCTGGAGGTGTTGATGATTGGCCTCATATGGAGGTCCATTC 600
ATTCCCCTGGAAAACAT 619

```

Abb. 3.13: Nukleotidsequenz der Estrogenrezeptor α -cDNA Z-ER α 0.6 des Zebrafischs (*Danio rerio*)

Z-Vg1	CATGATGATGCTCCATTCAGTTTGTTCAGCTTGTCCAGCTCTTGCCTGTTGCCCTCCTGGAGAAAATTGAGGCTATCTGGTCTCAGTTCAGGCAAAACCAGTTTACAG	1099
Z-Vg2	GACAGTGAACACAGCACAGAAATTCGGACCTAAATTCAGTTGATGCGGGTAAACAACACTTGATAATCTAGAGCATTATGGAAGCAGCTCTCAGGAAATGATGAGCAG	507
Z-Vg1	CGCTGGCTTCTGGATGCTCTTCCTGTGTGGTACACCAGTCA-TTATAAAATTCATCAAGGAGAAGTTCCCTGGCTGGTGAATTTACCACTCCCGAGTTTAC-TAGACT	1207
Z-Vg2	CGGTGGTTCCTGGAC-TTGGTTGGGAGTAAACAGATGAAAGAATTCCTCAATTCCTTGGAGCCAGATACAAAGCAGGAGACATCACAGCAATGAGGCAGGACAGCA	616
Z-Vg1	CTTGTGATGCTCTGCAAAATGGTCACTGCTGATCTGAAACCATTAATAAGACA-GCTAGTT--TGGCTACTCATGAGAATTTGCCCAATCCCAGCTCTGCGTGAAGT	1314
Z-Vg2	CTGGTAGTGGCATTAAACCACTTTCGGCTGAGCCTGTGCGTGGCATTAGCTCAGGAGTTCCTGACCATTCTTTCAG-TAAATCCCATCTC--TCCTGTGGAAC	723
Z-Vg1	TGTATGCTTGGATATGGTCCCTGATTGCAAAATCTGTGTGACAGTCCCACTTGCCTGTGAGCTCCTCAGGCCATCCACGAGATCGCCACAGAGCCATTCTTA	1424
Z-Vg2	TGTAGTTTGGCATTATGATCTCTGTACACAGATACTGTATATACTGACCCCTGCCCTACTGCTGGTACAGCCATTGCTGAATATGGCTGCAAGTAGCTAAGTA	833
Z-Vg1	AGAATGACATTCTGAAATCACTTTGGCTCTGAAAGTTATGGGCAATGCTGGTCAACCTTCAAGTCTTAAGCAATCATGAAGCTCCTTCTGGACTGAGAATGCAGCT	1534
Z-Vg2	AAAATCTGAGGATGAAATGGTCTGGCTGAACTCTGGGAAACGACCTCATCTTCCAGCATCAAGACTCCTCAAGTTCCTCAAGTTCCTCAACTGCAATGGAGCT	943
Z-Vg1	AATGCTTGGCCATTAGAGTCCAGTTGATGCCATCTTGGCCCTGAGAAACATTGCCAAGATGTGCCCATCTGGTTCAGCCTATTGCCCTGCAGCTTGTTTGGACAG	1644
Z-Vg2	GAAAACCTTCCACCAGAGTGCAGGGAGCTGCAGTCCAAAGCATTAGGCTGCTGCAAGCAGAGCCTCCACAGTGTACAGGATATTGCTTAAACCTCTTCGTACAGAA	1053
Z-Vg1	AGCTTCCACCCCGAGGTGCGCATGGTGTGTTGATTTGTGCTGTTTGGAGCCAAAGCCCTCAGTGGCTCTGCTCTCCAGTCTTGTGGAGCTTTGAGGATTGAGCCAAACA	1754
Z-Vg2	ACATTTACCAGCTGAAATCCGCATGCTGGCTGCATAGTTCTTCTAGAGCCAAGCCGCTCCACAGCTCTGATTTCAGTAGTAAGTGAAGTCCCTTCTAGAAGAGGCTGATC	1163
Z-Vg1	TGCATGTGCAAGCTTTGCCTATCCACATCAAGTCAATGACCAGAATCACTGCTCCTGATATGGCATCTGTGCTGGTGCAGCTAATGTTGCCATCAAGCTTATGAAC	1864
Z-Vg2	TGCAGTTTGCAGTTTCTCCTACTCTGCTCAAAGCTTTGCCAAGTCCCGTACCCTGATAAACAACATCTATCTATTGCCTGTAATATGCCATGAAGATTCTAACC	1273
Z-Vg1	CGCAAGCTGGACAGACTTAACACCTTACAGCAGAGCTTTCATATGGACTATTATCACTCCTCTTATGATTGGNGCTGTGGTGTGCTATATGATCAATGATGC	1974
Z-Vg2	CGTAAACTTGGCCACTTGATTTACCGCTACAGAACCTGGCACTTGGACTGGTTCATGATGACTTTTATTTGGGACATGCTGATGTTTATATGCTACAGAAATGA	1383
Z-Vg1	TGCCACCATCCTGCCAGAGCTATTGTAGCTAAAGCAGTACCTACCTGGCTGGAGCAGCTGCTGATGTTATGAGTTGGTGTGAGAATGGAGGAATCCATGAGGCC	2084
Z-Vg2	AAGTCCCATCCCCAACAATCTATGCTA--AAGGAAAAAATTCATTTTATTGGGAAATACTGCAATTTCTTGGTGGTATCCGTGAGATGGACTCCA-----	1482
Z-Vg1	TTCTAAAATCTTCTGCTGCAGATGAAAGTGTGACCGTATCACAAAGATTAAAGCGTACACTGAAGGCCTTGCAAACTGGAAGGC--CTTGCCAACCGATAGACCCCTTG	2192
Z-Vg2	---AGACTGTT--TGCTGAAAAATCCCTGAACTCACAA--AAGATTAGAGCTAGCGATTGGGCTTCCATATTGAAAATTAGCTTACCAAAAGCAAGCCCTCTTT	1583
Z-Vg1	CTTCAGCTATGTCAAAGTATTGGACAAGAAGTGGCTTATGTCAACTTTGCAAAAACCTCATTTGAGAAGCCATA---CGATGGTTTCTGGACCAAAACCAGCTGC	2298
Z-Vg2	TGACAGCTTATGCAAGAGTTTTTGGACAGGAGCCCTTTTATGATGTAAGCAGAGACTCAGTTCAAAGCATCATAAAGTCTTTCAGTCTCTGACGAAAGGAGAGT	1693
Z-Vg1	ACTGCTGAAGGAGGCTCTTAAAGCTTTGCAGGAAGGAGTGGCTTCCAGTATGCCAACCTTTGCTTGCAGCTGAAGTGGCTGCTATCTTGCACACTGCAGTTGGTGTGC	2408
Z-Vg2	AAAGTTTGGGAAAGGATCAAGATGTT-CAGAAAGGACTTTCATGGCACTGGACTGACCGCATCTTGTGTATGAGGCTCGGTTTCATACAGCCAAC-ATGCTTGGGGTCT	1801
Z-Vg1	CCA-TGGAGTTCAGTTTGTACACTGCTGCTGTGCTGCTGCATCTGTCAATGTTAGGCCACCATTACACCTGCTCTCCCTGAGAAATGGAGTCCATGACTCTTGATCA	2517
Z-Vg2	CCAGTTGAAATCAGCAAAATATTATTCGTAAGTAAATGCTGTTCAATGCAAGCAAAAGCTGAAATAAATCC--TCTCCAAAGGAAACA-----TCTGGGTGA	1896
Z-Vg1	ACTGAAGGAGTGTGTTTCAAGTGA-AGCTAGACCAAGTGTGCTCTCCAGACATTGCTGTGATG-GGAGTTAACACTGCCTCATACAAGTCTGCTTAT	2625
Z-Vg2	ACTGCTAAGCTCAGACATTTCCATGCAGACAGATGGCTTATCG-CGGTACAAAGGAT-CATTTCTCTCCATGGAATCAACACTGATCTTTTCAGTGTGGAAGTGA	2004
Z-Vg1	GGCAGAGGAAAGATCCGTACAATTTGCCCTGGAAAAGTGGCAGCAAGGAGCAGACATTTCAAGGGCAACTACAAGGTGGAGACTCTGCCTGTTG--AACTTCTGAACAC	2734
Z-Vg2	GCTGAAAAGTAAAGTTTTCAATGGCCCTGGGCTTTG--ACCTGAAAATAAATCCGAAAGGCAAACTGTAAGTGAATGAACTTGAATCCAAAGCAATCGGTCACCGA	2112
Z-Vg1	ATTGCTT-CAGCAAGCTTTGAGACTCTGTGCTGTGGTCAAAA-CATTGAAGTACAGTGTCAAAGGCTTATTCCTTGGTACCTGAGTTGTCTCTCAAAAATTTCTCAG	2842
Z-Vg2	ATTATTTTCACTGATGATGTTGCTGTTTGGAAAACATTTAGACCCAACTCATCTAAAATAACACCCATGATGCTGAGACA----GGGAGTCTGGCTGGC	2217
Z-Vg1	ACA-TCTTCTGCTGGTATTGTTCCACTGAGATGTCATCTGCTGCTCAGTGTGAGAGCTTCTGCTCCATTTGACAGAACCCCTTGTATTCTGCCATATATTCAAGTTA	2951
Z-Vg2	AGGTTGTCCTCTGAGAAATGTTACCCCTTTAAGGATGAACAGACCAA---AAATCTGGAATGAAATTCAGCAATGTGCTGAAGCCAAAATTTATG-----GAACTG	2319
Z-Vg1	AAGGATGTGTTGAGTGCACCTTACAAATGC-TGCTTTTATCAGAAATTTACTCTGTTTACATAAATGGACAGCACTCAGCCATGTTGAGTGGCAAGAGCTGAAG	3060
Z-Vg2	CACTCTGCATTTAGGCAAGCAACAGCTGCACACTATCTTACCAATA-TCTCTGTATTAC-TTACTGGGTGATCTCA-CTTTTACAGAT-TAGAACCAGCAAA	2425
Z-Vg1	TCTGCAAGTGAAGGCTGGAGTTGAAGTTCAAGTTGGTCCTAGAGTGTGAGAGGCTTGTAAACAAATCAACATCATTGATGACGATACTCTGAAGGACAGGCTT	3170
Z-Vg2	GGATGCAAAACCCATTGAAAATTCAGATTCAAGTCTGCTGCAG--CAGACAACCTTCAAGTAAATGAGTGA-ATGGTGAATCTCAA----CCAAAGGATTTAA	2527
Z-Vg1	TCTGTTGAAACTGAGGAAAATCTGGACACTGAAGCTAAAATGCACCCGCTCTTCTGAAAGCAGCAGC-AGTAGCCGCAACAGCCGAGCATCAGCAGCTCAAGCTC	3279
Z-Vg2	GGAGACAAGAGATGAGAACACCTCTGTGAGGAACGCAAAACATCCAGTCACTCCAGTACTAGATGTCCTCCAGCCCGGTATGCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCA	2637
Z-Vg1	AAACTCAAAATCAAATCAAGCTCAAGCTCAAGTTCAAGTTCAAGTCAAGCTCCTCTATGCTCCAGCTCTGATGTTAAGACTGCCACCATCAT---TGAGCTTTCA	3386
Z-Vg2	TTAGTTAAGTCCA---CAAGCAAAACCCCTTGGCTATGA--AGGCTAGCCTTTTATCTGCCAACTGCCAAAAGACGACATTGAAATGATCGTCTCAAGTTGGT	2742
Z-Vg1	GAAAATCCAC--AAAGATCGTACTTGGACACCATAGCGCCACAAGGATAGTACAGTGAAGTGC--TGCAGTACTTGAACAAATGCAGAAACAGAAATAGATTCC	3492
Z-Vg2	AAGAAGCAAACTGAAAATGTGCCATTGC-TTATTTTGTAAAGACTATAC-ATCAGCAGGGCTCATCTCAGATGGGTGCAGAGTCAACATATGAT-GTTTCT	2849
Z-Vg1	TTGAAATG---ATATTCCACCTGTTTTGCTATCATCGCCCTGCTGTTAGAG-CTGACCAGAAGCTTGGGCT-ACCAACTGCTGCTTACTTTGACAAAACCAACTGC	3597
Z-Vg2	ATGAGAGTGTCTGACGCTGCAACAGAGTCCAAAGCATATAAGCAACAAGATTAACTGGGGACTCTGCCCTCAGTATTCACAAC--AGTGTCAAATAGTTCAA	2957
Z-Vg1	AAGAGTCAACTGATGATTTCTCCATTGCTGAAACGACAACATGAAGATCTGCTGATGTTGCTGCTGTTGAGCAAGCACAAGTTACTGGCAAGTTTCTTGGGTGGC	3707
Z-Vg2	GAGTATGTACTGGC-GTGTCTTACATTTATGGT---CTACCAGAAA-CTGAGGAAA---ACCCAGAACGGCAGCATCTGTCACCCGTTGATCATCTCACCAG	3059
Z-Vg1	GAGTCAAAACAGTATGCACTTCTGCTAAAAGTGAAGTGGTCTGCTGGGTGAATTCCTGCTGCACGCTGAGAAGTGAAGTGGGAGAGACTGCCAAATAATGTCACCACC	3817
Z-Vg2	ACCTTTGACCTGAAAGTGAAAAATTCAGAACGACCTATCTACAAAAGGAAAATTCCTCAC---CAATTGAACTGTGGGATCGAAGCTGCAAA---TCTCACC---	3160

3.2 *In vitro*-Untersuchungen an isolierten Hepatocyten aus der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*)

Zusammenfassung:

Aufgrund des hohen Zeit-, Material- und Kostenaufwands sind *In vivo*-Untersuchungen mit einer größeren Probenzahl nur bedingt durchführbar. Hepatocytenprimärkulturen bieten wegen ihrer vergleichsweise hohen metabolischen Kapazität, einen Kompromiss zwischen hoher Prozessivität und der Erhaltung physiologischer Eigenschaften des Kultursystems. Da die Induktion der Vitellogeninsynthese in Primärkulturen von Hepatocyten als Biomarkersystem für estrogenen Substanzen eingesetzt kann, wurde eine Adaption der Kulturbedingungen an die Anforderungen eines *In vitro*-Testsystems für Xenoestrogene vorgenommen. Hierzu wurde die Verwendung von Mediensupplementen wie FKS und BSA, der Einsatz verschiedener Kulturmaterialien sowie auch die Inkubationstemperatur im Hinblick auf eine maximale Sensitivität des Testsystems gegenüber Estrogenen überprüft. Als Resultat konnte auf den Zusatz von Mediensupplementen beim Erhalt der vollständigen Kapazität zur Vitellogenin-mRNA-Synthese verzichtet werden, wobei sich eine vergleichsweise hohe Kultivierungstemperatur von 18 °C als günstig erwies. Abschließend wurde eine vergleichende Validierung der Detektionsmöglichkeit der Vitellogeninexpression über Dot Blot/RNase Protection Assay und RT-PCR vorgenommen. Hinsichtlich ihrer estrogenen Potenz können die eingesetzten Testsubstanzen in folgender absteigenden Reihenfolge geordnet werden: 17 α -Ethinylestradiol > 17 β -Estradiol > Genistein > Methoxychlor > Nonylphenol > Bisphenol A. Um die Applikation des Testsystems für den Nachweis einer estrogenen Aktivität in Kläranlagenausflüssen zu überprüfen wurden sechs Schweizer Abwässer nach der Abschätzung ihrer Cytotoxizität in subletalen Dosen exponiert. Als Ergebnis war einem der Abwässer eine eindeutige, wenn auch schwache estrogenen Wirkung zuzuordnen.

3.2.1 Zeitlicher Verlauf der Vitellogenin-mRNA-Expression in Hepatocytenprimärkulturen aus der männlichen Regenbogenforelle nach Stimulation mit 1 μ M 17 β -Estradiol

Um die Vitellogenin-mRNA-Synthese in der Hepatocytenprimärkultur im zeitlichen Verlauf unter kontinuierlicher Belastung zu beschreiben, wurden isolierte Hepatocyten aus einer männlichen Regenbogenforelle für 6, 12, 24, 48, 96 und 144 h mit einer Konzentration von 1 μ M 17 β -Estradiol bei einer Inkubationstemperatur von 14 °C belastet. Der Vitellogenin-mRNA-Gehalt in den Hepatocyten wurde als relative Lumineszenzintensität ermittelt. Bereits 6 h nach Expositionsbeginn konnte eine eindeutige Induktion der Vitellogeninexpression beobachtet werden, die im weiteren Versuchszeitraum stetig anstieg, ohne ein Plateau zu erreichen. Generell folgte dabei der zeitliche Verlauf der Vitellogenin-mRNA-Synthese einer Exponentialfunktion (Abb. 3.2.1). Während die Vitellogenin-mRNA-Synthese

in den ersten 24 h des Experiments nur langsam induziert wurde, war die Phase der darauffolgenden 48 h durch eine schnellere Zunahme an Vitellogenin-mRNA gekennzeichnet. Eine zunehmende Seneszens der Zellen im späten Versuchszeitraum, wie sie bei der Kultur von Primärhepatocyten im Monolayer anhand der Proteinexpressionsrate festzustellen ist, konnte hinsichtlich der Synthese der Vitellogenin-mRNA bis zu diesem Zeitpunkt nicht festgestellt werden.

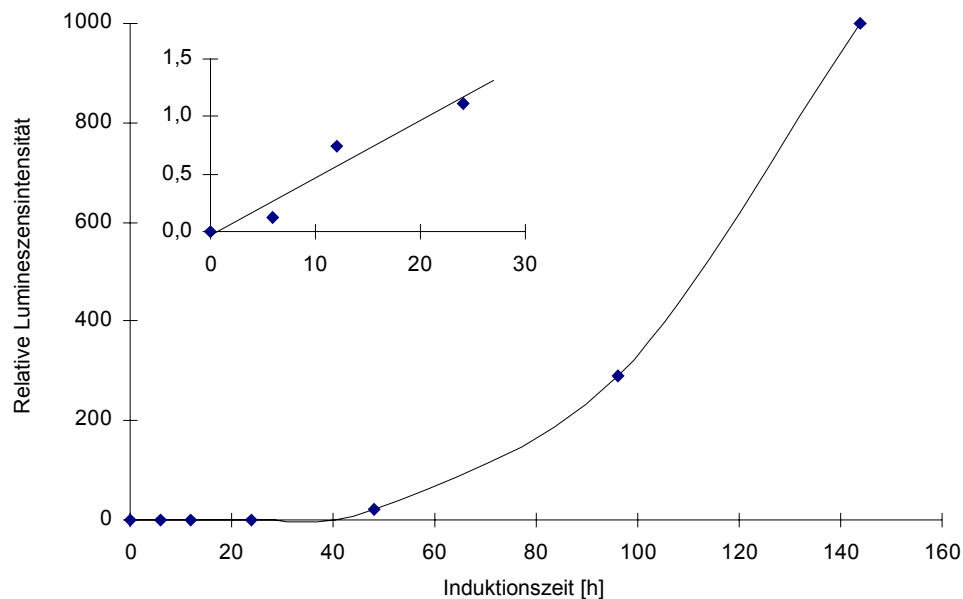


Abb. 3.16: Zeitlicher Verlauf der Expression von Vitellogenin-mRNA in der Primärkultur von Hepatocyten einer männlichen Regenbogenforelle unter kontinuierlicher Belastung mit $1 \mu\text{M}$ 17β -Estradiol. Das Insert oben links zeigt die frühe Expressionsphase in einer Ausschnittsvergrößerung der Übersichtsgraphik

3.2.2 Zusatz von Mediensupplementen

Bestimmte Mediensupplemente können auf die Vitellogenin-mRNA-Expression ebenfalls Einfluss nehmen. Um diesen Einfluss auf die Expressionsrate der Vitellogenin-mRNA zu prüfen, wurden Hepatocytenprimäkulturen, die einer männlichen Regenbogenforelle entstammten, parallel in Medium 199, Medium 199 mit Zusatz von 4 % (w/v) Rinder-Serum-Albumin (BSA), Medium 199 mit 10 % (v/v) foetalem Kälberserum (FKS) und Medium 199 mit 10 % Aktivkohle-behandeltem fötalem Kälberserum (CCS-FKS) kultiviert.

BSA wurde als Matrix für eine unspezifische Bindung der lipophilen Steroide zugesetzt. Dadurch sollte die Möglichkeit einer höheren Verfügbarkeit mäßig lipophiler Xenobiotika, wie sie die meisten Xenoestrogene darstellen, durch unspezifische Bindung an in Mediensupplementen enthaltene Proteine und gekoppelter Aufnahme durch die Hepatocyten simuliert werden. Zur Bestimmung von Unterschieden in der maximalen Vitellogenin-mRNA Expressionsrate wurden die Zellen bei 14°C mit 100 nM 17β -Estradiol stimuliert.

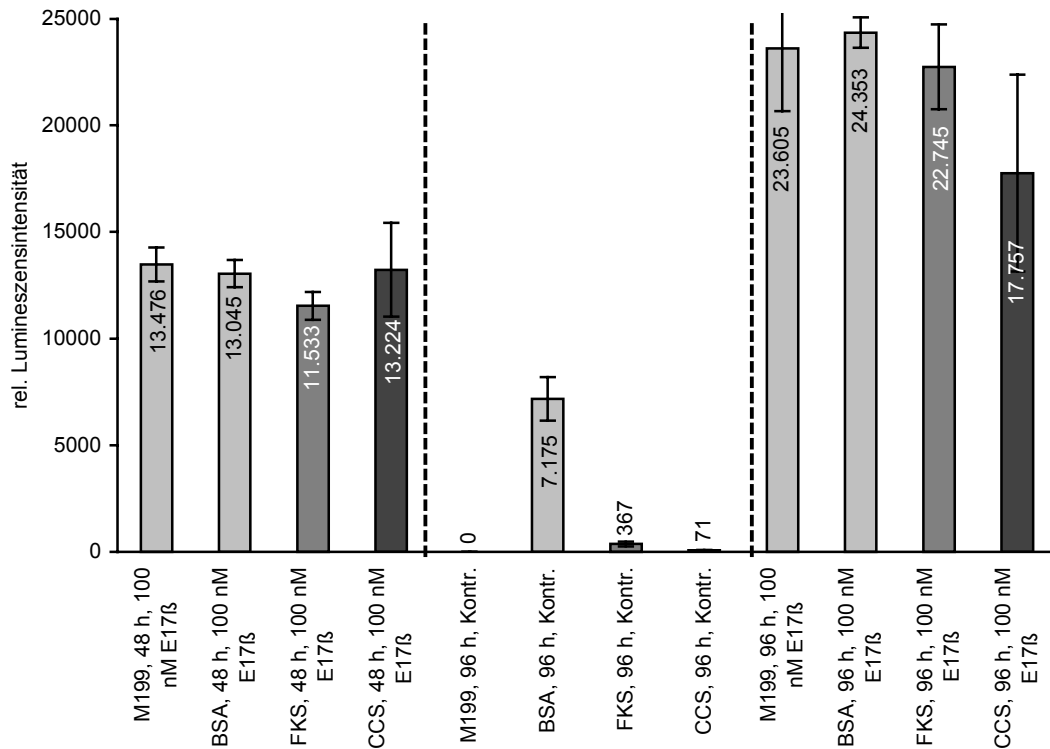


Abb. 3.17: Einfluß von Mediensupplementen auf maximale Vitellogenin-mRNA-Expression und Vitellogenin-mRNA Synthese in unbelasteten Hepatocyten. Abkürzungen: M199 - Medium 199, E17β - 17β-Estradiol, BSA - 4 % (w/v) Rinder Serum-Albumin, FKS - 10 % (v/v) foetales Kälberserum, CCS - 10 % (v/v) charcoal stripped FKS

Sowohl nach 48stündiger als auch 96stündiger Exposition konnte kein signifikanter Einfluß der Supplemente auf die maximale Vitellogenin-mRNA-Syntheserate in Hepatocytenprimärkulturen ermittelt werden (Abb. 3.17). Eine Betrachtung der Vitellogenin-mRNA Expression in 96 h kultivierten, uninduzierten Hepatocyten zeigte jedoch die unterschiedliche Kontamination der Supplemente mit Steroiden auf. Das aus Rinderplasma isolierte Albumin wies eine vergleichsweise hohe Kontamination mit estrogenen Steroiden auf, wie mit einem Estradiol-spezifischen ECLIA-System nachgewiesen werden konnte (2 nM 17β-Estradiol in BSA-supplementierten M199 gegenüber einem Hintergrund von 170 – 180 pM im unsupplementierten Kontrollmedium), so dass daraus der hohe Vitellogenin-mRNA-Gehalt erklärbar ist. Auch das unbehandelte fötale Kälberserum bewirkte eine schwache Induktion der Vitellogenin-Expression, die durch das zur Entfernung von Steroiden durchgeführte „charcoal stripping“ zwar weitgehend vermindert, jedoch nicht vollständig unterdrückt werden konnte. In den ausschließlich in Minimalmedium kultivierten Hepatocyten konnte dagegen auch mit langen Filmexpositionszeiten keine Vitellogenin-mRNA nachgewiesen werden.

3.2.3 Einfluss von Temperatur und Zeit auf die Vitellogeninexpression

Ein entscheidender Faktor bei der Kultur von Zellen aus poikilothermen Organismen ist die verwendete Inkubationstemperatur, da die physiologische Funktion der Organsysteme bei diesen Lebewesen in starkem Maße von der Umgebungstemperatur abhängen kann (Hazel und Prosser 1974). Bei der Re-

genbogenforelle wurde auch für die Vitellogeninsynthese nach Injektion von 17β -Estradiol *in vivo* eine Temperaturabhängigkeit festgestellt (MacKay und Lazier 1993).

Um den Einfluss der Inkubationstemperatur auf die Vitellogenin-mRNA-Synthesekapazität der Hepatocyten zu testen, wurden die Primärkulturen bei Temperaturen von 14 und 18 °C kultiviert. Nach einer Regenerationszeit von 72 h erfolgte die Exposition mit 17β -Estradiol in den Konzentrationen von 0,01 nM bis 10 nM.

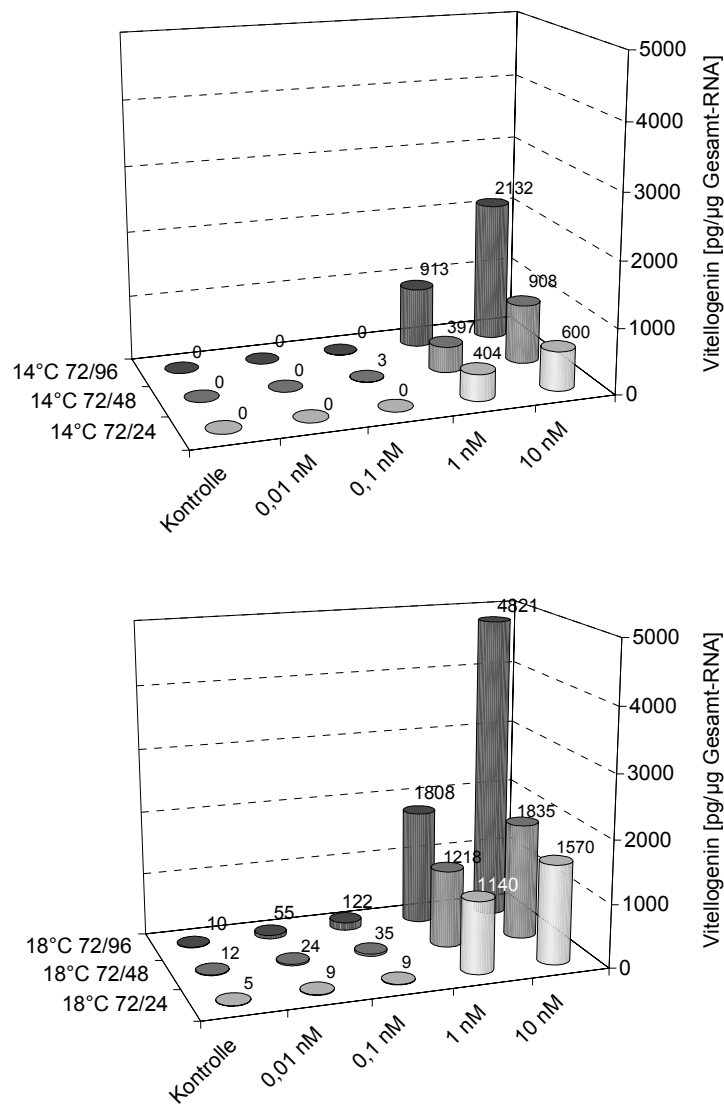


Abb. 3.18: Vitellogeninexpression in Hepatocytenprimärkulturen nach Exposition von 17β -Estradiol bei unterschiedlicher Kultivierungstemperatur. Nach einer Regenerationszeit von 72 h erfolgte die Exposition für 24, 48 und 96 h in den angegebenen Konzentrationen. Die Detektion der Vitellogenin-mRNA erfolgte mit dem Dot Blot Ribonuklease Protection Assay (Dot Blot RPA). Während bei einer Temperatur von 14 °C ein LOEC (Lowest Observed Effect Concentration) von nur 1 nM 17β -Estradiol gemessen wurde (A), lag die Sensitivität des Assays bei 18 °C bereits nach 48 h Exposition bei 100 pM (B), jedoch wurde auch in den Kontrollen ein spezifisches Signal detektiert.

Nach 24, 48 und 96 h Expositionszeit wurde in diesen Primärkulturen der Gehalt an Vitellogenin-mRNA über den Dot Blot/RNase Protection Assay (Dot Blot RPA) bestimmt. Bei beiden Inkubationstemperaturen ist ein sowohl zeit- als auch dosisabhängiger Anstieg der Vitellogeninsynthese nachweisbar, jedoch konnte bei einer Inkubationstemperatur von 18 °C im Vergleich zu 14 °C eine erhöhte Syntheserate beobachtet werden (Abb. 3.18). Wie in der genannten Abbildung zu erkennen ist, resultierte eine Verlängerung der Inkubationszeit nicht nur in einer Erhöhung der Vitellogenin-mRNA-Menge, sondern auch in einer Erweiterung des Detektionsbereichs nach unten. Bei der Kulturtemperatur von 18 °C lag der Vitellogenin-mRNA-Gehalt durchschnittlich beim 2- bis 3fachen der bei 14 °C gemessenen Werte. Hinsichtlich der Reaktion der Hepatocyten gegenüber 17 β -Estradiol wurde bei 18 °C eine erhöhte Sensitivität des Systems beobachtet. Beginnend mit einer Expositionsdauer von 48 h konnte eine schwache Induktion der Vitellogenin-mRNA Transkription bereits bei einer Konzentration von 100 pM nachgewiesen werden. Bei einer Temperatur von 14 °C wurde dagegen eine eindeutige Induktion der Vitellogeninsynthese zu jedem Zeitpunkt des Experiments nur bis zu einer Konzentration von ≥ 1 nM 17 β -Estradiol beobachtet, so dass die Bedingungen für die Synthese von Vitellogenin bei einer Inkubationstemperatur von 18 °C begünstigt erscheinen. Bei den bei 18 °C kultivierten Hepatocyten war auch in den Kontrollen eine schwach positive Reaktion des Dot Blot RPAs nachweisbar.

Um zu klären, ob es sich hierbei um eine unspezifische Bindung der cRNA-Sonde handelt oder um eine Induktion der Vitellogeninexpression in den Kontrollen, wurde das RT-PCR-System verwendet. Hierfür wurden Hepatocytenprimärkulturen bei 14 und 18 °C mit den gleichen Konzentrationen von 17 β -Estradiol wie im Dot Blot RPA belastet und nach 12 und 24 h beprobt.

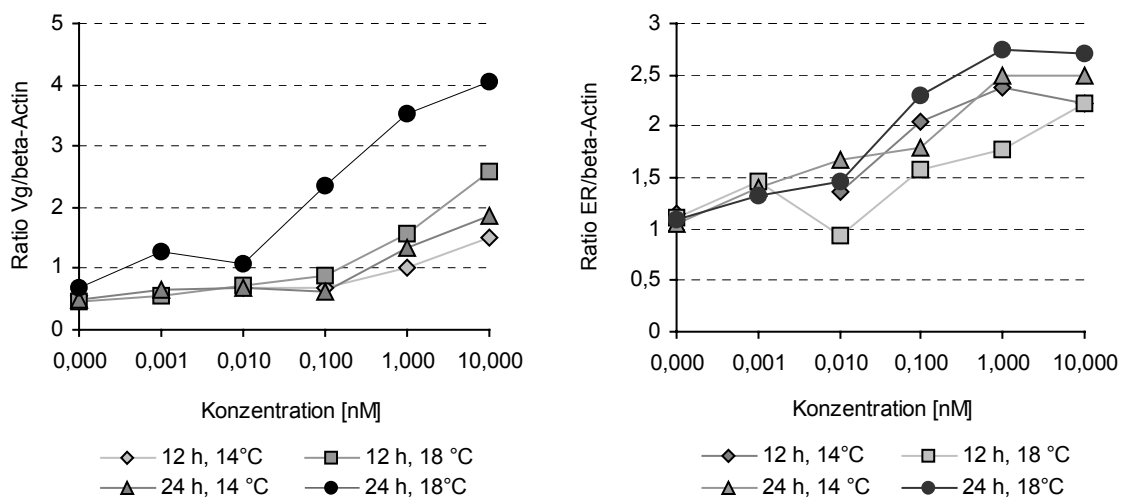


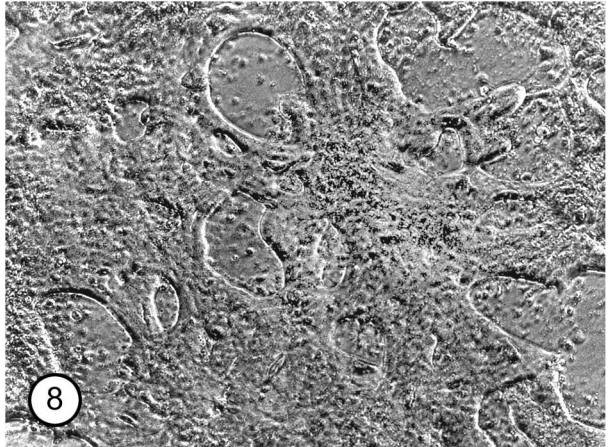
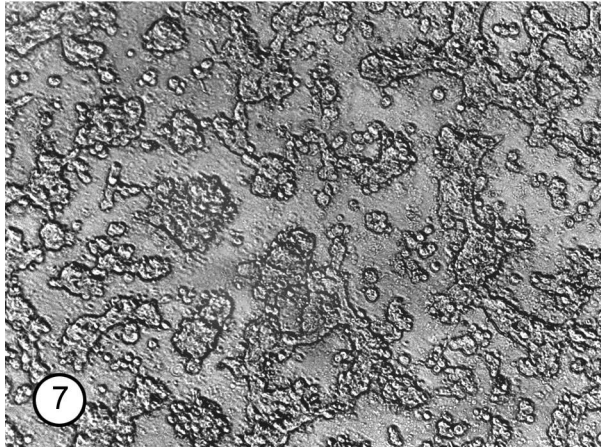
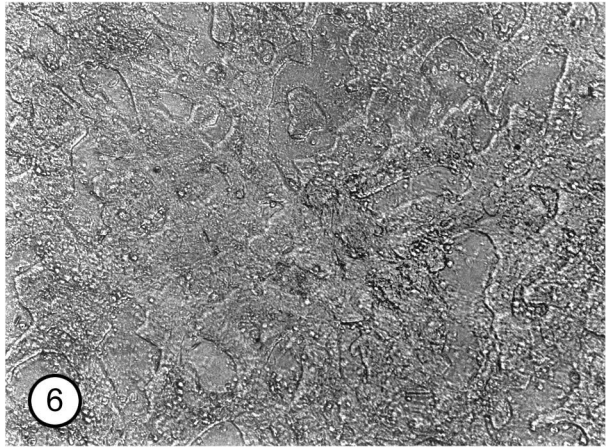
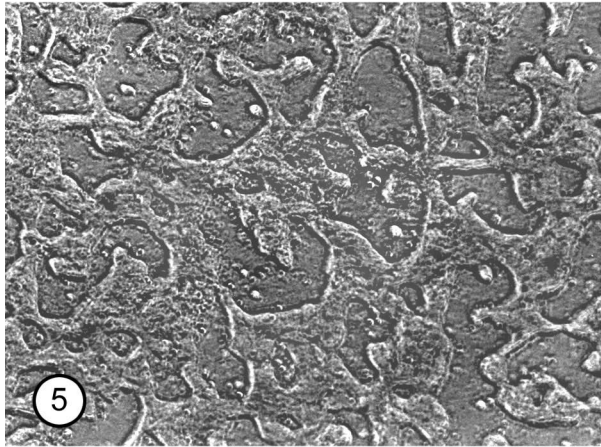
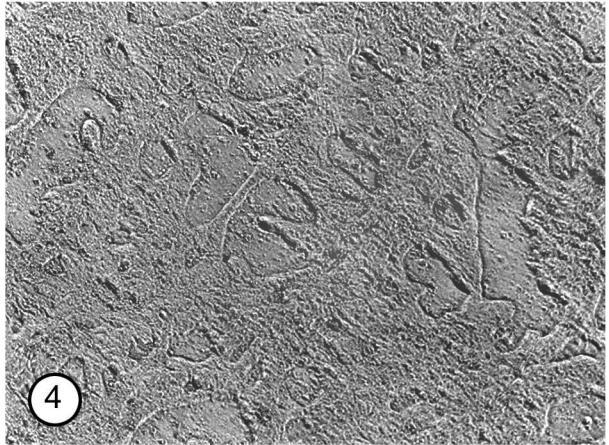
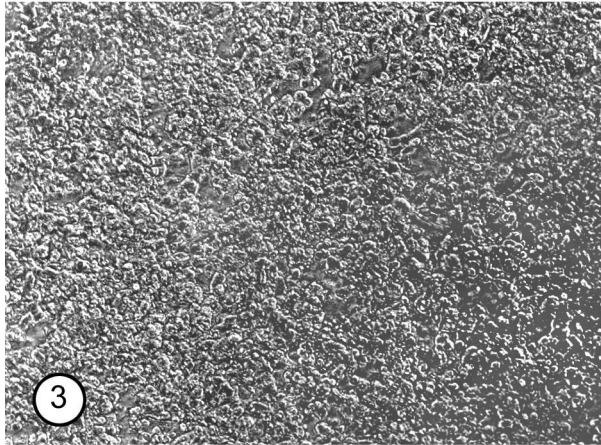
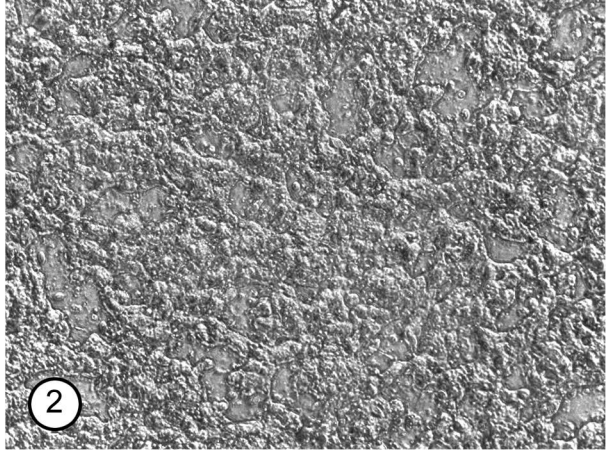
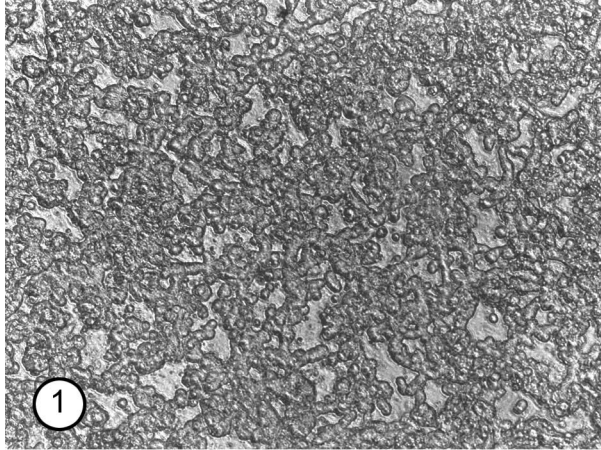
Abb. 3.19: Relative Expression von Vitellogenin (links) und Estrogenrezeptor (rechts) in Primärkulturen von Hepatocyten aus der Regenbogenforelle bei 14 und 18 °C nach Exposition mit 17 β -Estradiol. Die Exposition erfolgte jeweils für 12 und 24 h; dargestellt ist der Ratio zwischen Estrogen-reguliertem Gen und dem als internen Standard verwendeten β -Actin nach Amplifikation der cDNAs durch RT-PCR. Nach 24 h Exposition bei 18 °C konnte sowohl für Vitellogenin als auch für den Estrogenrezeptor ein LOEC (Lowest Observed Effect Concentration) von 100 pM ermittelt werden.

Aufgrund der hohen Sensitivität des PCR-Systems war es möglich, in allen Kontrollen eine schwache Vg0.8 cDNA-Bande nachzuweisen, wodurch eindeutig die Existenz der Vitellogenin-mRNA in den unbehandelten Hepatocyten geklärt werden konnte, da eine DNA-Kontamination durch den Einsatz Exon-überspannender Primer ausgeschlossen werden kann. Auch mit dem RT-PCR System wurde ein eindeutiger temperaturabhängiger Unterschied in der Sensitivität der Hepatocyten gegenüber Estrogenen festgestellt (Abb. 3.19). Während die Nachweisgrenze für die Induktion der Vitellogeninexpression bei 14 °C wiederum bei 1 nM 17 β -Estradiol lag, wurde nach 24 h Exposition bei 18 °C ein LOEC (Lowest Observed Effect Concentration) von 100 pM bestimmt. Für den Estrogenrezeptor ist ein ähnlicher Dosis-abhängiger Induktionsverlauf bestimmbar, jedoch waren die temperaturabhängigen Induktionsunterschiede nicht darstellbar, was auf eine ungenauere Quantifizierungsmöglichkeit der RT-PCR bei schwächer induzierbaren Genen hinweist.

Die Reaggregation der Hepatocyten stellt einen guten Indikator für die Vitalität von Hepatocytenprimärkulturen dar (Maitre et al. 1986, Braunbeck et al. 1995). Vergleicht man das mikroskopische Erscheinungsbild der bei beiden Temperaturen kultivierten unbehandelten Hepatocyten zu verschiedenen Inkubationszeiten (Abb. 3.20), wird deutlich, dass eine Reaggregation der Hepatocyten bei 18 °C wesentlich schneller als bei 14 °C stattfindet. Während die Zellen der Primärkulturen bei 18 °C nach 96 h einen stabilen, netzartigen Gewebeverband ausgebildet hatten, lagen die Zellen bei 14 °C noch weitgehend vereinzelt oder lose assoziiert vor. Nach 168 h Kultur wurde auch bei den bei 14 °C inkubierten Hepatocyten die netzartige Aggregatformation erreicht. Während diese Organisationsform jedoch bei 18 °C für weitere 48 h stabil blieb, wurde bei 14 °C nach 216 h (9 Tage) Kulturdauer ein sukzessives Ablösen der Hepatocyten vom Boden der Kulturplatte und damit der Verlust der Aggregatstruktur beobachtet, was als ein Anzeichen von zunehmender Seneszens gedeutet werden kann.

Hinsichtlich der Kapazität zur Vitellogeninexpression im Verlauf der Kulturdauer konnten ebenfalls Unterschiede zwischen beiden Kulturtemperaturen nachgewiesen werden. Hierzu wurden Hepatocyten nach einer 72stündigen Regenerationsphase kontinuierlich mit 1 nM 17 β -Estradiol belastet und für bis zu 196 h kultiviert (Abb. 3.21).

Abb. 3.20: Isolierte Hepatocyten aus der Regenbogenforelle nach unterschiedlicher Kulturdauer bei einer Temperatur von 14 oder 18 °C im Phasenkontrast: (1) 48 h nach Isolation, 14 °C: Beginnende Reaggregation der Hepatocyten, jedoch besitzen die Zellen in diesem Stadium noch eine klare sphäroide Form. (2) 96 h nach Isolation, 14 °C: die Reaggregation ist weiter fortgeschritten, einzelne Zellen sind nicht mehr klar voneinander abzugrenzen. (3) 168 h nach Isolation, 14 °C: Ausbildung eines Tubulus-artigen Hepatocytennetzwerks. Zellgrenzen sind nicht mehr erkennbar. (4) 216 h nach der Isolation, 14 °C: Verlust der Aggregatform, sukzessive Ablösung vom Boden der Kulturplatte. (5) 48 h nach Isolation, 18 °C: Frühe Reaggregationsphase, Einzelzellen erkennbar, jedoch bereits Verlust der sphäroiden Form. (6) 96 h nach Isolation, 18 °C: Ausbildung des netzartigen Zellverbands. (7) 168 h nach Isolation, 18 °C: Keine signifikanten Veränderungen zur Situation nach 96 h. (8) 216 h nach Isolation, 18 °C: Fortdauer des netzartigen Zellverbands, die Junktion der Hepatocyten ist weiter fortgeschritten, die Zellflächen erscheinen weitgehend homogen. Vergrößerung: 200 \times .



Bei einer Temperatur von 18 °C zeigten die Hepatocyten bis zu einer Kulturdauer von 168 h einen kontinuierlichen Anstieg der Vitellogeninexpressionsrate; über die nachfolgenden 24 h blieb der Vitellogenin-mRNA Gehalt in den Hepatocyten weitgehend konstant. Während der ersten 168 h der 17 β -Estradiolexposition verlief die Vitellogeninexpression in den bei 14 °C kultivierten Hepatocyten weitgehend parallel, wenn auch mit schwächerer Gesamtintensität; nach 216 h zeigten diese Hepatocyten jedoch einen signifikanten Rückgang in ihrer Vitellogeninexpression. Bezieht man diesen drastischen Rückgang des Vitellogenin-mRNA-Gehalts bei 14 °C auf das Gesamalter der Primärkultur von 12 Tagen, so verläuft dieser um 3 Tage verzögert zu dem nach 9 Tagen mikroskopisch beobachteten Verlust der Aggregatstruktur der Kulturen, was auf einen fortschreitenden Verlust der zelltypischen Funktionen der Hepatocyten schließen lässt.

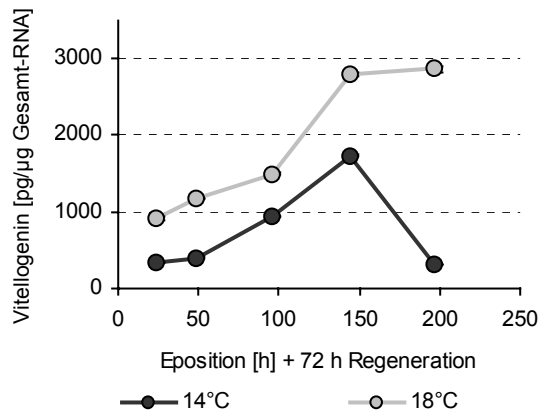


Abb. 3.21: Zeitabhängige Expression von Vitellogenin in männlichen Hepatocyten bei kontinuierlicher Exposition mit 1 nM 17 β -Estradiol. Die Quantifikation erfolgte mit dem Dot Blot RPA. Deutlich ist der Unterschied zwischen einer Kultur bei 14 und 18 °C zu erkennen.

3.2.4 Interassay-Variabilität

Ein Problem bei der Hepatocytenprimärkultur stellt die zum Teil erhebliche Individualität einzelner Testtiere hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit für estrogenartige Substanzen dar. Abbildung 3.22 zeigt die Vitellogenin-mRNA-Synthese in Hepatocytenprimärkulturen aus drei ausgewählten männlichen Regenbogenforellen nach 96stündiger Inkubation mit Konzentrationen von 100 bis 0,1 nM 17 β -Estradiol.

Die maximalen Vitellogenin-mRNA-Konzentrationen bei hoher Estradiolkonzentration liegt bei allen drei Individuen in der gleichen Größenordnung (15 - 31 ng/µg Gesamt-RNA für 100 nM bzw. 12 - 35 ng/µg Gesamt-RNA für 10 nM 17 β -Estradiol). Die Sensitivität gegenüber den niederen Estradiolkonzentrationen von 1 nM und 100 pM erweist sich jedoch bei den Fischen als recht unterschiedlich, wobei das Fehlen einer Vitellogenin-mRNA-Synthese bei einer Estradiolkonzentration von 1 nM (Fisch 1) erfahrungsgemäß eine selten beobachtete Ausnahme darstellt. Ein weiterer problematischer Faktor bei der Erfassung geringer Vitellogenin-mRNA-Konzentrationen stellt das bei langen Filmexpositionszeiten stark zunehmende Hintergrundsignal dar, wodurch sehr schwache spezifische Signale zum Teil überdeckt werden. Hier sollte durch weitere Verbesserung des Dot-Blot-Assay-Protokolls eine Steigerung der Assay-Sensitivität und Reproduzierbarkeit möglich sein.

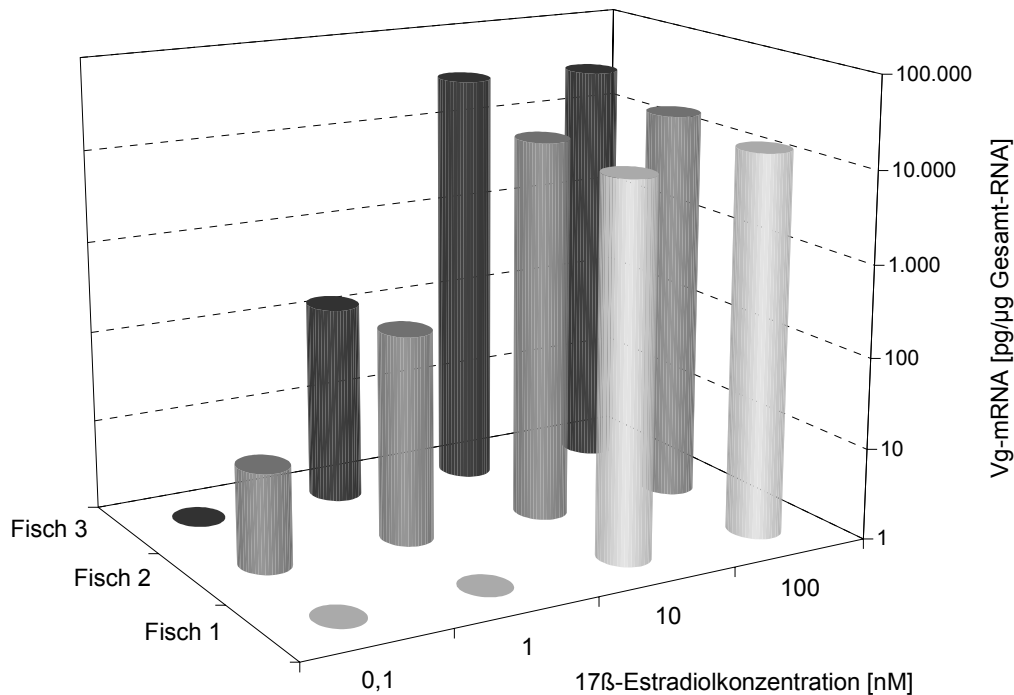


Abb. 3.22: Inter-Assay-Variabilität der Vitellogenin-mRNA-Bestimmung in Hepatocytenprimärkulturen der Regenbogenforelle. Vitellogeninengehalt nach 96 h Inkubation mit 17β-Estradiol verschiedener Konzentration in Hepatocyten aus drei unabhängig voneinander bearbeiteten Fischen; in Zusammenarbeit mit S. Pawlowski.

3.2.5 Induktion der Vitellogeninsynthese in Kontrollkulturen

Beobachtet man den zeitlichen Verlauf der Vitellogeninexpression in den Negativkontrollen, so ist bei einer Kultivierungstemperatur von 18 °C ein langsamer kontinuierlicher Anstieg der Vitellogeninexpression festzustellen (Abb. 3.23). Auch bei einer Inkubationstemperatur von 14 °C wurde nach 196 h Kulturdauer eine Induktion der Vitellogeninexpression festgestellt. Um eine potentielle estrogenwirksame Kontamination des Kulturmediums und der verwendeten Kulturplatten zu überprüfen, wurden Hepatocyten vergleichend mit Minimal Essential Medium (MEM) und auf Platten verschiedener Hersteller kultiviert.

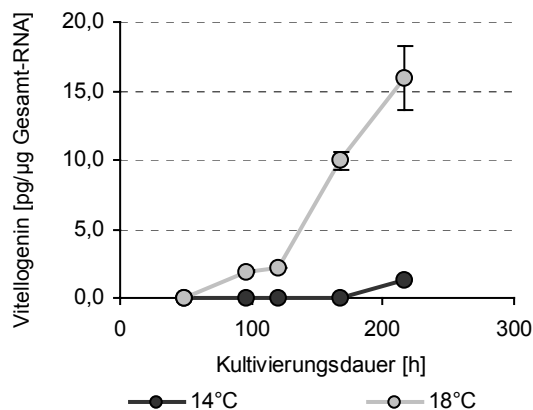


Abb. 3.23: Vitellogenin-mRNA in Kontrollhepatocyten aus der Regenbogenforelle in Abhängigkeit von der Kulturdauer. Bei einer Kultur bei 18 °C ist ein zeitabhängiger Anstieg der Vitellogeninexpression feststellbar, doch auch bei 14 °C ist nach 216 h Exposition die Existenz von Vitellogenin-mRNA nachweisbar.

Neben in der Routine benutzten Zellkulturplatten der Firma Greiner wurden hierzu die Hersteller TPP und Falcon getestet, wobei alle für die Zellkultur angebotenen Multiwell-Platten aus Polystyrol hergestellt waren. Wie aus Abb. 3.24 ersichtlich, wurde bei allen Kulturplatten eine deutliche Vitellogenin-cDNA in den Kontrollen amplifiziert. Auch der

Wechsel des Kulturmediums zu einem Minimalmedium führte zu keiner erkennbaren Verminderung der Vitellogeninexpression in den Kontrollzellen.

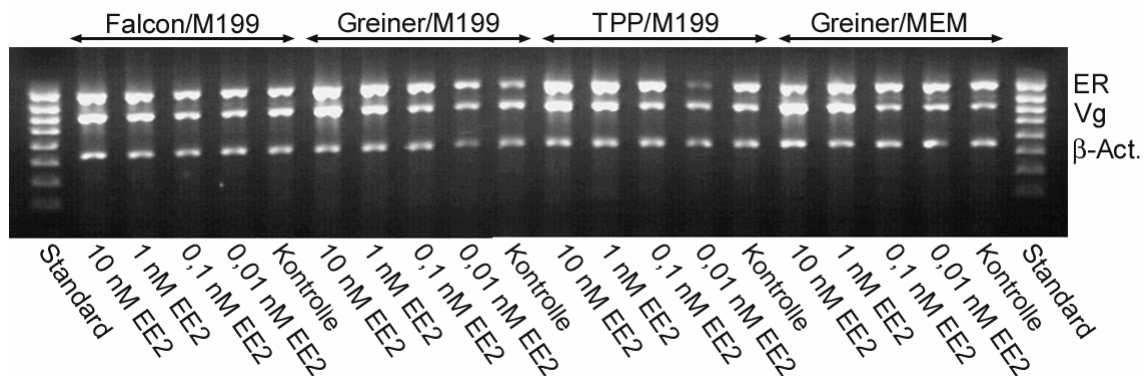


Abb. 3.24: Einfluss von Medium und Kulturplatten auf die Expression von Vitellogenin und Estrogenrezeptor. Sowohl Wechsel des Mediums zum Minimalmedium MEM als auch der Verwendung verschiedener Zellkulturplatten zeigten keinen Einfluss auf die Vitellogeninexpression in den Negativkontrollen. Abkürzungen: ER – Estrogenrezeptor, Vg – Vitellogenin, β -Act. – β -Actin, EE2 – 17α -Ethinylestradiol, Standard – peqlab 100 bp DNA ladder (300 bp – 1000 bp-Bande sichtbar).

3.2.6 Einfluss der Regenerationszeit der Hepatocyten aus der Regenbogenforelle auf die Induzierbarkeit der Vitellogensynthese

Während der Isolation werden Hepatocyten einer erheblichen Zahl von Stressfaktoren ausgesetzt, die zu einer verminderten Vitellogeninsyntheserate führen könnten. Daher wurden Hepatocytenprimärkulturen aus der Regenbogenforelle nach unterschiedlicher Regenerationszeit mit 17β -Estradiol im Bereich von 0,001 nM – 10 nM belastet (Abb. 3.25).

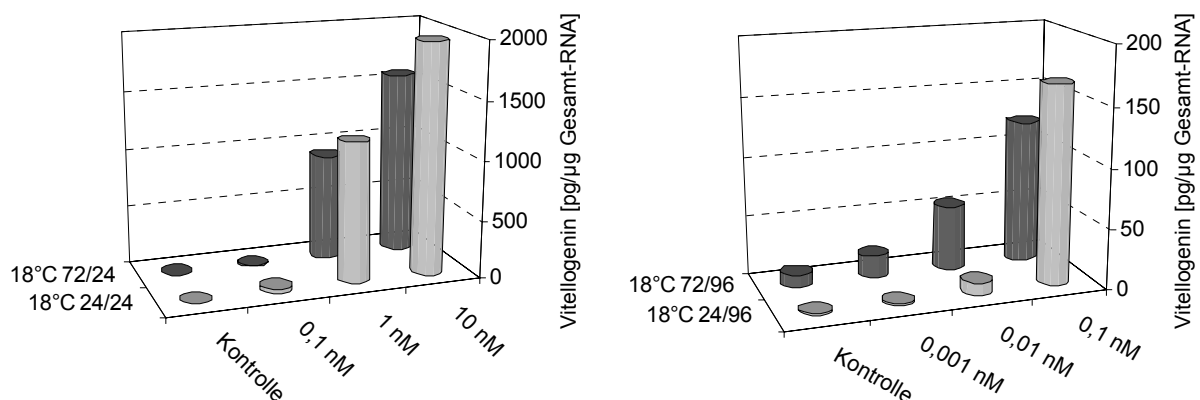


Abb. 3.25: Vitellogeninexpression in 17β -Estradiol-exponierten Hepatocyten nach unterschiedlicher Regenerationszeit (24 und 72 h). Während nach einer Expositionszeit von 24 h keine Unterschiede im Vitellogenin-mRNA-Gehalt feststellbar waren, wurde nach 96 h ein erhöhter Vitellogenin-mRNA-Gehalt in Kontrollen und bei den niedrigsten Estrogenkonzentrationen nachgewiesen.

Als Regenerationszeit wurden 24 h und 72 h bei einer Temperatur von 18 °C gewählt; 24 h nach der Isolation liegen die Hepatocyten noch weitgehend als Einzelzellen vor, sind jedoch bereits an den Boden der Kulturplatte angeheftet. Nach 72 h sind die Zellen deutlich in Zellaggregaten assoziiert.

Vergleicht man die Sensitivität der Vitellogenin-mRNA-Induktion, so lassen sich zunächst keine Unterschiede in Abhängigkeit von der Regenerationsdauer erkennen. Auch in der Quantität der transkribierten Vitellogenin-mRNA zeigten sich keine

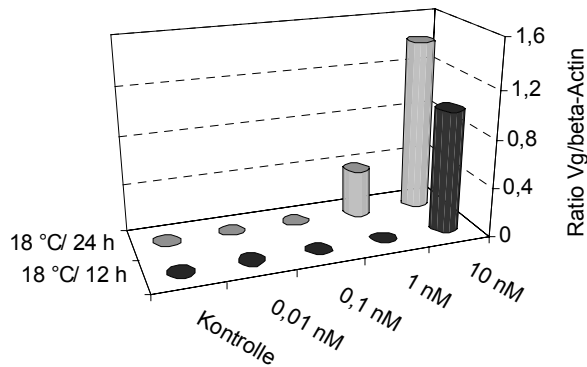


Abb. 3.26: Vitellogenin-mRNA in Hepatocyten bei Applikation von 17 β -Estradiol bei der Zellaussaat. Im Vergleich zur Applikation nach einer 24stündigen Regenerationsphase ist die Sensitivität deutlich erniedrigt.

signifikanten Unterschiede, jedoch trat der Induktionseffekt nach 168 h Kulturdauer deutlich in Kontrollen bei niederen Estradiolkonzentrationen hervor. Aufgrund des nicht nachweisbaren Einflusses der Länge der Regenerationsphase auf die Vitellogeninexpression wurde zusätzlich die Möglichkeit einer Direktapplikation der hormonell wirksamen Substanz beim Aussähen der Zellen in die Kulturplatten überprüft. Als Analysesystem wurde hierbei das RT-PCR-System nach einer Exposition von 12 und 24 h verwendet. Hier ergab sich jedoch im Vergleich zu einer 24stündigen Regenerationsphase eine deutlich verminderte Sensitivität gegenüber 17 β -Estradiol (Abb. 3.26).

3.2.7 Bestimmung des oestrogenen Potentials von umweltrelevanten Verbindungen in Dot Blot RPA und RT-PCR

Während die natürliche Effektorsubstanz 17 β -Estradiol bereits in äußerst niederen Konzentrationen zu

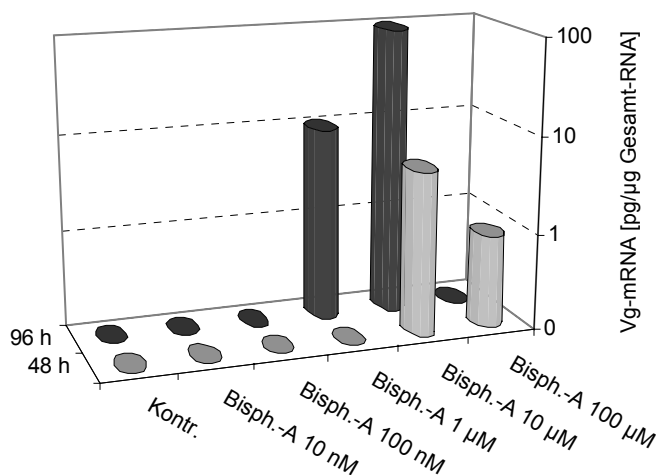


Abb. 3.27: Induktion der Vitellogenin-mRNA Synthese durch Bisphenol-A. Bei einer Konzentration von 100 μ M Bisphenol-A wird das endokrine Potential der Verbindung von ihrer cytotoxischen Wirkung überdeckt.

einer maximalen Induktion von Estrogen-gesteuerten Genen führt, bewirken die in ihrem oestrogenen Potential häufig um Größenordnungen schwächeren Xenoestrogene erst in weit höheren Konzentrationen eine Hormonantwort in der Zielzelle. Die zeit- und konzentrationsabhängige Bestimmung der Aktivität des schwachen Xenoestrogens Bisphenol-A illustriert jedoch die bei verlängerten Expositionszeiten steigende Gefahr einer cytotoxischen Wirkung der Effektorsubstanz, die das oestrogene Potential einer Monosubstanz oder eines Abwassers überlagern kann (Abb. 3.27).

Durch das cytotoxische Potential von Bisphenol-A wurde die Vitellogenin-mRNA-Synthese bei einer Induktorkonzentration von 100 μM nach 96 h Inkubation vollständig unterdrückt bzw. die bestehende Vitellogenin-mRNA wieder abgebaut; nach 48 h waren dagegen noch geringe Mengen der Vitellogenin-mRNA feststellbar. Die fehlende Information darüber, inwieweit die Vitellogeninkonzentration durch die Toxizität von Bisphenol-A in den niederen eingesetzten Konzentrationen beeinflusst wurde, erschwerte daher eine Beurteilung der tatsächlichen hormonellen Aktivität der Substanz, die bei den geringen umweltrelevanten Konzentrationen unter Langzeitbelastung aber eine erhebliche Rolle spielen kann.

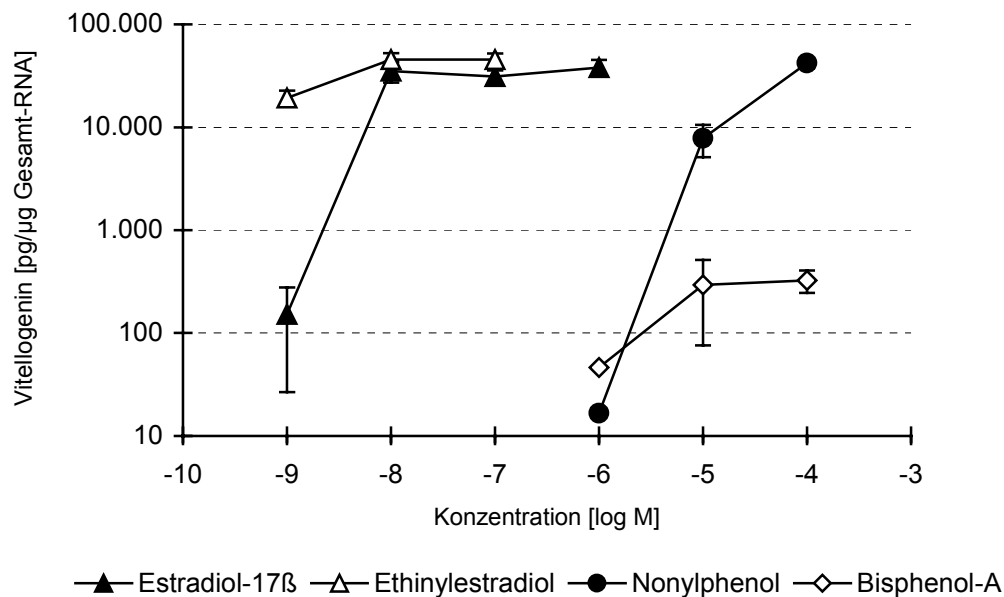


Abb. 3.28: Induktion von Vitellogenin-mRNA durch verschiedene Estrogene bzw. Xenoestrogene gemessen mit dem Dot Blot RPA. Dargestellt sind die Mittelwerte aus der Primärkultur von jeweils zwei Regenbogenforellen nach 96 h Exposition; in Zusammenarbeit mit S. Pawlowski.

Zur Bestimmung der estrogenen Aktivität der Xenoestrogene Nonylphenol, Bisphenol-A und 17 α -Ethinylestradiol im Dot Blot RPA wurden Hepatocytenprimärkulturen 96 h je drei Konzentrationen eines Induktors exponiert. Jede Testsubstanz wurde mit Hepatocyten von zwei männlichen Individuen beprobt, die zugehörigen Induktionskurven aus den Mittelwerten der Parallelexperimente erstellt (Abb. 3.28). Im Vergleich zu 17 β -Estradiol wiesen die Industriechemikalien Nonylphenol (techn.) und Bisphenol-A eine deutlich geringere estrogenen Potenz auf. Zur genaueren Bestimmung der hormonellen Aktivität der Testsubstanzen wurden die zu gleichen Vitellogenin-mRNA-Gehalten führenden Effektkonzentrationen an verschiedenen Stellen im linearen Bereich der Induktionskurven bestimmt. Für Nonylphenol konnte somit eine im Vergleich zu 17 β -Estradiol um 5.000fach verminderte estrogenen Potenz ermittelt werden, Bisphenol-A zeigte eine 4.000- bis 10.000fach verringerte Aktivität, wobei cytotoxische Effekte eine präzisere Angabe verhinderten.

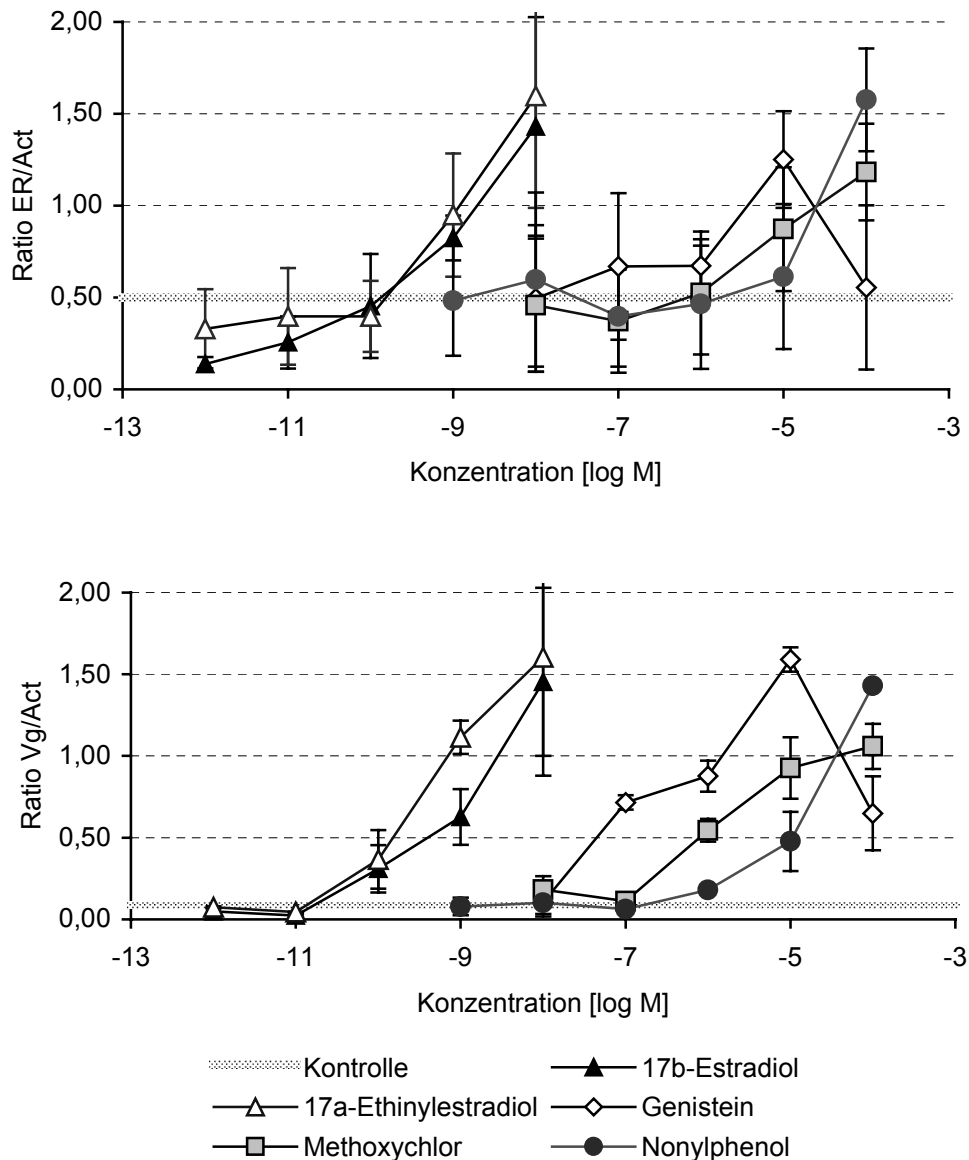


Abb. 3.29: RT-PCR-Nachweis der Induktion von Estrogenrezeptor- und Vitellogeninexpression in der Hepatocyten der Regenbogenforelle nach 24stündiger Exposition gegenüber estrogen wirksamen Verbindungen. Der relative Gehalt an Estrogenrezeptor- und Vitellogenin-mRNA ist als Ratio zwischen Vitellogenin und dem House Keeping-Protein β -Actin dargestellt. Die Mittelwerte wurden aus der Primärkultur von jeweils zwei Regenbogenforellen ermittelt. Abkürzungen: Vg – Vitellogenin, Act – β -Actin.

Das Kontrarezeptivum 17α -Ethinylestradiol besitzt im Dot Blot RPA die höchste hormonelle Aktivität der geprüften Testsubstanzen. Alle verwendeten Induktorkonzentrationen lagen bereits im Sättigungsbereich der sigmoidalen Induktionskurven. Die estrogene Potenz von 17α -Ethinylestradiol konnte daher nur näherungsweise ermittelt werden und liegt ungefähr beim vierfachen des für 17β -Estradiol ermittelten Vitellogenin-mRNA-Induktionspotentials.

Um die Anwendbarkeit einer semiquantitativen RT-PCR für Vitellogenin und Estrogenrezeptor zur Bewertung des Potentials von estrogen aktiven Verbindungen zu prüfen, wurde eine Expositionszeit

von 24 h gewählt; auch hier wurde jede Substanz parallel an Primärkulturen zweier männlicher Regenbogenforellen getestet.

Für alle Substanzen – 17β -Estradiol, 17α -Ethinylestradiol, Nonylphenol, Genistein, Methoxychlor – konnte auch mit dem RT-PCR System eine eindeutige Dosis-Wirkungsbeziehung für die Vitellogeninexpression ermittelt werden (Abb. 3.29a). 17α -Ethinylestradiol und 17β -Estradiol zeigten ein vergleichbares estrogenes Potential bei einem LOEC von 100 pM (29,6 bzw. 27,2 ng/L) für beide Verbindungen. Im Vergleich hierzu zeigten alle Xenoestrogene eine stark verminderte endokrine Aktivität. Das aus Sojabohnen stammende Phytoestrogen Genistein induzierte die Synthese von Vitellogenin-mRNA ab einer Konzentration von 100 nM (27,0 μ g/L), wobei die Vitellogeninexpression bis zu einer Konzentration von 10 μ M kontinuierlich anstieg. In der höchsten Konzentration wurde dagegen ein signifikant verminderter Vitellogenin-mRNA Gehalt gemessen, was auf das Erreichen einer zytotoxischen Konzentration schließen lässt, zumal die Zellen bei dieser Konzentration nur noch unvollständig am Boden der Zellkulturplatten adhärirt waren. Die estrogenen Potentiale von Methoxychlor und Nonylphenol lagen in der gleichen Größenordnung; für beide Substanzen wurde ein LOEC von 1 μ M bestimmt (220 μ g/L bzw. 346 μ g/L). Ordnet man die getesteten Chemikalien nach absteigendem endokrinen Potential, ergibt sich folgende Reihenfolge (in Klammern das estrogenes Potential in Bezug auf 17β -Estradiol): 17α -Ethinylestradiol \geq 17β -Estradiol > Genistein (~ Faktor 1.000) > Methoxychlor (~ Faktor 6.000) > Nonylphenol (~ Faktor 20.000). Die für die Expression des Estrogenrezeptors ermittelten Dosis-Wirkungskurven zeigen im Allgemeinen eine mit der Vitellogenininduktion vergleichbare Form (Abb.3.29b). Allerdings war der basale Gehalt an Estrogenrezeptor-mRNA in beiden Fischen sehr unterschiedlich, was zu hohen Standardabweichungen führte. Daher liegen die LOECs für die Induktion des Estrogenrezeptors um ein bis zwei Dekaden über den für die Vitellogenininduktion ermittelten Werten.

Vergleicht man die mittels Dot Blot RPA und RT-PCR ermittelten estrogenen Wirksamkeiten, so ergeben sich für die Vitellogenininduktion vergleichbare Werte, wobei die Sensitivität im RT-PCR-System trotz kürzerer Expositionszeit leicht erhöht erscheint.

3.2.8 Verwendung des Vitellogenin-mRNA-Assay für das Screening auf endokrin wirksame Abwässer

Im Rahmen einer für das Amt für Gewässerschutz und Abfallwirtschaft des Kantons Bern, Schweiz durchgeführten Abwasserbewertungsstudie wurden sechs Abwässer ergänzend auf ihre estrogenen Potenz untersucht. Vorausgehend wurden diese Abwässer einer intensiven Untersuchung auf Zytotoxizität unterzogen. Tab. 3.11 gibt eine Zusammenfassung der Befunde zur ökotoxikologischen Charakterisierung der sechs untersuchten Abwässer.

Mit der permanenten Zelllinie RTG-2 konnte nur im Abwasser der Kläranlage Worblental ein leichter zytotoxischer Effekt ermittelt werden, durch S9-Supplementierung wurde eine Toxifizierung von Lyss, Lotzwill und Bern erreicht. Die Abwässer der Kläranlagen Bern, Biel, Huttwil, Lyss und Worblental verursachten in Hepatocytenprimärkulturen nach 24 h Exposition zytotoxische Effekte, die entweder durch LDH-Freisetzung oder MTT-Assay dokumentiert werden konnten (Abb. 3.31 und 3.32).

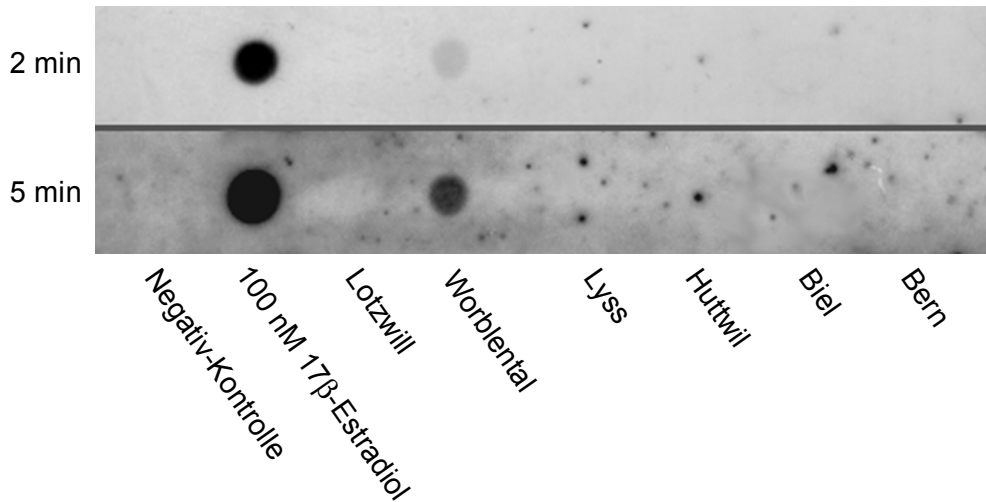


Abb. 3.30: Estrogene Aktivität von sechs Schweizer Abwässern im Vitellogenin-mRNA-Assay (Dot Blot). Die Exposition der Abwässer erfolgte in einer 1 : 8-Verdünnung in Medium M199 für 48 h. Pro Dot wurden 1 µg Gesamt-RNA aufgetragen. In den unbelasteten Hepatocyten konnte keine Vitellogenin-mRNA nachgewiesen werden; mit 100 nM 17β-Estradiol belastete Hepatocyten zeigten eine starke Reaktion hinsichtlich der Vitellogeninsynthese

Tab. 3.11: Zusammenfassung der Befunde von ökotoxikologischen Untersuchungen an sechs Abwasserproben aus dem Kanton Bern. Die stärkste toxikologische Belastung konnte für die Probe Bern, eine leichte Belastung für Biel, Lyss und Worblental ermittelt werden

<i>Test</i>	<i>Parameter</i>	<i>Bern</i>	<i>Biel</i>	<i>Huttwil</i>	<i>Lyss</i>	<i>Lotzwill</i>	<i>Worblental</i>
Cytotoxizität, RTG-2-Zellen	NR, ohne S9	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	+/- *
	NR, mit S9	+ ^{3**}	n.b.	n.b. ²	+/- ^{1*}	+ **	+/-
Cytotoxizität, Hepatocyten	LDH-Freisetzung	+ ⁴	+/- ⁵	+/- ⁵	+/- ⁵	n.b.	+/- ⁵
Toxizität, Hepatocyten	MTT-Assay	+	+/-	n.b.	+	n.b.	+/-

Legende:

+ = deutliche Wirkung; +/- = leichte Wirkung; n.b. = nicht bestimmbar

Endkonz.: Endkonzentration, d.h. 50 % Abwasser im Testansatz, OA: Originalabwasser, Fkt.: Aufkonzentrierungs-Faktor des OA; NR: Neutralrot-Test; *Vitalität der Zellen bei 50 % Originalabwasser (OA): 80-85 % ** Vitalität der Zellen bei 50 % Originalabwasser (OA): 60-65 %; ¹Vitalitätsanstieg bis 120 % ab 0,39 % des OA; ²leichter Vitalitätsanstieg; ³LOEC: 0,39 % OA; ⁴max 200 % bei der Endkonz.; ⁵Hepatocyten; #max. 120 % der Kontrolle; ⁵max. 113 bis 120 % der Kontrolle.

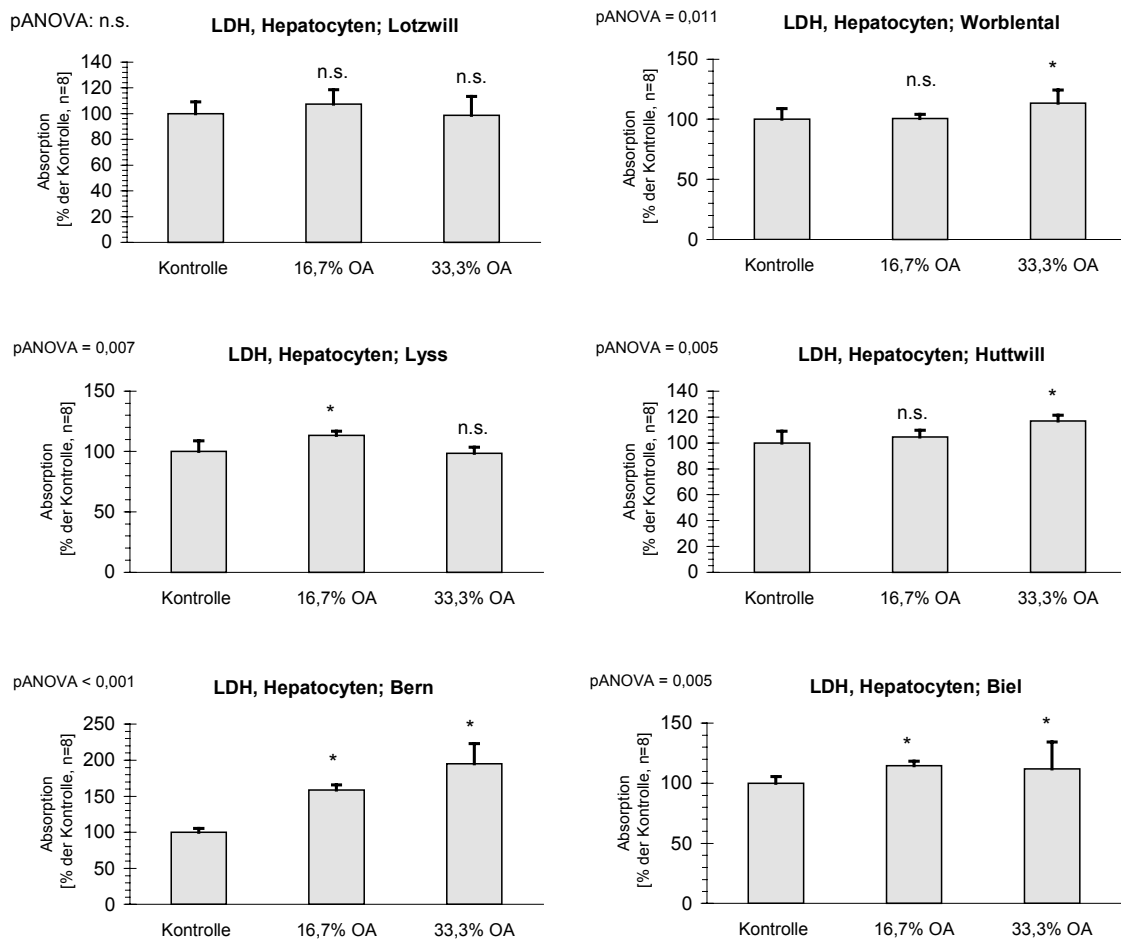


Abb. 3.31: Toxizität der Abwasserproben aus dem Kanton Bern nach 24 Stunden Exposition an isolierten Hepatocyten aus der Regenbogenforelle. Als Endpunkt wurde die Aktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) im Überstand verwendet, die über die Absorption bei 340 nm aus acht Replika photometrisch bestimmt und als Prozent der Kontrolle aufgetragen wurde. Die LDH-Freisetzung ins umgebende Medium ist ein Parameter für Membranschädigungen der Zellen. Die mit * gekennzeichneten Konzentrationen des Abwassers unterschieden sich in einem post-hoc-Test nach Dunnett mit einer Signifikanz $p < 0,05$ von der Kontrolle. %OA: Prozent des Originalabwassers im Testansatz.

Eine deutliche Schädigung der isolierten Hepatocyten konnte für die Abwasserproben Bern ermittelt werden, die bei 33 % des Originalabwassers einen LDH -Anstieg auf etwa 200 % der Kontrolle induzierte. Für die Proben Worblental, Biel, Lyss und Huttwill konnte eine leichte, aber statistisch signifikante Erhöhung der LDH-Aktivität durch die Abwasserexposition ermittelt werden (max. 115-120 % der Kontrolle). Die Probe Lotzwill beeinträchtigte die LDH-Freisetzung der isolierten Hepatocyten in keiner Weise.

Da von einer Verstärkung dieser Effekte bei einer verlängerten Expositionszeit, wie sie für den Vitellogenin-mRNA-Assay benötigt wird, ausgegangen werden musste, wurde für die zu diesem Zweck durchgeführten Abwasserbelastung der Hepatocyten ein Kompromiss aus moderat verlängerter Expositionszeit und erhöhter Abwasserverdünnung geschlossen: Die Hepatocytenprimärkulturen wurden 48 h mit einer 1: 8-Verdünnung der Abwässer belastet.

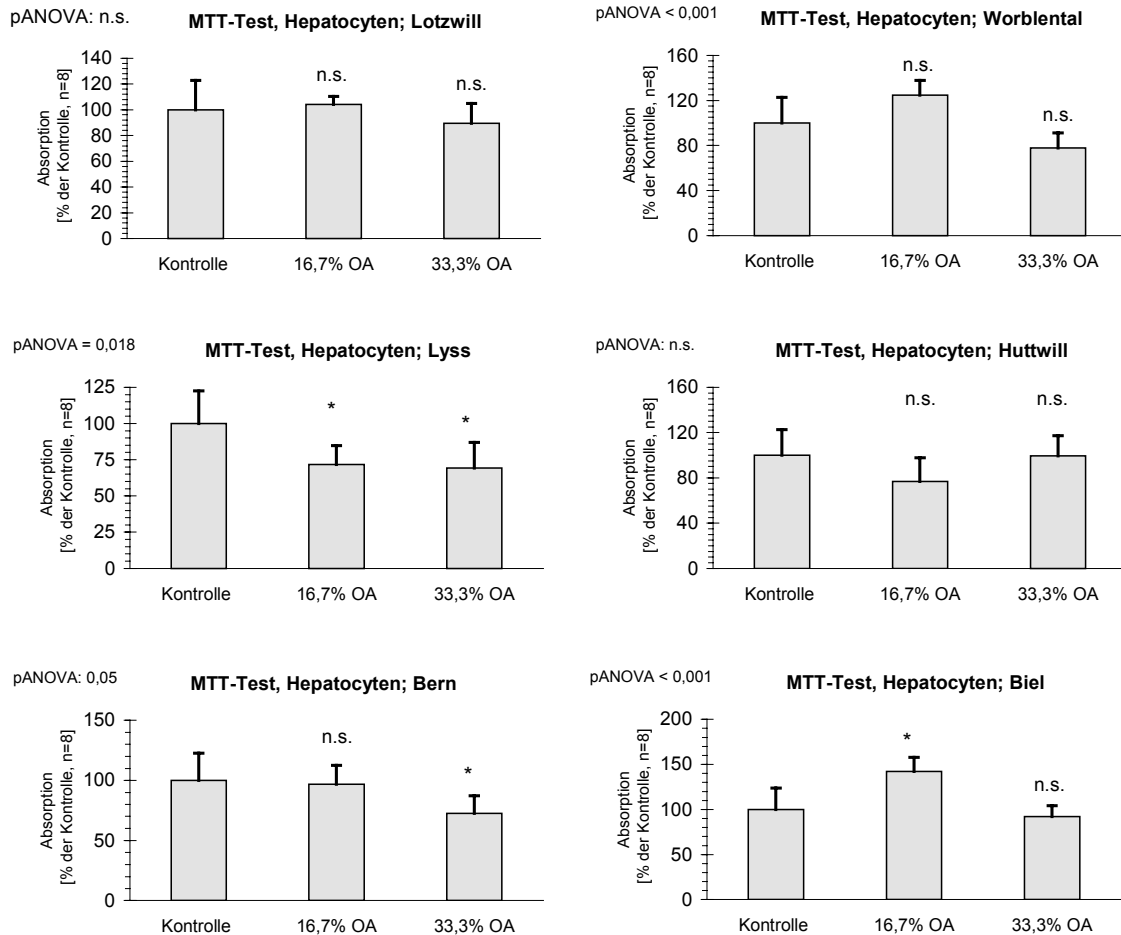


Abb. 3.32: Toxizität der Abwasserproben aus dem Kanton Bern nach 24 Stunden Exposition an isolierten Hepatocyten aus der Regenbogenforelle. Als Endpunkt wurde die Aktivität der succinatabhängigen mitochondrialen Dehydrogenase im MTT-Assay verwendet, die über die Absorption bei 550 nm aus acht Replika photometrisch bestimmt und als Prozent der Kontrolle aufgetragen wurde. Die mit * gekennzeichneten Konzentrationen des Abwassers unterschieden sich in einem post-hoc-Test nach Dunnett mit einer Signifikanz $p < 0,05$ von der Kontrolle. %OA: Prozent des Originalabwassers im Testansatz.

Eine deutliche Schädigung der Zellen konnte bei den Abwasserproben Bern und Lyss ermittelt werden. Die Proben Biel und Worblental bewirkten eine statistisch signifikante Aktivierung der succinatabhängigen Dehydrogenase von isolierten Hepatocyten.

Die Abwässer der Kläranlagen Bern, Biel, Huttwill, Lyss und Lotzwill zeigten unter diesen Bedingungen keine endokrine Aktivität auf die Hepatocyten (Abb 3.30). In der Abwasserprobe der Kläranlage Worblental konnte dagegen ein deutliches estrogenes Potential nachgewiesen werden. Die estrogenere Potenz dieses Abwassers liegt zwar deutlich unter der 100 nM Estradiolkontrolle, die in etwa die maximal erreichbare Vitellogenin-mRNA Syntheserate induziert, zeigt jedoch hinsichtlich der kurzen Expositionszeit dennoch deutliche endokrine Aktivität. Es ist nicht auszuschließen, dass auch für die anderen Abwässer bei geringerer Verdünnung ein estrogenes Potential hätte nachgewiesen werden können.

3.3 *In vivo*-Untersuchungen zur estrogenen Aktivität von umweltrelevanten Chemikalien

Zusammenfassung

Für eine grundlegende Beurteilung des estrogenen Potentials von Xenobiotika in der Umwelt sind *In vivo*-Untersuchungen unerlässlich, da nur die Belastung eines intakten Organismus Aufschluss über Bioakkumulation, metabolische Umsetzung und Exkretion von Xenoestrogenen geben kann. Aus diesem Grund ist die Validierung der *In vivo*-Expressionsmuster von Genen, die als Biomarker für eine estrogenen Wirkung eingesetzt werden, notwendig. In der Regenbogenforelle wurden vergleichende Untersuchungen zur Kinetik der Expression von Vitellogenin auf mRNA- und Proteinebene durchgeführt, um Vor- und Nachteile dieser beiden Detektionsmethoden für die Probennahme im Freiland abzuschätzen. Die hohe Persistenz des Proteins im Plasma männlicher Regenbogenforellen impliziert hierbei eine höhere Sensitivität dieser Methode bei einer intermittierenden Belastung in der Umwelt, wobei dadurch jedoch auch die Gefahr einer Überschätzung des tatsächlichen estrogenen Potentials besteht.

Die parallele Exposition von Medakas und Zebraabärblingen gegenüber ausgewählten Xenoestrogenen in zeit- und dosisabhängigen Experimenten erbrachte signifikante Unterschiede in der Reaktivität dieser Fischarten gegenüber den einzelnen Substanzen. Allgemein konnte im Zebraabärbling eine Erhöhung der transkriptionalen Aktivität der Leber in Folge einer estrogenen Wirkung beobachtet werden, wogegen beim Medaka nur eine Veränderung des Expressionsmusters der estrogen-regulierten Gene nachweisbar war. Hinsichtlich der estrogenen Sensibilität, war beim Zebraabärbling eine hohe Sensitivität gegenüber 17α -Ethinylestradiol nachweisbar, das eine Induktion von Vitellogenin- und Estrogenrezeptor α -Expression bis zu einer nominalen Konzentration von 2,5 ng/L hervorrief. Im Medaka konnte dagegen erst ab einer Konzentration von 25 ng/L eine Reaktion auf die Präsenz des synthetischen Estrogens gemessen werden. Für Nonylphenol wurde bei beiden Fischarten eine vergleichbare estrogenen Sensitivität mit einem LOEC von 8,5 - 25 μ g/L bestimmt. Methoxychlor wiederum zeigte in subletalen Dosen keinen Einfluss auf die estrogen-induzierte Genaktivität im Zebraabärbling, wogegen im Medaka einer Induktion der Genexpression von Choriogenin H, Vitellogenin und Estrogenrezeptor α beginnend mit einer Konzentration von 25 μ g/L nachweisbar war.

Am Beispiel des Zebraabärblings konnte in adulten Männchen keine Verweiblichung des Gonadengewebes, sondern eine Destruktion des Hodens im ultramikroskopischen Bild beobachtet werden. Eine Verweiblichung der Geschlechtsorgane ist demzufolge nur in einer früheren Entwicklungsphase dieser Fischart möglich. In diesen Zusammenhang konnte eine estrogenen Sensibilität der Larven bereits in einem Alter von 4 Tagen nach der Eibefruchtung nachgewiesen werden.

3.3.1 *In vivo*-Untersuchungen an der Regenbogenforelle - Ein Vergleich zwischen Expression der Vitellogenin- und Estrogenrezeptor-mRNA und der Sekretion von Vitellogenin in das Blutplasma männlicher Regenbogenforellen nach einmaliger Injektion von 1 mg/kg 17 β -Estradiol

Die Expression eines Proteins wird auf transkriptioneller Ebene durch Transkriptionsrate und mRNA-Stabilisierung geregelt. Um Aufschlüsse über das Expressionsmuster von Estrogenrezeptor- und Vitellogenin-mRNA in der Regenbogenforelle zu gewinnen, wurde eine einmalige Injektion (i.p.) männlicher Tiere mit einer Dosis von 1 mg 17 β -Estradiol pro kg Körpergewicht vorgenommen. Anschließend wurden Vitellogenin und Estrogenrezeptor-mRNA über Dot Blot RPA und/oder RT-PCR bestimmt. Zusätzlich wurde der Vitellogeningehalt im Blutplasma der Tiere per ELISA bestimmt, um den endokrinen Status der Zelle mit dem in männlichen Tieren akkumulativen Exportprozess zu vergleichen. Nach der Injektion konnte eine drastische Induktion der Vitellogensynthese beobachtet werden, die sowohl als Vitellogenin-mRNA in der Leber (Abb. 3.33) als auch als exportiertes Protein im Plasma (Abb. 3.34) nachgewiesen werden konnte. Erwartungsgemäß erfolgte die Sekretion des Vitellogens ins Blutplasma etwas verzögert zur mRNA-Synthese in der Leber. Bereits 24 h nach der Injektion konnte ein erheblicher Teil an Vitellogenin-mRNA (22,7 % des ermittelten Maximalwerts) in der Leber nachgewiesen werden, wogegen nur wenig Vitellogenin im Plasma gemessen werden konnte (0,5 % des ermittelten Maximalwerts).

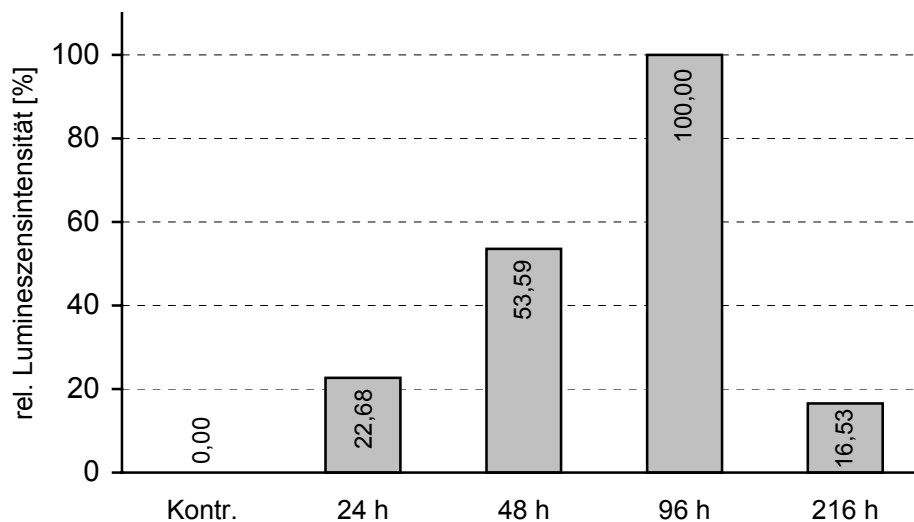


Abb. 3.33: Relativer Gehalt an Vitellogenin-mRNA in der Leber von männlichen Regenbogenforellen nach Injektion von 1 mg/kg 17 β -Estradiol ermittelt über den Dot Blot RPA

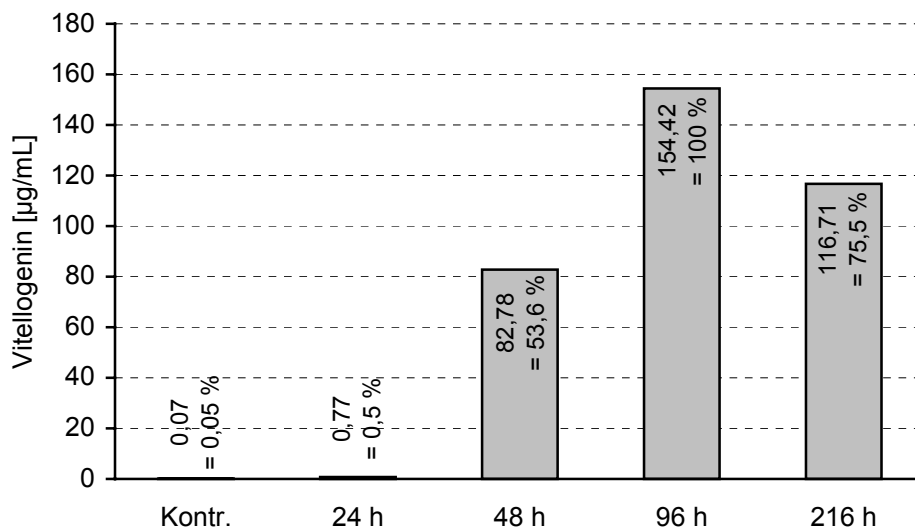


Abb. 3.34: Vitellogeningehalt im Blutplasma männlicher Regenbogenforellen nach Injektion von 1 mg/kg 17β-Estradiol.

Sowohl Vitellogenin-mRNA in der Leber als auch Vitellogeningehalt im Blut stiegen im weiteren Zeitverlauf bis zum Meßpunkt bei 96 h nach der Injektion weiter an. Neun Tage bzw. 216 h nach der Estradiol-Injektion zeigten sich jedoch deutliche Unterschiede zwischen den beiden Endpunkten: Zu diesem Zeitpunkt waren nur noch 16,5 % des maximal ermittelten Vitellogenin-mRNA-Gehalts in der

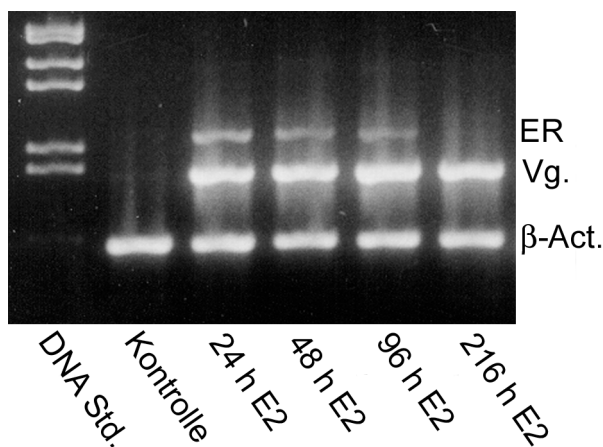


Abb. 3.35: Semiquantitative RT-PCR der Expression von Estrogenrezeptor (ER), Vitellogenin (Vg) und β-Actin (β-Act.) in männlichen Regenbogenforellen nach Injektion von 1 mg/kg 17β-Estradiol (E2). DNA-Std. – λ-EcoR I/Hind III digest

Leber vorhanden, jedoch konnte immer noch 75,5 % der maximal ermittelten Vitellogeningehalt im Blutplasma gemessen werden (Abb. 3.33 und 3.34). War die Vitellogenin-mRNA in der Leber bereits neun Tage nach dem durch die Injektion simulierten, einmaligen Belastungsereignis wieder in hohem Maße abgebaut, so war die Abnahme von Vitellogenin im Blutplasma im Vergleich erheblich schwächer, was für eine hohe Verweildauer und damit für eine Akkumulation von Vitellogenin im Blutplasma männlicher Regenbogenforellen spricht. Vergleicht man die im Dot Blot RPA ermittelten absoluten Werte für den Vitellogeningehalt mit der in durch RT-PCR amplifizierte Vg0.8 cDNA-Menge (Abb. 3.35), so wird deutlich,

dass eine quantitative Beurteilung der RT-PCR-Ergebnisse nur im linearen Bereich der PCR-Amplifikation möglich ist. Für die Vitellogenin-mRNA-Gehalte in den Hepatocyten nach Injektion einer hohen 17β-Estradiol-Dosis wurden in dieser RT-PCR zu viele Amplifikationszyklen durchgeführt, so dass bereits vor Beendigung der PCR die Konzentrationen von Nukleotiden oder Primern nicht mehr in genügend hohem Überschuss vorlagen.

Die Expression des Estrogenrezeptorgens verdeutlicht weit stärker die zeitabhängige Plastizität der Hormonantwort auf die 17β -Estradiol-Injektion als die der Vitellogenin-mRNA (Abb. 3.36). Bereits 24 h nach Auslösung des Hormonpulses liegt die Estrogenrezeptor-mRNA in maximaler Konzentration vor und fällt im Verlauf der folgenden 168 h wieder kontinuierlich unter die Nachweisgrenze ab. Es wird deutlich, dass vor Beginn einer intensiven Vitellogeninsynthese zunächst eine Erhöhung der zellulären Estrogenrezeptor-Konzentration stattfindet, da das Maximum der Vitellogeninsynthese erst nach 96 h erreicht wurde. Die im Vergleich zur Estrogenrezeptor-mRNA einen langen Zeitraum in hoher Konzentration nachweisbare Vitellogenin-mRNA weist zusätzlich auf eine hohe Halbwertszeit der zuletzt genannten mRNA hin, da eine estrogenbedingte mRNA-Neusynthese bei beiden Genen stattfinden würde.

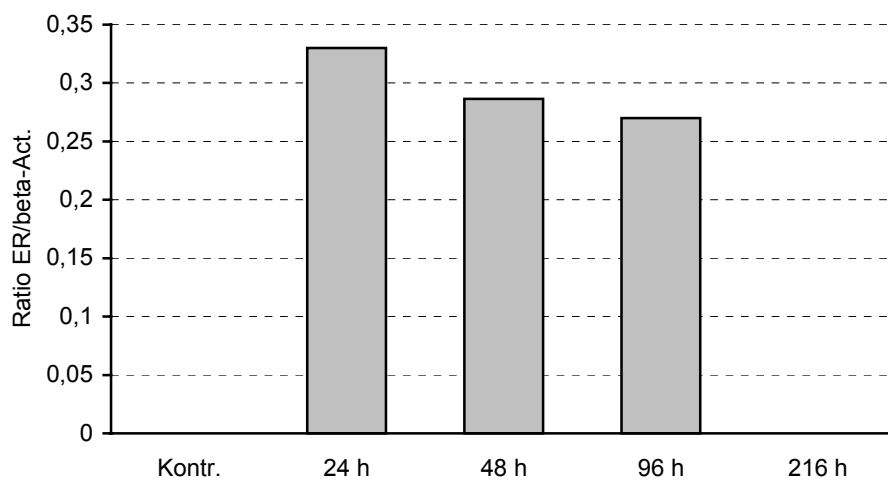


Abb. 3.36: Semiquantitative RT-PCR-Analyse der Estrogenrezeptor-Expression in der Leber männlicher Regenbogenforellen nach Injektion von 1 mg/kg 17β -Estradiol. Während die Konzentration in der Kontrolle unter der Nachweisgrenze liegt, war die maximale Konzentration bereits nach 24 h erreicht und sank im weiteren Verlauf des Experiments kontinuierlich bis unter die Detektionsgrenze ab.

3.3.2 *In vivo*-Untersuchungen am Medaka (*Oryzias latipes*) – Exposition von (Xeno)-estrogenen unter semistatischen und Durchflussbedingungen

Estrogenrezeptor α , Choriogenin H und Vitellogenin stellen Estrogen-regulierte Gene dar, die in der Leber weiblicher Medakas im Zuge der Oogenese exprimiert werden. Um die estrogenabhängige Reaktion dieser Gene hinsichtlich zeitlicher und dosisbezogener Expression zu charakterisieren, wurden männliche Medakas im Durchfluss 17α -Ethinylestradiol exponiert. In Bezug auf die zeitabhängige Expression dieser Gene wurde eine Belastung mit 50 ng/L 17α -Ethinylestradiol simuliert; die Dosisabhängige Expression infolge exogener Estrogenbelastung wurde nach 5-tägiger Exposition unter Durchflussbedingungen mit 17α -Ethinylestradiol (0,25 – 85 ng/L), Nonylphenol (2,5 – 85 μ g/L) und dem Proestrogen Methoxychlor (2,5 – 85 μ g/L) gemessen. Parallel wurden diese Versuche mit dem Zebraabrbilling durchgeführt, um potentielle speziesspezifische Unterschiede zu erforschen.

Betrachtet man die pro Leber isolierte RNA-Menge als Marker für eine potentielle Hypertrophie der Leber in Folge drastisch gesteigerter Genaktivität, konnte sowohl bei den zeit- als auch bei den dosisabhängig exponierten Medakas keine Anzeichen für eine veränderte transkriptionelle Gesamtaktivität der Leber in Form eines allgemeinen RNA-Anstiegs festgestellt werden (Abb. 3.37 und 3.38). In Bezug auf die estrogenabhängige Expression der drei gemessenen Gene waren jedoch eindeutige Zeit- und Dosis-Wirkungsbeziehungen feststellbar. Bereits 24 h nach Beginn der Belastung mit 50 ng/L Ethinylestradiol wurde hohe Expressionsraten für alle Gene gemessen (Abb. 3.37). Im weiteren Verlauf des Experiments verlief die Expression im Rahmen der Quantifikationsmöglichkeiten der RT-PCR weitgehend konstant; es waren keine adaptiven Reaktionen der Männchen auf die exogene Estrogenapplikation feststellbar.

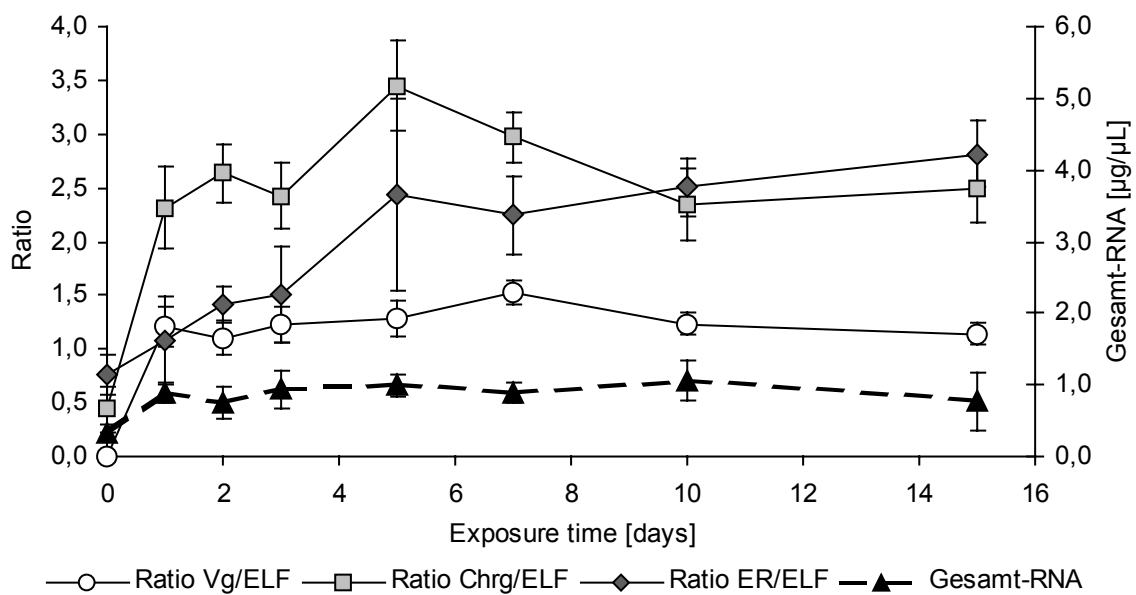


Abb. 3.37: Zeitabhängige Expression der Vitellogenin-, Choriogenin H- und Estrogenrezeptorgene in der Leber männlicher Medakas nach Belastung mit 50 ng/L 17α -Ethinylestradiol. Die Ergebnisse sind als Ratio zwischen dem estrogen-regulierten Gen und dem House Keeping-Protein Elongationsfaktor 1α dargestellt, das als interner Standard verwendet wurde. Die unterbrochene Linie zeigt die Konzentration an Gesamt-RNA, die pro Leber isoliert werden konnte (rechte Ordinate). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ($n = 6$ bzw. 7 für RNA-Gehalt). Vg: Vitellogenin 1, Chrg: Choriogenin H, ER: Estrogenrezeptor α , ELF: Elongationsfaktor 1α .

Im Experiment zur Dosis-Wirkungsbeziehung wurde eine bemerkenswert niedrige Sensitivität des Medakas gegenüber 17α -Ethinylestradiol ermittelt (Abb. 3.38). Eine signifikante Induktion der Expression von Vitellogenin und Estrogenrezeptor war erst ab einer Konzentration von 85 ng/L nachweisbar. Für die Expression von Choriogenin H wurde eine hochsignifikante Expression über dem Kontrolllevel bereits ab einer Konzentration von 25 ng/L ($p = 0,001$) gemessen, wobei das Profil der Dosis-Wirkungskurve jedoch flacher als bei Estrogenrezeptor und Vitellogenin ausfällt.

Die Belastung mit Nonylphenol führte bis zu einer Konzentration von 25 $\mu\text{g}/\text{L}$ zu einer signifikanten Aktivierung des Vitellogenins ($p = 0,001$). Bei niedrigeren Testkonzentrationen konnte eine deutliche Expression von Vitellogenin-mRNA in einzelnen Individuen beobachtet werden, jedoch war in

der Mehrzahl der Proben keine Vitellogenin-mRNA identifizierbar, so dass individuelle Unterschiede im Grundexpressionslevel oder Unterschiede in der Empfindlichkeit für Hormone zu bestehen scheinen.

Parallel zu Vitellogenin wurde auch eine verstärkte Expression des Estrogenrezeptors α in allen Konzentrationen oberhalb 8,5 $\mu\text{g/L}$ Nonylphenol gemessen. Wie bei Vitellogenin zeigten wiederum einzelne Individuen bei tieferen Konzentrationen erhöhte Estrogenrezeptor-Expression. Wie bereits bei 17α -Ethinylestradiol war der Bereich einer signifikanten Choriogenin H-Induktion durch Nonylphenol bis einschließlich 8,5 ng/L nachzuweisen. Auch für Methoxychlor war eine eindeutige estrogene Aktivität im Medaka nachzuweisen, so dass eine ausreichende Metabolisierung durch den Organismus stattfinden muss. Bis zu einer Konzentration von 25 $\mu\text{g/L}$ Methoxychlor wurde in allen Individuen eine massive Induktion von sowohl Vitellogenin, Choriogenin H als auch Estrogenrezeptor α bei allen Individuen gemessen. Eine Induktion der Vitellogeninexpression war auch bei 70 % aller Tiere aus der Testgruppe von 8,5 $\mu\text{g/L}$ nachweisbar.

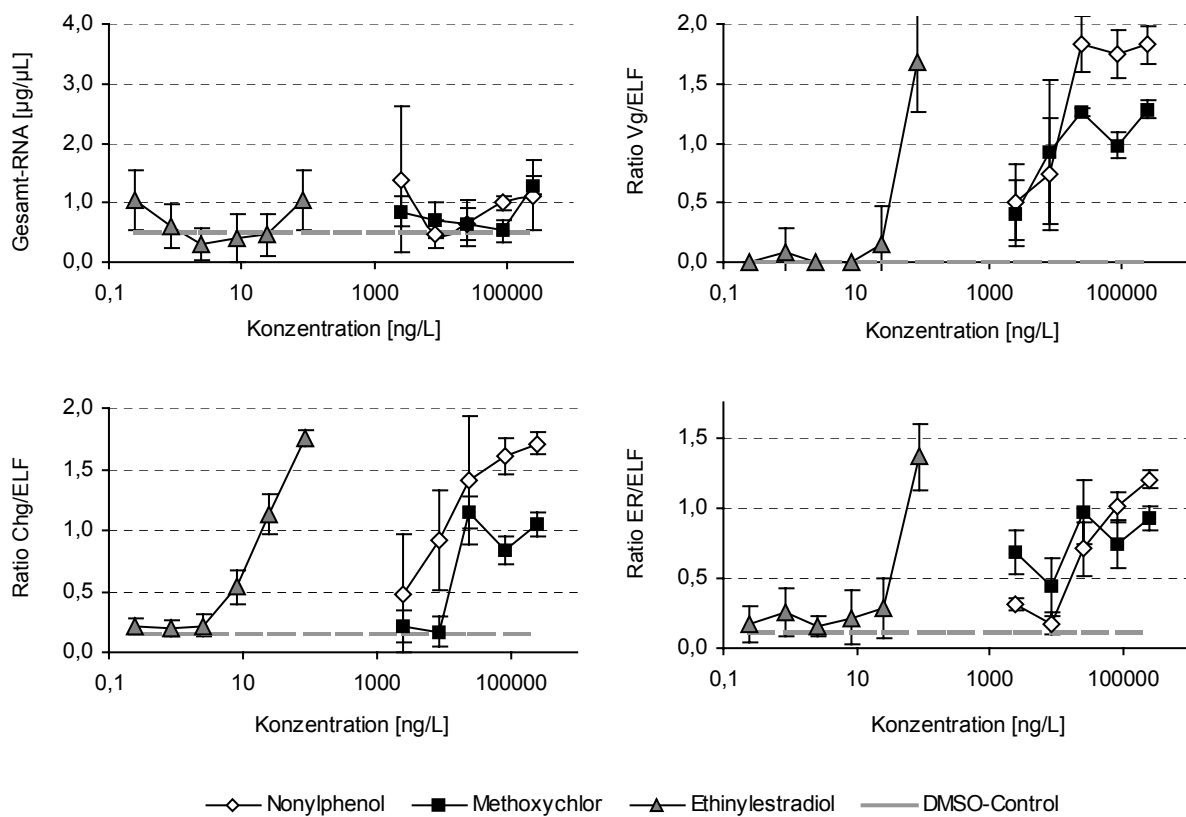


Abb. 3.38: Estrogen-abhängige Reaktion der Leber des Medaka auf die Belastung mit unterschiedlichen Konzentrationen der Xenoestrogene 17α -Ethinylestradiol, Nonylphenol und Methoxychlor *in vivo*. Der pro Leber durchschnittlich isolierte RNA-Gehalt ist als Maß für die allgemeine transkriptionelle Aktivität des Organs angegeben. Induktion von Vitellogenin (Vg), Choriogenin H (Chg) und Estrogenrezeptor α (ER) sind als Ratio zwischen estrogen-reguliertem Protein und dem House Keeping-Protein Elongationsfaktor 1α (ELF) dargestellt.

Neben der Exposition unter Durchflussbedingungen stellt die Belastung mit (Xeno-)Estrogenen unter semistatischen Bedingungen (periodischer Wasserwechsel) eine weit verbreitete Applikationsart dar.

Um zu klären, inwieweit sich semistatische Expositionssysteme für eine Bestimmung estrogener Aktivitäten in Lösungen eignen, wurden ergänzend männliche Medakas mit 17α -Ethinylestradiol und Nonylphenol in einem semistatischen System für sieben Tage exponiert, wobei jeden Tag die Hälfte des Expositionswassers erneuert wurde.

Vergleichbar mit der Durchflussexposition wurde für Nonylphenol auch hierbei eine Detektionsgrenze für die Expression von Vitellogenin von $20 \mu\text{g/L}$ ermittelt (Abb. 3.39). Auch für 17α -Ethinylestradiol lag die Nachweisgrenze bei einer tolerierbar abweichenden Konzentration von 25 ng/L im Vergleich zu den 50 ng/L , die im zeitabhängigen Durchflussexperiment bestimmt wurden. Wiederum waren individuelle Unterschiede in der Empfindlichkeit für Estrogene festzustellen, wobei in den Kontrollen, die in $0,001 \%$ DMSO, das als Lösungsvermittler verwendet wurde, exponiert waren, höchstens Spuren von Vitellogenin-mRNA nachzuweisen waren. In diesem Sinne erscheint eine semistatische Exposition bei häufigem Austausch der Hormonlösung zu vergleichbaren Induktionsergebnissen zu führen.

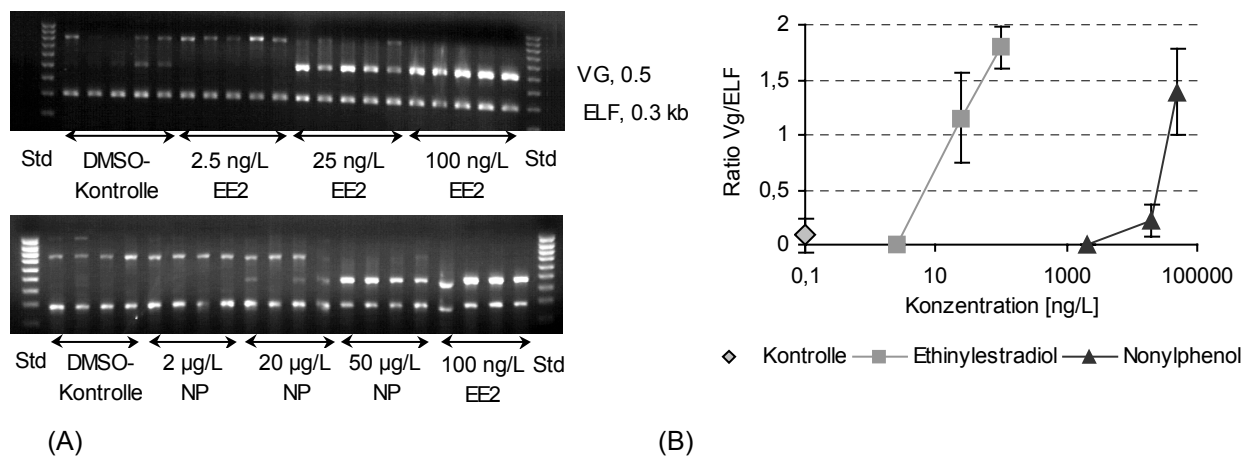


Abb. 3.39: (A) RT-PCR der Vitellogeninexpression in männlichen Medakas (*Oryzias latipes*) nach 7-tägiger Exposition von Nonylphenol und 17α -Ethinylestradiol unter semistatischen Bedingungen. Die Gesamt-RNA von vier Individuen, die gegenüber 100 ng/L 17α -Ethinylestradiol exponiert waren, wurden mit den Nonylphenol-exponierten Proben coamplifiziert, um die Vergleichbarkeit beider PCR-Läufe zu gewährleisten. (B) Die densitometrische Analyse des Gels ist als Ratio zwischen Vitellogenin und dem Elongationsfaktor 1α dargestellt, der als interner Standard verwendet wurde. NP: Nonylphenol, EE2: 17α -Ethinylestradiol, ELF: Elongationsfaktor 1α , Vg: Vitellogenin, Std: 100 bp DNA ladder (peqlab) von $200 - 1.000 \text{ bp}$.

3.3.3 *In vivo*-Untersuchungen am Zebraquarienfisch (*Danio rerio*) – Auswirkung der Exposition von (Xeno-)estrogenen auf Genexpression und Ultrastruktur von Leber und Hoden

Betrachtet man die Verteilung von Estrogenrezeptoren in den Geweben adulter männlicher Fische nach Estrogenexposition, so weisen besonders Leber und Geschlechtsorgane hohe Konzentrationen von Estrogenrezeptoren auf (Legler et al. 2000), so dass sie als Hauptzielorgane für eine exogene estrogene Belastung angesehen werden können. Um die Labilität dieser beiden Organe gegenüber Estrogenen oder Estrogen-wirksamen Verbindungen genauer zu beleuchten, wurde die Aktivität Estrogen-regulierter Gene sowohl hinsichtlich ihrer zeit- als auch ihrer dosisabhängigen Expression bestimmt. In der Leber wurden hierfür die Vitellogenin-ähnlichen cDNAs Vg1 und Vg2 sowie der Estrogenrezeptor α verwendet, im Hoden wiederum Estrogenrezeptor α und das Zona Pellucida-

Protein ZP 2, das als Spermienrezeptor in der Eihülle fungiert und folglich als Marker für eine potentielle Verweiblichung des Gewebes steht. Zunächst wurde die zeitabhängige Expression dieser Gene nach Exposition gegenüber 50 ng/L 17 α -Ethinylestradiol unter Durchflussbedingungen gemessen; danach erfolgte eine Dosis-Wirkungs-Analyse mit 17 α -Ethinylestradiol in Konzentrationen von 0,1 – 85 ng/L nach einem Zeitraum von 4 sowie 21 Tagen. Zur Abschätzung des estrogenen Potentials der weitaus schwächeren Xenoestrogene *in vivo* wurde exemplarisch eine viertägige Belastung mit Nonylphenol und Methoxychlor in einem Konzentrationsbereich von 2,5 – 250 μ g/L vorgenommen. Parallel hierzu wurden Medakas coexponiert, um Aufschluss über speziesspezifische Unterschiede hinsichtlich der Sensibilität und Reaktionsart gegenüber verschiedenen (Xeno-)estrogenen zu gewinnen. Expressionsunterschiede wurden als Ratio zwischen dem Estrogen-regulierten Gen und dem als internen Standard verwendeten House Keeping-Protein Elongationsfaktor 1 α gemessen.

Untersuchungen zur Veränderung der Ultrastruktur von Leber und Hoden unter Estrogeneinwirkungen wurden nach einer 21-tägigen Exposition gegenüber 17 α -Ethinylestradiol vorgenommen. Es wurden je 12 Kontrollen und 12 exponierte Tiere untersucht.

Zeitabhängige Expression Estrogen-regulierter Gene

Als eine erste Reaktion auf die Belastung mit 50 ng/L 17 α -Ethinylestradiol wurde ein bemerkenswerter Anstieg des RNA-Gesamtgehalt in der Leber gemessen. Der mittlere Gesamt-RNA Gehalt, der pro Leber eines Zebrafährblings isoliert wurde, stieg beginnend nach einer Expositionszeit von zwei Tagen signifikant an, bis nach 5 – 7 Tagen ein Plateau erreicht wurde, das beim 5fachen Wert des Kontrolllevels lag (Abb. 3.40).

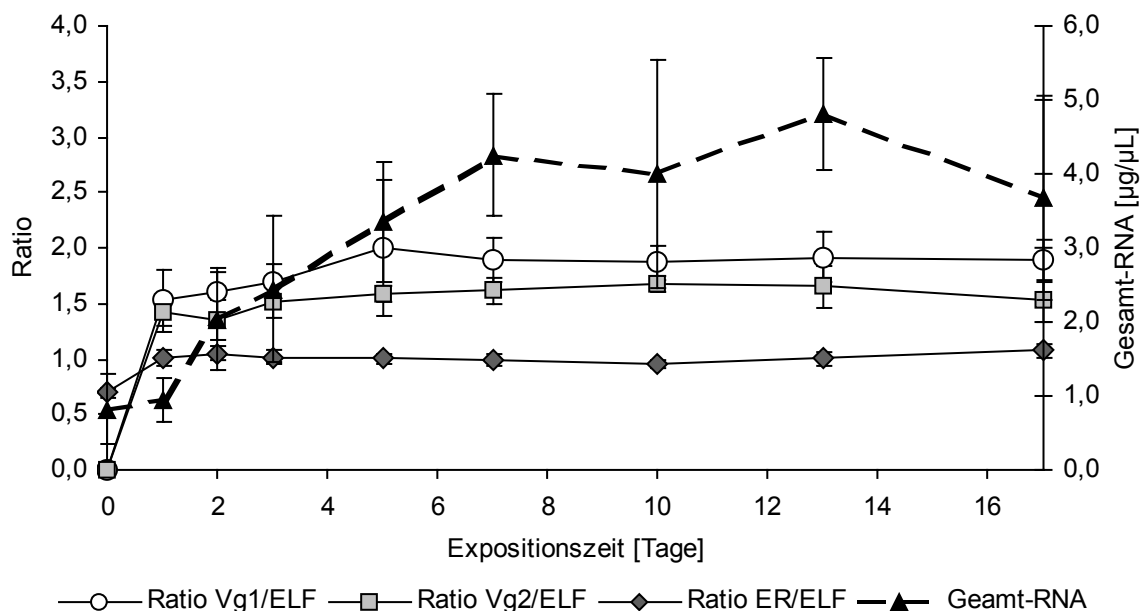


Abb. 3.40: Estrogen-induzierte Reaktion von Zebrafährblings auf Belastung mit den Xenoestrogenen 17 α -Ethinylestradiol, Nonylphenol and Methoxychlor *in vivo*. Veränderung im RNA-Gehalt sind als Mittelwerte der pro Leber erhaltenen Gesamt-RNA Konzentration angegeben. Die Induktion von Vitellogenin 1 (Vg1), Vitellogenin 2 (Vg2), Estrogenrezeptor α (ER) ist als Ratio gegenüber dem House Keeping-Protein Elongationsfaktor 1 α (ELF) dargestellt, das als interner Standard verwendet wurde.

Im Vergleich zur langsamen Annäherung an ein Plateau bei der Betrachtung des Gesamt-RNA-Gehalts wurde die maximale Expression der Estrogen-kontrollierten Gene Vg1, Vg2 und Estrogenrezeptor α bereits nach 24 h erreicht und blieb über die gesamte Dauer des Experiments von 17 Tagen weitgehend konstant. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Vitellogenese beim Zebraabärbling nicht nur über eine Veränderung des Genexpressionsmusters sondern vor allem auch durch eine Erhöhung der gesamten Syntheseleistung der Leber gesteuert wird.

Im Gegensatz zur Situation in der Leber konnte für die Expression des Estrogenrezeptors α im Hoden keine Veränderung infolge der Belastung mit 17α -Ethinylestradiol gemessen werden (Abb. 3.41). Die Expression des normalerweise in Ovarien produzierten Zona pellucida Proteins ZP2 war nur in Spuren im Hoden des Zebraabärblings nachweisbar, die jedoch auch in DMSO- und Wasserkontrollen detektiert werden konnte. Nach einer Expositionszeit von 17 Tagen war jedoch in allen Proben eine Induktion von ZP2 bestimmbar, was eine Verweiblichung des Gewebes andeutet.

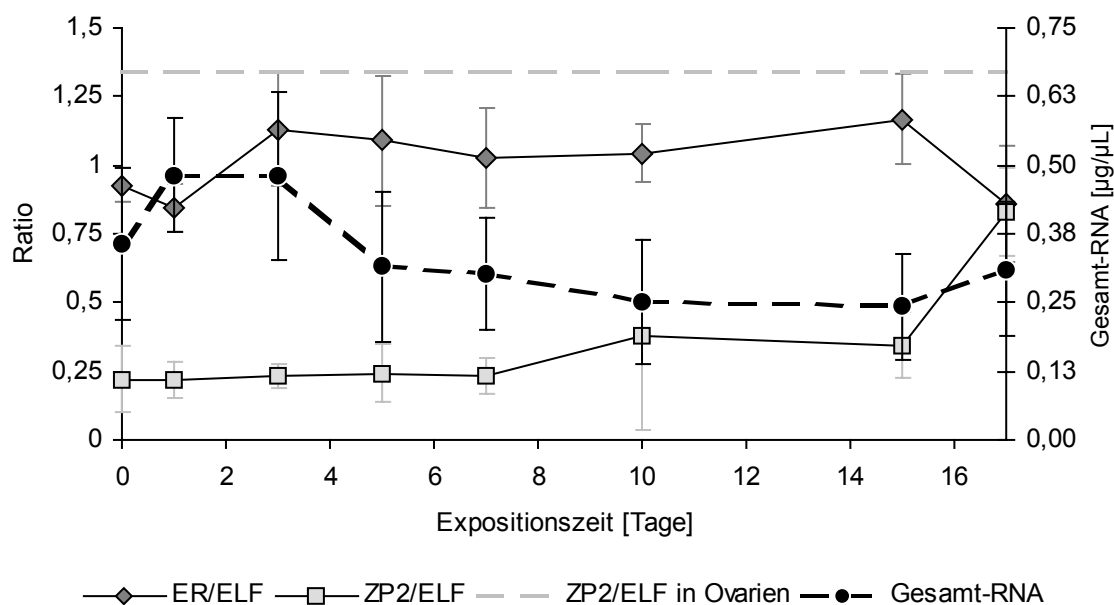


Abb. 3.41: Zeitabhängige Genexpression von ZP2 und Estrogenrezeptor im Hoden adulter männlicher Zebraabärblinge nach Belastung mit 50 ng/L 17α -Ethinylestradiol. Die Ergebnisse sind als Ratio zwischen dem Estrogen-regulierten Gen und dem House Keeping Protein-Elongationsfaktor 1α angegeben, das als interner Standard verwendet wurde. Zusätzlich sind zeitliche Veränderungen im Gesamt-RNA Gehalt, der pro Leber isoliert wurde, dargestellt (rechte y-Achse). Alle Angaben sind Mittelwerte ($n = 8$ für Gesamt-RNA, $n = 6$ für Genexpression). ZP2: Zona Pellucida-Protein 2, ELF: Elongationsfaktor 1α

Dosis-abhängige Expression Estrogen-regulierter Gene

Die Belastung mit 17α -Ethinylestradiol in abgestuften Konzentrationen von $0.085 - 85 \text{ ng/L}$ führte ebenfalls zu einem Anstieg der Gesamt-RNA in der Leber, der als sigmoidale Dosis-Wirkungsbeziehung dargestellt werden kann (Fig. 3.42a). Die Verlängerung der Expositionszeit von 4 auf 21 d führte nicht nur zu einer Erhöhung der RNA-Konzentration bei gleicher Hormondosis, son-

dem auch zur Erniedrigung der Nachweisgrenze für einen signifikanten Anstieg des RNA-Gehalts. Während nach 4 Tagen eine deutliche Erhöhung des Leber-RNA-Gehalts ab einer Konzentration von 8,5 ng/L messbar war, konnte dies nach 21 Tagen bereits ab einer Konzentration von 2,5 ng/L nachgewiesen werden.

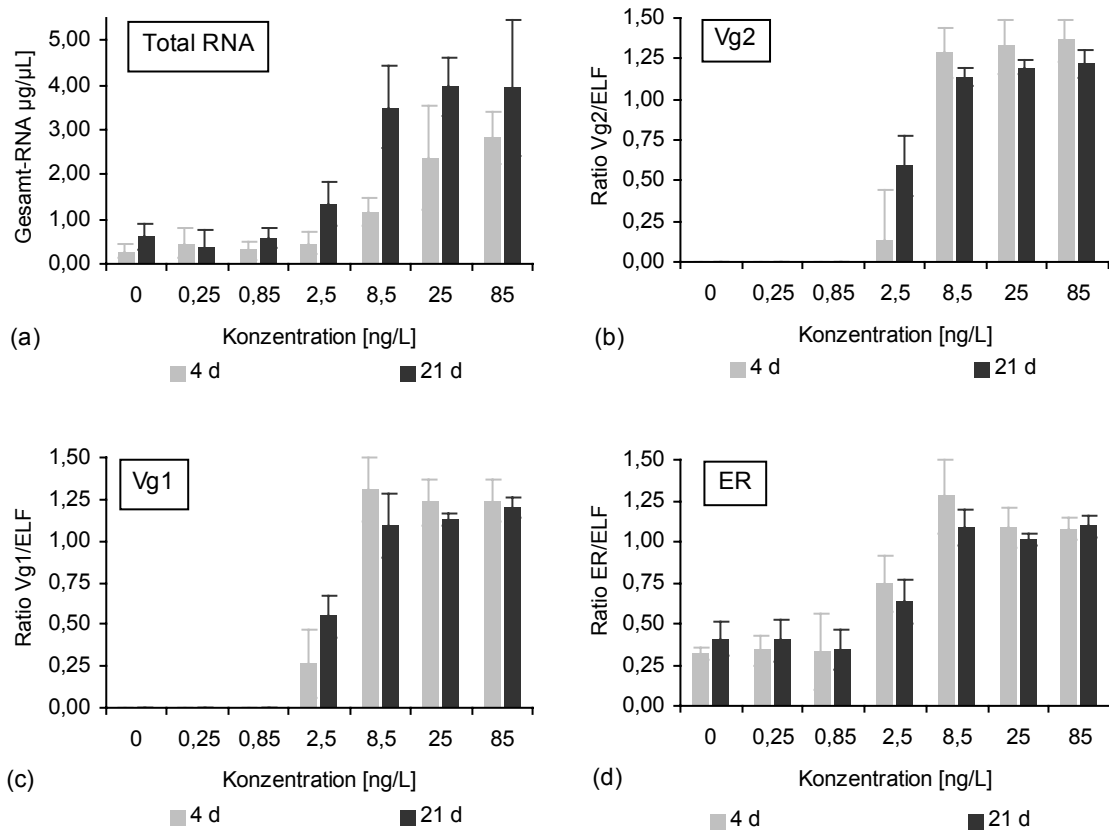


Abb. 3.42: (a): Dosis-abhängige Veränderung des hepatischen Gesamt-RNA-Gehalts nach einer Expositionszeit von 4 und 21 Tagen gegenüber 17α -Ethinylestradiol. Die Angaben sind Mittelwerte ($n = 8$). (b) – (d): Semiquantitative Analyse der Genexpression von Vitellogenin 2 (Vg2) (b), Vitellogenin 1 (Vg1) (c), Estrogenrezeptor α (d) in der Leber adulter, männlicher Zebrafische bei konzentrationsabhängiger Exposition von 17α -Ethinylestradiol nach 4 und 21 Tagen. Die Veränderung der Genexpression ist als Ratio zwischen dem Estrogen-kontrollierten Gen und dem House Keeping-Protein Elongationsfaktor 1α (ELF) angegeben.

Die höchste eingesetzte Konzentration von 85 ng/L 17α -Ethinylestradiol erwies sich bei längerer Exposition bereits als letal für einen Teil der Fische. Im Zeitraum von 14 – 21 Tagen nach Versuchsbeginn starben 40 % der Versuchstiere, was auf eine zunehmende physiologische Belastung der Organismen aufgrund der Hormonwirkung hinweist.

In Bezug auf die Induktion von Z-Vg2, konnte eine vergleichbare Reaktion auf die Hormonbelastung festgestellt werden, wie sie für den Gehalt an Gesamt-RNA beschrieben wurde (Abb. 3.42b). Wiederum lag die Detektionsgrenze nach 4 Tagen bei 8,5 ng/L und erreichte nach 21 Tagen einen LOEC von 2,5 ng/L. Für Z-Vg1 konnte bereits nach 4 Tagen ein LOEC von 2,5 ng/L ermittelt werden, jedoch war die Expression des Gens bei dieser Konzentration nur gering, während ab einer Konzentration von 8,5 ng/L Ethinylestradiol große Mengen an Z-Vg1-cDNA amplifiziert wurden. Durch Verlängerung

der Expositionszeit auf 21 Tage wurde bei Z-Vg1 keine Erniedrigung der Detektionsgrenze, sondern nur eine Erhöhung der Z-Vg1-Expressionsrate bei 2,5 ng/L erreicht (Abb. 3.42c). Diese Befunde verdeutlichen, dass bei Zebrabärblingen eine Korrelation zwischen Vitellogenese und der allgemeinen Syntheseaktivität der Hepatocyten besteht, die gesamte Leber also weitgehend in den Dienst der Reproduktion tritt.

In der Leber konnte eine positive Autoregulation der Expression des Estrogenrezeptors α beobachtet werden (Abb. 3.42d): Die Exposition gegenüber 17α -Ethinylestradiol bewirkte eine Induktion der ER α -mRNA-Transkription ab einer Konzentration von 2,5 ng/L, die bereits nach 4 Tagen erreicht wurde. Die Verlängerung der Expositionszeit auf 21 Tage ergab keine Erhöhung in der Sensitivität gegenüber Ethinylestradiol, die Induktionskurven verlaufen bei beiden Versuchszeiten weitgehend deckungsgleich, so dass das Zeitprofil der ER α -Induktion im Vergleich zu den Vitellogeninen verkürzt erscheint. Im Gegensatz zur Leber konnte im Hoden keine Estrogen-abhängige Expression des Estrogenrezeptors α nachgewiesen werden. Insofern scheint eine gewebespezifisch unterschiedliche Kontrolle der Genexpression dieses Rezeptors zu bestehen (Abb. 3.43).

Nach 21 Tagen konnte eine Induktion der Expression von ZP 2 für keine Konzentration von 17α -Ethinylestradiol nachgewiesen werden. In diesem Sinne scheint eine Verweiblichung der ausdifferenzierten Gonade nicht erfolgt zu sein.

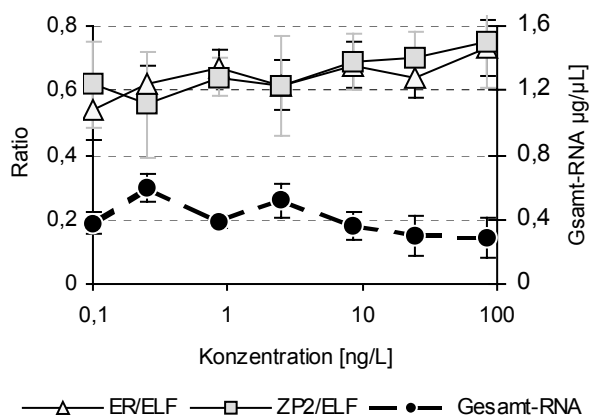


Abb. 3.43: Expression von Estrogenrezeptor α (ER) und Zona pellucida protein 2 (ZP2) im Hoden männlicher Zebrabärblinge nach Exposition gegenüber unterschiedlichen Konzentrationen von 17α -Ethinylestradiol. Die differentielle Expression ist als Ratio zwischen dem Estrogenkontrollierten Gen und dem House Keeping-Protein Elongationsfaktor 1α (ELF) angegeben, das als Referenz verwendet wurde. Die durchschnittliche Gesamt-RNA-Konzentration, die pro Hoden isoliert wurde (Gesamt-RNA, n = 8), ist in Bezug zur rechten y-Achse angegeben.

Neben 17α -Ethinylestradiol wurde eine 4tägige Belastung mit dem schwachen Xenoestrogen Nonylphenol und dem Proestrogen Methoxychlor vorgenommen, die beispielhaft als Vertreter für schwach estrogene Substanzen ausgewählt wurden. Wie bei der Exposition gegenüber 17α -Ethinylestradiol wurde auch bei Nonylphenol eine Erhöhung des Gesamt-RNA-Gehalts pro Leber festgestellt. Jedoch unterscheidet sich die Form der Dosis-Wirkungskurven für beide Verbindungen, da die Steigung der Kurve bei 17α -Ethinylestradiol wesentlich steiler als bei Nonylphenol ausfällt. Innerhalb subletaler Konzentrationen konnte dagegen bei der Belastung mit Methoxychlor keine Steigerung des Gehalts an Gesamt-RNA pro extrahierter Leber nachgewiesen werden (Abb. 3.44; vielmehr starben 80 % der Individuen in der höchsten eingesetzten Konzentration von 250 $\mu\text{g}/\text{L}$ Methoxychlor während des Experiments).

Betrachtet man die dosisabhängige Expression der unter Estradioleinfluss in der Leber exprimierten Gene Z-Vg1 und Z-Vg2, so zeigte Nonylphenol, wie erwartet, eine erheblich geringere Potenz als das synthetische Estrogen 17α -Ethinylestradiol. Für die beiden Vitellogenin-ähnliche Gene Z-Vg1 und Z-Vg2 wurde ein LOEC von 25 $\mu\text{g}/\text{L}$ Nonylphenol bestimmt ($\text{LOEC}_{\text{Z-Vg1}}$: 2.5 ng/L,

LOEC_{Z-Vg2}: 8.5 ng/L). Anhand der Kurvensteigung kann demnach für die Vitellogenininduktion eine im Vergleich zu 17 α -Ethinylestradiol 5.000 – 8.000fach schwächere estrogene Potenz angegeben werden (Abb. 3.51).

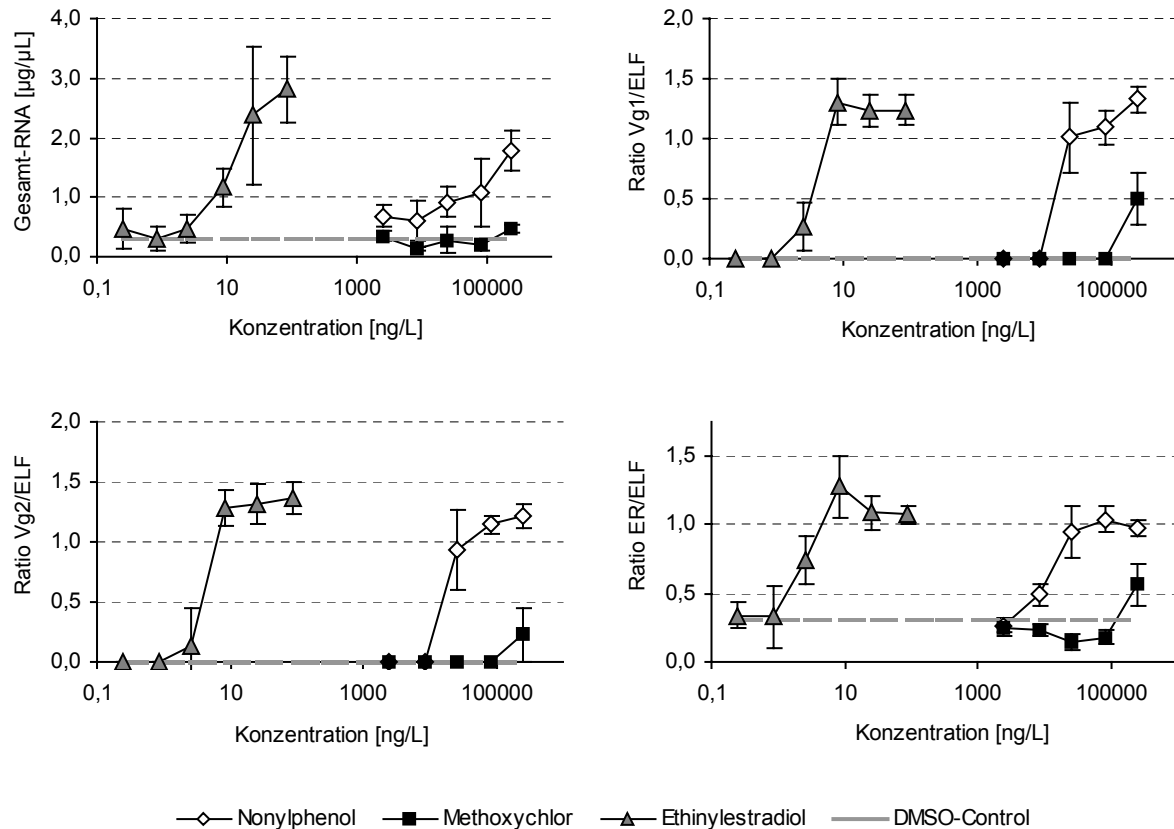


Abb. 3.44: Estrogen-induzierte Reaktionen des Zebrafärblings auf die Belastung mit unterschiedlichen Konzentrationen der Xenooestrogene 17 α -Ethinylestradiol, Nonylphenol und Methoxychlor *in vivo*. Veränderungen im RNA-Stoffwechsel sind als Mittelwerte der Gesamt-RNA, die pro Leber isoliert wurde angegeben. Die Induktion von Vitellogenin 1 (Vg1), Vitellogenin 2 (Vg2) und Estrogenrezeptor α (ER) ist als Ratio zum House Keeping-Protein Elongationsfaktor 1 α (ELF) dargestellt.

Für Methoxychlor war in den eingesetzten subletalen Konzentrationen keine estrogene Aktivität ermittelbar. Nur bei den beiden überlebenden Fischen der höchsten Konzentration von 250 $\mu\text{g/L}$ war eine Induktion der Vitellogenese nachzuweisen. Für den Estrogenrezeptor α wurde eine signifikante Induktion der Expressionsrate ab einer Konzentration von 25 $\mu\text{g/L}$ Nonylphenol beobachtet ($p \leq 0,002$; Ethinylestradiol LOEC_{ER}: 2,5 ng/L). Auch in Bezug auf die Induktion des Estrogenrezeptors kann für Nonylphenol anhand der Kurven eine 6.000 – 8.000fach schwächere estrogene Potenz als für 17 α -Ethinylestradiol angegeben werden. Die Exposition gegenüber Methoxychlor führte wiederum nur in der höchsten, letalen Konzentration (250 $\mu\text{g/L}$) zu einer signifikanten Steigerung der Estrogenrezeptorexpression in der Leber. Nach diesen Ergebnissen scheint Methoxychlor im Zebrafärbling nur in geringerem Maße in den hormonell aktiven Metaboliten HPTE umgesetzt zu werden, bevor toxische Konzentrationen des Ausgangsverbindungs erreicht werden.

Ultrastrukturelle Untersuchungen

Um die in Bezug auf die Expression estrogen-regulierter Gene unterschiedliche Reaktion von Hoden- und Lebergewebe auf ultrastruktureller Ebene zu überprüfen, wurden männliche Zebraabärblinge für die Dauer von 21 Tagen mit 25 ng/L 17α -Ethinylestradiol exponiert und mit Kontrolltieren verglichen.

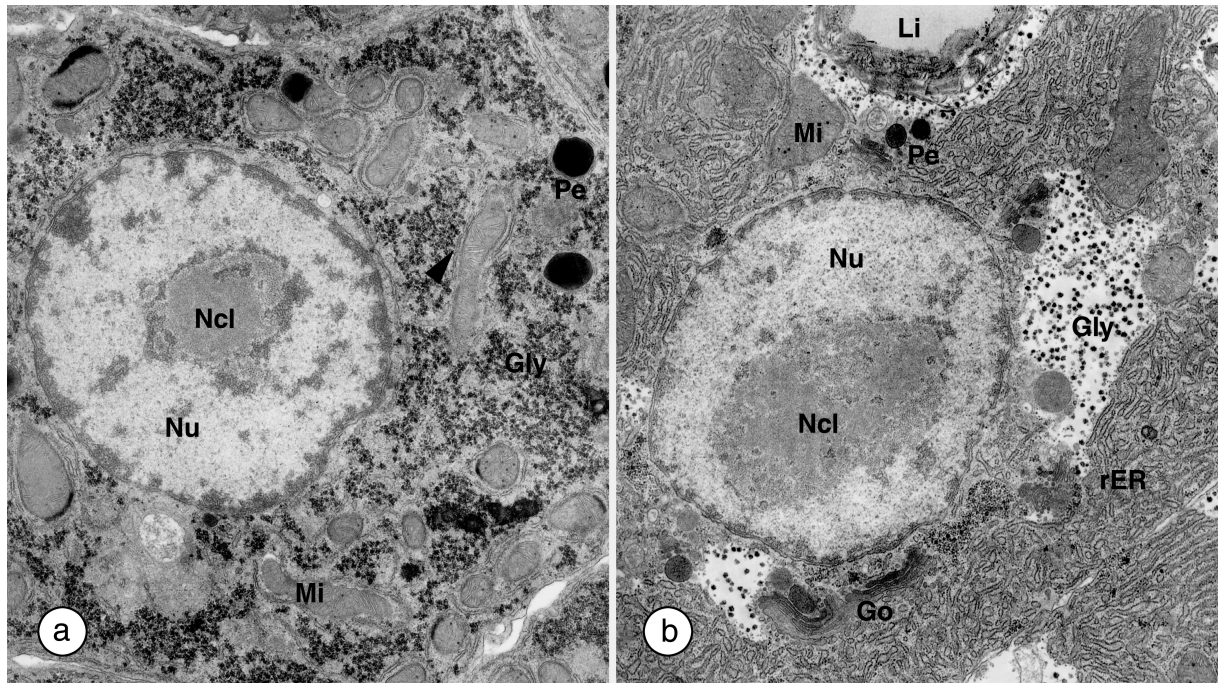
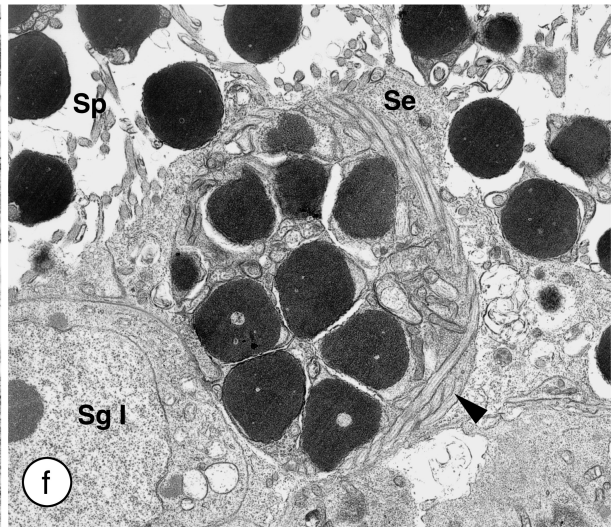
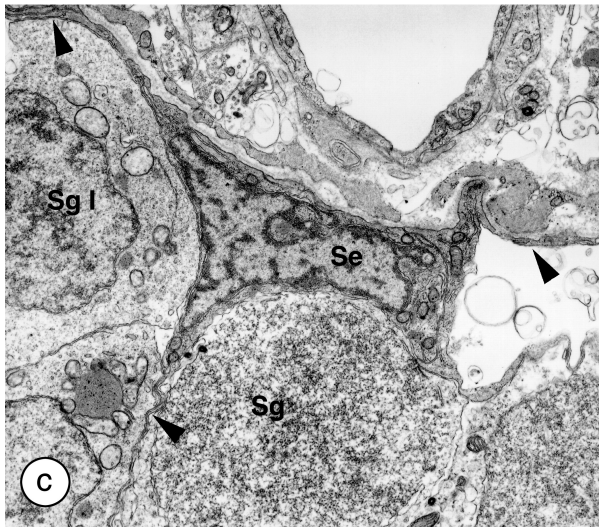
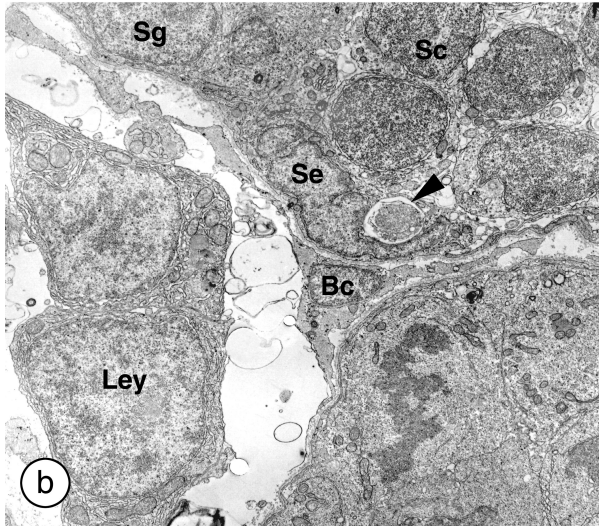
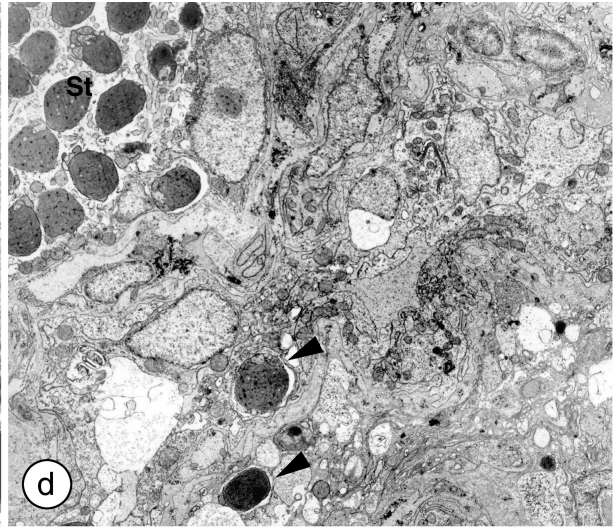
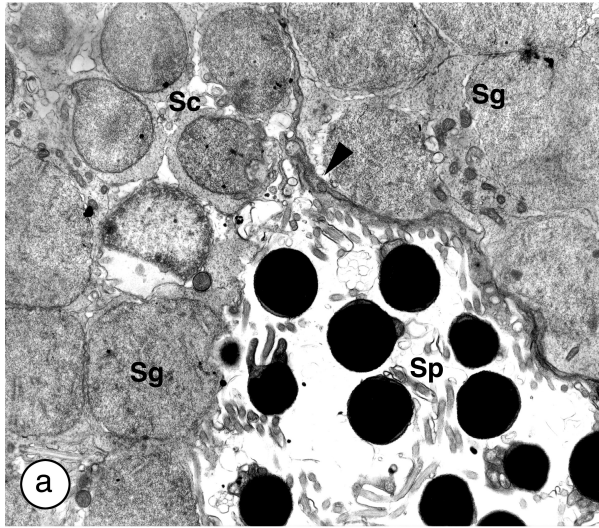


Abb. 3.45: (a) Hepatocyten un behandelter männlicher Zebraabärblinge weisen einen moderat entwickelten Nukleolus (Ncl) innerhalb des kugelförmigen Nukleus (Nu) auf. Die wenigen Zisternen rauhen endoplasmatischen Retikulums (Pfeil) sind mit Mitochondrien assoziiert (Mi). Die Hepatocyten beherbergen große Glycogenmengen (Gly) (8,000 \times). (b) Nach 21 Tagen Exposition gegenüber 25 ng/L 17α -Ethinylestradiol zeigen die Hepatocyten der Männchen Anzeichen vermehrter Protein-Synthese. Der Nukleolus der Zellen ist signifikant vergrößert, das raue endoplasmatische Retikulum (rER) und der Golgi-Apparat (Go) stark entwickelt. Die entleerten Glykogenfelder weisen auf einen hohen Energieverbrauch der Zellen hin (8,000 \times).

Abb. 3.46: (a) Charakteristische tubuläre Struktur eines unbegrenzt spermatogonialen Hodens in den Kontrollen des Zebraabärblings. Die unterschiedlich entwickelten Keimzellen sind in Zysten angeordnet, die von cytoplasmatischen Fortsätze der Sertoli-Zellen begrenzt werden (Pfeil). (2,500 \times). (b) Während der Spermatogenese stoßen die sich entwickelten Spermien Cytoplasma als Residualkörper ab. Der Pfeil weist auf eine Sertolizelle (Se) in den Kontrollen, die einen Residualkörper phagozytiert. Leydig-Zellen (Ley), charakterisiert durch gut entwickeltes endoplasmatisches Retikulum und tubuläre Mitochondrien, sind im Interstitium lokalisiert. (4,000 \times). (c) Eine Sertoli-Zelle mit cytoplasmatischen Fortsätzen (Pfeile), die sich zwischen verschiedenen Spermatogonien-Zysten erstrecken bzw. eine Grenze zum Interstitium bilden (6,300 \times). (d) Verlust der Zystenstruktur des Hodens nach 21-tägiger Exposition gegenüber 17α -Ethinylestradiol. Neben zahlreichen lysosomalen Elementen sind auch ganze Spermien in Phagolysosomen eingeschlossen (Pfeile). (2,500 \times). (e) Große Verdauungsvakuolen im Hoden der Estrogen-exponierten Tiere (Pfeile, vergleiche Abb. (b) bei gleicher Vergrößerung). Im Vergleich zu den Kontrollen besitzen die Fische eine hohe Zahl von Sertoli-Zellen (Se) (4,000 \times). (f) Spermien-Cluster, das von einem cytoplasmatischen Fortsatz einer Sertoli-Zelle phagozytiert wurde (6,000 \times). Abkürzungen: Sg I, Sg: primäre bzw. weiterentwickelte Spermatogonien, Sc: Spermatozyten, St: Spermadien, Sp: Spermien, Bc: Basalzellen.



Die elektronenmikroskopische Auswertung der Leber der männlichen Kontrolltiere zeigt ein einheitliches Leberparenchym, in dem die polygonalen Hepatocyten in einem engen Zellverband aneinanderalagen. Der kugelförmige Kern der Hepatocyten lag leicht dezentral und wies einen mittelgroßen Nukleolus auf, der in der Mitte des Nukleus lokalisiert war. Die Hepatocyten der Kontrollen zeigten Bereiche mit glattem endoplasmatisches Retikulum auf, besaßen jedoch nur eine geringe Zahl an Zisternen von rauem endoplasmatisches Retikulum, die meist eng mit den zahlreichen Mitochondrien assoziiert waren (Abb. 3.45a). Die Form der Mitochondrien war rundlich bis langgestreckt, wobei mitunter auch keulenförmige Exemplare auftraten. Der Golgi-Komplex war nur schwach ausgeprägt und mit nur schwach elektronendichtem Material angefüllt, Peroxisomen waren in moderater Menge im Cytoplasma verteilt. Fast der gesamte Bereich des Cytoplasmas war mit Glykogen gefüllt, so dass eine intrazelluläre Gliederung in Speicherareale und synthetisch aktive Bereiche nicht zu erkennen war; Lipid war in den Zellen nur wenig zu finden.

Nach einer 21-tägigen Exposition mit 25 ng/L 17α -Ethinylestradiol war das Erscheinungsbild der Hepatocyten signifikant verändert, wobei besonders Anzeichen einer vermehrten Proteinsynthese augenscheinlich waren (Abb. 3.45b): Der Zellkern wies einen enorm vergrößerten Nukleolus auf, das in den Kernen auftretende Heterochromatin war im Vergleich zu den Kontrollen weitgehend dekondensiert. Große Bereiche des Cytoplasmas waren mit Stapeln von rauem endoplasmatisches Retikulum ausgefüllt, die den Hauptanteil der Zellorganellen ausmachten. Bei einem Teil der untersuchten Fische war eine leichte Dilatation des rauem endoplasmatisches Retikulums feststellbar, glattes endoplasmatisches Retikulum konnte nicht mehr beobachtet werden. Besonders auffällig waren die enorm vergrößerten Golgi-Felder, die eine charakteristische graduell verlaufende Zonierung zwischen geringer und hoher Elektronendichte aufwiesen. Im Vergleich zu den Kontrollen war ein auffälliger Rückgang des Glykogens festzustellen, das nun in begrenzten, weitgehend entleerten Arealen zu finden war. Im Gehalt an Mitochondrien und Peroxisomen wurden keine Unterschiede beobachtet.

Der Hoden des Zebraärlings wies die typische Morphologie eines unbegrenzt spermatogonialen Hodens auf, wie er von Grier et al. (1980) beschrieben wurde und der vom begrenzt spermatogonialen Hoden der Atheriniformes unterschieden werden kann. Innerhalb eines Hodentubulus sind Spermatogonien über die gesamte Länge verteilt und bilden kleine periphere Zysten, die sich im Verlauf der Spermatogenese in Richtung des Tubuluslumens ausdehnen und vergrößern. Innerhalb der Zysten ist die Reifung der Keimzellen stets synchron, bis die reifen Spermien in das Tubuluslumen entlassen werden. Die einzelnen Zysten enthielten Spermatogonien und Spermatozyten unterschiedlicher Entwicklungsstufen (Abb. 3.46a). Mit fortschreitender Entwicklung der Spermatogonien wurde das Chromatin der Kerne zunehmend dichter und heterogener. Innerhalb des Cytoplasmas, in dem häufig freie Ribosomen vorkamen, waren die meist kugelförmigen Mitochondrien an einem Zellpol konzentriert. Spermatozyten wiesen im Gegensatz zu Spermatogonien häufig ovale bis langgestreckte Mitochondrien auf, die mit elektronendichtem Material gefüllt waren. Während der Differenzierung der Spermatozyten zu Spermien kam es zur graduellen Verkleinerung des Nukleus, wobei das Chromatin immer homogener und dichter wurde; parallel wurde hierbei ein großer Teil des Cytoplasmas abgestoßen. Die einzelnen Zysten der reifenden Keimzellen wurden von Sertoli Zellen umschlossen, die hierzu lange cytoplasmatische Ausläufer bildeten. Dabei konnte eine einzelne Sertoli-Zelle durchaus die Wand zweier benachbarter Zysten formen (Abb. 3.46c). Die Kerne der Sertoli-Zellen wiesen eine gelappte, irreguläre Form auf, das Cytoplasma war von höherer Elektronendichte als bei den Keimzellen. Innerhalb des Cytoplasmas wurden kleine, ovale Mitochondrien, moderat ausgebildetes en-

doplasmatisches Retikulum und Lysosomen beobachtet, die zum Teil zu Residualkörpern entwickelt waren (Abb. 3.46b). Benachbarte Sertoli-Zellen waren durch gut entwickelte Zelljunctionen aneinandergelagert. Innerhalb des Interstitiums waren vereinzelt Leydig-Zellen zu finden, die durch stark entwickeltes endoplasmatisches Retikulum und für steroidbildende Zellen typische tubulo-vesikuläre Mitochondrien gekennzeichnet waren (Abb. 3.46b).

Nach 21-tägiger Exposition gegenüber 25 ng/L 17 α -Ethinylestradiol war die klar definierte zystenartige Organisation des Hodens in einem Teil der Fische völlig aufgehoben (Abb. 3.46d). In allen Individuen zeigten sich Merkmale einer zunehmenden Degeneration des Gewebes, die sich besonders in der Zunahme der Zahl der Sertoli-Zellen äußerte, die eine große Menge signifikant vergrößerter Residualkörper enthielt (Abb. 3.46e). Häufiger wurden im Cytoplasma der Sertoli-Zellen Phagolysosomen beobachtet, die einzelne Spermien oder gar ganze Spermiencluster enthielten, was auf eine vermehrte Resorption von Spermien schließen lässt (Abb. 3.46f). Des Weiteren waren innerhalb des Tubuluslumens häufig Cluster von degenerierten Spermatozoen zu finden. Neben diesen degenerativen Phänomenen konnten jedoch keine Anzeichen einer Verweiblichung des Hodengewebes, z.B. in Form der Ausbildung einer Zwittergonade, auf der Ultrastrukturebene gefunden werden.

3.3.4 Expression und Induzierbarkeit von Vitellogenin, ER α , ER β und ZP2 während der Larval- und Juvenilentwicklung des Zebrafisches

Die Belastung mit Estrogenen während der Larval- und Juvenilentwicklung von Fischen kann zu Verschiebungen im Geschlechterverhältnis und zu Anomalien der Reproduktionsorgane führen. Durch die Messung der Expression der Gene von ER α und ER β sollten potentiell Estrogen-regulierte Differenzierungsphasen identifiziert werden; die Bestimmung des Zeitpunktes der natürlichen Genexpression von Vitellogenin und ZP2 sollte Aufschluss über den Zeitpunkt der Entwicklung einer reproduktionsfähigen weiblichen Gonade beim Zebrafisch geben. Für die semiquantitative RT-PCR wurde die Gesamt-RNA aus je 50 Tieren in einem Alter von 1 - 29 Tagen verwendet, um ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen genetischen Weibchen und Männchen zu erhalten. Zusätzlich wurden Zebrafische ab der Befruchtung 4 und 6 Tage mit einer Dosis von 100 ng/L 17 α -Ethinylestradiol belastet. Wiederum wurden in je 50 Individuen die Expression der genannten Gene bestimmt. Als interner Standard wurde wie bei den Versuchen mit adulten Tieren das House Keeping-Protein Elongationsfaktor 1 α verwendet.

Bei der PCR für den ER α wurden aus den Gesamtkörperhomogenaten der Embryonen zwei Banden ähnlicher Größe amplifiziert (Abb. 3.47). Die untere der beiden Banden konnte durch Größenvergleich mit dem PCR-Produkt aus der Leber von adulten Zebrafischen als cDNA des ER α identifiziert werden, jedoch war es nicht möglich, die Amplifikation der unbekannteren cDNA durch Modifikation von MgCl₂-Konzentration und Annealing-Temperatur der Primer vollständig zu unterbinden. Die Expression des ER α konnte in den Zebrafischen zunächst während der Embryonalentwicklung im Zeitraum von 1 und 2 Tagen nach der Befruchtung nachgewiesen werden. Das Fehlen der mRNA in den 6 h alten Embryonen bedarf hierbei weiterer Überprüfung, um diese frühe Expressionsphase eindeutig maternell oder embryonal synthetisierter mRNA zuzuordnen. Während im Alter von 4 und 6 Tagen keine mRNA des ER α detektierbar war, wurde eine kontinuierliche Expression während der gesamten

Juvenilphase von 9 – 29 Tagen festgestellt, wobei zwei Maxima nach 12 und 29 Tagen auftraten. Nach Exposition der Larven mit 17α -Ethinylestradiol war eine eindeutige Induktion der Expression nachweisbar; während in den unbelasteten Tieren nach 4 und 6 Tagen keine $ER\alpha$ -mRNA detektierbar war, wurde eine eindeutige Expression unter Estrogeneinwirkung beobachtet. Die mRNA des $ER\beta$ konnte beginnend mit einem Alter von 9 d übereinstimmend mit der zweiten Expressionsphase des $ER\alpha$ detektiert werden, wobei die Expression kontinuierlich über die gesamte weitere Entwicklung erfolgte. Nach 29 Tagen ist eine etwas verstärkte Expression des Gens im Vergleich zur Vorperiode erkennbar, was wiederum mit den Ergebnissen für den $ER\alpha$ korreliert. Bei Estrogenapplikation wurde der $ER\beta$ bereits in 4 und 6 d alten Larven deutlich exprimiert, was eindeutig eine estrogene Sensitivität des Zebraäbrblings während der Larvalentwicklung demonstriert.

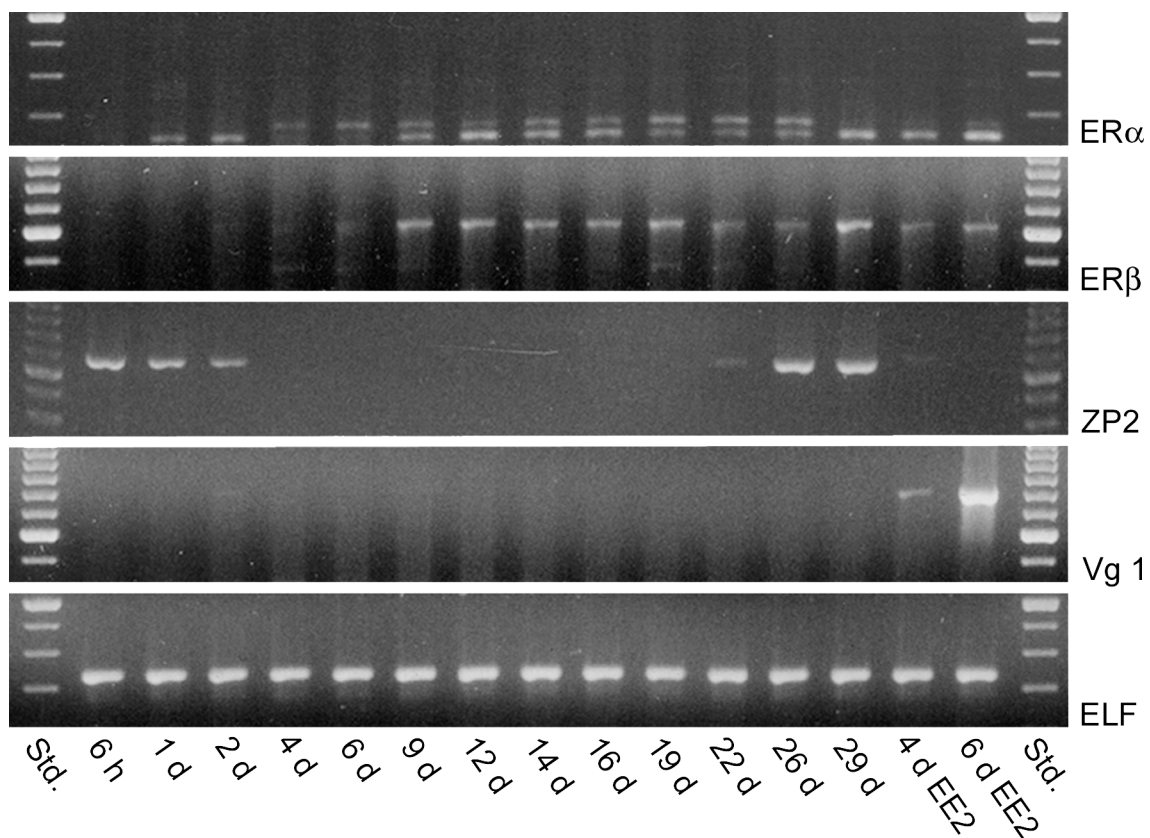


Abb. 3.47: Expression von Estrogenrezeptor α ($ER\alpha$), Estrogenrezeptor β ($ER\beta$), Zona Pellucida Protein 2 (ZP2), Vitellogenin 1 (Vg1) und Elongationsfaktor 1α (ELF) im Verlauf der Entwicklung des Zebraäbrblings vom Embryo zum Adultstadium, sowie nach 4 und 6-tägiger Exposition gegenüber 100 ng/L 17α -Ethinylestradiol ab der Befruchtung. Bei der Amplifikation des $ER\alpha$ wurde eine weitere etwas größere cDNA coamplifiziert, die jedoch durch Vergleich mit dem Amplikon aus der Leber von adulten Tieren unterschieden werden konnte. Als Größenreferenz für die Amplikons ist auf jedem Gelausschnitt die 600 bp Bande der verwendeten 100bp DNA-Ladder (Gibco) dargestellt, die besonders hervorgehoben ist.

Die mRNA von ZP2 war während zweier Entwicklungsperioden in den unbelasteten Tieren nachweisbar. Zunächst ist eine abnehmende Intensität der ZP2-cDNA-Bande während der Embryonalentwicklung erkennbar, was auf die relativ lange Existenz von Resten materneller ZP2-mRNA innerhalb des Embryos schließen lässt, die im Zeitverlauf zunehmend degradiert wird. Die Identität der ZP2-mRNA in den Embryonen wurde mit Northern Blots abgesichert (Ergebnisse nicht dargestellt). Beginnend mit

einem Alter von 22 Tagen war eine ansteigende Expression von ZP2 festzustellen, in diesem Zeitraum ist demnach eine Ausdifferenzierung der Gonadenanlage zu einem funktionellen Ovar in den weiblichen Individuen zu vermuten. In den Estrogen-exponierten Tieren im Alter von 4 und 6 Tagen konnte dagegen keine ZP2-Expression nachgewiesen werden. Im Gegensatz zur ZP2 war keine Expression von Vitellogenin I während der gesamten 29tägigen Entwicklungsperiode zu beobachten, die Tiere erreichten während dieser Zeit demnach nicht die Geschlechtsreife, da die Vitellogenese für die Produktion reifer Oocyten obligat ist. Aus dem Vergleich von Vitellogenin- und ZP2-Expression resultiert demnach die Existenz einer Differenzierungsphase, in der das Gonadengewebe bereits ovarien-spezifische transkriptionelle Aktivität zeigt, während in der Leber noch keine reproduktionsassoziierten Prozesse stattfinden. Bemerkenswerterweise konnte in den Ethinylestradiol-exponierten Larven die Expression von Vitellogenin auf dem mRNA-Level nachgewiesen werden, so dass während der Larvalentwicklung keine transkriptionelle Repressionsmechanismen für die Vitellogenese zu bestehen scheinen.

4. Diskussion

4.1 Entwicklung von Nachweismethoden für Estrogen-regulierte Gene

Als (semi-)quantitative Nachweismethoden für die Expression hormoninduzierter Genprodukte stellt die vorliegende Arbeit auf mRNA-Ebene Northern-Dot Blot-RNase Protection-Assay (RPA)- und RT-PCR-Verfahren zur Verfügung. Sowohl RT-PCR als auch eine Kombination aus Northern Dot Blot und RPA wurden als Methoden zur Detektion von Vitellogenin aus der Regenbogenforelle aufgrund ihrer unterschiedlichen Eigenschaften hinsichtlich Sensitivität und Quantifizierbarkeit etabliert. Im Vergleich zum klassischen Northern-Blot bietet die Direktapplikation der Proben auf die Blotting-Membran in einem Dot-Blot bei einer hohen Stringens der Hybridisierungsreaktion den Vorteil einer direkten Vergleichbarkeit von einer großen Zahl von Einzelproben; durch die Vermeidung des meist unvollständigen RNA-Transfers ergibt sich zudem eine Erhöhung der Sensitivität bei einer gleichzeitigen Reduktion der Arbeitsschritte (Farrell 1998). Da die verwendete Vitellogenin-cRNA-Sonde Vg1.1 hochspezifisch die Vitellogenin-mRNA-Bande im Northern-Blot markierte, war es möglich auf die größenspezifische Auftrennung des RNA-Gemischs zu verzichten und somit ein Dot-Blot-Verfahren durchzuführen. Aufgrund der hohen Stabilität von RNA-RNA-Hybriden wurden für die Vitellogenin-mRNA-Detektion DIG-markierte cRNA-Sonden verwendet, um eine hohe Stabilität der Hybride zu erreichen und durch die dadurch einsetzbaren hohen Hybridisierungstemperaturen Background-Reaktionen zu minimieren. Um die Spezifität der Hybridisierung zu maximieren, wurde im Anschluss an die Hybridisierungsreaktion ein einzelstrangspezifischer RNA-Verdau mit RNase A durchgeführt; hierdurch wird nicht hybridisierte einzelsträngige RNA wirkungsvoll entfernt, was eine verbesserte Quantifizierung der spezifischen mRNA-cRNA-Hybride gewährleistet (Zhan et al. 1997). Mit dieser Technik war es möglich, die Nachweisgrenze für den Vg1.1-sense-Standard bei Verwendung Chemolumineszenz-optimierten Filmmaterials bis auf eine maximale Sensitivität von 120 fg zu senken, was einer Menge von 600 fg Vitellogenin-mRNA entspricht. Generell ist es hierbei möglich, mit DIG-markierten Nukleinsäure-Sonden Sensitivitäten zu erreichen, die mit auf Isotopen-Markierung basierenden Detektionstechniken vergleichbar sind (Kimpton et al. 1989, Azzi et al. 1990), wobei durch die Verwendung von Chemolumineszenzsubstraten weitere Sensitivitätssteigerungen erzielt wurden (Más et al. 1993, Trayhurn et al. 1995, Zajc et al. 2000).

Die Möglichkeit der simultanen Prüfung einer großen Zahl von Proben macht es im Dot-Blot möglich, synthetische sense-cRNAs in Konzentrationsreihen als Mengenstandard aufzutragen und anhand der errechneten Regressionskurven eine exakte Quantifizierung unbekannter mRNA-Mengen vorzunehmen. Diese Methode wurde bereits für die Quantifizierung differentiell exprimierter Gene bei Hybridisierung mit radioaktiv markierten cRNA-Sonden verwendet (Yoshikawa und Aizawa 1988, Flouriot et al. 1995). Durch die Einführung eines RNase-Verdau, wie im hier dargestellten Testsystem, ist jedoch gewährleistet, dass unspezifische Bindung durch die hohe Anzahl an in den Proben vorkommender Non-Target-mRNA unterbunden wird. Weiterhin ermöglicht die Verwendung von Chemolumineszenzsubstraten, die im Vergleich zur radioaktiven Detektion nur kurze Expositionszeiten erfordern, ein wiederholtes Auflegen von Röntgenfilmen, wodurch verschiedene Belichtungszeiten verwendet werden können. Hierdurch ist es möglich, eine graduierte Grauwertabstufung über einen großen Konzentrationsbereich zu erreichen.

RT-PCR-Verfahren wurden in den letzten Jahren häufig für Expressionsmessungen von verschiedenen Genen verwendet. Im Vergleich zu Northern Blot-Experimenten liegen die Vorteile des RT-PCR-Verfahrens in der geringen benötigten Ausgangsmenge und der erhöhten Sensitivität (Wang et al. 1996), Nachteile bestehen jedoch in Bezug auf die Quantifizierbarkeit der Resultate, da bei der reversen Transkription in Einzelproben häufig unterschiedliche Effektivitäten erzielt werden (Nash et al. 1998), und die Amplifikation nur in einem engen Konzentrationsbereich linear verläuft (Ko et al. 1995). Zur exakten Quantifizierung der Expressionsraten von Genen in RT-PCR-Verfahren ist daher die Anwendung sogenannter kompetitiver PCR-, Real Time PCR- oder auf Standardkurven basierenden Amplifikationstechniken notwendig (Mansfield et al. 1998, Haberhausen et al. 1998, Jung et al. 2000). Aufgrund der hohen Arbeitsintensität und Kosten, die diese Methoden erfordern, ist beim derzeitigen Stand der Technik eine Aufarbeitung großer Probenmengen noch wenig praktikabel. Somit bleibt als Alternativmethode nur eine semiquantitative Erfassung differentiell exprimierter Gene, durch Coamplifikation einer cDNA eines konstitutiv exprimierten House Keeping Proteins, wodurch Amplifikationsunterschiede zwischen beiden Genprodukten rechnerisch korrigiert werden können (Kloas et al. 1999, Scholz und Gutzeit 2000).

Im Falle der Estrogen-regulierten Gene von an der Reproduktion beteiligten Proteinen liegen in männlichen Individuen nur minimale Expressionsraten oder eine vollkommene Unterdrückung der Transkription vor, so dass sehr große Mengenunterschiede von mRNA zwischen beiden Geschlechtern vorliegen. Da die oberste Prämisse für ein Screeningsystem nach der Auswirkung von Spuren estrogener Schadstoffe in einer Maximierung der Sensitivität liegt, ist es mittels RT-PCR nicht möglich, eine stets gleich gute Quantifizierbarkeit der Amplifikate zu gewährleisten. Bei einer hohen Expressionsrate der Estrogen-induzierbaren Gene ist eine Quantifizierung der Expressionsrate bei hohen Hormonkonzentrationen nicht mehr so sicher zu stellen, ohne einen Sensitivitätsverlust in Kauf zu nehmen, da die gleichen Genprodukte bei starker Expression bereits nach wenigen Amplifikationszyklen, bedingt durch den Verbrauch von Reaktionskomponenten, nicht mehr exponentiell angereichert werden, während der Nachweis bei schwacher Expressionsrate erst durch eine hohe Zyklenzahl zu gewährleisten ist. Daher wurde bei der Etablierung eines RT-PCR-Verfahrens für die Vitellogenin-mRNA der Regenbogenforelle primär auf das Erreichen einer niedrigen Nachweisgrenze geachtet, um den als quantitative Methode verwendbaren Dot Blot RPA zu ergänzen.

Durch die Erhöhung von $MgCl_2$ -, dNTP- oder Enzymkonzentrationen kann zwar die Amplifikationsrate erhöht werden, jedoch sind hierbei Verluste in der Spezifität der Reaktion zu befürchten (Newton und Graham 1994). Um eine hohe Sensitivität der Vg0.8-cDNA Amplifikation bei hoher Spezifität zu erreichen, wurden die als PCR-Enhancer bekannten Substanzen Glycerol und Formamid getestet (Sarkar et al. 1990, Varadaraj und Skinner 1994, Nagai et al. 1998, Kovarova und Traber 2000). Die Verwendung von 5 % Formamid führte zu einer Erhöhung der Sensitivität der Amplifikation, wenn zusätzlich die Konzentration der eingesetzten MuLV Reversen Transkriptase verdoppelt wurde. Höhere Formamidkonzentrationen wurden nicht getestet, da diese zu einer Inhibierung der Amplifikation führen sollen (Comey et al. 1991, Varadaraj und Skinner 1994). Die PCR-beschleunigende Wirkung von Formamid, die vor allem bei GC-reichen DNA-Segmenten zu beobachten ist, beruht auf der Eigenschaft dieser Verbindung die Hybridisierungstemperatur zur Bildung von DNA-Doppelsträngen in wässriger Lösung herabzusetzen (Schmeckpeper und Smith 1973) und somit die Anlagerung der Primer an die Zielsequenz zu erleichtern. Jedoch herrscht bisher Unklarheit, in welcher Weise hierbei die Spezifität der Reaktion erhöht wird. Durch zusätzliche Supplementierung des PCR-Master-Mix mit

10 % Glycerol konnte für die Amplifikation von Vg1.1 eine weitere Erhöhung der PCR-Ausbeute erzielt werden, wobei die Reverse Transkriptase-Konzentration auf die Herstellerangaben reduziert werden konnte. In der Literatur ist die Erhöhung von Ausbeute und Spezifität durch Glycerol wiederholt belegt worden (Smith et al. 1990, Pomp et al. 1991, Cheng et al. 1994). Die Glycerol-induzierten Verbesserungen in der PCR-Qualität werden dabei auf eine Erhöhung der hydrophoben Interaktion zwischen verschiedenen Proteindomänen, auf die Denaturierung von RNA-Sekundärstrukturen, die eine Primeranlagerung erleichtern, sowie auf eine Erhöhung der Denaturierungstemperatur der beteiligten Enzyme zurückgeführt (Nagai et al. 1998). Über eine additive Wirkung von Glycerol und Formamid sind bisher keine Daten vorhanden; dagegen berichten Varadaraj und Skinner (1994) bei Kombination beider PCR-Beschleuniger vom Auftreten unspezifischer Banden bei gleichbleibender Amplifikationseffizienz. Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen wurde für die Amplifikation von rt-Vg0.8 ein positiver Einfluss der Kombination von beiden Chemikalien auf Effektivität der Reaktion festgestellt, die eine von der jeweiligen DNA-Struktur und den Reaktionsbedingungen abhängigen spezifischen Replikationsmechanismus vermuten lassen.

Aufgrund der geringen RNA-Mengen, die bei der Isolation aus einzelnen Organen von Zebraäbrbling und Medaka zu gewinnen sind, wurde für diese beide Fischarten von der Etablierung eines Dot-Blot-Systems abgesehen. Die hohe Sensitivität der PCR-Technik bietet dagegen durch die geringen benötigten Probenmengen die Möglichkeit, die Expression mehrerer Gene parallel zu verfolgen. Aus diesen Gründen wurde für die Untersuchungen in den beiden kleinwüchsigen Fischarten die Entwicklung von RT-PCR-Systemen gegenüber dem Dot-Blot bevorzugt. Für die Konstruktion spezifischer Primerpaare wurde zunächst Information über die bis dahin unbekanntenen mRNA-Sequenzen des Vitellogenins von Medaka und Zebraäbrbling sowie des Estrogenrezeptors des Zebraäbrblings benötigt.

In Anbetracht der ermittelten Nukleotidsequenz konnte die M-Vg1.6 cDNA als das 5'-Ende des Medaka-Vitellogenins identifiziert werden. Sowohl in der Sequenz als auch der im Northern-Blot ermittelten Gesamtgröße des Medaka-Transkripts zeigen sich größte Ähnlichkeiten zum Vitellogenin des Killifisches (*Fundulus heteroclitus*). Die Sequenzhomologie zwischen *Oryzias* and *Fundulus* beträgt 72 %, die Größe des mRNA-Transkripts ca. 5.500 bp, was mit der Länge der *Fundulus*-Vitellogenin-mRNA von 5.197 bp vergleichbar ist (LaFleur et al. 1995). Hier spiegelt sich die nahe Verwandtschaft zwischen den in Nord- und Mittelamerika verbreiteten Familie der Fundulidae und den ostasiatischen Adrianichthyidae wieder, die in die Schwesterordnungen Cyprinodontiformes und Beloniformes eingeordnet werden, die sich vor ca. 45 Mio Jahren voneinander getrennt haben (Nelson 1994). Bezüglich der Konservierung der Aminosäuresequenz verringert sich die Homologie mit abnehmender evolutionärer Verwandtschaft: während ein Alignment mit Euteleostei, wie *Fundulus heteroclitus* oder der Regenbogenforelle (Mouchel et al. 1996), eine Übereinstimmung von mehr als 50 % identischer Aminosäuren ergibt, liegt die Aminosäuresequenzidentität von M-Vg1.6 zu anderen Vertebraten wie dem Stör (*Acipenser transmontanus*; Bidwel and Carlson 1995), dem südafrikanischen Krallenfrosch (*Xenopus laevis*, Gerber-Huber et al. 1987) oder dem amerikanischen Neunauge (*Ichthyomyzon unicuspis*; Sharrock et al. 1992) nur bei 40–30 % mit absteigender Ähnlichkeit in Reihenfolge ihrer Aufzählung. Die Identifikation von M-Vg1.6 als 5'-Ende der Vitellogenin-cDNA kann auch durch eine ProDom-Computer-Analyse (Corpet et al. 1998) gestützt werden; M-Vg1.6 weist die typische Lipovitellin 1 (Lv1)-Domäne auf, die in der N-terminalen Region des Proteins zu finden ist. Diese Proteindomäne ist für das Vitellogenin sowohl von Vertebraten als auch Invertebraten, aber auch für die der gleichen

Proteinfamilie zugerechneten Proteine Apolipoprotein B100 und dem mikrosomalem Triglycerid-Transferprotein charakteristisch (Anderson et al. 1998).

Im Vergleich zur Vitellogenin-cDNA des Medakas sowie der meisten anderen Vertebraten Vitellogene ist das Vitellogenin 1 des Zebraärbings (4,5 kb), das bezüglich der geringen Zahl an für die PCR-Amplifikation benötigten Zyklen das Haupttranskript zu sein scheint, von bemerkenswert geringer Länge. Nach einem Alignment mit den Vitellogenin-cDNAs des Killifischs (*Fundulus heteroclitus*; Lafleur et al. 1995) oder des Tilapia (*Oreochromis aureus*; GenBank AF017250), die eine Länge von 5,2 bzw. 5,5 kb besitzen, fand die Mehrheit der Nukleotid-Deletionen im Bereich der Lipovitellin 2 (LV2)-Domäne statt. Da die korrespondierende cDNA der Dickkopfelritze (*Pimephales promelas*, Korte et al. 2000) mit 4.0 kb eine vergleichbare Tendenz in der Größenreduktion zeigt, scheint dies für die Vitellogene der Cypriniformes eine charakteristische Eigenschaft zu sein. Die Aminosäuresequenz von Z-Vg1 weist 34 Serinreste auf, was mit anderen Fischarten wie der Regenbogenforelle (30 Serine, Goulas et al. 1996) oder der Dickkopfelritze (24 Serine) vergleichbar ist. Andere Teleostei wie Killifisch (*Fundulus heteroclitus*) oder Tilapia (*Oreochromis aureus*) aber auch der weiße Stör (*Acipenser transmontanus*, Bidwel und Carlson 1995) besitzen dagegen eine weit ausgedehntere Polyserindomäne, was eine große Variationsbreite dieser Domäne innerhalb der Fische anzeigt. Die Länge der Polyserindomäne wird häufig mit einer fortschreitenden Evolutionsstufe innerhalb der Vertebraten in Verbindung gebracht, da Krallenfrosch und Huhn wiederum längere Phosvitindomänen als Fische besitzen (La Fleur et al. 1995). In dieser Hypothese werden die Ca^{2+} -komplexierenden Eigenschaften der Phosphatreste als Calciumspeicher für die Verknöcherung der Skelettstrukturen angesehen (Follet und Redshaw 1968, Wallace 1970). Betrachtet man jedoch die phylogenetischen Beziehungen innerhalb der Fische, besitzen an der Basis stehende Gattungen wie *Ichthyomyzon* oder *Acipenser* vergleichsweise lange Phosvitindomänen, der früh im Stammbaum der Teleostei evoluierte Seitenzweig der Cyprinodontiformes extrem kurze und die am Ende der Teleosteerlinie stehenden Percomorpha und Atherinomorpha wiederum moderat lange Phosvitindomänen. In diesem Sinn kann die Länge der Phosvitindomäne nicht mit einer fortschreitenden Verknöcherung des Vertebratenskeletts korreliert werden, sondern es scheint sich vielmehr um eine schnell und unabhängig von den Lipovitellindomänen mutierende Domäne innerhalb des Proteins zu handeln.

Mit der cDNA Z-Vg2 konnte im Zebraärbing ein zweites Vitellogenin-ähnliches Transkript nachgewiesen werden. Obwohl das N-terminale Ende von Z-Vg2 nicht definitiv identifiziert werden konnte, erscheint dieses Transkript von geringerer Größe als Z-Vg1 zu sein, da beim Alignment beider cDNAs zahlreiche Lücken aufgrund fehlender Nukleotidfolgen in Z-Vg2 entstehen. In diesem Zusammenhang zeigt das Fehlen identischer Sequenzabschnitte jedoch auch, dass beide Transkripte nicht Splicevarianten eines einzelnen Gens sein können, sondern Produkte verschiedener Genloci sein müssen. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass in Z-Vg2 keine Domäne mit einer Häufung von Serinresten identifiziert werden konnte, die sonst für die Polyserindomäne in Vertebraten typisch ist (Byrne et al., 1989a). Zur näheren Charakterisierung der Funktion dieses zweiten Transkripts bedarf es jedoch der weiteren Aufklärung, ob das Z-Vg2-Transkript tatsächlich zu einem funktionellen Protein, das in die Vitellogenese involviert ist, translatiert wird. In diesem Zusammenhang ist jedoch interessant, dass auch im Haushuhn, für das ebenfalls mehrere Vitellogeningene identifiziert wurden, ein Transkript mit einer stark verkürzten Phosvitindomäne existiert (Byrne et al. 1989b). Während die Existenz mehrerer Vitellogeningene bisher für die höheren Vertebraten wie Vögel und Amphibien als typisch galt, weist

das Auftreten zweier sehr unterschiedlicher Vitellogenintranskripte im Zebraärbling auf die Möglichkeit einer weiteren Verbreitung mehrerer Vitellogeneningene innerhalb der Teleostei hin. Als weitere Beispiele für Unterschätzung der Genvielfalt bei Fischen wurden von Wittbrodt et al. (1998) zahlreiche Multigenfamilien beschrieben, für die bei anderen Vertebraten nur ein Gen bekannt ist. Die Autoren folgern aus ihren Beobachtungen, dass vollständige Genomduplikationen wahrscheinlich nur vor der Trennung der Evolutionslinien von Fischen und höheren Vertebraten stattgefunden haben; linienspezifische Genduplikationen scheinen dagegen weit verbreitete Ereignisse unter den Teleostei zu sein. Durch dieses Phänomen wird eine erhöhte Genomkomplexität erreicht, die diese Tiergruppe dazu befähigt, sich schnell auf verändernde Umweltbedingungen anzupassen.

Das neu identifizierte cDNA-Fragment für den Estrogenrezeptor α des Zebraärbling erstreckt sich von der DNA-bindenden C-Domäne bis zur Hormon-bindenden E-Domäne, die beide unter den Vertebraten hochkonserviert sind (Le Dréan et al. 1994). Ein Alignment mit der cDNA des Estrogenrezeptor α des getüpfelten Gabelwelses (*Ictalurus punctatus*) beweist die Identifikation einer α -Variante des Estrogenrezeptors des Zebraärblings, dass sowohl in der C- als auch der E-Domäne über 90 % der Nukleotide konserviert sind. Da die E-Domäne der bisher bekannten β -Formen des Estrogenrezeptors nur weit schwächere Homologien von ~ 50 % zur α -Form aufweisen (Gustaffson 1999), kann die Klonierung eines Estrogenrezeptor β -cDNA-Fragments ausgeschlossen werden. Die mRNA-Transkripte der bisher identifizierten α -Varianten des Estrogenrezeptors weisen bemerkenswert lange untranslatierte Regionen auf, so dass die Gesamtgröße vollständiger cDNAs erheblich unter den verschiedenen Teleostespecies abweicht. Unter dieser Voraussetzung liegen die im Northern-Blot markierten Banden von 5,2, 4,0 und 2,4 kb innerhalb des Bereichs der bisher bekannten vollständigen cDNAs für Estrogenrezeptoren des α -Typs, die von 6,8 kb bei *Ictalurus punctatus* (Xia et al. 1999) bis zu 2,8 kb beim japanischen Medaka (GenBank D28954) reichen. Verschiedene Splice-Varianten des Estrogenrezeptor α sind bei einigen Fischarten bekannt (Lazennec et al. 1995, Tan et al. 1996, Patino et al. 2000); daher könnte das Auftreten mehrerer Banden im Northern Blot mit der Existenz verschiedener Splicevarianten des ER α -Gens des Zebraärblings erklärt werden. Eine weitere Möglichkeit besteht auch in der Markierung verschiedener Prozessierungsstufen der ER α -mRNA von der transkribierten prä-mRNA bis zur tatsächlich an der Translation beteiligten mRNA-Sequenz.

Andererseits ist es möglich, dass die relativ kurze Z-ER 0.6 cRNA durch ihren C-Domänenabschnitt auch β -Varianten des Estrogenrezeptors markiert, deren Existenz im Zebraärbling durch Klonierung eines 0.8 kb-Fragments nachgewiesen wurde (Legler et al. 2000). Bei Fischen wurden β -Typen des Estrogenrezeptors mittlerweile bei mehreren Spezies aus sehr unterschiedlichen Familien gefunden. Hierzu gehören der getüpfelte Gabelwels (*Ictalurus punctatus*), der Goldfisch (*Carassius auratus*), die Tilapia (*Oreochromis niloticus*), die Goldbrasse (*Sparus auratus*), die Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) und der Adlerfisch (*Micropogonias undulatus*; Ma et al. 2000, Xia et al. 2000, Chang et al. 1999, GenBank AF136980, AJ289883, Hawkins et al. 2000), so dass dieser Rezeptortypus allgemein bei Vertebraten verbreitet zu sein scheint; da für den Estrogen-Rezeptor β bei Säugetieren mittlerweile zahlreiche Subtypen bekannt sind (McEwen und Alves 1999, Muramatsu und Inoue 2000), kann die Identifikation weiterer Estrogenrezeptoren auch in Fischen in naher Zukunft erwartet werden. Unter diesem Aspekt ist auch das Auftreten mehrerer Banden bei der RT-PCR in unterschiedlichen Geweben des Zebraärblings zu sehen, die einer weiteren zukünftigen Untersuchung bedürfen. Be-

sondere Beachtung gilt in diesem Zusammenhang der Identifikation eines dritten Estrogenrezeptortypus (ER γ) bei *Micropogonias undulatus* (Hawkins et al. 2000), der eine weitere Differenzierung der estrogen-kontrollierten Genregulation erwarten lässt.

4.2 Induktion von Vitellogenin und Estrogenrezeptor in isolierten Hepatocyten aus der Regenbogenforelle

Die Induktion von Vitellogenin in isolierten Hepatocyten gilt als ein etablierter Biomarker für die Präsenz einer estrogenen Aktivität von Xenobiotika oder Kläranlagenausflüssen (siehe Reviews von Heppel et al. 1995, Toppari et al. 1996, Nimrod and Benson 1996, Ankley et al. 1998), da die Expression dieses Dottervorläuferproteins in Fischen klar dosisabhängig und Estrogenrezeptor-vermittelt gesteuert wird (Vaillant et al. 1988, Pakdel et al. 1991). Tatsächlich konnte *in vivo* in männlichen unbehandelten Regenbogenforellen keine Vitellogenin-mRNA detektiert werden; vielmehr wurde in männlichen Individuen eine Vitellogenin-prä-mRNA nachgewiesen, die jedoch nicht mit der antisense-Vg1.1-cRNA-Sonde hybridisiert (Ren et al. 1996b). Aus diesen Gründen kann die Detektion von Vitellogenin-mRNA in Hepatocyten von männlichen Regenbogenforellen unzweifelhaft auf die Präsenz von exogenen Estrogen-aktiven Substanzen zurückgeführt werden.

4.2.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Die Etablierung eines auf Hepatocytenprimärkulturen basierenden Detektionssystems erfordert zunächst eine Validierung der verwendeten Kulturbedingungen, um eine durch Estrogen-wirksame Verunreinigungen induzierte Vitellogeninsynthese zu minimieren oder ganz zu vermeiden. Die Verwendung von Mediensupplementen wie FKS oder BSA führte zu einer deutlichen Induktion der Vitellogeninsynthese in den Kontrollzellen, wobei auch durch Charcoal Stripping des FKS keine vollständige Reduktion des estrogenen Potentials erreicht werden konnte. Das hohe estrogenes Potential von Albumin könnte in seiner Funktion als steroidbindendes Protein liegen (Westphal 1986, Rosner 1991), wodurch die Möglichkeit einer Kontamination mit 17 β -Estradiol beim Aufreinigungsprozess des Proteins aus dem Serum gegeben ist. In fötalem Serum dagegen liegen neben zahlreichen Steroidhormonen wie z.B. Dehydroepiandrosteron (DHEA) auch das Sex-Hormon bindende Protein (SHBG) vor, das die Konzentration an frei in Lösung befindlicher Steroide verändert. Da die Hepatocyten jedoch bei serumfreier Kultur keine Einschränkungen in ihrer Kapazität zur Vitellogenin-mRNA-Synthese zeigten, kann in den hier vorgestellten *In vitro*-Testsystemen auf derartige Supplemente verzichtet werden.

Trotz serumfreier Kultur der Hepatocyten konnte jedoch eine zeitabhängige Induktion der Vitellogeninexpression in den unbehandelten Kontrollzellen beobachtet werden, die auch nicht durch Wechsel von Kulturplatten und -medium unterdrückt werden konnte. Eine Präinduktion der Vitellogeninsynthese durch Kontamination des Futters mit Estrogen-aktiven Substanzen kann aufgrund der im Verlauf der Kultur ansteigenden Vitellogenin-Expressionsrate ausgeschlossen werden, so dass die für die Kultur der Hepatocyten verwendeten Arbeitsmaterialien als Quelle estrogenen Kontamination in

Betracht gezogen werden müssen. In diesen Zusammenhang berichten Miller et al. (1986) von der Produktion von 17β -Estradiol in Hefekulturen, die durch im Kulturmedium vorhandene Verunreinigungen mit Estron hervorgerufen wurden. Ebenso verbleibt durch die Verwendung von Alkylphenolen als Antioxidantien in Kunststoffen die Möglichkeit, dass die aus Polystyrol hergestellten Zellkulturplatten Alkylphenole in das Medium abgeben (Soto et al. 1991). Eine weitere Erklärung für die ansteigende Vitellogeninexpression in den Kontrollzellen besteht in einer potentiellen diffusionsbedingten Kreuzkontamination aus angrenzenden belasteten Proben der 24-Well-Platten. Beresford et al. (2000) konnten derartige Phänomene für Alkylphenole nachweisen, die in der Lage sind, aus der Probenlösung in die feste Matrix von Polystyrolplatten einzudringen und sich somit auf unbelastete Proben ausbreiten. Da ein großer Teil der bekannten (Xeno-)estrogene vergleichbare moderat unpolare Eigenschaften besitzen, könnte hierin ein allgemeines Problem für die von der Verwendung von Kunststoffkulturplatten abhängigen Zellkultursysteme bestehen.

4.2.2 Temperatureffekte bei der Vitellogeninexpression

Neben zeit- und dosisabhängiger Expression des Vitellogenins konnten bei der Hepatocytenprimärkultur aus der Regenbogenforelle auch temperaturabhängige Effekte hinsichtlich der Kapazität der Zellen zur Synthese von Vitellogenin-mRNA beobachtet werden. Generell besitzen bei einer Temperatur von $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ gegenüber $14\text{ }^{\circ}\text{C}$ kultivierte Hepatocyten eine sowohl in der Quantität als auch in der Sensitivität auf 17β -Estradiol erhöhte Reaktivität hinsichtlich der Vitellogenin- als auch der Estrogenrezeptor-mRNA-Expression. Ähnliche Temperatureffekte konnten auch *in vivo* beim Atlantischen Lachs (*Salmo salar*) und bei der Regenbogenforelle nachgewiesen werden. Beide Fischarten zeigten nach Injektion von 17β -Estradiol erhöhte Vitellogeninsyntheseraten, wenn sie bei erhöhter Wassertemperatur gehalten wurden (Korsgaard et al. 1986, MacKay und Lazier 1993). *In vitro* konnte bei Goldfischhepatocyten ein mit der Inkubationstemperatur steigender Sauerstoffverbrauch nachgewiesen werden, der zu 50 % auf Proteinsynthese zurückzuführen ist (Krumshabel et al. 1994). Ebenso wurde in Hepatocytenprimärkulturen der Regenbogenforelle ein mit der Erhöhung der Inkubationstemperatur fortschreitender Anstieg von Sauerstoffverbrauch und Proteinsynthese beobachtet (Pannevis und Houlihan 1992). Diese Ergebnisse sprechen für eine allgemeine Erhöhung des Zellmetabolismus bei einer Steigerung der Inkubationstemperatur. Koban (1986) berichtet dagegen von einer differenzierten Veränderung verschiedener Enzymaktivitäten und der allgemeinen Proteinsyntheserate bei Primärhepatocyten von *Ictalurus punctatus*, die bei Temperaturen zwischen 7 und $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ kultiviert wurden. Für Hepatocyten aus der Regenbogenforelle geben Klaunig et al. (1985) ein Temperaturoptimum zwischen 15 und $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ für die Cytochrom P450-Aktivität an, während die Überlebensrate der Zellen bei sehr tiefen Temperaturen von $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ am größten war. Verwendet man die Reaggregation der Hepatocyten als einen Marker für die Vitalität der Zellkulturen (Maître et al. 1986, Braunbeck et al. 1995), so widersprechen die hier vorgestellten Ergebnisse diesen Beobachtungen, da eine Vereinzelung der Hepatocyten bei $14\text{ }^{\circ}\text{C}$ nach längerer Kulturdauer festgestellt wurde, was möglicherweise auf differenzierte adaptive Prozesse in den verwendeten sehr unterschiedlichen Kultursystemen zurückzuführen ist.

Aufgrund dieser Beobachtungen bedarf es weiterer Untersuchungen, inwieweit die temperaturabhängige Erhöhung der Vitellogeninexpression zum einen auf eine allgemeine Steigerung der metaboli-

schen Aktivität der Zellen, zum anderen aber auf adaptive, mechanistische Veränderungen in der Zellphysiologie oder auf das Erreichen einer für die Zellvitalität günstigen Inkubationstemperatur zurückzuführen ist. In diesem Zusammenhang ist zunächst zu klären, in welcher Weise nicht Estrogen-regulierte Gene auf unterschiedliche Kulturtemperaturen reagieren, um Aufschluss über eine potentielle Temperatursteuerung der Reproduktionsbiologie der Regenbogenforelle zu erhalten. Hinsichtlich der Sensitivität des Detektionssystems konnte durch die Steigerung der Kulturtemperatur von 14 °C auf 18 °C eine Erniedrigung der Nachweisgrenze für die hormoninduzierte Vitellogenininduktion auf 100 pM 17 β -Estradiol erzielt werden, so dass besonders hinsichtlich der oft schwachen estrogenen Wirkung vieler Xenoestrogene eine Verbesserung der Assaybedingungen durch die Temperatursteigerung erreicht werden konnte.

Vergleicht man RT-PCR- und Northern Dot-Blot-Systeme hinsichtlich ihrer maximalen Nachweisgrenze für ein bestimmtes Genprodukt, so können mit dem RT-PCR System weitaus höhere Sensitivitäten erreicht werden (Ko et al. 1995, Wang et al. 1996). Bei der Messung einer hormonkontrollierten Genexpression kann der limitierende Faktor jedoch primär in der hormonellen Ansprechbarkeit des Gens liegen, über die hinaus eine Steigerung der Testsensitivität nicht mehr möglich ist. In diesem Sinne konnte für die Detektion von Vitellogenin keine Steigerung der hormonabhängigen Sensitivität des Testsystems erreicht werden, da bei einer Verlängerung der Expositionsdauer gegenüber den Testchemikalien auch im Dot Blot RPA eine vergleichbare hormonelle Sensitivität erreichbar ist. Die zunehmende Vitellogeninexpression in den Kontrollzellen führt hierbei zu einer potentiellen Erniedrigung der Nachweisgrenze, da schwach estrogenen Effekte durch die Backgroundinduktion überdeckt werden können. Betrachtet man die beiden Detektionssysteme hinsichtlich ihrer Kapazität, die unterschiedliche Potenz verschiedener Xenoestrogene darzustellen, so konnten keine signifikanten Divergenzen festgestellt werden. Mit beiden Systemen konnten eindeutige Dosis-Wirkungsbeziehungen für die getesteten Verbindungen dargestellt werden; ebenso war die Größenordnung des unterschiedlichen estrogenen Potentials von 17 β -Estradiol und Nonylphenol in beiden Systemen vergleichbar. Somit liegt der Vorteil des RT-PCR-Systems vor allem in der geringeren benötigten Probenmenge, die eine parallele Bestimmung der Expression mehrerer Gene ermöglicht, sowie der in verminderten Inkubationsdauer der Hepatocyten bei gleicher Sensitivität des Testsystems. Bei der kurzen Expositionszeit von 24 h können Abwässer ohne vorherige Sterilfiltration getestet werden, wodurch die Entfernung von Schwebstoffen gewährleistet und die Absorption lipophiler Substanzen an die Filtermatrix vermieden wird.

4.2.3 Sensitivität der Vitellogeninexpression gegenüber den ausgewählten Monosubstanzen

Vergleicht man das Monolayer Primärkultursystem mit anderen *In vitro*-Testsystemen, so zeigen sich eindeutige Varianzen in den Ergebnissen hinsichtlich der Sensitivität und der Bestimmung des estrogenen Potentials. Hierbei sind bei auf Primärhepatocyten basierenden Testsystemen hohe Schwankungen in der Sensitivität gegenüber 17 β -Estradiol zu beobachten. Pelissero et al. (1993) geben für die Induktion von Vitellogenin in Hepatocytenaggregatkulturen aus der Regenbogenforelle einen LOEC von 1 – 10 nM an. Mit dem gleichen Testsystem wurde von Jobling et al. (1993) ein LOEC von 10 pM für die Vitellogenininduktion bestimmt. Smeets et al. (1999b) konnten eine signifikante Vitellogeni-

ninduktion in Karpfenhepatocyten ab einer Konzentration von 2 nM bestimmen. Alle 3 Testsysteme basieren auf der Messung von Vitellogenin im Kulturüberstand der Hepatocyten durch ELISA. Für die Induktion der Vitellogenin-mRNA (gemessen über ein radioaktives Dot Blot Verfahren) wurde ein LOEC von 1 nM (Flouriot et al. 1995, Petit et al. 1999) bestimmt. Dieser Wert wurde nach einer kurzen Expositionszeit von 24 h bzw. 48 h ermittelt. Mit dem hier vorgestellten Dot Blot RPA-Assay waren nach derselben Inkubationszeit vergleichbare Werte messbar, was die Abhängigkeit der Sensitivität eines Testsystems von der Expositionszeit und der verwendeten Detektionstechnik verdeutlicht (LOEC im Dot Blot RPA_{96 h} und RT-PCR_{24 h} jeweils 100 pM 17β-Estradiol).

Die estrogenere Sensitivität gegenüber verschiedenen Xenoestrogenen verläuft bei diesen Studien jedoch nicht parallel zu den für 17β-Estradiol gemessenen Ergebnissen, so dass eine hohe Varianz in den veröffentlichten relativen estrogenen Potentialen dieser Substanzen besteht. Für Nonylphenol geben Jobling und Sumpter (1993) eine relative estrogenere Potenz von 9×10^{-6} an (17β-Estradiol = 1), während die Ergebnisse von Flouriot et al. (1995) ein estrogenes Potential von 2×10^{-3} bis 2×10^{-4} ergeben. Aufgrund dieser Tatsache ist eine Validierung der in dieser Arbeit ermittelten estrogenere Potentiale nur mit Einschränkungen möglich, jedoch liegt das estrogenere Potential für Nonylphenol mit 2×10^{-4} bis 5×10^{-5} innerhalb dieses Bereichs. Auch bei anderen Detektionssystemen zeigt sich eine Variation des für Nonylphenol angegebenen estrogenen Potentials. Auf der Basis des MCF-7-Proliferationsassays wurden estrogenere Aktivitäten für Nonylphenol publiziert, die um den Faktor 300.000 (Soto et al. 1992), 30.000 (Soto et al. 1995) und 100 (Villalobos et al. 1995) unter dem hormonellen Potential von 17β-Estradiol lagen. Zum Teil können diese Unterschiede durch die Verwendung verschiedener Isomergemische von Nonylphenol erklärt werden, denn von den zahlreichen Isomeren (Giger et al. 1984), aus denen sich technisches Nonylphenol zusammensetzt, sind nur die *para*-Isomere estrogen aktiv (Mueller und Kim 1978). Außerdem können die lipophilen Nonylphenole in unterschiedlichem Maß an verschiedene Kulturplatten und Glasmaterialien adsorbieren, die in den einzelnen Experimenten verwendet wurden.

Zum anderen resultiert die Angabe der unterschiedlichen relativen estrogenen Potentiale auch aus Schwankungen in der Bezugsgröße für 17β-Estradiol, das in Zellen schnell metabolisiert wird (Tenniswood et al. 1983), aber auch sensibel gegenüber Oxidation durch Sauerstoff und UV-Bestrahlung reagiert.

Darüber hinaus gilt vor allem für Primärzellkulturen, dass die Reaktivität der Zellen gegenüber Xenobiotika vom physiologischen Zustand des Spendertiers abhängt, was zu Veränderungen bei der Expression verschiedener Gene führen kann. Da die Expression des Vitellogenins direkt an die zelluläre Estrogenrezeptorkonzentration gebunden ist (Flouriot et al. 1996), müssen Unterschiede in der estrogenen Sensitivität auch bezüglich jahreszeitlicher Veränderungen des Estrogenrezeptorgehalts der Leber der Spendertiere beachtet werden (Smith und Thomas 1991). Möglicherweise sind hierauf die bereits erwähnten Unterschiede in der Sensitivität der Hepatozyten gegenüber 17β-Estradiol innerhalb des gleichen Kultur- und Detektionssystems zurückzuführen (Pelissero et al. 1993, Jobling und Sumpter, 1993).

Für Bisphenol-A, das ein ähnliches estrogenes Potential wie Nonylphenol zeigte, sind die in dieser Studie dargestellten Ergebnisse vergleichbar mit den von Harries et al. (1995) veröffentlichten Werten, die über die Sekretion von Vitellogenin in den Medienüberstand von Hepatocytenaggregatkulturen aus der Regenbogenforelle gemessen wurden. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch von Krishnan et al. (1993), Villalobos et al. (1995) sowie Routledge und Sumpter (1996) publiziert, die die Proliferation

von MCF-7-Zellen bzw. Reporterassays für die Bestimmung verwendeten. Für Ethinylestradiol und Genistein wurden von Pellissero et al. (1993) ebenfalls estrogene Potentiale publiziert, die mit den hier dargestellten Ergebnissen übereinstimmen und die über die Vitellogeninabgabe in den Kulturüberstand von Hepatocytenprimärkulturen gemessen wurden. 17α -Ethinylestradiol ist demnach auch *in vitro* ein höheres estrogenes Potential als 17β -Estradiol zuzuordnen, was wohl auf die etwas langsamere Metabolisierung dieser Verbindung zurückzuführen ist (Tenniswood et al. 1983, Standeven et al. 1990).

Das Phytoestrogen Genistein besitzt eine weitaus stärkere estrogene Aktivität als die bisher besprochenen Xenoestrogene Nonylphenol und Bisphenol-A (Faktor 1000 niedriger als 17β -Estradiol). Phytoestrogene sind zum Teil in hohen Konzentrationen in Nahrungsmitteln zu finden. Deshalb ist bei der Beurteilung des Gefährdungspotentials zu berücksichtigen, dass über die Nahrung aufgenommene Phytoestrogene ebenso in die Regulation Estrogen-kontrollierter Gene eingreifen können (Safe et al. 1998a, Safe und Gaido 1998).

Methoxychlor ist *a priori* keine Estrogen-aktive Verbindung, sondern wird erst durch Demethylierung zur aktiven Substanz *2,2-Bis-(p-hydroxyphenyl)-1,1,1-trichlorethan* metabolisiert (Kapoor et al. 1970). Die dennoch vergleichsweise hohe estrogene Aktivität, die bereits 24 h nach Expositionsbeginn nachweisbar war, beweist die Erhaltung der metabolischen Kapazitäten der Hepatocyten in der technisch einfachen Monolayerkultur. Ähnliche Nachweisgrenzen werden auch von Smeets et al. (1999b) angegeben, was die Bedeutung von Primärhepatocyten zur Untersuchung sogenannter Proestrogene unterstreicht.

Aufgrund des geringen Zeit- und Energieaufwands sind *In vitro*-Testsysteme zur Detektion estrogener Aktivitäten hinsichtlich ihrer Eignung als Screening-Systeme im Umwelt-Risikomanagement validiert worden. Aus diesem Grund ist es notwendig, eine Bewertung der Testsensitivität in Bezug auf die in der Umwelt zu erwartenden Konzentrationen an Xenoestrogenen vorzunehmen. Nonylphenol und Nonylphenoethoxylate wurden in Konzentrationen von 2,2 - 44 $\mu\text{g/L}$ (10 - 200 nM) bzw. 2,86 - 217 $\mu\text{g/L}$ (ca. 10 - 770 nM) in schweizerischen (Ahel et al. 1994) und von 0,7 - 37 $\mu\text{g/L}$ (3,2 - 172 nM) bzw. 1,8 - 65 $\mu\text{g/L}$ (ca. 6 - 230 nM) in schottischen Kläranlagenausflüssen nachgewiesen (Pirie et al., 1996). Vergleichbare Konzentrationen wurden auch in anderen europäischen Ländern und in Nordamerika nachgewiesen (Dicorcia et al. 1994, Field et al. 1996, Fytianos et al. 1997, Lye et al. 1999, Castillo et al. 2000). In Südostasien wurden jedoch weitaus höhere Konzentrationen von bis zu 1.100 $\mu\text{g/L}$ an Nonylphenol und -derivaten im Abwasser gemessen (Ding et al. 1999).

Natürliche und synthetische Estrogene wurden in Abwässern aus Deutschland in durchschnittlichen Konzentrationen von 17 ng/L (57,4 pM; Maximum 65 ng/L = 219 pM) für 17α -Ethinylestradiol und 4 ng/L (12,9 pM; Maximum 20 ng/L = 64,4 pM) für Mestranol gefunden. Die Konzentrationen an 17β -Estradiol lagen entweder unter der Nachweisgrenze von 1 ng/L oder im Bereich von 1 - 10 ng/L (3,7 - 37 pM; Stumpf et al., 1996). Dem stehen Werte für Kläranlagenausläufe aus Großbritannien gegenüber (Desbrow et al. 1998), in denen 17α -Ethinylestradiol nur in Spuren gefunden wurde, aber 17β -Estradiol in Konzentrationen von 1 - 80 ng/L nachweisbar war. Für Bisphenol A liegen noch wenige Daten über die Verbreitung im Abwasser vor. Im Allgemeinen erscheint diese Verbindung jedoch keine Rolle in kommunalen Abwässern zu spielen, konnte jedoch in zum Teil höheren Konzentrationen bis zu 149 $\mu\text{g/L}$ in Abwässern aus Betrieben der Kunststoffindustrie gefunden werden (Fuerhacker et al. 2000, Lee et al. 2000). Ausgehend von diesen Daten kann über die Bestimmung der Vitellogeninexpression in Primärhepatocyten mit einer maximalen Sensitivität von 100 pm 17β -Estradiol in Dot

Blot RPA oder RT-PCR eine estrogenere Aktivität nur in Abwässern mit einer relativ hohen Kontamination mit Xenoestrogenen oder Estradiolderivativen identifiziert werden. In diesem Zusammenhang gilt es jedoch zu bedenken, dass verschiedene estrogenere Verbindungen im Abwasser eine additive oder eventuell synergistische Wirkung auf die Estrogen-regulierte Genexpression entfalten können.

Für die Untersuchung estrogenere Aktivität in gering bis moderat belasteten Abwässern besteht die Möglichkeit, eine Aufkonzentrierung vorzunehmen und/oder organische Extrakte einzusetzen, wodurch der Einsatz hoher Schadstoffkonzentrationen simuliert werden kann. Andererseits besteht die Möglichkeit, die Sensitivität des Testsystems durch weitere Verbesserung der Kulturbedingungen zu erhöhen. In diesem Zusammenhang wurde eine erhöhte Vitellogeninexpressionsrate bei der Verwendung von Aggregatkulturen im Vergleich zu Monolayerkulturen beobachtet (Flouriot et al. 1993). Ebenso ist es denkbar, die Reaktion der Hepatocyten auf Estrogene über den Einsatz von synergistisch wirksamen Hormonen oder Cofaktoren zu steigern (Peyon et al. 1996). Wie die zum Teil stark divergierenden Ergebnisse zur estrogenen Potenz der hier vorgestellten (Xeno-)estrogene zeigen, muss jedoch ein weiterer Forschungsschwerpunkt in der parallelen Untersuchung von ausgewählten Modellschubstanzen in den verschiedenen Testsystemen liegen. Die teilweise sehr unterschiedlichen Reaktivitäten einzelner Testsubstanzen in verschiedenen Testsystemen zeigen (Andersen et al. 1999), dass zukünftig Standardbedingungen für endokrine Nachweisverfahren erarbeitet werden müssen, um zu einer Vergleichbarkeit der Systeme durch zu gelangen.

Im Hinblick auf Schnelligkeit und Sensitivität können auf Hepatocytenprimärkultur basierende estrogenere Testsysteme nicht mit den artifiziellen Reporterassays verglichen werden, die für das Screening hoher Probenzahlen optimiert sind. Vielmehr liegt die Bedeutung von Primärzellkulturen in ihrer Eignung für die Untersuchung grundlegender physiologischer Prozesse, zum Beispiel der metabolischen Aktivierung von Xenobiotika wie des bereits angesprochenen Methoxychlor (Bulger et al. 1978, Schlenk et al. 1997) oder auch verschiedener PCB-Kongenere (Anderson et al. 1996a). Ebenso können Hepatocytenprimärkulturen als Modellsysteme zur Untersuchung der Interaktion zwischen verschiedenen anderen nukleären Rezeptorsystemen und der Expression estrogen-regulierter Gene dienen. In diesem Zusammenhang konnte den Orphan-Rezeptoren COUP-TF (chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor) und Arp-1 (apolipoprotein AI regulatory protein 1) eine positive Regulation des Estrogenrezeptorgens in der Leber der Regenbogenforelle (Lazennec et al. 1997) nachgewiesen werden. Ebenso sind Wechselwirkungen zwischen Heterodimeren des Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR) / Retinoid X Rezeptors (RXR) oder des Aryl-Hydrocarbonrezeptor (AHR) / AHR Nuclear Translocator (ARNT) und Estrogen-responsiven Elementen bekannt, die einen Einfluss auf die Estrogen-vermittelte Regulation der Genexpression haben (Keller et al. 1995, Nuñez et al. 1997, Klinge et al. 1999). Weiterhin können Epidermal Growth Factor (EGF) und Insulin-like Growth Factor estrogenere Wirkungen über Phosphorylierungsreaktionen am Estrogenrezeptor vermitteln (Martin et al. 2000). Im Hinblick auf diese Ergebnisse könnte die Genexpression von Vitellogenin auch durch Non-Estrogenrezeptor-Antagonisten beeinflusst werden, so dass die Vitellogenin-mRNA-Expression in Hepatocytenprimärkulturen möglicherweise auch für die Detektion indirekt auf das estrogenere System wirkender Xenobiotika eingesetzt werden könnte.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass Hepatocytenprimärkulturen aufgrund des erheblichen Zeit- und Materialaufwands im Vergleich zu Reporterassays kaum für ein Routinescreening großer Probenzahlen geeignet sind. Vielmehr legen die physiologisch bedeutenden Biotransformationskapazitäten der Hepatocyten eine Anwendung dieser Zellsysteme als ein Modellsystem für mechanistische

Studien nahe. In diesem Zusammenhang besteht auch die Möglichkeit, gezielt Abwässer oder Sedimentextrakte zu untersuchen, bei denen auf Hefezellen basierende Reporterassays, die nicht die komplexen Biotransformations- und Rezeptorsysteme der Vertebraten besitzen (Aoyama et al. 1996, Escriva et al. 1997), keine estrogen Aktivität anzeigen, aus deren Einzugsgebiet jedoch Störungen in der Reproduktion bei Wildtierpopulationen bekannt ist.

4.3 *In vivo*-Expression der Estrogen-regulierten Gene von Estrogenrezeptor Vitellogenin und Choriogenin H

4.3.1 Kinetik der Estradiol-induzierten mRNA- und Proteinsynthese von Vitellogenin *in vivo* in der Regenbogenforelle

Die rezeptorinduzierte Synthese von Vitellogenin ist ein Prozess, der Kontrollmechanismen auf mehreren Regulationsebenen beinhaltet. Neben der Kontrolle der Genexpression auf Transkriptions- und Translationsebene (Nielsen und Shapiro 1990, Dodson und Shapiro 1994, Gupta und Kanungo 1995, Flouriot et al. 1996, Edinger 1997) besteht eine zusätzliche Regulation über die Zahl und Konzentration der Estrogenrezeptoren (Perlman et al. 1984, Corthesy et al. 1990, Pakdel et al. 1991, Webb et al. 1992, Flouriot et al. 1997) sowie über die Verfügbarkeit der am Aufbau des sogenannten "Foldosomes" beteiligten Heatshock-Proteine (Wolffe et al. 1984a, b, Sabbah et al. 1996). Für die *In vivo*-Messung der Vitellogeninexpression bei Freiland- oder Versuchstieren aus Käfig- bzw. Bypassexperimenten als Indikator einer estrogenen Belastung eines Ökosystems ist es von Bedeutung, inwieweit punktuelle Belastungen durch Bestimmung von mRNA und Protein erfasst werden können beziehungsweise in welchem Ausmaß die Messergebnisse Rückschlüsse auf den aktuellen physiologischen Status einer hormonellen Belastung der Testindividuen zulassen. Aus diesem Grund ist eine grundlegende Betrachtung der Kinetik der Expression, Synthese und Export von Vitellogenin notwendig, um die Anwendbarkeit des Nachweises von Vitellogenin auf mRNA- oder Proteinebene im Freiland bewerten zu können.

Betrachtet man die Kinetik von Vitellogenin-mRNA-Synthese und Akkumulation des exportierten Proteins im Blutplasma von männlichen Regenbogenforellen, so ist nach einer einmaligen Injektion von 1 mg/kg 17 β -Estradiol in der Reihenfolge ihrer Synthese zunächst die Vitellogenin-mRNA und mit zeitlicher Verzögerung das Protein im Blutplasma nachzuweisen. Während die Menge der Vitellogenin-mRNA der Tiere im Verlauf von 9 Tagen jedoch deutlich reduziert wird, bleibt die Konzentration des Proteins im Blutplasma fast unvermindert hoch. Hierbei ist es von besonderer Bedeutung, dass in männlichen Individuen die Aufnahme von Vitellogenin in Oocyten unmöglich ist, so dass das Protein nur über Degradation und Ausscheidung über die Niere aus dem Tier entfernt werden kann (Herman und Kincaid 1988). Aus diesem Grund ergeben sich sehr unterschiedliche Halbwertszeiten für die Präsenz dieses Proteins im Blutplasma von Männchen und Weibchen. Für den südafrikanischen Kralenfrosch (*Xenopus laevis*) wurde eine Halbwertszeit von 2 Tagen in weiblichen, jedoch 40 Tage in männlichen Tieren gemessen (Wallace und Jarred 1968). Aus diesen Gründen kann Vitellogenin im Blutplasma von männlichen Fischen noch nachgewiesen werden, wenn bereits keine mRNA in den

Hepatocyten mehr detektiert werden kann (Le Guellec et al. 1988). Für die Nutzung der Vitellogenininduktion als Biomarker im Freiland ergibt sich hieraus die Konsequenz, dass zum Einen durch die Bestimmung des Vitellogeninplasmagehalts auch diskontinuierliche Belastungen erfasst werden können, zum Anderen besteht hierbei jedoch die Gefahr einer Überschätzung einer potentiellen estrogenen Belastung eines Gewässers, da der Plasmavitellogeningehalt in geringeren Maße als der Vitellogenin-mRNA Gehalt den Estrogen-regulierten physiologischen Status eines Individuums darstellt. Ebenso muss beachtet werden, dass die Akkumulation von Vitellogenin im Blutplasma von Männchen über eine längere Zeitspanne zur Ermittlung einer überhöhten Genexpressionrate führen kann.

Im Vergleich zur mRNA des Estrogenrezeptors, die bereits innerhalb der 9tägigen Versuchsperiode weitgehend vollständig abgebaut wurde, weist die Vitellogenin-mRNA eine hohe zeitliche Stabilität auf (Shapiro et al. 1976, Shapiro 1982). Für beide mRNAs ist eine Stabilisierung der mRNA nach Estrogeneinwirkung bekannt. In Hepatocytenprimärkulturen aus der Regenbogenforelle wurde nach 72 h Inkubation mit 17β -Estradiol eine Halbwertszeit von 14 h für den Estrogenrezeptor und von 29 h für Vitellogenin gemessen (Flouriot et al. 1996), was einer Verdreifachung der Halbwertszeit im Vergleich zu den Kontrollen entspricht. Als ein Faktor für die Stabilisierung der Vitellogenin-mRNA wurde das RNA-bindende Protein Vigilin, das an die 3'-untranslatierte Region der Vitellogenin-mRNA bindet, identifiziert, wodurch ein Abbau der mRNA durch sequenzspezifische Nukleasen verhindert wird (Dodson und Shapiro 1994, Cunningham et al. 2000). Da für beide eine vergleichbare proteinbedingte mRNA-Stabilisierung postuliert wird (Flouriot et al. 1996), kann die längere Halbwertszeit für die Vitellogenin-mRNA in einer Verlängerung des Polyadenylierungssignals im Verlauf einer Estrogenexposition liegen. Cochrane und Deeley (1988) beobachteten eine Verlängerung der Vitellogenin-mRNA nach Estrogenexposition in Hühnern, die mit einer zunehmenden Halbwertszeit korrelierte, die auch nach Entzug des Hormons erhalten blieb. Diese unterschiedliche Stabilitätsregulation beider mRNAs gibt zusätzlich Einblick in die differenzierte Steuerung Estrogen-regulierter Gene. Während der Estrogenrezeptor in der Leber von Fischen unabhängig von der zellulären Rezeptorkonzentration exprimiert wird, ist die Transkription anderer Gene, wie Vitellogenin, direkt mit Menge der verfügbaren Estrogenrezeptoren korrelierbar (Flouriot et al. 1997). Um eine differenzierte Steuerung der Expression verschiedener Estrogen-regulierter Gene über die Estrogenrezeptorkonzentration zu gewährleisten, ist daher eine hohe Plastizität der Rezeptorverfügbarkeit erforderlich. Aus diesen Gründen ist die frühe Transkription und vergleichsweise geringe Stabilität der Estrogenrezeptor-mRNA erklärbar, über die eine unterschiedliche Expression verschiedener Gene in Abhängigkeit von der Hormonkonzentration ermöglicht wird. Als Konsequenz für die Verwendung der Vitellogenininduktion als Biomarker für die Beurteilung einer estrogenen Belastung besteht demnach die Möglichkeit, dass andere Estrogen-regulierte Gene bereits bei niedrigeren Hormonkonzentrationen Expressionsmaxima erreichen, was eine Validierung der Expression von Vitellogenin im Vergleich zu anderen Genen erforderlich macht.

4.3.2 Estrogene Sensibilität von Medaka und Zebraquarienfisch *in vivo* gegenüber (Xeno)-estrogenen

Sowohl der Japanische Medaka (*Oryzias latipes*) als auch der Zebraquarienfisch (*Danio rerio*) wurden als Modelorganismen für das Monitoring einer exogenen endokrinen Belastung vorgeschlagen (Patyna et

al. 1999, Andersen et al. 2000). Von der US-amerikanischen Umweltbehörde (US Environmental Protection Agency, 1998) ist dagegen die Dickkopfelritze (*Pimephales promelas*) als universeller aquatischer Testorganismus für die Bewertung des umweltgefährdenden Potentials endokrin wirksamer Schadstoffe vorgesehen. Unter diesem Aspekt sind vergleichende Studien zur Empfindlichkeit verschiedener Fischarten für endokrine Effekte notwendig, da sichergestellt werden muss, ob eine Beschränkung auf eine einzige Fischart ein sicheres Umweltmanagement für die Bewertung des estrogenen Gefahrenpotentials im Freiland gewährleisten kann.

Da die Expression von sowohl Vitellogenin als auch Estrogenrezeptor α und Choriogenin H (nur beim Medaka) in der Leber unter strikter estrogenen Kontrolle stehen (Skipper und Hamilton 1977, Hayward et al. 1982, Tata et al. 1983, Pakdel et al. 1991, Oppen-Berntsen et al. 1992a, Tata et al. 1993, MacKay et al. 1996, Murata et al. 1997, Celius und Walther 1998a, Parks et al. 1999), mag eine vergleichende Messung der dosisabhängigen Expressionsmuster einen ersten Eindruck über intra- und interspezifische Variationen der hormonellen Sensitivität geben.

Erhöhung des Gesamt-RNA-Gehalts

Betrachtet man zunächst die unterschiedliche Akkumulation der Gesamt-RNA in Zebrabärbling und Medaka nach Estrogenapplikation, so wird deutlich, dass bei beiden Fischarten in verschiedener Weise Einfluss auf die Leberphysiologie genommen wird. Allgemein scheint der Zebrabärbling seinen gesamten Lebermetabolismus innerhalb der ersten 5 – 7 Tagen nach Beginn der Exposition gegenüber 17α -Ethinylestradiol, die benötigt wurden um ein neues Plateau bei der Gesamt-RNA zu erreichen, auf eine extrem vermehrte Proteinsynthese einzustellen. Der Medaka dagegen moduliert die Zusammensetzung der exprimierten Gene, während er die Rate des Proteinmetabolismus in der Leber weitgehend beibehält. Eine Zunahme der Gesamt-RNA wurde in der Leber Estradiol-exponierter Hähne, männlicher Krallenfrösche und auch Regenbogenforellen gefunden (Brasch und Peters 1985, Martin et al. 1986, Le Guellec et al. 1988) und war mit der Induktion der Vitellogenese korrelierbar.

Parallel zu diesem Ergebnis verändert sich die Ultrastruktur der Hepatocyten des Zebrabärblings auffällig: Die große Menge an rauem endoplasmatischem Retikulum und Golgi-Vesikeln, die das elektronenmikroskopische Bild der männlichen Hepatocyten nach Estrogenexposition prägen, ist charakteristisch für die Ultrastruktur der Leber weiblicher Zebrabärblinge während der Vitellogenese (Peute et al., 1978, 1985, Olivereau und Olivereau 1979b). Vergleichbare Veränderungen in der Ultrastruktur der Hepatocyten wurden auch im Zackenbarsch (*Epinephelus akaara*; Ng et al. 1984) oder in den Fröschen *Rana pipiens* und *Xenopus laevis* beobachtet (Lewis et al. 1976, Herbener et al. 1983). Auch im Medaka treten das raue endoplasmatische Retikulum und die Golgi-Stapel im Weibchen prominenter hervor (Braunbeck et al. 1992), jedoch geschieht das in weit geringerem Maße als beim Zebrabärbling, so dass bei dieser Fischart die Menge neu-induzierter ribosomaler RNAs unterhalb der statistischen Varianz des Gesamt-RNA-Gehalts der einzelnen Individuen bleibt.

Diese Unterschiede in der Regulation der Estrogen-induzierten Proteinsynthese mögen die verschiedenen Reproduktionsstrategien beider Fischarten reflektieren: Während es dem Zebrabärbling möglich ist, jeden 2. bis 3. Tag bis zu 300 Eier in das freie Wasser abzulaichen (Eaton und Farley 1974), produziert der Medaka nur 10 - 30 Eier pro Tag, die das Weibchen nach dem Laichakt an die Analflosse heftet (Yamamoto 1975). In Bezug auf den Energiehaushalt des Zebrabärblings erfordert die massive

Proteinsynthese, die mit der Vitellogenese einhergeht, einen weitgehenden Verbrauch des hepatischen Glykogens, während der Gehalt an Lipiden in der Leber zunächst ansteigt (Korsgaard und Petersen 1979, Peute et al. 1985). Daher muss die Energieversorgung der Leber bald auf den Katabolismus von Aminosäuren umgestellt werden (Ng et al. 1984, Korsgaard 1990), was eine erhebliche physiologische Belastung für männliche Zebrabärblinge bedeuten kann, die über längere Zeiträume hohen Estrogendosen ausgesetzt sind.

Im Zuge der vermehrten Proteinsyntheserate in der Leber während der Vitellogenese kommt es bei vielen Fischarten zu einer Erhöhung des Hepatosomatischen-Index (HSI, Tam et al. 1983, Benfey et al. 1989, Mañanos et al. 1994). Übereinstimmend zum Ausbleiben einer messbaren Erhöhung des Gesamt-RNA-Gehalts konnte beim Medaka keine Veränderung des HSI nach Estradiolexposition bis zu 100 ng/L festgestellt werden (Scholz und Gutzeit 2000). In diesem Sinn kann die starke Erhöhung des Gesamt-RNA-Gehalts im Zebrabärbling mit einer Hypertrophierung der Leber erklärt werden (Emmerson et al. 1979, Olivereau und Olivereau 1979a, Folmar et al. 2001), oder es besteht die Möglichkeit einer Induktion der Proliferation der Leberzellen durch die Hormoneinwirkung. Eine proliferationsfördernde Eigenschaft von 17β -Estradiol in Hepatocyten konnte sowohl parallel zur Induktion der Vitellogenese in *Xenopus laevis* (Spolski et al. 1985, Aprison et al. 1986, Spolski und Wangh 1987) als auch bei Mäusen und Ratten (Fujii et al. 1985, Francavilla et al. 1989, Machishi et al. 1995) beobachtet werden. Es ist daher notwendig, die Art der Kompensation der vermehrten Proteinsynthese beim Zebrabärbling genauer zu prüfen, da eine vermehrte Zellproliferation eine Induktion von Proto-Onkogenen beinhalten kann. Da die Beteiligung von Onkogenen aus dem Bereich der Steuerung des Zellzyklus an der Entwicklung zahlreicher Estrogen-induzierter Karzinome in Säugern bekannt ist (Hyder et al. 1992, Hong et al. 1998, Prall et al. 1998), besteht im Bereich der aquatisch lebenden Organismen ein vermehrter Forschungsbedarf, wie die vermehrte Bildung von Lebercarcinomen nach Estradiolapplikation im Medaka zeigt (Cooke und Hinton 1999).

Zeitabhängige-Expression von Vitellogenin, Estrogenrezeptor α , und Choriogenin H in Medaka und Zebrabärbling

Bezüglich der zeitabhängigen Genexpression in Folge der Exposition gegenüber 17α -Ethinylestradiol zeigten alle gemessenen leberspezifischen Genprodukte sowohl in Medaka als auch Zebrabärbling eine rasche Induktion der mRNA-Synthese, da bereits 24 h nach Expositionsbeginn hohe Expressionsraten erreicht waren. Dies bedeutet, dass das lipophile Estrogen schnell aus dem Wasser über die Kiemen aufgenommen wird (Quiao et al. 2000) und über die Blutbahn zu den Zielorganen gelangt. In diesem Zusammenhang gilt es zu berücksichtigen, dass die Messung der Expression spezifischer Gene unter Einsatz konstanter Gesamt-RNA-Mengen in der RT-PCR gemessen wurde. Somit ist die aus einer Hypertrophierung der Leberzellen resultierende Erhöhung der Synthese spezifischer mRNAs nicht erfasst. Neben Estrogenrezeptoren wurden in der Leber von oviparen Vertebraten auch Androgenrezeptoren nachgewiesen (Roy und Chatterjee 1983, Assisi et al. 2000). Bei männlichen Tieren besteht daher die Möglichkeit, dass eine exogen induzierte Vitellogenese durch eine vermehrte endogene Produktion von Androgenen inhibiert werden könnte. Ebenso sind adaptive Reaktionen hinsichtlich einer inhibierenden Wirkung durch mit dem Estrogenrezeptor interagierende Proteine denkbar, wie sie z.B. für Estrogen-kontrollierte Expression von Genprodukten im Gehirn bekannt sind (Gay et

al. 2000). Die kontinuierliche Expression der gemessenen Genprodukte über einen längeren Zeitraum in beiden Fischarten legt jedoch nahe, dass bei der estrogenen Regulation der Vitellogenese/Choriogenese keine adaptiven Prozesse in den Männchen möglich sind.

Vergleicht man die dosisabhängige Empfindlichkeit der beim Zebraquarienfisch verwendeten Markergene gegenüber 17α -Ethinylestradiol, so wird deutlich, dass die rasche Induktionsskinetik bereits nach einer kurzen Expositionsphase ein weitgehend konstantes Abbild des Expressionsmusters liefert. Dadurch bietet der Nachweis der Genexpression von Vitellogenin oder Estrogenrezeptor in diesen kleinwüchsigen Fischarten die Möglichkeit, ein vergleichsweise rasch durchführbares *In vivo*-Testsystem für die Beurteilung der relativen estrogenen Potenz von der endokrinen Wirksamkeit verdächtiger Verbindungen zu etablieren, die zum Teil erheblich von den *in vitro* bestimmten Ergebnissen abweichen kann (Breinholt et al. 2000).

Dosis-abhängige Expression der Estrogen-regulierter Gene in Medaka und Zebraquarienfisch im Vergleich

Im Vergleich der dosisabhängigen Regulation der Estrogen-kontrollierten Gene von Medaka und Zebraquarienfisch fallen zunächst die erheblichen Empfindlichkeitsunterschiede gegenüber 17α -Ethinylestradiol auf. Parallel zur Induzierbarkeit der Estrogen-regulierten Gene war auch eine erhöhte Letalität des Zebraquarienfisch gegenüber 17α -Ethinylestradiol festzustellen. Während beim Medaka toxische Konzentrationen von Ethinylestradiol erst mit $1 \mu\text{g/L}$ erreicht wurden (Scholz und Gutzeit nach persönlicher Kommunikation), tritt beim Zebraquarienfisch eine erhöhte Mortalität von adulten und juvenilen Individuen bereits ab einer Konzentration zwischen $85 - 100 \text{ ng/L}$ auf. Matthews und Zacharewski (2000) berichten von signifikanten Unterschieden in der Bindungsaffinität von PCBs an rekombinante Estrogenrezeptoren von Mensch, Regenbogenforelle und grünen Anolis (*Anolis carolinensis*). In diesem Zusammenhang könnten die Sensitivitätsunterschiede für 17α -Ethinylestradiol in einer strukturellen Variation zwischen den E/F-Domänen der Estrogenrezeptoren von Medaka und Zebraquarienfisch liegen. Andererseits müssen auch Unterschiede in der Metabolisierung der Xenobiotika in Betracht gezogen werden: 17α -Ethinylestradiol wird in menschlichen Hepatocyten hauptsächlich direkt in Sulfat- und Glucuronid-Konjugate transformiert (Li et al. 1999). Innerhalb der Säugetiere sind für die Aktivitäten der darin involvierten Phase 2-Biotransformations-Enzyme signifikante Speziesunterschiede beobachtet worden (Sharer et al. 1995); somit besteht die Möglichkeit, dass unterschiedliche Enzymeigenschaften auch bei den evolutionär weit voneinander getrennten Fischarten Medaka und Zebraquarienfisch bestehen.

Das Proestrogen Methoxychlor wird durch Demethylierung in der Leber in estrogenwirksame Metaboliten umgewandelt (Kupfer und Bulger 1987). Aus diesen Gründen ist eine Variation in der Biotransformationskapazität oder sogar der dabei verfolgten Reaktionswege die plausibelste Erklärung für die unterschiedliche estrogenen Aktivität von Methoxychlor in Zebraquarienfisch und Medaka. Prinzipiell wird Methoxychlor hauptsächlich durch das P450-Enzym CYP2 metabolisiert, jedoch bedarf es weiterer Aufklärung, inwieweit dieser Metabolismus durch verschiedene P450-Isoenzyme modifiziert wird (Schlenk et al. 1997). Da bei Fischen ein Mangel an Information über die Zusammensetzung der P450-Isoenzyme besteht und Unterschiede zu den bei Säugetieren bekannten Isoenzymformen zu erwarten sind (Monostory et al. 1996), sind weitere Forschungen über Spezies-spezifische Zusammen-

setzung und enzymatische Kapazität der P450-Isotypen bei Fischen notwendig, um nähere Kenntnis über potentiell unterschiedliche Metabolisierung, Bioakkumulation und Exkretion von Xenoestrogenen zu erlangen. In Bezug auf Nonylphenol, das bei Salmoniden rasch durch die P450-Isoenzyme CYP1A und CYP3A metabolisiert wird (Arukwe et al. 1997a, Coldham et al. 1998, Arukwe et al. 2000), lag der Induktionsbereich für die Estrogen-regulierten Gene in beiden Fischarten bei vergleichbaren Konzentrationen. Daher wird bereits bei Betrachtung des unterschiedlichen Reaktionsmusters von Medaka und Zebrafisch, das aufgrund der alternierenden höheren Sensitivität der einzelnen Testsubstanzen in den beiden Fischarten nicht auf Unterschiede in den Nachweisgrenzen zurückzuführen ist, bei 17 α -Ethinylestradiol, Nonylphenol und Methoxychlor deutlich, dass die Sensibilität einzelner Fischarten oder -familien von zahlreichen individuellen Parametern abzuhängen scheint.

Die Empfindlichkeitsunterschiede für die Testsubstanzen lagen jedoch nicht um mehrere Größenordnungen auseinander. Innerhalb einer Fischart lagen die Induktionsbereiche der verschiedenen gemessenen Estrogen-regulierten Gene sogar immer innerhalb enger Konzentrationsspannen. Alle gemessenen Genprodukte stehen jedoch in Zusammenhang mit dem Prozess der Oocytenreifung, so dass in anderen Bereichen der Zellphysiologie, in denen ein Einfluss von Estrogenen auf die Genregulation besteht, andere Konzentrationen wirksam sein können. Bindungsaffinitätsexperimente beim Adlerfisch (*Micropogonias undulatus*) ergaben signifikante gewebespezifische Unterschiede zwischen den Estrogenrezeptorpopulationen in Leber und Hoden (Loomis and Thomas 1999). Dies könnte durch eine gewebeabhängige Expression der Estrogenrezeptor α - und β -Subtypen verursacht worden sein, denn zwischen Estrogenrezeptor α und β wurden signifikante Abweichungen in ihrer Bindungsaffinität gegenüber verschiedenen Xenoestrogenen beobachtet (Pennie et al. 1998, Makela et al. 1999, Sun et al. 1999, Routledge et al. 2000, Jaimez et al. 2000), und beide weisen Unterschiede in ihrer gewebespezifischen Verbreitung auf (Enmark et al. 1997, Kuiper et al. 1997, Xia et al. 2000, Legler et al. 2000). Ebenso zeigen beide Rezeptorisoformen Unterschiede in ihrer Interaktion mit Coaktivatoren und Transkriptionsfaktoren (Kraichely et al. 2000, Routledge et al. 2000). In diesen Zusammenhang konnte für den aktiven Methoxychlormetaboliten 2,2-Bis-(*p*-hydroxyphenyl)-1,1,1-trichloroethan (HPTE) ein komplexes Reaktionsschema bei der Interaktion mit beiden Rezeptorisoformen festgestellt werden: während HPTE in transgenen HEPG2 Zellen als Rezeptoragonist von ER α wirkte, zeigte die Substanz eine antagonistische Wirkung gegenüber ER β (Gaido et al. 1999).

Neben den nukleären Estrogen-Rezeptoren wird jedoch auch von der Aktivierung Estrogen-regulierter Gene über Plasmamembranrezeptoren berichtet (Watson et al. 1995, Levin 1999, Watson et al. 1999, Baldi et al. 2000, Kuroki et al. 2000, Nadal et al. 2000, Stefano et al. 2000), so dass die Möglichkeit eines weiteren differenzierten Regulationsystems besteht. Es bedarf weiterführender Studien um zu klären, ob der Einfluss, den Estrogene auf die Prozesse der Sexualdifferenzierung (Feist und Schreck 1996) und Steuerung der Reproduktionsphysiologie (Dawson et al. 1998), Knochenmineralisierung (Migliaccio et al. 1995) sowie neuronalen Entwicklung (Beyer 1999) ausüben, in vergleichbaren oder individuellen Konzentrationsbereichen erfolgt.

Sensitivität der Expression der bearbeiteten Genprodukte in Medaka und Zebraquarienfisch im Vergleich zu anderen *In vivo*-Untersuchungen und Schadstoffkonzentrationen in der Umwelt

Für Nonylphenol, 17α -Ethinylestradiol und Methoxychlor liegen zahlreiche *In vivo*-Studien zur endokrinen Wirksamkeit in verschiedenen Organismen und Geweben vor, die auf Messung teilweise sehr unterschiedlicher Endpunkte beruhen. Zur folgenden Validierung der in der vorliegenden Arbeit erzielten Messergebnisse werden jedoch nur Daten herangezogen, die die Induktion vergleichbarer Biomarker auf Protein- oder mRNA-Ebene erfassen oder endokrine Reaktionen auf der Ebene des Gesamt-Organismus darstellen. Viele *In vivo*-Studien zur endokrinen Aktivität von Xenoestrogenen basieren auf abdominalen, intravenösen, subcutanen oder direkter Injektion der Testsubstanzen in das Zielgewebe (Purdom et al. 1994, Shelby et al. 1996, Odum et al. 1997, Christiansen et al. 1998a, Papoulias et al. 2000, Folmar et al. 2001). Eine direkte Injektion der Substanzen in den Organismus ist jedoch nicht mit der Aufnahme über natürliche Expositionswege vergleichbar, so dass diese Daten nur zu einem qualitativen Vergleich der Ergebnisse herangezogen werden können.

Lech et al. (1996) konnten eine Induktion der Vitellogenin-mRNA in Regenbogenforellen nach Exposition gegenüber Nonylphenol unter Durchflussbedingungen bis zur einer Konzentration von $10 \mu\text{g/L}$ nachweisen. Bei der Messung von Vitellogenin im Blutplasma der Regenbogenforelle wurde ein vergleichbarer LOEC von $20,3 \mu\text{g/L}$ bzw. $16 \mu\text{g/L}$ bestimmt (Jobling et al. 1996, Thorpe et al. 2000), was mit den LOECs der Vitellogenin-mRNA-Induktion in Zebraquarienfisch und Medaka ($8,5 - 25 \mu\text{g/L}$) übereinstimmt. Für den Medaka existiert eine Studie zur Induktion der Vitellogeninsynthese durch 4-Octylphenol, bei der ein LOEC von $41 \mu\text{g/L}$ für den Nachweis des Proteins im Blutplasma über Western-Blot angegeben wird (Gronen et al. 1999). Da das estrogene Potential von Octylphenol etwas über dem Wert für Nonylphenol liegt (Jobling et al. 1996, Pedersen et al. 1999), erscheint der Nachweis der Vitellogeninexpression auf mRNA-Ebene eine leicht erhöhte Sensitivität gegenüber dem Nachweis der Proteininduktion zu besitzen. Die Entwicklung von Testis-Ova und ein Rückgang des Befruchtungserfolgs konnten beim Medaka ab einer Nonylphenolkonzentration von 50 bzw. $66 \mu\text{g/L}$ beobachtet werden (Gray and Metcalfe 1997, Shioda und Wakabayashi 2000), so dass die Induktion der Vitellogeninsynthese durchaus mit der Ausprägung von populationsrelevanteren Schädigungen in Fischen korrelierbar erscheint.

Für 17α -Ethinylestradiol wurde für die Induktion der Vitellogeninsynthese in adulten Männchen, erfasst in Gesamtkörperhomogenaten durch ELISA, eine Nachweisgrenze von 20 ng/L angegeben (Andersen et al. 2000), was eine Zehnerpotenz unterhalb der Nachweisgrenze für die Vitellogenin-mRNA-Induktion von $2,5 \text{ ng/L}$ liegt. Eine erhöhte Mortalität wurde bei diesen Versuchen ab einer nominalen Konzentration von 50 ng/L festgestellt, der EC 50 lag wie in der vorliegenden Studie bei 100 ng/L , was auf eine Übereinstimmung der aktuellen Aquarienkonzentrationen schließen lässt. Eine hochsignifikante Verschiebung des Geschlechterverhältnisses trat bei Andersen und Mitarbeitern ab einer Konzentration von 10 ng/L Ethinylestradiol auf. Diese massive Störung für den Erhalt des Populationsgleichgewichts verläuft parallel zu der starken Expression von Vitellogenin- und Estrogen-Rezeptor-mRNA-Konzentration in der vorliegenden Arbeit, so dass auch bei dieser Fischart eine Korrelation zwischen Induktion der Vitellogeninsynthese und dem Auftreten von Reproduktionsstörungen wahrscheinlich erscheint. Während zur Wirkung von 17α -Ethinylestradiol auf die Vitellogenese des Medaka zur Zeit keine weiteren Daten vorliegen, beobachteten Scholz und Gutzeit (2000) eine vollständige Verweiblichung ab 100 ng/L 17α -Ethinylestradiol in Medakas, die ab der Befruchtung exponiert wa-

ren. Bei 10 ng/L traten keine Veränderungen im Geschlechterverhältnis auf, jedoch konnte in den Hoden eine schwache und variable Induktion der Aromatase-Genexpression sowie eine leichte Verminderung des gonadosomatischen Index bei weiblichen Fischen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sprechen parallel zur Induktion von Vitellogenin- und Estrogenrezeptorinduktion in der Leber für eine schwächere Sensitivität des Medakas für 17 α -Ethinylestradiol im Vergleich zum Zebraärbübling, der bei der Konzentration von 10 ng/L bereits eine massive Störung des endokrinen Gleichgewichts auf Populationsebene zeigt.

Für die Stimulation der Vitellogeninsynthese in der Regenbogenforelle werden Effektkonzentrationen zwischen 0,1 – 0,5 ng/L 17 α -Ethinylestradiol angegeben (Purdom et al. 1994, Sheahan et al. 1994). Allner et al. (1999) berichten von einem LOEC von 4 ng/L in juvenilen Regenbogenforellen, der allerdings über die wenig sensitive Methode der Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen ermittelt wurde. Ab einer Konzentration von 2 ng/L wurde eine 40 %ige Verminderung des Gonadosomatischen Indexes nach dreiwöchiger Belastung nachgewiesen (Jobling et al. 1996). Im Vergleich zu Zebraärbübling und Medaka scheint die Regenbogenforelle somit eine größere Empfindlichkeit für 17 α -Ethinylestradiol zu besitzen. Ebenso konnte bei der Regenbogenforelle auch eine höhere Sensitivität für 17 β -Estradiol und Octylphenol als bei Rotaugen (*Rutilus rutilus*), einem weiteren Vertreter der Cypriniden, beobachtet werden (Desbrow et al. 1998), so dass in dieser Fischart eine allgemein erhöhte estrogene Sensitivität zu bestehen scheint.

Aufgrund des Mangels an Daten zur Wirkung von 17 α -Ethinylestradiol auf die Reproduktion von Fischen liegt ein Vergleich mit dem natürlichen Hormon 17 β -Estradiol nahe. *In vivo* verläuft die Metabolisierung und Biodegradation des synthetischen Estrogens jedoch weit langsamer als die des natürlichen Hormons, da die Hydroxylierung des Moleküls zum entsprechenden Estronderivat durch Einführung der Ethinylgruppe am C₁₇-Atom verhindert wird (Reed et al. 1972, Ranney 1977, Desbrow et al. 1998). Dadurch verfügt 17 β -Estradiol *in vivo* über ein schwächeres estrogenes Potential als 17 α -Ethinylestradiol. Daraus erklärt sich auch die relativ hohe Nachweisgrenze von 8,9 bzw. 100 ng/L für die Induktion von Vitellogenin in der Regenbogenforelle nach Exposition gegenüber 17 β -Estradiol (Routledge et al. 1998, Thorpe et al. 2000). Ebenso liegen die Nachweisgrenzen für die Vitellogenininduktion durch Estradiol in Rotaugen (*Rutilus rutilus*) und Dickkopfelritze (*Pimephales promelas*) mit 100 ng/L bzw. 50 ng/L in einem relativ hohen Konzentrationsbereich (Routledge et al. 1998, Tyler et al. 1999). Auch auf Organismusebene wurden beim Zebraärbübling signifikante Unterschiede im estrogenen Potential zwischen synthetischem und natürlichem Estrogen beobachtet. Eine Verschiebung des Geschlechterverhältnis zugunsten von Weibchen wurde erst bei 100fach höheren Konzentrationen von 17 β -Estradiol als bei 17 α -Ethinylestradiol erreicht (Andersen et al. 2000), was für ein hohe Persistenz des synthetischen Estrogens 17 α -Ethinylestradiol *in vivo* spricht.

Die estrogene Wirkung von Methoxychlor *in vivo* ist sowohl von Säugetieren als auch Fischen bekannt (Welch et al. 1969, Bitman und Cecil 1970, Shelby et al. 1996, Schlenk et al. 1997), jedoch liegen zur Zeit nur wenige Daten zur Dosis-Wirkungsbeziehung dieses Proestrogens in Fischen vor. Hinzu kommt, dass in verschiedenen Untersuchungen teilweise gegensätzliche Beobachtungen zur endokrinen Aktivität dieser Substanz veröffentlicht wurden: Während Christiansen et al. (2000) nach dreimaliger intraperitonealer Injektion von bis zu 200 mg/kg Methoxychlor keine Induktion der Vitellogeninsynthese in adulten Regenbogenforellen entdecken konnten, berichten Thorpe et al. (2000) von einer Nachweisbarkeit von Vitellogenin ab der niedrigen Konzentration von 8,9 μ g/L in juvenilen Regenbogenforellen. Hinsichtlich der Ausprägung von Reproduktionsstörungen in männlichen Tieren

konnten wiederum keine Beeinträchtigung durch diese Substanz nachgewiesen werden (Krisfalusi et al. 1998). Die derzeit noch lückenhafte Datenlage zur estrogenen Aktivität von Methoxychlor in Fischen lässt somit ohne weitere Studien zur dosisabhängigen Wirkung dieser Verbindung keine Bewertung der in Medaka und Zebrafisch bestimmten Nachweisgrenzen zu.

Im Hinblick auf die Verwendung der Genexpression von Estrogenrezeptor, Vitellogenin oder Chorionogenin H in Zebrafisch oder Medaka als Biomarker für die Detektion estrogenen Aktivitäten im Freiland ist es sinnvoll aktuelle Analysedaten aus der Umwelt mit den Detektionsgrenzen für die drei eingesetzten Testsubstanzen zu vergleichen. Ferner bietet ein Vergleich zwischen Umweltdaten und Effektkonzentrationen aus Laborversuchen eine erste Möglichkeit, das Potential einer exogenen Belastung abzuschätzen, die negativ auf die Regulation der Reproduktionsphysiologie von Fischen einwirken kann.

Im Vergleich zu DDT weist Methoxychlor in der Umwelt keine hohe Persistenz auf und wird von Säugetieren und Insekten schnell metabolisiert und ausgeschieden (Kapoor et al. 1970). In Deutschland konnte folglich in den 1990er Jahren keine Belastung von Oberflächengewässern mit dieser Verbindung nachgewiesen werden (Gülden et al. 1997), wobei jedoch umfassende Studien zur Umweltbelastung mit Methoxychlor fehlen (Cummings et al. 1997, Bätcher et al. 1999).

Beim Vergleich der in der Umwelt gemessenen Konzentrationen von Alkylphenolen sowie von natürlichen und synthetischen Estrogenen fallen zunächst hohe nationale und lokale Schwankungen der Konzentrationen in Kläranlageneffluaten und Oberflächengewässern auf. In Mittel- und Nordeuropa liegen die Konzentrationen von Nonylphenol und Derivaten in Kläranlagenausläufen im Bereich von 0,3 – 5 µg/L; in Oberflächengewässern wurden in Folge des Verdünnungseffekts nur Konzentrationen im Nanogramm-Bereich gefunden (Larsson et al. 1999, Ahel et al. 2000, Körner et al. 2000), welche damit weit unter den Effektkonzentrationen für eine Induktion der Expression von Vitellogenin und Estrogenrezeptor in Zebrafisch und Medaka liegen. In den USA und Kanada liegen die Abwasserkonzentrationen allgemein im Bereich von 0 – 70 µg/L, wobei ein isolierter Spitzenwert von 6300 µg/L auftrat (Hale et al. 1999, Lee et al. 1999). Von asiatischen Oberflächengewässern sind Alkylphenolbelastungen zwischen 0,1 – 3,1 µg/L bekannt (Ding et al. 2000, Tsuda et al. 2000), was auf Abwasserkonzentrationen schließen lässt, die deutlich über den aus Europa und Nordamerika bekannten Werten liegen. In Großbritannien liegen die Werte für die Alkylphenolbelastung ebenfalls erheblich über dem europäischen Mittel. In Ausläufen von Kläranlagen wurden Gesamtkonzentrationen von Nonylphenolen und Nonylphenolethoxylaten von bis zu 1883 µg/L gemessen, so dass in Oberflächengewässern Spitzenwerte von bis zu 180 µg/L Nonylphenol erreicht wurden (Blackburn und Waldock 1995, Pirie et al. 1996). Auf Basis dieser Daten erscheint für Mitteleuropa und Nordamerika eine Gefährdung des Reproduktionserfolgs von Fischen durch Alkylphenole weitgehend auszuschließen zu sein, da die Bioakkumulationsrate dieser Verbindungen ebenfalls gering ist (Liber et al. 1999). Auch die Werte in asiatischen Oberflächengewässern reichen isoliert betrachtet noch nicht für eine endokrine Gefährdung von Fischpopulationen aus. Bei Standorten in räumlicher Nähe zu stark verschmutzten Kläranlagenausläufen sind jedoch Konzentrationen möglich, die zum Teil einen exogenen Einfluss auf die Reproduktionsphysiologie von Fischen haben können. Eine Ausnahme stellen die hohen Alkylphenolbelastungen in Großbritannien dar. Hier überschreiten die in der Umwelt gefundenen Konzentrationen die für eine Störung die in Laborversuchen nachgewiesenen Konzentrationsgrenzen lokal, so dass die estrogenen Belastungen von Oberflächengewässern in diesem Fall zumindest teilweise auf die Verwendung von Alkylphenolen zurückgeführt werden kann. In Übereinstimmung mit der hohen Um-

weltbelastung mit Alkylphenolen in Großbritannien wurden auch in Feldstudien Hinweise für eine lokale Beeinträchtigung der Geschlechtsentwicklung in Plötzen und Fludern gefunden (Jobling et al. 1998b, Allen et al. 1999).

Aufgrund der anthropogenen Ausscheidung und der hohen estrogenen Aktivität stellen natürliche und künstliche Estrogene in dicht besiedelten Regionen ein weiteres endokrines Gefahrenpotential dar (Shore et al. 1993, Larsson et al. 1999). Für die natürlichen Estrogene 17 β -Estradiol und Estron liegen die in Kläranlagenausläufen nachgewiesenen Konzentrationen meist im Bereich zwischen 1 – 10 ng/L, wobei das in seinem endokrinen Potential schwächere Estron allgemein in den höheren Konzentrationen vorliegt (Kalbfus et al. 1997, Belfroid et al. 1999, Larsson et al. 1999, Ternes et al. 1999, Baronti et al. 2000). Allgemein konnte eine Belastung mit Estrogenen nicht in allen betesteten Ausläufen festgestellt werden, jedoch wurden als Maxima auch Werte von bis zu 15 ng/L 17 β -Estradiol und 70 ng/L Estron gemessen (Belfroid et al. 1999, Ternes et al. 1999). In kanadischen Kläranlagen lag der Median für die Belastung der Eluate mit Estron bei 3 ng/L und für 17 β -Estradiol bei 6 ng/L, wobei für beide Verbindungen Maxima von über 40 ng/L gefunden wurden (Ternes et al. 1999). Im Gegensatz zu den Alkylphenolen liegen die Belastungen von Kläranlagenausläufen in Großbritannien ebenfalls in vergleichbarem Rahmen; hier wurden Konzentrationen von 3 – 48 ng/L 17 β -Estradiol und 1 – 76 ng/L Estron nachgewiesen (Desbrow et al. 1998). Trotz der erhöhten Persistenz von 17 α -Ethinylestradiol in Kläranlagen liegen die Werte in Kläranlagenausläufen innerhalb Europas häufig unterhalb der Nachweisgrenzen (Desbrow et al. 1998, Kalbfus et al. 1997, Merz et al. 1998, Belfroid et al. 1999). Vereinzelt werden jedoch auch Konzentrationen im Bereich von 4 - 15 ng/L erreicht (Larsson et al. 1999, Desbrow et al. 1998, Ternes et al. 1999). In Kanada scheinen durchschnittlich höhere Konzentrationen von 17 α -Ethinylestradiol aufzutreten (9 ng/L), so dass Spitzenwerte bis zu 42 ng/L in Ausläufen von Kläranlagen nachweisbar waren (Ternes et al. 1999). In Anbetracht des Verdünnungseffekts liegen die Konzentrationen der natürlichen und synthetischen Estrogene meist unterhalb der Nachweisgrenzen der Analytik, vereinzelt konnten jedoch in einer italienischen Studie in der Summe Konzentrationen im Bereich von 1 – 2 ng/L nachgewiesen werden (Baronti et al. 2000). Geht man von einer schwerwiegenden Verschiebung des Geschlechterverhältnis und einer verringerten Fertilität auf der Basis der für den Zebraärbüchling vorliegenden Daten von 10 ng/L 17 α -Ethinylestradiol aus, so werden kritische Konzentrationen höchstens lokal im Einzugsgebiet von stark belasteten Kläranlagen erreicht, so dass eine populationsgefährdenden estrogenen Belastung, die von einer einzelnen Substanz oder Stoffgruppe der bisher bekannten Verbindungen mit estrogenen Wirkung ausgeht, innerhalb Europas nicht zu erwarten ist. In diesem Sinne ist das Erreichen einer kritischen estrogenen Belastung in der Umwelt jedoch durch kumulative (Knudsen et al. 1998, Sonnenschein und Soto 1998) oder potentiell synergistische (Vonier et al. 1996, Arnold et al. 1997) Effekte eines Substanzgemischs aus mehreren Estrogen-wirksamen Verbindungen denkbar, die jedoch, wie aus den Stichproben von Kläranlagenausläufen des Schweizer Mittellandes ersichtlich, durchaus zur Induktion von Vitellogenin in Hepatocytenprimärkulturen führen können. Vor allem in kleinen Flussläufen, bei denen 50 % oder mehr des abfließenden Wasserkörpers aus Abwasser bestehen können (Körner et al. 2000), sind potentiell populationsbelastende estrogenen Effekte zu erwarten. Da eine massive Induktion der Estrogenrezeptor- und Vitellogeninexpression im gleichen Konzentrationsbereich beobachtet werden konnte, mag der Nachweis hoher Vitellogeninexpressionraten in männlichen Fischen in der Umwelt als ein Indikator für die Identifikation hoch belasteter Standorte dienen.

4.3.3 Wirkung von 17 α -Ethinylestradiol auf den Hoden adulter Zebrabärblinge

Sowohl hinsichtlich der Expression reproduktionsrelevanter Gene als auch nach dem ultrastrukturellen Erscheinungsbild gleicht die Leber adulter, männlicher Zebrabärblinge nach Estrogeneinwirkung der weiblicher Individuen während der Vitellogenese. Dabei zeigen die Leberzellen der Männchen trotz der hohen Dosis von 25 ng/L keine ultrastrukturellen Veränderungen, die auf eine toxische Wirkung von Ethinylestradiol schließen lassen. Dagegen konnte eine spekulative Feminisierung des Hodens, wie sie im Medaka beobachtet wurde (Shibata und Hamaguchi 1988), auf keiner Untersuchungsebene nachgewiesen werden. Während Shibata und Hamaguchi eine Bipotentialität der Spermatogonien vom B-Typus, die sich nach 17 β -Estradiol-Exposition partiell zu Oocyten ausdifferenzierten, feststellten, waren bei den Männchen des Zebrabärblings nach der dreiwöchigen Exposition gegenüber 17 α -Ethinylestradiol ausschließlich pathologische Merkmale innerhalb des Hodengewebes nachzuweisen, die sich in einer Autolyse des Zellverbandes äußerte. Vergleichbare Resultate wurden auch bei der Dickkopfelritze (*Pimephales promelas*) und der Aalmutter (*Zoarces viviparus*) gefunden (Christiansen et al. 1998b, Miles-Richardson et al. 1999a). Im Hinblick auf diese Ergebnisse scheinen geschlechtsreife männliche Zebrabärblinge unter Estrogeneinwirkung kein Potential zu einer Reorganisation ihrer Gonaden zu einer ovarienartigen Struktur zu besitzen. Gimeno et al. (1998a) konnten jedoch bei adulten männlichen Karpfen, die mit 17 β -Estradiol belastet waren, die Bildung von Ovo-Testes beobachten, nachdem der Hoden vollständig rückgebildet war. Eine ähnliche Neuorganisation der Gonade wäre auch für den Zebrabärbling bei einer verlängerten Expositionszeit denkbar und bedarf weiterführender Studien.

Bei einer embryonalen bzw. juvenilen Exposition von Estrogenen ist dagegen in allen eierlegenden Vertebraten eine vollständige Geschlechtsumwandlung oder Feminisierung der Gonade möglich (Pandian 1993, Gimeno et al. 1998b, Hartley et al. 1998, Berg et al. 1999, Willingham und Crews 1999, Edmunds et al. 2000, Papoulias et al. 2000), was die Existenz von Estrogen-sensitiven Zeitfenstern verdeutlicht, innerhalb derer eine exogene Belastung besonders kritisch ist (Villalpando und Merchant-Larios 1990). Die Bestimmung der Zona pellucida-Protein-Induktion in den Gonaden als Biomarker für die Präsenz von Xenoestrogenen bei Zebrabärblingen erscheint daher nur bei juveniler Exposition während der Phase der Geschlechtsdifferenzierung sinnvoll. Während dieser Entwicklungsphase können sich einzelne Individuen zu Hermaphroditen differenzieren, die Oocyten innerhalb einer Gonade mit einer makroskopisch hodenartigen Struktur beherbergen (Gray und Metcalfe 1997). In diesem Fall besteht die Möglichkeit, ein Auftreten derartiger Mischgonaden über die Expression des ZP2-Gens nachzuweisen und so die extrem arbeitsaufwendige histologische Bearbeitung der Gonaden zu ersetzen. Für eine Beurteilung destruktiver Einflüsse von Estrogenen auf die Funktion des Hodens bedarf es dagegen der Entwicklung von Biomarkersystemen, welche die Abnahme der Expression von Genen bestimmen, die für den Erhalt der Hodenphysiologie charakteristisch sind. In diesem Zusammenhang wäre die Messung der Abnahme der Expression von Sox 9 (Takamatsu et al. 1997), Protamin (Tamura et al. 1994), P450-17 α -Hydroxylase, C17, C20-Lyase, dem steroidogenen Faktor (Saunders et al. 1997) oder DMRT1 (Marchand et al. 2000) denkbar. Dabei ist jedoch zu beachten, dass niedere Estrogenkonzentrationen zu einer Stimulation der Hodenfunktionen führen können (Miura et al. 1999, Ebling et al. 2000). *In vitro*-Test Systeme, die die Funktionalität von Spermien erfassen können (Hinsch et al. 2000), mögen hierbei zusätzlichen Aufschluss über den Einfluss von Xenoestrogenen auf den Reproduktionserfolg geben.

4.3.4 Expression und Induzierbarkeit reproduktionsrelevanter Gene im Verlauf der Entwicklung des Zebrafischlings

Die genetische Geschlechtsdeterminierung bei Fischen folgt keinem allgemeinen Muster: Sowohl männliche (XX/XY) als auch weibliche Heterogamete (ZZ/ZW) sind bekannt, jedoch existieren auch artspezifische Modelle, welche die Beteiligung von mehreren Sexchromosomen, von Autosomen oder eine polygenetische Geschlechtsdetermination einschließen (Baroiller et al. 1999). Neben genetischen Einflüssen ist die Ausprägung des sexuellen Phänotyps bei Fischen jedoch durch die Applikation von Steroidhormonen während eines engen Zeitfensters in der Entwicklung beeinflussbar (Krisfalusi und Cloud 1999). Aus diesem Grund ist es von Bedeutung zu wissen, wann Estrogenrezeptoren während der Entwicklung vermehrt exprimiert werden und als Vermittler der Estrogen-gesteuerten Entwicklungsvorgänge dienen können. Ferner gibt die Aktivität ovarienspezifischer Gene wie ZP2 Aufschluss über den Beginn des Auftretens funktional ausdifferenzierter Reproduktionsgewebe. Takahashi (1977) beschreibt Anzeichen einer beginnenden sexuellen Differenzierung beim Zebrafischling ab einem Alter von 10 Tagen, da zu diesem Zeitpunkt zum ersten Mal Keimzellen mit meiotischen Teilungen beginnen, wobei Wachstumsrate und Ernährungszustand keinen Einfluss auf die Kinetik der Sexualentwicklung zeigten. Parallel zu diesen Beobachtungen konnte zu dieser Zeit (9 Tage) die beginnende verstärkte Expression von ER α und ER β nachgewiesen werden, was für eine Beteiligung von Estradiol an der Induktion dieser Differenzierungsphase spricht. Bei Regenbogenforelle und Tilapia konnte vor dem Beginn der Geschlechtsdifferenzierung eine hohe P450-Aromataseexpression in den weiblichen Gonaden nachgewiesen werden, was zeigt, dass unmittelbar vor der Differenzierungsphase vermehrt endogene Estrogene synthetisiert werden (Guiguen et al. 1998, 1999). Eine Unterdrückung der Aromatasefunktion während der Juvenilentwicklung führt dementsprechend bei vielen der sogenannten „niederen“ Vertebraten zu einer Vermännlichung der Brut, da sich die gebildeten Steroide als Testosteron anreichern (Yu et al. 1993, Piferrer et al. 1994, Richard-Mercier et al. 1995, Shimada et al. 1996). Somit scheint die Präsenz von Estrogenen bei eierlegenden Vertebraten auch unter natürlichen Bedingungen die Hauptrolle in der Differenzierung der Gonadenanlagen zu Ovarien zu spielen.

Verfolgt man den Verlauf der Gonadenentwicklung des Zebrafischlings im weiteren Zeitverlauf histologisch, so kommt es im Alter von 20 Tagen bei 50 % der Individuen zu einer Neuorganisation der zunächst bei allen als Ovar ausgebildeten Gonade (Takahashi et al. 1977). In den Männchen werden von diesem Zeitpunkt an Oocyten in den Gonaden rückgebildet, und eine Differenzierung von Stromazellen zu Spermatogonien wird eingeleitet. Interessanterweise konnte mit Ausnahme der ersten 3 Tage nach der Befruchtung bis zu einem Alter von 22 Tagen keine Präsenz der ZP2-mRNA, dessen Translationsprodukt am Aufbau des Echorions beteiligt ist (Hinsch und Hinsch 1999, Wang und Gong 1999), in den juvenilen Zebrafischlingen beobachtet werden. Somit erscheint das bis dahin vorliegende Ovar sowohl in genetischen Männchen als auch Weibchen keine vollständige funktionale Genaktivität zu besitzen. Bei Säugetieren sind die Zona pellucida-Proteine auch nach der Befruchtung unter anderem am Schutz des Eies vor Beschädigung beteiligt (Sinowatz et al. 2001), so dass das Auftreten der ZP2-mRNA im Embryo vielleicht einer noch andauernden Neusynthese dieses Proteins dient. Erst nach der Entwicklungsphase, die zur endgültigen Differenzierung in Weibchen und Männchen führt, scheinen nach diesen Ergebnissen voll funktionsfähige Gonaden in beiden Geschlechtern vorzuliegen. In Fischarten, bei denen die Chorionproteine in der Leber synthetisiert werden, setzt die Chorionogenese zeitlich vor der Vitellogenese ein (Celius und Walther 1998b). Trotz der örtlichen Trennung

der Synthese von Chorionproteinen und Vitellogeninen im Zebra­bärbling scheint dieses zeitliche Ex­pressionsmuster konserviert zu sein, da während der ersten 29 Tage der Entwicklung des Zebra­bärblings keinerlei Vitellogeninexpression feststellbar war. Da die Entwicklung des Hoden erst nach ca. 40 Tagen abgeschlossen ist (Takahashi 1977), lässt die spät einsetzende Vitellogenese in den Weibchen eine zeitlich parallele Reifung von Hoden und Ovarien vermuten, so dass die Fertilität innerhalb der aufwachsenden Fischpopulation in beiden Geschlechtern gleichzeitig erreicht wird.

Neben ihrer Beteiligung an der Geschlechtsdifferenzierung üben Estrogene auch Funktion bei der Entwicklung von Skelett (Migliaccio et al. 1995, Bodine et al. 1998, Urusitani et al. 1999), Gehirn und Nerven (Lustig et al. 1994, Toran-Allerand 1996, Simerly et al. 1997, Beyer 1999) und des Immunsystems bei Säugetieren (Rijhsinghani et al. 1996, Yellayi et al. 2000) aus. Aus diesem Grund wurde im Zebra­bärbling die Ansprechbarkeit der Estrogen-gesteuerten Genregulation während der Larvalentwicklung überprüft. Die Induktion der beiden Estrogenrezeptortypen sowie von Vitellogenin durch 17α -Ethinylestradiol veranschaulicht, dass funktionelle Estrogenrezeptoren bereits während dieser frühen Entwicklungsphasen vorliegen müssen. Wie auch bei Hühnern ist hierbei die Ansprechbarkeit der Vitellogeningene nicht unterdrückt (Evans et al. 1988), was bedeutet, dass hohe punktuelle Estradioldosen zu einer vollkommenen Veränderung des Genexpressionsmusters während der Entwicklung führen können. Zusätzlich bietet die Induzierbarkeit dieses Gens die Möglichkeit, dass dieser Biomarker bereits bei Larven für den Nachweis estrogener Belastung eingesetzt werden kann. Die Existenz und Induzierbarkeit von Estrogenrezeptoren im Zebra­bärbling zeigt jedoch auch, dass Estrogen-regulierte Signalwege eventuell bereits während früher Entwicklungsphasen existieren, was mit den Beobachtungen von Urusitani et al. (1999) übereinstimmt, die eine Expression des Estrogenrezeptor α im Killifisch (*Fundulus heteroclitus*) von Beginn der Neurulation und eine Induzierbarkeit durch 17β -Estradiol bei frühesten Entwicklungsstadien nachweisen konnten. Auch in Mäusembyonen konnte eine weite Verbreitung von Estrogenrezeptor α und Estrogenrezeptor β in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden (Lemmen et al. 1999), was verbreitete Funktionen von Estrogenen während der Embryonalentwicklung nahelegt. Erweist sich die Vitellogenese in Fischen aber während der gesamten Embryonalentwicklung als induzierbar, so bedeutet dies, dass die natürliche estrogene Regulation innerhalb des Embryos bei Estradiolkonzentrationen liegen sollte, die unterhalb dieser Induktionsschwelle liegen. Ein Hinweis auf eine hormonelle Wirkung von Estradiol in äußerst tiefen Konzentrationen geben die Arbeiten von Christian und Gillies (1999), die eine Beeinflussung der Wachstums dopaminerger Neuronen bereits ab einer Konzentration von 10^{-14} M 17β -Estradiol oder 10^{-11} M Octylphenol nachweisen konnten. Somit erscheint eine estrogene Beeinflussung der neuronalen Entwicklung bereits durch Estradioldosen möglich, die keinen Einfluss auf die Reproduktion haben, jedoch in einer Veränderung des Sexualverhaltens resultieren könnten (Arnold et al. 1993, Ogawa et al. 1997, Bayely et al. 1999). Ebenso ist der Einfluss einer embryonalen Exposition auf die Entwicklung maligner Tumore weitgehend ungeklärt (Jones und Hajek 1995). Aus diesem Grund erscheint ein weiteres Studium der Estrogen-gesteuerten Expression von Genen während der Embryonalentwicklung zum tieferen Verständnis des von einer exogenen endokrinen Belastung ausgehenden Gefahrenpotentials unumgänglich.

5. Ausblick auf weiteren Forschungsbedarf

Die Messung der Genexpression von Vitellogeninen, Estrogenrezeptoren oder auch Choriogeninen in Hepatocytenprimärkulturen und der Leber intakter Organismen stellt ein Biomarkersystem dar, das zwischen den hochproduktiven, aber artifiziellen Reportergensystemen und der aufwendigen Erfassung von Reproduktionsstörungen auf der Populationsebene vermitteln kann. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass die *in vitro* und *in vivo* erzielten Ergebnisse für die Vitellogenin- und Estrogenrezeptorexpression im relativen estrogenen Potentials weitgehend übereinstimmen, wobei jedoch artspezifische Reaktionsunterschiede gegenüber einzelnen Substanzen auftreten können (Tab. 5.1, Desbrow et al. 1998). Die Artspezifität endokriner Mechanismen, die auch bei Säugetieren beobachtet wurde (vom Saal et al. 1994, Freeman 1994), erfordert eine vorsichtige Interpretation der Ergebnisse aus Laborversuchen mit nur einem Modellorganismus, wenn es gilt, eine Extrapolation auf die Gefährlichkeit einer Substanz in der Umwelt durchzuführen (Barton und Andersen 1998). Allgemein ist jedoch festzustellen, dass die *in vitro* nachweisbaren Induktionsgrenzen erst oberhalb der *in vivo* beobachtbaren Effektkonzentrationen liegen. Sowohl im Vergleich zu den in dieser Arbeit präsentierten Induktionsgrenzen bei Zebrabärbling und Medaka als auch zur beobachteten estrogenen Sensitivität der Regenbogenforelle aus anderen *In vivo*-Untersuchungen (Lech et al. 1996), liegen die in der Hepatocytenprimärkultur erzielten Nachweisgrenzen bei geringerer Sensitivität. Aus diesem Grund erscheint eine weitere Verbesserung der Kulturbedingungen für die Etablierung von stabilen Hepatocytenprimärkulturen hinsichtlich ihres Bedarfs an Cofaktoren und Spurenelementen, aber auch der Art und Gestalt des Trägermaterials notwendig, um zu einer verbesserten Erhaltung ihrer physiologischen Funktionen zu gelangen (siehe Berry und Edwards 2000). Eine Alternative zur Hepatocytenprimärkultur mag in diesem Sinn in der Organkultur von Leberschnitten liegen, in der die einzelnen Zellen nicht aus ihrer natürlichen Umgebung herausgelöst werden und daher in Interaktion mit verschiedenen Zellen treten können (Parrish et al 1995).

Tab. 5.1: LOECs der Vitellogenin- und Estrogenrezeptor-Induktion nach (Xeno-)Estrogenexposition

	Gesamt-RNA	Vitellogenin*	Estrogenrezeptor α
17α-Ethinylestradiol			
Regenbogenforelle – <i>in vitro</i>	nicht bestimmt	30 ng/L	300 ng/L
Zebrabärbling – <i>in vivo</i>	8,5 ng/L	2,5 ng/L	2,5 ng/L
Medaka – <i>in vivo</i>	nicht messbar	85 ng/L	85 ng/L
Nonylphenol			
Regenbogenforelle – <i>in vitro</i>	nicht bestimmt	220 μ g/L	2200 μ g/L
Zebrabärbling – <i>in vivo</i>	85 μ g/L	25 μ g/L	25 μ g/L
Medaka – <i>in vivo</i>	nicht messbar	25 μ g/L	25 μ g/L
Methoxychlor			
Regenbogenforelle – <i>in vitro</i>	nicht bestimmt	346 μ g/L	3460 μ g/L
Zebrabärbling – <i>in vivo</i>	nicht messbar	250 μ g/L	250 μ g/L
Medaka – <i>in vivo</i>	nicht messbar	8,5 μ g/L	25 μ g/L

* die dargestellten LOECs stehen beim Zebrabärbling für die Induktion von Vg1.

Mit dieser Technik wurden bereits erste Studien zur Vitellogenininduktion von Xenoestrogenen übernommen, jedoch besteht noch ein erheblicher Mangel an vergleichbaren Daten, um die Anwendbarkeit dieser Methode für die Untersuchung estrogenen Verbindungen sinnvoll bewerten zu können (Schmieder et al. 2000, Shilling und Williams 2000).

Im Freiland werden Organismen komplexen Stoffgemischen aus zahlreichen Substanzen eines sehr unterschiedlichen Wirkungsspektrums ausgesetzt (Suntio et al. 1988, Whittle al. 1993), welche die Homöostase eines Organismus in unterschiedlicher Weise beeinflussen können. So wirken Schwermetalle wie Cadmium inhibierend auf Estrogenrezeptor-vermittelte zelluläre Prozesse (Olsson et al. 1995, Guevel et al. 2000, Hwang et al. 2000); ebenso scheint eine antagonistische Wirkung von AH-Rezeptoren an Estrogen-responsiven Elementen zu bestehen, die sich in einer Antiestrogenizität von PAHs und Dioxinen ausdrückt (Kohn et al. 1993, Anderson et al. 1996b, Safe et al. 1998b, Chaffin et al. 1999, Wormke et al. 2000). Aber auch allgemein können toxische Substanzen über die Induktion von Cortisol als Stressantwort (Wendelaar Bonga 1997, Dethloff et al. 1999) antagonistische Effekte auf Estrogen-gesteuerte Reproduktionsbiologie ausüben (Carragher et al. 1989, Teitsma et al. 1998, Pankhurst und van der Kraak 2000). In diesem Zusammenhang stellen Hepatocytenprimärkulturen eine sinnvolle Alternative zu aufwendigen *In vivo*-Untersuchungen dar und können Aufschluss über die Interaktion verschiedener Regulationssysteme geben (Anderson et al. 1996a, Lethimonier et al. 2000, Navas und Segner 2000). Auch wenn die Standardisierbarkeit, die geringere Sensitivität und der hohe Arbeitsaufwand im Vergleich zu Reporterassays gegen eine Verwendung von Hepatocytenprimärkulturen als Screeningsysteme für estrogenen Substanzen spricht, stellen Primärkulturen von Hepatocyten aufgrund der zentralen Rolle der Leberzellen im Stoffwechsel eines Organismus im Hinblick auf die Erforschung prinzipieller Mechanismen in der Estrogen-gesteuerten Regulation hochwertige Versuchssysteme dar und können so zur Aufklärung des komplexen Zusammenspiels zwischen den verschiedenen in der Leber aktiven Hormonsystemen *in vivo* beitragen.

Zur Klärung eines potentiellen estrogenen Gefahrenpotentials in der aquatischen Umwelt erscheinen zum einen grundlegende Untersuchungen zur Existenz von erhöhten Vitellogeninwerten in männlichen Fischen und dem Auftreten von Intersexen im Freiland notwendig, da zur Zeit, mit Ausnahme von Großbritannien, keine überregionalen Feldstudien vorliegen und chemische Analysen nicht das gesamte Spektrum potentiell Estrogen-wirksamer Substanzen erfassen können, die infolge additiver oder synergistischer Wirkung schädigende Konzentrationen erreichen könnten (Kortenkamp und Altenburger 1999). In diesem Zusammenhang ist es notwendig, die Auswirkungen zeitlich intermittierender Belastungen zu untersuchen, die durch punktuelle Belastung Estrogen-responsiver Entwicklungsabschnitte Auswirkungen auf Gonadenentwicklung und Geschlechterverhältnis haben mögen (Tyler et al. 1998).

Zum anderen herrscht weiterhin ein Mangel an Untersuchungen zur Veränderung des allgemeinen Genexpressionsmusters durch Estrogeneinwirkung. Mit Ausnahme ihrer Rolle bei der Kontrolle der Reproduktionsfunktionen und der Differenzierung der Gonaden (Danzo 1998, Toppari und Skakkebaek 1998) besteht zur Zeit noch weitgehende Unkenntnis über weitere Funktionen, die diese klassischen Sexualhormone ausüben. Dennoch lässt die fast ubiquitäre Verbreitung verschiedener Estrogenrezeptorisoformen im Körper eine Beteiligung an der Kontrolle weiterer Körperfunktionen vermuten (Dechering et al. 2000), die nicht primär im Dienst der Reproduktion stehen. In diesem Zusammenhang wächst die Zahl an Publikationen, die eine Beteiligung von Estrogenen an der

Differenzierung des Gehirns und damit auch der Ausprägung des Verhaltens beschreiben (Shughrue und Merchenthaler 2000, Palanza et al. 1999). Ebenso wurde die grundlegende Beteiligung von Estrogenen an der Entwicklung und dem Aufbau des Skeletts nachgewiesen (Rickard et al. 1999). Allgemein besteht dabei die Meinung, dass eine Störung estrogener Kontrollsysteme während der Entwicklung zu einer weitreichenden Schädigung eines Organismus führen und bereits bei niedrigeren Effektkonzentrationen ausgelöst werden kann (Bigsby et al. 1999).

Zebraäbrbling und Medaka stellen aufgrund ihrer schnellen Reproduktion und raschen Entwicklung weitverbreitete Modellorganismen in der Entwicklungsbiologie dar, und es laufen aus diesen Grund bei beiden Fischarten Genomprojekte, die in naher Zukunft abgeschlossen sein werden (Dooley und Zon 2000, Ishikawa 2000). Somit existiert bei beiden Fischarten die molekulare Basis, um Gene mit estrogener Regulation identifizieren zu können. Durch Behandlung der Fische mit den Aromataseinhibitoren Fadrozol oder 1,4,6-Androstatrien-3-17-dion (ATD) ist es möglich, die endogene Estrogensynthese zu unterdrücken und dadurch gezielt eine exogene Stimulation der Expression Estrogen-regulierter Gene auslösen zu können. Über die Technik der Subtractive Hybridization oder der Differential Display RT-PCR besteht so die Möglichkeit, Estrogen-stimulierbare Genprodukte während unterschiedlicher Entwicklungsstufen zu isolieren und durch Vergleich mit EST- oder Genomdatenbanken zu identifizieren, um zu einer tieferen Verständnis über die Beteiligung estrogener Regulationssysteme an Entwicklung und Homöostase des Organismus zu gelangen.

6. Zusammenfassung

Die Bewertung des Gefahrenpotentials Estrogen-wirksamer Verbindungen in der Umwelt erfordert eine genaue Kenntnis über Schadstoffverbreitung, -konzentration und Wirkungsstärke hormonell aktiver Substanzen. Aus diesen Gründen werden *In vitro*-Testsysteme benötigt, die die Aufarbeitung einer großen Probenzahl gewährleisten können. Allerdings ergibt die alleinige Erfassung eines estrogenen Potentials in Abwässern oder Sedimenten keinen Aufschluss über die Beeinträchtigung der Hormonphysiologie eines intakten Organismus, so dass *In vitro*-Detektionssysteme hinsichtlich ihrer Aussagekraft validiert werden müssen.

Hepatocytenprimärkulturen stellen aufgrund ihrer vergleichsweise hohen physiologischen Kapazität ein Bindeglied zwischen auf Hefezellen oder Carcinomzelllinien basierenden Reporterassays und intakten Organismen dar. Daher können diese *In vitro*-Systeme für die Untersuchung prinzipieller Zusammenhänge zur Regulation Estrogen-kontrollierter Transkription und Translation sowie Metabolismusstudien eingesetzt werden. Vitellogenin und Estrogenrezeptoren stehen in der Leber von Fischen unter estrogener Kontrolle und werden in männlichen Individuen nicht bzw. nur gering exprimiert. Durch exogene Applikation Estrogen-wirksamer Stoffe wird jedoch auch bei Männchen eine Expression der Vitellogenin- und Estrogenrezeptorgene induziert, so dass beide Gene als Marker für estrogene Wirkmechanismen dienen können. Unter dieser Voraussetzung wurde in der vorliegenden Dissertation ein Nachweissystem für die Expression dieser beiden Gene in Hepatocytenprimärkulturen aus der Regenbogenforelle entwickelt, die wegen ihrer Größe und Leberanatomie gut für die Isolation von Leberzellen geeignet ist. Zur Detektion beider Gene wurden sowohl ein Northern Dot Blot/Ribonuklease Protection Assay als auch ein RT-PCR-Verfahren in Bezug auf Sensitivität und Kapazität zur Darstellung von quantitativen Dosis-Effekt-Beziehungen erprobt. Nach Adaption der Kulturbedingungen hinsichtlich Mediumsupplementa-tion, Inkubationstemperatur und Expositionsdauer waren beide Detektionssysteme in der Lage, Dosis-Wirkungsbeziehungen mit vergleichbarer Empfindlichkeit darzustellen. In einem ersten Bewertungsansatz wurde das estrogene Potential ausgewählter bekannter Xenoestrogene in folgender abnehmender Reihenfolge erfasst: 17α -Ethinylestradiol > 17β -Estradiol > Genistein > Methoxychlor > Nonylphenol > Bisphenol A. Ebenso konnte in einem Stichprobentest bei 6 Abwässern aus dem Schweizer Mittelland die Anwendbarkeit der Methode auf komplexe Lösungen nachgewiesen werden.

Für eine grundlegende Beurteilung des estrogenen Potentials einer Substanz sind jedoch *In vivo*-Untersuchungen unerlässlich, da nur die Belastung eines intakten Organismus Aufschluss über Bioakkumulation, metabolische Umsetzung und Exkretion geben kann. Um *In vivo*-Studien unter Laborbedingungen durchführen zu können, bedarf es kleiner, schnellwüchsiger und reproduktionsstarker Modellorganismen, die keine saisonalen Schwankungen in ihren hormonalen Zyklen aufweisen. Mit dem Zebraäbrbling und dem Medaka stehen zwei (sub-)tropische Fischarten zur Verfügung, die sich aufgrund ihrer evolutionären Distanz, differenzierten Geschlechtsdeterminierung und unterschiedlichen Reproduktionsstrategien gut für vergleichende Untersuchungen zur estrogenen Beeinflussbarkeit verschiedener Organismen eignen. Zur Etablierung geeigneter Nachweissysteme zur Expression Estrogen-regulierter Gene wurde zunächst ausreichende Sequenzinformation über die cDNAs von Vitellogenin des Medakas und Vitellogenin sowie Estrogenrezeptor α des Zebraäbrblings benötigt. Während für das Vitellogenin des Zebraäbrblings zwei signifikant verschiedene Vitellogenin-cDNAs aus Expressed-Sequence-Tag-Datenbanken konstruiert werden konnte, wurden cDNA-Fragmente vom Vitellogenin des Medakas und des Estrogenrezeptor α des Zebraäbrblings durch RT-PCR mit konservierten Primern synthetisiert. Nach Verifizierung der Ergebnisse durch Sequenzierung und Northern Blots wurden auf semiquantitativer RT-PCR basierende Nachweissysteme für diese Genprodukte sowie für Estrogenrezeptor α und Choriogenin H des Medakas bzw. ZP2 des Zebraäbrblings entwickelt. Anschließend erfolgte eine vergleichende Studie zur zeitlichen und dosisabhängigen Expression dieser Gene in beiden Fischarten, die zum Teil durch ultrastrukturelle Untersuchungen ergänzt wurde. Neben dem synthetischen Estrogen 17α -Ethinylestradiol wurden das schwache Xenoestrogen Nonylphenol und das Proestrogen Methoxychlor untersucht. Bei der Auswertung der Ergebnisse waren distinkte Unterschiede in der Empfindlichkeit beider Fischarten für die einzelnen Modellsubstanzen festzustellen. Für die Bewertung der Emission estrogener Substanzen in das Freiland ergibt sich hieraus die Konsequenz, dass signifikante Artunterschiede in der estrogenen Sensibilität zu berücksichtigen sind. Im Vergleich zur Nachweisgrenze der gleichen Substanzen im *In vitro*-System wurde eine allgemein höhere Empfindlichkeit bei den *In vivo*-Versuchen beobachtet. Somit erscheint der Einsatz von Hepatocytenprimärkulturen im Bereich des Screenings auf estrogene Substanzen in der Umwelt limitiert, kann aber zur Erforschung prinzipieller Wirkungsmechanismen empfohlen werden.

Die Sexualentwicklung des juvenilen Zebraäbrblings bis zum fertilen Adulttier ist durch mehrere histologische Differenzierungsphasen gekennzeichnet. Parallel zu diesen Differenzierungsstadien wurde die Induktion der Expression von Estrogenrezeptoren bzw. ZP2 festgestellt. Generell zeigen Zebraäbrlinge bereits während früher Entwicklungsstufen eine Empfindlichkeit für Estrogene, was durch die Induktion von Vitellogenin und Estrogenrezeptoren durch Estrogene bei 4 und 6 Tage alten Larven belegt werden kann.

7. Literatur

- Ahel, M. und Giger, W., 1993a. Aqueous solubility of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates. *Chemosphere* 26, 1461-1470.
- Ahel, M. und Giger, W., 1993b. Partitioning of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates between water and organic solvents. *Chemosphere* 26, 1471-1478.
- Ahel, M., Molnar, E., Ibric, S. und Giger, W., 2000. Estrogenic metabolites of alkylphenol polyethoxylates in secondary sewage effluents and rivers. *Water Science and Technology* 42, 15-22.
- Ahel, M., Schaffner, C. und Giger, W., 1994. Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment I. Occurrence and transformation in sewage treatment. *Wat. Res.* 30, 37-46.
- Ahne, W., 1985. Untersuchungen über die Verwendung von Fischzellkulturen für Toxizitätsbestimmungen zur Einschränkung und Ersatz des Fischtests. *Zbl. Bakt. Hyg.* 180, 480-504.
- Allen, E. und Doisy, E.A., 1923. An ovarian hormone: Preliminary report on its localization, extraction and partial purification and action in test animals. *J. Am. Med. Assoc.* 81, 819.
- Allen, Y., Matthiessen, P., Scott, A.P., Haworth, S., Feist, S. und Thain, J.E., 1999. The extent of oestrogenic contamination in the UK estuarine and marine environments - further surveys of flounder. *Sci. Total Environ.* 233, 5-20.
- Allner, B., Wegener, G., Knacker, T. und Stahl-schmidt-Allner, P., 1999. Electrophoretic determination of estrogen-induced protein in fish exposed to synthetic and naturally occurring chemicals. *Sci. Total Environ.* 233, 21-31.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. und Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.
- Andersen, H.R., Andersson, A.M., Arnold, S.F., Atrup, H., Barfoed, M., Beresford, N.A., Bjerregaard, P., Christiansen, L.B., Gissel, B., Hummel, R., Jorgensen, E.B., Korsgaard, B., Leguevel, R., Leffers, H., McLachlan, J., Moller, A., Nielsen, J.B., Olea, N., Oleskarasko, A., Pakdel, F., Pedersen, K.L., Perez, P., Skakkeboek, N.E., Sonnenschein, C., Soto, A.M., Sumpter, J.P., Thorpe, S.M. und Grandjean, P., 1999. Comparison of short-term estrogenicity tests for identification of hormone-disrupting chemicals. *Environ. Health Perspect.* 107, 89-108.
- Andersen, L., Bengtsson, B.E., Björk, M., Gessbo, A., Holbeck, H., Hylland, K., Norrgren, L., Pedersen, K.L., Lundgren, A., Petersen, G.I., Steinholz, A. und Örn, S., 2000. Zebrafish for testing endocrine disrupting chemicals. *Nordic Council of Ministers, Copenhagen.*
- Anderson, M.J., Miller, M.R. und Hinton, D.E., 1996a. *In vitro*-modulation of 17 β -estradiol-induced vitellogenin synthesis: effects of cytochrome P4501A1 inducing compounds on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver cells. *Aquat. Toxicol.* 34, 327-350.
- Anderson, M.J., Olsen, H., Matsumura, F. und Hinton, D.E., 1996b. *In Vivo* modulation of 17 β -estradiol-induced vitellogenin synthesis and estrogen receptor in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver cells by β -naphthoflavone. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 137, 210-218.
- Anderson, T.A., Levitt, D.G. und Banaszak, L.J., 1998. The structural basis of lipid interactions in lipovitellin, a soluble lipoprotein. *Structure* 6, 895-909.
- Ankley, G., Mihaich, E., Stahl, R., Tillitt, D., Colborn, T., McMaster, S., Miller, R., Bantle, J., Campbell, P., Denslow, N., Dickerson, R., Folmar, L., Fry, M., Giesy, J., Gray, L.E., Guiney, P., Hutchinson, T., Kennedy, S., Kramer, V., Leblanc, G., Mayes, M., Nimrod, A., Patino, R., Peterson, R., Purdy, R., Ringer, R., Thomas, P., Touart, L., Van Der Kraak, G. und Zaccharewski, T., 1998. Overview of a workshop on screening methods for detecting potential (anti-)estrogenic/androgenic chemicals in wildlife. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 68-87.
- Anstead, G.M., Carlson, K.E. und Katzenellenbogen, J.A., 1997. The estradiol pharmacophore: ligand structure-estrogen receptor binding affinity rela-

- tionships and a model for the receptor binding site. *Steroids* 62, 268-303.
- Aoyama, Y., Noshiro, M., Gotoh, O., Imaoka, S., Funae, Y., Kurosawa, N., Horiuchi, T. und Yoshida, Y., 1996. Sterol 14-demethylase P450 (P45014DM) is one of the most ancient and conserved P450 species. *J. Biochem. Tokyo* 119, 926-933.
- Aprison, B.S., Martin-Morris, L., Spolski, R.J. und Wangh, L.J., 1986. Estrogen-dependent DNA synthesis in cultures of *Xenopus* liver parenchymal cells. *In-vitro Cell. Develop. Biol.* 22, 457-464.
- Arcand-Hoy, L.D. und Benson, W.H., 1998. Fish reproduction: An ecologically relevant indicator on endocrine disruption. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 49-57.
- Arnold, A.P. und Schlinger, B.A., 1993. Sexual differentiation of brain and behavior: The zebra finch is not just a flying rat. *Brain Behav. Evol.* 42, 231-241.
- Arnold, S.F., Bergeron, J.M., Tran, D.Q., Collins, B.M., Vonier, P.M., Crews, D., Toscano, W.A.J. und Mclachlan, J.A., 1997. Synergistic responses of steroidal estrogens *in vitro* (yeast) and *in vivo* (turtles). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235, 336-342.
- Arnold, S.F., Klotz, D.M., Collins, B.M., Vonier, P.M., Guillette, L.J. und Mclachlan, J.A., 1996a. Synergistic activation of estrogen receptor with combinations of environmental chemicals. *Science* 272, 1489-1492.
- Arnold, S.F., Robinson, M.K., Notides, A.C., Guillette, L.J. und Mclachlan, J.A., 1996b. A yeast estrogen screen for examining the relative exposure of cells to natural and xenoestrogens. *Environ. Health Perspect.* 104, 544-548.
- Arukwe, A., Celius, T., Walther, B.T. und Goksoyr, A., 1998. Plasma-levels of vitellogenin and eggshell zona radiata proteins in 4-Nonylphenol and *o,p'*-DDT treated juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Marine Environ. Res.* 46, 133-136.
- Arukwe, A., Forlin, L. und Goksoyr, A., 1997a. Xenobiotic and steroid biotransformation enzymes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) liver treated with an estrogenic compound, 4-nonylphenol. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 2576-2583.
- Arukwe, A., Knudsen, F.R. und Goksøyr, A., 1997b. Fish zona radiata (eggshell) protein: A sensitive biomarker for environmental estrogens. *Environ. Health Perspect.* 105, 418-422.
- Arukwe, A., Thibaut, R., Ingebrigtsen, K., Celius, T., Goksoyr, A. und Cravedi, J.-P., 2000. *In vivo* and *in vitro* metabolism and organ distribution of nonylphenol in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquat. Toxicol.* 49, 289-304.
- Assisi, L., Di Fiore, M.M., Lamanna, C. und Botte, V., 2000. Relationships between liver testosterone receptor isoforms and aromatase activity in female green frog, *Rana esculenta*. *Life Sci.* 67, 373-382.
- Auger, J., J.M., K., F., C. und P., J., 1995. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *New Engl. J. Med.* 332, 281-285.
- Azzi, A., Zakrzewska, K., Gentilomi, G., Musiani, M. und Zerbini, M., 1990. Detection of B19 parvovirus infections by a dot-blot hybridization assay using a digoxigenin-labelled probe. *J. Virol. Meth.* 27, 125-133.
- Babin, P.J., 1987. Apolipoproteins and the association of egg yolk proteins with plasma high density lipoproteins after ovulation and follicular atresia in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Biol. Chem.* 262, 4290-4296.
- Balaguer, P., Francois, F., Comunale, F., Fenet, H., Boussioux, A.M., Pons, M., Nicolas, J.C. und Casellas, C., 1999. Reporter cell lines to study the estrogenic effects of xenoestrogens. *Sci. Total Environ.* 233, 47-56.
- Baldi, E., Luconi, M., Muratori, M. und Forti, G., 2000. A novel functional estrogen receptor on human sperm membrane interferes with progesterone effects. *Mol. Cell. Endocrinol.* 161, 31-35.
- Barile, F.A., 1994. Introduction to an *in vitro* cytotoxicology: mechanism and methods. CRC Press,
- Barkhem, T., Carlsson, B., Nilsson, Y., Enmark, E., Gustafsson, J. und Nilsson, S., 1998. Differential response of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta to partial estrogen agonists/antagonists. *Mol. Pharmacol.* 54, 105-112.
- Baroiller, J.F., Guiguen, Y. und Fostier, A., 1999. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cell. Mol. Life Sci.* 55, 910-931.

- Baronti, C., Curini, R., D'ascenzo, G., Di Corcia, A., Gentili, A. und Samperi, R., 2000. Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. *Environ. Sci. Technol.* 24, 5059-5066.
- Barton, H.A. und Andersen, M.E., 1998. Endocrine active compounds: From biology to dose response assessment. *Crit. Rev. Toxicol.* 28, 363-423.
- Bätscher, R., Studer, C. und Fent, K., 1999. Stoffe mit endokriner Wirkung in der Umwelt. Eidgenössische Anstalt für Wasserversorgung, Abwasserreinigung und Gewässerschutz (EAWAG) und Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft (BUWAL), Bern.
- Bayley, M., Nielsen, J.R. und Baatrup, E., 1999. Guppy sexual behavior as an effect biomarker of estrogen mimics. *Ecotoxicol Environ Saf* 43, 68-73.
- Begovac, P.C. und Wallace, R.A., 1989. Major vitelline envelope proteins in pipefish oocytes originate with the follicle and are associated with Z3 layer. *J. Exp. Zool.* 251, 56-73.
- Belfroid, A.C., Van Der Horst, A., Vethaak, A.D., Schafer, A.J., Rijs, G.B., Wegener, J. und Cofino, W.P., 1999. Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands. *Sci. Total Environ.* 225, 101-108.
- Benbow, R.M., Pestell, R.Q.W. und Ford, C.C., 1975. Appearance of DNA polymerase activity during early development of *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* 43, 159-174.
- Benfey, T.J., Donaldson, E.M., Owen, T.G., 1989. An homologous radioimmunoassay for coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) vitellogenin, with general applicability to other Pacific salmonids. *Gen. Comp. Endocrinol.* 75, 78-82.
- Beresford, N., Routledge, E.J., Harris, C.A. und Sumpter, J.P., 2000. Issues arising when interpreting results from an *in vitro* assay for estrogenic activity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 162, 22-33.
- Berg, C., Halldin, K., Fridolfsson, A.K., Brandt, I. und Brunstrom, B., 1999. The avian egg as a test system for endocrine disruptors: effects of diethylstilbestrol and ethynylestradiol on sex organ development. *Sci. Total Environ.* 233, 57-66.
- Bergman, A. und Olsson, M., 1985. Pathology of Baltic ringed seal and gray seal females with special reference to adrenocortical hyperplasia: is environmental pollution the cause of a widely distributed disease syndrome? *Finn Game Res* 44, 47-62.
- Berry, M.N. und Edwards, A.M., 2000. *The Hepatocyte Review*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.
- Beyer, C., 1999. Estrogen and the developing mammalian brain. *Anat. Embryol. (Berl.)* 199, 379-90.
- Bidwel, C.A. und Carlson, D.M., 1995. Characterization of vitellogenin from white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. *J. Mol. Evol.* 41, 104-112.
- Bigby, R., Chapin, R.E., Daston, G.P., Davis, B.J., Gorski, J., Gray, L.E., Howdeshell, K.L., Zoeller, R.T. und Vom Saal, F.S., 1999. Evaluating the effects of endocrine disruptors on endocrine function during development. *Environ. Health Perspect.* 107 Suppl., 613-618.
- Bitman, J. und Cecil, H.C., 1970. Estrogenic activity of DDT analogs and polychlorinated biphenyls. *J. Agricult. Food Chem.* 18, 1108-1112.
- Bitman, J., Cecil, H.C., Harris, S.J. und Fries, G.F., 1968. Estrogenic activity of *o,p'*-DDT in the mammalian uterus and avian oviduct. *Science* 162, 371-372.
- Blackburn, M.A. und Waldock, M.J., 1995. Concentrations of alkylphenols in rivers and estuaries in England and Wales. *Wat. Res.* 29, 1623-1629.
- Bleil, J.D. und Wassarman, P.M., 1980. Mammalian sperm-egg interaction: identification of a glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm. *Cell* 20, 873-882.
- Blom, A., Ekman, E., Johannisson, A., Norrgren, L. und Pesonen, M., 1998. Effects of Xenoestrogenic Environmental-Pollutants on the Proliferation of a Human Breast-Cancer Cell-Line (MCF-7). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 34, 306-310.
- Bodine, P.V.N., Henderson, R.A., Green, J., Aronow, M., Owen, T., Stein, G.S., Lian, J.B. und Komm, B.S., 1998. Estrogen receptor-alpha is developmentally regulated during osteoblast differentiation and contributes to selective responsiveness of gene expression. *Endocrinology* 139, 2048-2057.

- Borenfreund, E., Babich, H. und Martin-Alguacil, N., 1988. Comparison of two *in-vitro* cytotoxicity assays - the neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxicol. In Vitro* 2, 1-6.
- Bradbury, S.P., Mekenyan, O.G. und Ankley, G.T., 1998. The role of flexibility in predicting biological activity: structure-activity relationships for aryl hydrocarbon, estrogen, and androgen receptor binding affinity. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 15-25.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brasch, K. und Peters, K.E., 1985. Nuclear protein, matrix and structural changes in rooster liver after estrogenic induction of vitellogenesis. *Biol. Cell* 54, 109-121.
- Braunbeck, T., 1993. Entwicklung von Biotestverfahren mit Zellkulturen aus Fischen und Mollusken zum Nachweis letaler und subletaler Schäden von Organismen durch Umweltschadstoffe im Wasser. In: Veröff. PAÖ, 7. Landesanstalt für Umweltschutz Baden Württemberg, Karlsruhe. 537-559.
- Braunbeck, T., Arnold, H., Bauer, I., Briese, I., Hauck, C., Hollert, H., Holzschuh, J., Islinger, M., Müller, F. und Zahn, T., 1995. Zelltests in der Ökotoxikologie - Cytotoxizitätstests mit Zellkulturen aus Fischen als Alternative und Ergänzung zu konventionellen Fischtests. In: Veröff. PAÖ, 11. Landesanstalt für Umweltschutz Baden Württemberg, Karlsruhe. 1-204
- Braunbeck, T.A., Teh, S.J., Lester, S.M. und Hinton, D.E., 1992. Ultrastructural alterations in liver of medaka (*Oryzias latipes*) exposed to diethylnitrosamine. *Toxicol. Pathol.* 20, 179-196.
- Breinholt, V., Hossaini, A., Svendsen, G.W., Brouwer, C. und Nielsen, E., 2000. Estrogenic activity of flavonoids in mice. The importance of estrogen receptor distribution, metabolism and bioavailability. *Food Chem. Toxicol.* 38, 555-564.
- Bromwich, P., Cohen, J., Stewart, I. und Walker, A., 1994. Decline in sperm counts: an artefact of changed reference range of "normal"? *Br. Med. J.* 309, 19-22.
- Bua, B.F.U.S., 1988. Nonylphenol. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim
- Bulger, W.H., Muccitelli, R.M. und Kupfer, D., 1978. Studies on the *in vivo* and *in vitro* estrogenic activities of methoxychlor and its metabolites. Role of hepatic mono-oxygenase in methoxychlor activation. *Biochem. Pharmacol.* 27, 2417-23.
- Byrne, B.M., Gruber, M. und Ab, G., 1989a. The evolution off egg yolk proteins. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 53, 33-69.
- Byrne, B.M., Van Het Schip, A.D., Van De Klundert, J.A.M., Arnberg, A.C., Gruber, M. und Ab, G., 1989b. Rudimentary phosphovitin domain in a minor chicken vitellogenin gene. *Biochemistry* 28, 2572-2577.
- Campbell, C.M. und Idler, D.R., 1980. Characterization of an estradiol-induced protein from rainbow trout as vitellogenin by the cross reactivity to ovarian yolk fractions. *Biol. Reprod.* 22, 605-617.
- Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N. und Skakkebaek, N.E., 1992. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Br. Med. J.* 305, 609-613.
- Carmichael, J., Degraff, W.G., Gazdar, A.F., Minna, J.D. und Mitchell, J.B., 1987. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 47, 936-42.
- Carnevali, O. und Belvedere, P., 1991. Comparative studies of fish, amphibian, and reptilian vitellogenins. *J. Exp. Zool.* 259, 18-25.
- Carragher, J.F., Sumpter, J.P., Pottinger, T.G. und Pickering, A.D., 1989. The deleterious effects of cortisol implantation on reproductive function in two species of trout, *Salmo trutta* L. and *Salmo gairdneri* Richardson. *Gen. Comp. Endocrinol.* 76, 310-321.
- Castillo, M., Martinez, E., Ginebreda, A., Tirapu, L. und Barcelo, D., 2000. Determination of non-ionic surfactants and polar degradation products in influent and effluent water samples and sludges of sewage treatment plants by a generic solid-phase extraction protocol. *Analyst* 125, 1733-1739.
- Celius, T., Haugen, T.B., Grotmol, T. und Walther, B.T., 1999. A sensitive zogenetic assay for rapid *in vitro* assessment of estrogenic potency of xenobiotics and mycotoxins. *Environ. Health Perspect.* 107, 63-68.

- Celius, T. und Walther, B.T., 1998a. Differential sensitivity of zonagenesis and vitellogenesis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) to DDT pesticides. *J. Exp. Zool.* 281, 346-353.
- Celius, T. und Walther, B.T., 1998b. Oogenesis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) occurs by zonagenesis preceding vitellogenesis in vivo and in vitro. *J. Endocrinol.* 158, 259-266.
- Chaffin, C.L., Trewin, A.L. und Hutz, R.J., 1999. Estrous cycle-dependent changes in the expression of aromatic hydrocarbon receptor (AHR) and AHR-nuclear translocator (ARNT) mRNAs in the rat ovary and liver. *Chem. Biol. Interact.* 124, 205-216.
- Chan, S.T.H. und Yenung, W.S.B., 1983. Sex control and sex reversal in fish under natural conditions. In: Hoar, W.S., Randall, D.J., Donaldsen, E.M. (Eds.), *Fish physiology*. 9B. Academic Press, New York. 171-222.
- Chang, X., Kobayashi, T., Todo, T., Ikeuchi, T., Yoshiura, M., Kajiura-Kobayashi, H., Morrey, C. und Nagahama, Y., 1999. Molecular cloning of estrogen receptors alpha and beta in the ovary of a teleost fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Zool. Sci.* 16, 653-658.
- Chang, Y.S., Hsu, C.C., Wang, S.C., Tsao, C.C. und Huang, F.L., 1997. Molecular cloning, structural analysis, and expression of carp ZP2 gene. *Mol. Reprod. Dev.* 46, 258-267.
- Chang, Y.S., Wang, S.C., Tsao, C.C. und Huang, F.L., 1996. Molecular cloning, structural analysis, and expression of carp ZP3 gene. *Mol. Reprod. Dev.* 44, 295-304.
- Chen, T.T., 1983. Identification and characterization of estrogen-responsive gene products in the liver of rainbow trout. *Can. J. Biochem.* 61, 802-810.
- Cheng, S., Fockler, C., Barnes, W.M. und Higuchi, R., 1994. Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 5695-5699.
- Christian, M. und Gillies, G., 1999. Developing hypothalamic dopaminergic neurones as potential targets for environmental estrogens. *J. Endocrinol.* 160, R1-R6.
- Christiansen, L.B., Pedersen, K.L., Korsgaard, B. und Bjerregaard, P., 1998a. Estrogenicity of xenobiotics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using in vivo synthesis of vitellogenin as a biomarker. *Marine Environ. Res.* 46, 137-140.
- Christiansen, L.B., Pedersen, K.L., Pedersen, S.N., Korsgaard, B. und Bjerregaard, P., 2000. *In vivo* comparison of xenoestrogens using rainbow trout vitellogenin induction as a screen system. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 1867-1874.
- Christiansen, T., Korsgaard, B. und Jespersen, A., 1998b. Effects of Nonylphenol and 17-Beta-Estradiol on Vitellogenin Synthesis, Testicular Structure and Cytology in Male Eelpout Zoarces Viviparus. *J. Exp. Biol.* 201, 179-192.
- Christiansen, T., Korsgaard, B. und Jespersen, A., 1998c. Induction of Vitellogenin Synthesis by Nonylphenol and 17-Beta-Estradiol and Effects on the Testicular Structure in the Eelpout Zoarces Viviparus. *Marine Environ. Res.* 46, 141-144.
- Cochrane, A.W. und Deeley, R.G., 1988. Estrogen-dependent activation of the avian very low density apolipoprotein II and vitellogenin genes. Transient alterations in mRNA polyadenylation and stability early during induction. *J. Mol. Biol.* 203, 555-567.
- Coldham, N.G., Sivapathasundaram, S., Dave, M., Ashfield, L.A., Pottinger, T.G., Goodall, C. und Sauer, M.J., 1998. Biotransformation, tissue distribution, and persistence of 4-nonylphenol residues in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Drug Metab Dispos* 26, 347-354.
- Comey, C.T., Jung, J.M. und Budowle, B., 1991. Use of formamide to improve amplification of HLA DQ α sequences. *Biotechniques* 10, 60-61.
- Cooke, J.B. und Hinton, D.E., 1999. Promotion by 17-beta-estradiol and beta-hexachlorocyclohexane of hepatocellular tumors in medaka, *Oryzias latipes*. *Aquat. Toxicol.* 45, 127-145.
- Copeland, P.A., Sumpter, J.P., Walker, K. und Croft, M., 1986. Vitellogenin levels in male and female rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) at various stages of the reproductive cycle. *Comp. Biochem. Physiol. B* 83, 487-493.
- Corpet, F., Gouzy, J. und Kahn, D., 1998. The ProDom database of protein domain families. *Nucleic Acids Res.* 26, 323-326.
- Corthesy, B., Claret, F.X. und Wahli, W., 1990. Estrogen receptor level determines sex-specific *in*

- in vitro* transcription from the Xenopus vitellogenin promoter. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 7878-82.
- Couse, J.F., Lindzey, J., Grandien, K., Gustafsson, J.A. und Korach, K.S., 1997. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse. Endocrinology 138, 4613-4621.
- Cowley, S.M., Hoare, S., Mosselman, S. und Parker, M.G., 1997. Estrogen receptors alpha and beta form heterodimers on DNA. J. Biol. Chem. 272, 19858-19862.
- Cummings, A.M., 1997. Methoxychlor as a model for environmental estrogens. Crit. Rev. Toxicol. 27, 367-379.
- Cunningham, K.S., Dodson, R.E., Nagel, M.A., Shapiro, D.J. und Schoenberg, D.R., 2000. Vigilin binding selectively inhibits cleavage of the vitellogenin mRNA 3'-untranslated region by the mRNA endonuclease polysomal ribonuclease 1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 12498-12502.
- Danzo, B.J., 1998. The effects of environmental hormones on reproduction. Cell. Mol. Life Sci. 54, 1249-1264.
- Dawson, A., 1998. Comparative reproductive physiology of nonmammalian species. Pure Appl. Chem. 70, 1657-1669.
- de Vlaming, V.V., Wiley, H.S., Delahunty, G. und Wallace, R.A., 1980. Goldfish (*Carassius auratus*) vitellogenin: induction, isolation, properties and relationfish to yolk proteins. Comp. Biochem. Physiol. B 67, 613-623.
- Dechering, K., Boersma, C. und Mosselman, S., 2000. Estrogen receptors alpha and beta: two receptors of a kind? Curr. Med. Chem. 7, 561-576.
- Denizot, F. und Lang, R., 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. J. Immunol. Methods 89, 271-277.
- Desbrow, C., Routledge, E.J., Brighty, G.C., Sumpster, J.P. und Waldock, M., 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and *in vitro* biological screening. Environ. Sci. Technol. 32, 1549-1558.
- Dethloff, G.M., Schlenk, D., Khan, S. und Bailey, H.C., 1999. The effects of copper on blood and biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 36, 415-423.
- Dicorcia, A., Samperi, R. und Marcomini, A., 1994. Monitoring aromatic surfactants and their biodegradation intermediates in raw and treated sewages by solid-phase extraction and liquid chromatography. Environ. Sci. Technol. 28, 850-858.
- Ding, W.H., Tzing, S.H. und Lo, J.H., 1999. Occurrence and concentrations of aromatic surfactants and their degradation products in river waters of Taiwan. Chemosphere 38, 2597-2606.
- Ding, W.H. und Wu, C.Y., 2000. Determination of estrogenic nonylphenol and bisphenol A in river water by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. Journal of the Chinese Chemical Society 47, 1155-1160.
- Dittmar, K.D., Banach, M., Galigniana, M.D. und Pratt, W.B., 1998. The role of DnaJ-like proteins in glucocorticoid receptor - hsp90 heterocomplex assembly by the reconstituted hsp90 - p60 - hsp70 foldosome complex. J. Biol. Chem. 273, 7358-7366.
- Dodds, E.C. und Lawson, W., 1936. Synthetic estrogenic agents without the phenanthrene nucleus. Nature 137, 996.
- Dodds, E.C. und Lawson, W., 1938. Molecular structure in relation to oestrogenic activity. Compounds without a phenanthrene nucleus. Proc. R. Soc. Lond. [Biol.] 127, 140-167.
- Dodson, R.E. und Shapiro, D.J., 1994. An estrogen-inducible protein binds specifically to a sequence in the 3' untranslated region of estrogen-stabilized vitellogenin mRNA. Mol. Cell. Biol. 14, 3130-3138.
- Dodson, R.E. und Shapiro, D.J., 1997. Vigilin, a ubiquitous protein with 14 K homology domains, is the estrogen-inducible vitellogenin mRNA 3'-untranslated region-binding protein. J. Biol. Chem. 272, 12249-12252.
- Dooley, K. und Zon, L.I., 2000. Zebrafish: a model system for the study of human disease. Current Opinions in Genetics and Development 10, 252-256.

- Dorfman, R.I. und Dorfman, A.S., 1953. The assay of estrogens in the chick by oral administration. *Endocrinology* 53, 301-305.
- Eaton, R.C. und Farley, R.D., 1974. Spawning cycle and egg production of zebrafish, *Brachydanio rerio*, in the laboratory. *Copeia* 1, 195-204.
- Ebling, F.J., Brooks, A.N., Cronin, A.S., Ford, H. und Kerr, J.B., 2000. Estrogenic induction of spermatogenesis in the hypogonadal mouse. *Endocrinology* 141, 2861-2869.
- Edinger, R.S., Mambo, E. und Evans, M.I., 1997. Estrogen-dependent transcriptional activation and vitellogenin gene memory. *Mol. Endocrinol.* 11, 1985-1993.
- Edmunds, J.S., McCarthy, R.A. und Ramsdell, J.S., 2000. Permanent and functional male-to-female sex reversal in d-rR strain medaka (*Oryzias latipes*) following egg microinjection of *o,p'*-DDT. *Environ. Health Perspect.* 108, 219-224.
- Emmerson, J., Korsgaard, B. und Petersen, I., 1979. Dose response kinetics of serum vitellogenin, liver DNA, RNA, protein and lipid after induction by estradiol-17 beta in male flounders (*Platichthys flesus* L.). *Comp. Biochem. Physiol. B* 63, 1-6.
- Enmark, E., Pelto-Huikko, M., Grandien, K., Lagercrantz, S., Lagercrantz, J., Fried, G., Nordenskjöld, M. und Gustafsson, J.A., 1997. Human estrogen receptor β - gene structure, chromosomal localization, expression pattern. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 4258-4265.
- Eroschenko, V.P. und Palmiter, R.D., 1980. Estrogenicity of kepone in birds and mammals. In: McLachlan, J.A. (Eds.), *Estrogens in the environment*. Elsevier, New York. 305-325.
- Escriva, H., Delaunay, F. und Laudet, V., 2000. Ligand binding and nuclear receptor evolution. *BioEssays* 22, 717-727.
- Escriva, H., Safi, R., Hänni, C., Langlois, M.C., Saumitou-Laprade, P., Stehelin, D., Capron, A., Pierce, R. und Laudet, V., 1997. Ligand binding was acquired during evolution of nuclear receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 6803-6808.
- Evans, M.I., Silva, R. und Burch, J.B.E., 1988. Isolation of chicken vitellogenin I und III cDNAs and the developmental regulation of five oestrogen-responsive genes in the embryonic liver. *Genes Dev.* 2, 116-124.
- Falandysz, J., Yamashita, N., Tanabe, S., Tutsukawa, R., Rucinska, L., Mizera, T. und Jakuczum, B., 1994. Congener-specific analysis of polychlorinated biphenyls in white-tailed sea eagles *Haliaeetus albicilla* collected in Poland. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 26, 13-22.
- Farrell, R.E.J., 1998. *RNA Methodologies - A Laboratory guide for isolation and characterization*. Academic Press, San Diego.
- Feist, G. und Schreck, C.B., 1996. Brain-pituitary-gonadal axis during early development and sexual differentiation in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 102, 394-409.
- Field, J.A. und Reed, R.L., 1996. Nonylphenol polyethoxy carboxylate metabolites of nonionic surfactants in US paper-mill effluents, municipal sewage-treatment plant effluents, and river waters. *Environ. Sci. Technol.* 30, 3544-3550.
- Flouriot, G., Pakdel, F., Ducouret, B., Ledrean, Y. und Valotaire, Y., 1997. Differential regulation of two genes implicated in fish reproduction: vitellogenin and estrogen receptor genes. *Mol. Reprod. Dev.* 48, 317-323.
- Flouriot, G., Pakdel, F., Ducouret, B. und Valotaire, Y., 1995. Influence of xenobiotics on rainbow trout liver estrogen receptor and vitellogenin gene expression. *J. Mol. Endocrinol.* 15, 143-151.
- Flouriot, G., Pakdel, F. und Valotaire, Y., 1996. Transcriptional and post-transcriptional regulation of rainbow trout estrogen receptor and vitellogenin gene expression. *Mol. Cell. Endocrinol.* 124, 173-181.
- Flouriot, G., Vaillant, C., Salbert, G., Pelissero, C., Guiraud, J.M. und Valotaire, Y., 1993. Monolayer and aggregate cultures of rainbow trout hepatocytes: long-term and stable liver-specific expression in aggregates. *J. Cell Sci.* 105, 407-416.
- Follet, B.K. und Redshaw, M.R., 1968. The effects of oestrogen and gonadotrophins on lipid and protein metabolism in *Xenopus laevis* Daudin. *J. Endocrinol.* 40, 439-456.
- Folmar, L.C., Denslow, N.D., Rao, V., Chow, M., Crain, D.A., Enblom, J., Marcino, J. und Guillet, L.J., Jr., 1996. Vitellogenin induction and reduced

- serum testosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. *Environ. Health Perspect.* 104, 1096-1101.
- Folmar, L.C., Gardner, G.R., Schreiber, M.P., Magliulo-Cepriano, L., Mills, L.J., Zaroogian, G., Gutjahr-Gobell, R., Haebler, R., Horowitz, D.B. und Denslow, N.D., 2001. Vitellogenin-induced pathology in male summer flounder (*Paralichthys dentatus*). *Aquat. Toxicol.* 51, 431-441.
- Forsberg, J.G., 2000. Neonatal estrogen treatment and its consequences for thymus development, serum level of autoantibodies to cardiolipin, and the delayed-type hypersensitivity response. *J. Toxicol. Environ. Health* 60, 185-213.
- Foster, T.S., 1973. Evaluation of the possible estrogenic activity of methoxychlor in the chicken by means of feeding trials. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 9, 234-242.
- Francavilla, A., Polimeno, L., Dileo, A., Barone, M., Ove, P., Coetzee, M., Eagon, P., Makowka, L., Ambrosino, G., Mazzaferro, V. und Al, E., 1989. The effect of estrogen and tamoxifen on hepatocyte proliferation *in vivo* and *in vitro*. *Hepatology* 9, 614-620.
- Freedman, L.P., 1999. Strategies for transcriptional activation by steroid/nuclear receptors. *J. Cell. Biochem. Suppl.* 32/33, 103-109.
- Freeman, M.E., 1994. The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. In: Knobil, E., Neill, J.D. (Eds.), *The Physiology of Reproduction*, 2nd Edition. Raven Press, Ltd., New York. 613-658.
- Frémont, L. und Riazzi, A., 1988. Biochemical analysis of vitellogenin from rainbow trout (*Salmo gairdneri*): fatty acid composition of phospholipids. *Reprod. Nutr. Dev.* 28, 939-952.
- Fry, D.M. und Toone, C.K., 1981. DDT-induced feminization of gull embryos. *Science* 213, 922-924.
- Fuerhacker, M., Scharf, S. und Weber, H., 2000. Bisphenol A: Emissions from point sources. *Chemosphere* 41, 751-756.
- Fujii, H., Hayama, T. und Kotani, M., 1985. Stimulating effect of natural estrogens on proliferation of hepatocytes in adult mice. *Acta Anatomica* 121, 174-178.
- Fytianos, K., Pegiadou, S., Raikos, N., Eleftheriadis, I. und Tsoukali, H., 1997. Determination of non-ionic surfactants (polyethoxylated-nonylphenols) by HPLC in waste-waters. *Chemosphere* 35, 1423-1429.
- Gaido, K.W., Leonard, L.S., Maness, S.C., Hall, J.M., McDonnell, D.P., Saville, B. und Safe, S., 1999. Differential interaction of the methoxychlor metabolite 2,2-bis-(p-hydroxyphenyl)-1,1,1-trichlor with estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 140, 5746-5753.
- Gay, F., Anglade, I., Gong, Z. und Salbert, G., 2000. The LIM/homeodomain protein islet-1 modulates estrogen receptor functions. *Mol. Endocrinol.* 14, 1627-1648.
- Gellert, R.J., Heinrichs, W.L. und Swerdloff, R., 1974. Effects of neonatally-administered DDT homologs on reproductive function in male and female rats. *Neuroendocrinology* 16, 84-94.
- Gerber-Huber, S., Nardelli, D., Haefliger, J.A., Cooper, D.N., Givel, F., Germond, J.E., Engel, J., Green, N.M. und Wahli, W., 1987. Precursor-product relationship between vitellogenin and the yolk proteins as derived from the complete sequence of a *Xenopus* vitellogenin gene. *Nucleic Acids Res.* 15, 4737-4760.
- Giger, W., Brunner, P.H. und Schaffner, C., 1984. 4-Nonylphenol in sewage sludge: Accumulation of toxic metabolites from nonionic surfactants. *Science* 225, 623-625.
- Gimeno, S., Komen, H., Gerritsen, A.G.M. und Bowmer, T., 1998a. Feminization of young males of the Common carp, *Cyprinus carpio*, exposed to 4-tert-pentylphenol during sexual differentiation. *Aquat. Toxicol.* 43, 77-92.
- Gimeno, S., Komen, H., Jobling, S., Sumpter, J. und Bowmer, T., 1998b. Demasculinisation of sexually mature male Common carp, *Cyprinus carpio*, exposed to 4-tert-pentylphenol during spermatogenesis. *Aquat. Toxicol.* 43, 93-109.
- Goolish, E.M., Evans, R., Okutake, K. und Max, R., 1998. Chamber volume requirements for reproduction of the zebrafish *Danio rerio*. *Progressive Fish-Culturist* 60, 127-132.
- Goulas, A., Triplett, E.L. und Taborsky, G., 1996. Isolation and characterization of a vitellogenin cDNA from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

- and the complete sequence of a phosvitin coding segment. *DNA Cell Biol.* 15, 605-616.
- Gray, M.A. und Metcalfe, C.D., 1997. Induction of testis-ova in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to *p*-Nonylphenol. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 1082-1086.
- Grier, H.J., Linton, J.R., Leatherland, J.F. und De Vlaming, V.L., 1980. Structural evidence for two different testicular types in teleost fishes. *Am. J. Anat.* 159, 331-345.
- Gronen, S., Denslow, N., Manning, S., Barnes, S., Barnes, D. und Brouwer, M., 1999. Serum vitellogenin levels and reproductive impairment of male Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 4-tert-octylphenol. *Environ. Health Perspect.* 107, 385-390.
- Guevel, R.L., Petit, F.G., Goff, P.L., Metivier, R., Valotaire, Y. und Pakdel, F., 2000. Inhibition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) estrogen receptor activity by cadmium. *Biol. Reprod.* 63, 259-266.
- Guiguen, Y., Baroiller, J.F., Ricordel, M.J., Iseki, K., Mcmeel, O.M., Martin, S.A. und Fostier, A., 1999. Involvement of estrogens in the process of sex differentiation in two fish species: the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and a tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Mol. Reprod. Dev.* 54, 154-162.
- Guiguen, Y., Ricordel, M. und Fostier, A., 1998. Involvement of estrogens in the process of sex differentiation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): In vivo treatments, aromatase activity and aromatase gene expression. *J. Exp. Zool.* 281, 506.
- Guillette, L.J., Gross, T.S., Masson, G.R., J.M., M., H.F., P. und Woodward, A.R.S.O., 1994. Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environ. Health Perspect.* 102, 680-681.
- Guillette, L.J., Jr., Gross, T.S., Gross, D.A., Rooney, A.A. und Percival, H.F., 1995. Gonadal steroidogenesis *in vitro* from juvenile alligators obtained from contaminated or control lakes. *Environ. Health Perspect.* 103, 31-36.
- Guillette, L.J.J., Pickford, D.B., Crain, D.A., Rooney, A.A. und Percival, H.F., 1996. Reduction in penis size, and plasma testosterone concentrations in juvenile alligators living in a contaminated environment. *Gen. Comp. Endocrinol.* 101, 32-42.
- Gülden, M., Turan, A. und Seibert, H., 1997. Substanzen mit endokriner Wirkung in Oberflächengewässern. Umweltbundesamt, TEXTE 46. Berlin.
- Gupta, S. und Kanungo, M.S., 1996. Modulation of vitellogenin II gene by estradiol and progesterone in the Japanese quail. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 222, 181-185.
- Gustafsson, J.A., 1999. Estrogen receptor β - a new dimension in estrogen mechanism of action. *J. Endocrinol.* 163, 379-383.
- Haberhausen, G., Pinsl, J., Kuhn, C.C. und Markert-Hahn, C., 1998. Comparative study of different standardization concepts in quantitative competitive reverse transcription-PCR assays. *J. Clin. Microbiol.* 36, 628-633.
- Hale, R.C., Smith, C.L., De Fur, P.O., Harvey, E. und Bush, E.O., 2000. Nonylphenols in sediments and effluents associated with diverse wastewater outfalls. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 946-952.
- Hara, A. und Hirai, H., 1978. Comparative studies on immunochemical properties of female-specific serum protein and egg yolk proteins in rainbow trout, (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol. B* 59, 339-343.
- Hara, A. und Hirai, H., 1982. Structural studies of bony fish vitellogenin. In: Richter, C.J.J., Goos, H.J.T. (Eds.), *Reproductive physiology of fish*. Pudoc, Wageningen. 158.
- Hara, A., Yamauchi, K. und Hirai, H., 1980. Immunochemical identification of female-specific serum protein (vitellogenin) and egg yolk proteins in Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Comp. Biochem. Physiol. B* 65, 315-320.
- Harries, J.E., Jobling, S., Matthiesen, P., Sheahan, D.A. und Sumpter, J.P., 1995. Effects of trace organics on fish - phase 2. Department of the Environment, London, UK.
- Harries, J.E., Sheahan, D.A., Jobling, S., Matthiesen, P., Neall, P., Sumpter, J.P., Tylor, T. und Zaman, N., 1997. Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 534-542.

- Hartley, W.R., Thiyagarajah, A., Anderson, M.B., Broxson, M.W., Major, S.E. und Zell, S.I., 1998. Gonadal development in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 17-beta-estradiol. *Marine Environ. Res.* 46, 145-148.
- Hawkins, M.B., Thornton, J.W., Crews, D., Skipper, J.K., Dotte, A. und Thomas, P., 2000. Identification of a third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 10751-10756.
- Hayward, M.A., Brock, M.L. und Shapiro, D.J., 1982. Activation of vitellogenin gene transcription is a direct response to estrogen in *Xenopus laevis* liver. *Nucleic Acids Res.* 10, 8273-8284.
- Hazel, J.R. und Prosser, C.L., 1974. Molecular mechanisms of temperature compensation in poikilotherms. *Physiol. Rev.* 54, 620-677.
- Helander, B., Olsson, M. und Reutergård, L., 1982. Residue levels of organochlorine and mercury compounds in unhatched eggs and the relationships to breeding success in white-tailed sea eagles *Haliaeetus albicilla* in Sweden. *Holarctic Ecology* 5, 349-366.
- Heppel, S.A., Denslow, N.D., Folmar, L.C. und Sullivan, C.V., 1995. Universal assay of vitellogenin as a biomarker for environmental estrogens. *Environ. Health Perspect.* 103, 9-15.
- Herbener, G.H., Feldhoff, R.C. und Fonda, M.L., 1983. A correlated morphometric and biochemical study of estrogen-induced vitellogenesis in male *Rana pipiens*. *J. Ultrastruct. Res.* 83, 28-42.
- Herman, R.L. und Kincaid, H.L., 1988. Pathological effects of orally administered estradiol to rainbow trout. *Aquaculture* 72, 165-172.
- Hinsch, K.D., Aires, V., Hagele, W. und Hinsch, E., 2000. *In vitro* tests for essential sperm functions using the phyto-oestrogen genistein as a test substance. *Andrologia* 32, 225-231.
- Hinsch, K.D. und Hinsch, E., 1999. The zona pellucida 'receptors' ZP1, ZP2 and ZP3. *Andrologia* 31, 320-322.
- Hisaka, K. und Battle, H., 1954. The normal development stages of the zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan). *J. Morphol.* 102, 311-327.
- Hong, J.T., Shah, N.N., Thomas, T.J., Gallo, M.A., Yurkow, E.J. und Thomas, T., 1998. Differential-effects of estradiol and its analogs on cyclin D1 and Cdk4 expression in estrogen-receptor positive MCF-7 and estrogen receptor-transfected MCF-10Ae(Wt5) Cells. *Oncol. Rep.* 5, 1025-1033.
- Hori, S.H., Kodama, T. und Tanahashi, K., 1979. Induction of vitellogenin synthesis in goldfish by massive doses of androgens. *Gen. Comp. Endocrinol.* 37, 306-320.
- Howell, W.M., Blank, D.A. und Bortone, S.A., 1980. Abnormal expression of secondary sex characters in a population of mosquitofish, *Gambusia affinis holbrooki*: Evidence for environmentally-induced masculinization. *Copeia* 4, 676-681.
- Hwang, U.G., Kagawa, N. und Mugiya, Y., 2000. Aluminium and cadmium inhibit vitellogenin and its mRNA induction by estradiol-17 beta in the primary culture of hepatocytes in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 119, 69-76.
- Hyder, S.M., Stancel, G.M., Nawaz, Z., McDonnell, D.P. und Loose-Mitchell, D.S., 1992. Identification of an estrogen response element in the 3'-flanking region of the murine c-fos protooncogene. *J. Biol. Chem.* 267, 18047-18054.
- Hyllner, S.J., Oppen-Berntsen, D.O., Helvik, J.V., Walther, B.T. und Haux, C., 1991. Oestradiol-17 β induces the major vitelline envelope proteins in both sexes in teleosts. *J. Endocrinol.* 131, 229-236.
- Irvine, S., Cawood, E., Macdonald, D.R.E. und Aitken, J., 1996. Evidence of deteriorating semen quality in the United Kingdom: Birth cohort study in 577 men in Scotland over 11 years. *Br. Med. J.* 312, 467-471.
- Ishikawa, Y., 2000. Medakafish as a model system for vertebrate developmental genetics. *BioEssays* 22, 487-495.
- Islinger, M. und Braunbeck, T., 1998. Östrogene Wirkung von Umweltchemikalien - Teilthema 2: Entwicklung und Erprobung eines *In vitro*-Testsystems an primären Leberzellen von Regenbogenforellen. Umweltbundesamt, Berlin.
- Jaimez, R., Cooney, A., Jackson, K., Lemus, A.E., Lemini, C., Cardenas, M., Garcia, R., Silva, G. und Larrea, F., 2000. *In vivo* estrogen bioactivities and *in vitro* estrogen receptor binding and transcrip-

- tional activities of anticoagulant synthetic 17 β -aminoestrogens. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 73, 59-66.
- Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C.R., Brighty, G. und Sumpter, J.P., 1998a. Widespread sexual disruption in wild fish. *Environ. Sci. Technol.* 32, 2498-2506.
- Jobling, S., Reynolds, T., White, R., Parker, M.G. und Sumpter, J.P., 1995. A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ. Health Perspect.* 103, 582-587.
- Jobling, S., Sheahan, D., Osborne, J.A., Matthiessen, P. und Sumpter, J.P., 1996. Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 194-202.
- Jobling, S. und Sumpter, J.P., 1993. Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: An in vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquat. Toxicol.* 27, 361-372.
- Jobling, S., Tyler, C.R., Nolan, M. und Sumpter, J.P., 1998b. The identification of estrogenic effects in wild fish. Environment Agency, Bristol, UK.
- Jones, L.A. und Hajek, R.A., 1995. Effects of estrogenic chemicals on development. *Environ. Health Perspect.* 103, 63-67.
- Jørgensen, M., Hummel, R., Bevort, M., Andersson, A.M., Skakkebaek, N.E. und Leffers, H., 1998. Detection of oestrogenic chemicals by assaying the expression level of oestrogen regulated genes. *AP-MIS* 106, 245-251.
- Juberg, D.R., 2000. An evaluation of endocrine modulators: implications for human health. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 45, 93-105.
- Jung, R., Soondrum, K. und Neumaier, M., 2000. Quantitative PCR. *Clin. Chem. Lab. Med.* 38, 833-836.
- Kalbfus, W., 1997. Belastung bayerischer Gewässer durch synthetische Östrogene. In: Stoffe mit endokriner Wirkung im Wasser. Münchener Beiträge zur Abwasser-, Fischerei- und Flussbiologie, 50. Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft - Institut für Wasserforschung, München. 31-38.
- Kanamori, H., Dodson, R.E. und Shapiro, D.J., 1998. In vitro genetic analysis of the RNA binding site of vigilin, a multi-KH-domain protein. *Mol. Cell. Biol.* 18, 3991-4003.
- Kapoor, I.P., Metcalf, R.L., Nystrom, R.F. und Sangha, G.K., 1970. Comparative metabolism of methoxychlor, methiochlor, and DDT in mouse, insects, and in a model ecosystem. *J. Agricult. Food Chem.* 18, 1145-1152.
- Karnovsky, M.J., 1971. Use of ferrocyanide-reduced osmium tetroxide in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 51, 146A.
- Katzenellenbogen, J.A., O'malley, B.W. und Katzenellenbogen, B.S., 1996. Tripartite steroid hormone receptor pharmacology: interaction with multiple effector sites as a basis for the cell- and promoter-specific action of these hormones. *Mol. Endocrinol.* 10, 119-131.
- Kavlock R.J., Daston G.P., DeRosa C., Fenner-Crisp P., Gray L.E, Kaattari S., Lucier G., Luster M., Mac M.J., Maczka C., Miller R., Moore J., Rolland R., Scott G., Sheehan D.M., Sinks T., Tilson H.A., 1996. Research needs for risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: A report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ. Health Perspect.* 104,715-740.
- Keller, H., Givel, F., Perroud, M. und Wahli, W., 1995. Signaling crosstalk between peroxisome proliferator-activated receptor/retinoid X receptor and estrogen receptor through estrogen response elements. *Mol. Endocrinol.* 9, 794-804.
- Keymer, L.F., Wells, G.A.F., Mason, C.F. und Macdonald, S.M., 1988. Pathological changes and organochlorine residues in tissues of wild otters (*Lutra lutra*). *Veterinary Records* 122, 153-155.
- Kimpton, C.P., Corbitt, G. und Morris, D.J., 1989. Detection of cytomegalovirus DNA using probes labelled with digoxigenin. *J. Virol. Meth.* 24, 335-346.
- Kinnberg, K., Korsgaard, B., Bjerregaard, P. und Jespersen, Å., 2000. Effects of nonylphenol and 17 β -estradiol on vitellogenin synthesis and testis morphology in male platyfish *Xiphophorus maculatus*. *J. Exp. Biol.* 203, 171-181.
- Kishida, M. und Specker, J.L., 1993. Vitellogenin in tilapia (*Oreochromis mossambicus*): Induction of two forms by estradiol, quantification in plasma

- and in oocyte extract. *Fish Physiol. Biochem.* 12, 171-182.
- Klaunig, J.E., Ruch, R.J. und Goldblatt, P.J., 1985. Trout hepatocyte culture: isolation and primary culture. *In-vitro Cell. Develop. Biol.* 21, 221-8.
- Klein, K.O., Baron, J., Colli, M.J., McDonnell, D.P. und Cutler, G.B., Jr., 1994. Estrogen levels in childhood determined by an ultrasensitive recombinant cell bioassay. *J. Clin. Invest.* 94, 2475-2480.
- Klinge, C.M., Bowers, J.L., Kulakosky, P.C., Kamboj, K.K. und Swanson, H.I., 1999. The aryl hydrocarbon receptor (AHR)/AHR nuclear translocator (ARNT) heterodimer interacts with naturally occurring estrogen response elements. *Mol. Cell. Endocrinol.* 157, 105-119.
- Kloas, W., Lutz, I. und Einspanier, R., 1999. Amphibians as a Model to Study Endocrine Disruptors - II - Estrogenic Activity of Environmental Chemicals in-Vitro and in-Vivo. *Sci. Total Environ.* 225, 59-68.
- Kloas, W., Schrag, B., Ehnes, C. und Segner, H., 2000. Binding of xenobiotics to hepatic estrogen receptor and plasma sex steroid binding protein in the teleost fish, the common carp. *Gen. Comp. Endocrinol.* 119, 287-299.
- Klotz, D.M., Beckman, B.S., Hill, S.M., McLachlan, J.A., Walters, M.R. und Arnold, S.F., 1996. Identification of environmental chemicals with estrogenic activity using a combination of in vitro assays. *Environ. Health Perspect.* 104, 1084-1089.
- Knoblauch, R. und Garabedian, M.J., 1999. Role of Hsp90-associated cochaperone p23 in estrogen receptor signal transduction. *Mol. Cell. Biol.* 19, 3748-3759.
- Knudsen, F.R., Arukwe, A. und Pottinger, T.G., 1998. The *in vivo* effect of combinations of octylphenol, butylbenzylphthalate and estradiol on liver estradiol-receptor modulation and induction of zona radiata proteins in rainbow trout - No evidence of synergy. *Environ. Poll.* 103, 75-80.
- Ko, Y., Totzke, G., Schiermeyer, B., Zeitler, H., Schmitz, U., Vetter, H. und Sachinidis, A., 1995. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR): A sensitive method to examine basic fibroblast growth factor-induced expression of the early growth response gene-1 (egr-1) in human umbilical arterial endothelial cells. *Mol. Cell. Probes* 9, 215-222.
- Koban, M., 1986. Can cultured teleost hepatocytes show temperature acclimation? *Am. J. Physiol.* 250, R211-R220.
- Kohn, M.C., Lucier, G.W., Clark, G.C., Sewall, C., Tritscher, A.M. und Portier, C.J., 1993. A mechanistic model of effects of dioxin on gene expression in the rat liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 120, 138-154.
- Komatsu, M., Matsumoto, W. und Hayashi, S., 1996. Protease activity appeared after trypsin treatment of the purified vitellogenin from eel *Anguilla japonica*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 113, 561-571.
- Korach, S.K., Levy, L.A. und Sarver, P.J., 1987. Estrogen receptor stereochemistry: receptor binding and hormonal responses. *J. steroid Biochem.* 27, 281-290.
- Körner, W., Bolz, U., Stüblich, W., Hiller, G., Schuller, W., Hanf, V. und Hagenmaier, H., 2000. Input/output balance of estrogenic active compounds in a major municipal sewage plant in Germany. *Chemosphere* 40, 1131-1142.
- Körner, W., Hanf, V., Schuller, W., Kempter, C., Metzger, J. und Hagenmaier, H., 1999. Development of a sensitive E-screen assay for quantitative analysis of estrogenic activity in municipal sewage plant effluents. *Sci. Total Environ.* 225, 33-48.
- Korsgaard, B., 1990. Estrogen treatment and its influence on protein synthesis and amino acid metabolism in *Zoarces viviparus* (L.) males. *Fish Physiol. Biochem.* 8, 121-127.
- Korsgaard, B., Mommsen, T.P. und Saunders, R.L., 1986. The effect of temperature on the vitellogenic response in Atlantic salmon post-smolts (*Salmo salar*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 62, 193-201.
- Korsgaard, B. und Petersen, I., 1979. Vitellogenin, lipid and carbohydrate metabolism during vitellogenesis and pregnancy, and after hormonal induction in the blenny *Zoarces viviparus* (L.). *Comp. Biochem. Physiol. B* 63, 245-251.
- Korte, J.J., Kahl, M.D., Jensen, K.M., Pasha, M.S., Parks, L.G., Leblanc, G.A. und Ankley, G.T., 2000. Fathead Minnow Vitellogenin: Complementary DNA Sequence and Messenger RNA and Protein

- Expression after 17(beta)-Estradiol Treatment. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 972-981.
- Kortenkamp, A. und Altenburger, R., 1999. Approaches to assessing combination effects of oestrogenic environmental pollutants. *Sci. Total Environ.* 233, 131-140.
- Kovárová, M. und Dráber, P., 2000. New specificity and yield enhancer of polymerase chain reactions. *Nucleic Acids Res.* 28, i-iv.
- Kraichely, D.M., Sun, J., Katzenellenbogen, J.A. und Katzenellenbogen, B.S., 2000. Conformational changes and coactivator recruitment by novel ligands for estrogen receptor-alpha and estrogen receptor-beta: correlations with biological character and distinct differences among SRC coactivator family members. *Endocrinology* 141, 3534-3545.
- Kramer, V.J., Miles-Richardson, S., Pierens, S.L. und Giesy, J.P., 1998. Reproductive impairment and induction of alkaline-labile phosphate, a biomarker of estrogen exposure, in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to waterborne 17 β -estradiol. *Aquat. Toxicol.* 40, 335-360.
- Krisfalusi, M. und Cloud, J.G., 1999. Gonadal sex reversal in triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Zool.* 284, 466-472.
- Krisfalusi, M., Eroschenko, V.P. und Cloud, J.G., 1998. Exposure of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to methoxychlor results in a dose-dependent decrease in growth and survival but does not alter male sexual differentiation. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 60, 659-666.
- Krishnan, A.V., Stathis, P., Permuth, S.F., Tokes, L. und Feldman, D., 1993. Bisphenol-A: An estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology* 132, 2279-2286.
- Krumschnabel, G., Malle, S., Schwarzbaum, P.J. und Wieser, W., 1994. Glycolytic function in goldfish hepatocytes at different temperatures: Relevance for Na⁺ pump activity and protein synthesis. *J. Exp. Biol.* 192, 285-290.
- Kuhnemann, S., Brown, T.J., Hochberg, R.B. und Maclusky, N.J., 1994. Sex differences in the development of estrogen receptors in the rat brain. *Hormones and Behaviour* 28, 483-491.
- Kuiper, G.G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Häggblad, J., Nilsson, S. und Gustafsson, J.A., 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptor α and β . *Endocrinology* 3, 863-870.
- Kuiper, G.G.J.M., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S.H., Vandersaag, P.T., Vandenburg, P. und Gustafsson, J.A., 1998. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen-receptor-beta. *Endocrinology* 139, 4252-4263.
- Kupfer, D., 1975. Effects of pesticides and related compounds on steroid metabolism and function. *Crit. Rev. Toxicol.* 4, 83-124.
- Kupfer, D. und Bulger, W.H., 1987. Metabolic activation of pesticides with proestrogenic activity. *Fed Proc* 46, 1864-1869.
- Kuroki, Y., Fukushima, K., Kanda, Y., Mizuno, K. und Watanabe, Y., 2000. Putative membrane-bound estrogen receptors possibly stimulate mitogen-activated protein kinase in the rat hippocampus. *European Journal of Pharmacology* 400, 205-209.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- La Fleur, G.J., Jr., Byrne, B.M., Kanungo, J., Nelson, L.D., Greenberg, R.M. und Wallace, R.A., 1995. *Fundulus heteroclitus* vitellogenin: The deduced primary structure of a piscine precursor to noncrystalline, liquid-phase yolk protein. *J. Mol. Evol.* 41, 505-521.
- Larsson, D.G.J., Adolfsson, M., Parkkonen, J., Pettersson, M., Berg, A.H., Olsson, P.E. und Forlin, L., 1999. Ethinylestradiol - An undesired fish contraceptive. *Aquat. Toxicol.* 45, 91-97.
- Laudet, V., 1997. Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *J. Mol. Endocrinol.* 19, 207-226.
- Lazennec, G., Huignard, H., Valotaire, Y. und Kern, L., 1995. Characterization of the transcription start point of the trout estrogen receptor encoding gene: evidence for alternative splicing in the 5' untranslated region. *Gene* 166, 243-247.
- Lazennec, G., Kern, L., Valotaire, Y. und Salbert, G., 1997. The nuclear orphan receptors COUP-TF and ARP-1 positively regulate the trout estrogen recep-

- tor gene through enhancing autoregulation. *Mol. Cell. Biol.* 17, 5053-5066.
- Le Dréan, Y., Pakdel, F. und Valotaire, Y., 1994. Structure and regulation of genes for estrogen receptors. In: Sherwood, N.M., Hew, C.L. (Eds.), *Molecular endocrinology of fish*. Fish Physiology, 13. Academic Press, New York. 331-366.
- Le Guellec, K., Lawless, K., Valotaire, Y., Kress, M. und Tenniswood, M., 1988. Vitellogenin gene expression in male rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 71, 359-371.
- Le Hir, M., Herzog, V. und Fahimi, H.D., 1979. Cytochemical detection of catalase with 3,3'-diaminobezidine. A quantitative reinvestigation of the optimal assay conditions. *Histochemistry* 64, 51-66.
- Lech, J.J., Lewis, S.K. und Ren, L., 1996. *In vivo* estrogenic activity of nonylphenol in rainbow trout. *Fundam. Appl. Toxicol.* 30, 229-232.
- Lee, H.B. und Peart, R.E., 1999. Occurrence of nonylphenol ethoxylates and their metabolites in Canadian pulp and paper mill effluents and sludge. *Water Quality Research Journal of Canada* 34, 633-652.
- Lee, H.B. und Peart, T.E., 2000. Bisphenol A contamination in Canadian municipal and industrial wastewater and sludge samples. *Water Quality Research Journal of Canada* 35, 283-298.
- Legler, J., Broekhof, J.L.M., Brouwer, A., Lanser, P.H., Murk, A.J., Van Der Saag, P.T., Vethaak, A.D., Wester, P., Zivkovic, D. und Van Der Burg, B., 2000. A novel *in vivo* bioassay for (xeno)-estrogens using transgenic zebrafish. *Environ. Sci. Technol.* 34, 4439-4444.
- Legler, J., Van Den Brink, C.E., Brouwer, A., Murk, A.J., Van Der Saag, P.T., Vethaak, A.D. und Van Der Burg, B., 1999. Development of a stably transfected estrogen receptor-mediated luciferase reporter gene assay in the human T47D breast cancer cell line. *Toxicol. Sci.* 48, 55-66.
- Legrand, C., Bour, J.M., Jacob, C., Capiaumont, J., Martial, A., Marc, A., Wudtke, M., Kretzmer, G., Demangel, C., Duval, D. und Hache, J., 1992. Lactate dehydrogenase (LDH) activity of the number of dead cells in the medium of cultured eukaryotic cells as marker. *J. Biotechnol.* 25, 231-243.
- Lemmen, J.G., Broekhof, J.L.M., Kuiper, G.J.M., Gustafsson, J.A., Van Der Saag, P.T. und Van Der Burg, B., 1999. Expression of estrogen receptor alpha and beta during mouse embryogenesis. *Mech. Dev.* 81, 163-167.
- Leonards, P.E.G., Elmeros, M., Cofino, W.P., Conroy, J., Gutleb, A.C., Mason, C.F., Murk, A.J., Smit, M.D., Van Hattum, B. und Madsen, A.B., 1996. Toxic PCBs in European otter populations in relation to biological factors and health status. In: Smit, M.D., Leonards, P.E.G., Murk, A.J., De Jongh, A.J.J., Van Hattum, B. (Eds.), *Development of Otter-Based Quality Objectives for PCBs*. Institute for Environmental Studies, Amsterdam.
- Lethimonier, C., Flouriot, G., Valotaire, Y., Kah, O. und Ducouret, B., 2000. Transcriptional interference between glucocorticoid receptor and estradiol receptor mediates the inhibitory effect of cortisol on fish vitellogenesis. *Biol. Reprod.* 62, 1763-1771.
- Levin, E.R., 1999. Cellular functions of the plasma membrane estrogen receptor. *Trends Endocrinol. Metabol.* 10, 374-377.
- Lewis, J.A., Clemens, M.J. und Tata, J.R., 1976. Morphological and biochemical changes in the hepatic endoplasmic reticulum and golgi apparatus of male *Xenopus laevis* after induction of egg-yolk protein synthesis by oestradiol-17 beta. *Mol. Cell. Endocrinol.* 4, 311-329.
- Li, A.P., Hartman, N.R., Lu, C., Collins, J.M. und Strong, J.M., 1999. Effects of cytochrome P450 inducers on 17alpha-ethinyloestradiol (EE2) conjugation by primary human hepatocytes. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 48, 733-742.
- Liber, K., Gangl, J.A., Corry, T.D., Heinis, L.J. und Stay, F.S., 1999. Lethality and bioaccumulation of 4-nonylphenol in bluegill sunfish in littoral enclosures. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 394-400.
- Lim, E.H., Ding, J.L. und Lam, T.J., 1991. Estradiol-induced vitellogenin gene expression in a teleost fish, *Oreochromis aureus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 82, 206-214.
- Loomis, A.K. und Thomas, P., 1999. Binding characteristics of estrogen receptor (ER) in Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*) testis: Different affinity for estrogens and xenobiotics from that of hepatic ER. *Biol. Reprod.* 61, 51-60.

- Lustig, R.H., 1994. Sex hormone modulation of neural development in vitro. *Horm. Behav.* 28, 383-395.
- Lutz, I. und Kloas, W., 1999. Amphibians as a Model to Study Endocrine Disruptors - I - Environmental-Pollution and Estrogen-Receptor Binding. *Sci. Total Environ.* 225, 49-57.
- Lye, C.M., Frid, C.L.J., Gill, M.E., Cooper, D.W. und Jones, D.M., 1999. Estrogenic alkylphenols in fish tissues, sediments, and waters from the UK Tyne and Tees estuaries. *Environ. Sci. Technol.* 33, 1009-1014.
- Lye, C.M., Frid, C.L.J., Gill, M.E. und McCormick, D., 1997. Abnormalities in the reproductive health of flounder *Platichthys flesus* exposed to effluent from a sewage treatment works. *Mar. Poll. Bull.* 34, 34-41.
- Lyons, C.E., Payette, K.L., Price, J.L. und Huang, R.C., 1993. Expression and structural analysis of a teleost homolog of a mammalian zona pellucida gene. *J. Biol. Chem.* 268, 21351-21358.
- Ma, C.H., Dong, K.W. und Yu, K.L., 2000. cDNA cloning and expression of a novel estrogen receptor beta-subtype in goldfish (*Carassius auratus*). *Biochim. Biophys. Acta* 1490, 145-152.
- Machishi, H., Higashi, S., Hibasami, H., Nakashima, K., Kawarada, Y. und Mizumoto, R., 1995. Role of activation of ornithine decarboxylase and DNA synthesis on ethynylestradiol-induced hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 16, 2965-2971.
- MacKay, M.E. und Lazier, C.B., 1993. Estrogen responsiveness of vitellogenin gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) kept at different temperatures. *Gen. Comp. Endocrinol.* 89, 255-66.
- MacKay, M.E., Raelson, J. und Lazier, C.B., 1996. Up-regulation of estrogen receptor mRNA and estrogen receptor activity by estradiol in liver of rainbow trout and other teleostean fish. *Comp. Biochem. Physiol. C* 115, 201-209.
- Maître, J.-L., Valotaire, Y. und Guguen-Guillouzo, C., 1986. Estradiol-17 β stimulation of vitellogenin synthesis in primary culture of male rainbow trout hepatocytes. *In-vitro Cell. Develop. Biol.* 22, 337-343.
- Makela, S., Davis, V., Tally, W.C., Korkman, H., Salo, L., Santti, R., Vikho, R. und Korach, K.S., 1994. Dietary estrogens act through receptor mediated processes and show no antiestrogenicity in cultured breast cancer cells. *Environ. Health Perspect.* 102, 572-578.
- Makela, S., Savolainen, H., Aavik, E., Myllarniemi, M., Strauss, L., Taskinen, E., Gustafsson, J.A. und Hayry, P., 1999. Differentiation between vasculo-protective and uterotrophic effects of ligands with different binding affinities to estrogen receptors alpha and beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 7077-7082.
- Mañanós, E., Núñez, J., Zanuy, S., Carrillo, M. und Le Menn, F., 1994. Sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) vitellogenin. II - Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Comp. Biochem. Physiol. B* 107, 217-223.
- Mansfield, L.S., Urban, J.F., Holley-Shanks, R.R., Murtaugh, M.P., Zarlenga, D.S., Foss, D., Canals, A., Gause, W. und Lunney, J.K., 1998. Construction of internal cDNA competitors for measuring IL-10 and IL-12 cytokine gene expression in swine. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 65, 63-74.
- Marchand, O., Govoroun, M., D'Cotta, H., Mcmeel, O., Lareyre, J., Bernot, A., Laudet, V. und Guiguen, Y., 2000. DMRT1 expression during gonadal differentiation and spermatogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biochim. Biophys. Acta* 1493, 180-187.
- Markin, H.L.J.L., 1984. *Biochemistry of steroid hormones.* Blackwell Scientific Publications.
- Martin, M.B., Franke, T.F., Stoica, G.E., Chambon, P., Katzenellenbogen, B.S., Stoica, B.A., Mclemore, M.S., Olivo, S.E. und Stoica, A., 2000. A role for Akt in mediating the estrogenic functions of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 141, 4503-4511.
- Martin, M.B., Riegel, A.T. und Schoenberg, D.R., 1986. Differential induction of vitellogenin gene transcription and total transcriptional activity by estrogen in *Xenopus laevis* liver. *J. Biol. Chem.* 261, 2355-23.
- Más, P., Sánchez-Navarro, J.A., Sánchez-Pina, M.A. und Pallás, V., 1993. Chemiluminescent and colorimetric detection of cherry leaf roll virus with digoxigenin-labeled RNA probes. *J. Virol. Meth.* 45, 93-102.

- Matthews, J. und Zacharewski, T., 2000. Differential binding affinities of PCBs, HO-PCBs, and aroclors with recombinant human, rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*), and green anole (*Anolis carolinensis*) estrogen receptors, using a semi-high throughput competitive binding assay. *Toxicol. Sci.* 53, 326-339.
- Mayr, U., Butsch, A. und Schneider, S., 1992. Validation of two in vitro test systems for estrogenic activities with zearalenone, phytoestrogens and cereal extracts. *Toxicology* 74, 135-149.
- Mazur, W., 1998. Phytoestrogen content in foods. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.* 12, 729-742.
- Mazur, W. und Adlercreutz, H., 2000. Overview of naturally occurring endocrine-active substances in the human diet in relation to human health. *Nutrition* 16, 654-658.
- McEwen, B.S. und Alves, S.E., 1999. Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr. Rev.* 20, 279-307.
- McLachlan, J.A., Newbold, R.R., Li, S. und Negishi, M., 1998. Are estrogens carcinogenic during development of the testes? *APMIS* 106, 240-244.
- Mellanen, P., T., P., Lehtimäki, J., Mäkelä, S., Bylund, G., Holmbom, B., Mannila, E., Oikari, A. und Santti, R., 1996. Wood-derived estrogens: studies *in vitro* with breast cancer cell lines and *in vivo* in trout. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 136, 381-388.
- Mellanen, P., Soimasuo, M., Holmbom, B., Oikari, A. und Santti, R., 1999. Expression of the Vitellogenin Gene in the Liver of Juvenile Whitefish (*Coregonus lavaretus* L-S.L.) Exposed to Effluents from Pulp and Paper-Mills. *Ecotoxicol Environ Saf* 43, 133-137.
- Merz, W., Metzger, J.W., Kemper, C. und Jenkins, E., 1998. Untersuchung zum Eintrag, Verhalten und Verbleib von Sexualhormonen im Abwasser und Klärschlamm - Abschlussbericht für das Forschungsvorhaben. Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte- und Abfallwirtschaft der Universität Stuttgart, Abt. Hydrochemie, Stuttgart.
- Migliaccio, S., Newbold, R., R., McLachlan, J.A. und Korach, K.S., 1995. Alterations in estrogen levels during development affects the skeleton: Use of an animal model. *Environ. Health Perspect.* 103, 95-97.
- Migliaccio, S., Newbold, R.R., Teti, A., Jefferson, W.J., Toverud, S.U., Taranta, A., Bullock, B.C., Suggs, C.A., Spera, G. und Korach, K.S., 2000. Transient estrogen exposure of female mice during early development permanently affects osteoclastogenesis in adulthood. *Bone* 27, 47-52.
- Miles-Richardson, S.R., Kramer, V.J., Fitzgerald, S.D., Render, J.A., Yamini, B., Barbee, S.J. und Giesy, J.P., 1999a. Effects of waterborne exposure of 17 beta-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Aquat. Toxicol.* 47, 129-145.
- Miles-Richardson, S.R., Pierens, S.L., Nichols, K.M., Kramer, V.J., Snyder, E.M., Snyder, S.A., Render, J.A., Fitzgerald, S.D. und Giesy, J.P., 1999b. Effects of waterborne exposure to 4-nonylphenol and nonylphenol ethoxylate on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ. Res.* 80, S122-S137.
- Miller, S.C., Bottema, C.D., Stathis, P.A., Tokes, L.G. und Feldman, D., 1986. Unexpected presence of estrogens in culture medium supplements: subsequent metabolism by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. 119, 1362-1369.
- Mitchel, D.B., Santone, K.S. und Acosta, D., 1980. Evaluation of cytotoxicity in cultured cells by enzyme leakage. *J. Tissue Cult. Methods* 6, 113-116.
- Miura, T., Miura, C., Ohta, T., Nader, M.R., Todo, T. und K., Y., 1999. Estradiol-17beta stimulates the renewal of spermatogonial stem cells in males. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 264, 230-234.
- Monostory, K., Jemnitz, K. und Vereczkey, L., 1996. Xenobiotic metabolizing enzymes in fish: diversity, regulation and biomarkers for pollutant exposure. *Acta Physiol. Hung.* 84, 369-381.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
- Mouchel, N., Trichet, V., Betz, A., Le Pennec, J.-P. und Wolff, J., 1996. Characterization of vitellogenin from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gene* 174, 59-64.
- Mrsić, W., 1923. Die Spätbefruchtung und deren Einfluss auf Entwicklung und Geschlechtsbildung,

- experimentell nachgeprüft an der Regenbogenforelle. Arch. Mikrosk. Anat. Entw.-Mech. 98, 129-209.
- Mueller, G.C. und Kim, U., 1978. Displacement of estradiol from estrogen receptors by simple alkyl phenols. Endocrinology 102, 1429-1435.
- Muramatsu, M. und Inoue, S., 2000. Estrogen receptors: how do they control reproductive and nonreproductive functions? Biochem. Biophys. Res. Commun. 270, 1-10.
- Murata, K., Sugiyama, H., Yasumasu, S., Iuchi, I., Yasumasu, I. und Yamagami, K., 1997. Cloning of cDNA and estrogen-induced hepatic gene expression for choriogenin H, a precursor protein of the fish egg envelope (chorion). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 2050-2055.
- Nadal, A., Roperio, A.P., Laribi, O., Maillet, M., Fuentes, E. und Soria, B., 2000. Nongenomic actions of estrogens and xenoestrogens by binding at a plasma membrane receptor unrelated to estrogen receptor α and estrogen receptor β . Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 11603-11608.
- Nagai, M., Yoshida, A. und Sato, N., 1998. Additive effects of bovine serum albumin, dithiothreitol, and glycerol on PCR. Biochem. Mol. Biol. Int. 44, 157-163.
- Nash, M.A., Lenzi, R., Platsoucas, C.D. und Freedman, R.S., 1998. RT-PCR quantitation of cytokine responses in vivo from specimens containing small numbers of cells during bioimmunotherapy. J. Immunol. Meth. 219, 169-179.
- Nath, P. und Sundaraj, B.I., 1981. Isolation and identification of female specific serum lipophosphoprotein (vitellogenin) in the catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). Gen. Comp. Endocrinol. 43, 184-190.
- Navas, J.M. und Segner, H., 2000. Antiestrogenicity of beta-naphthoflavone and PAHs in cultured rainbow trout hepatocytes: evidence for a role of the arylhydrocarbon receptor. Aquat. Toxicol. 51, 79-92.
- Nelson, J.S., 1994. Fishes of the world. John Wiley & Sons, New York.
- Newton, C.R. und Graham, A., 1994. PCR. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Ng, T.B. und Idler, D.R., 1983. Yolk formation and differentiation in teleost fishes. In: Hoar, W.S., Randall, D.J., Donaldson, E.M. (Eds.), Fish Physiology. IXA. Academic Press, New York. 373-404.
- Ng, T.B., Woo, N.Y.S., Tam, P.P.L. und Au, C.Y.W., 1984. Changes in metabolism and hepatic ultrastructure induced by estradiol and testosterone in immature female *Epinephelus akaara* (Teleostei, Serranidae). Cell Tiss. Res. 236, 651-659.
- Nielsen, D.A. und Shapiro, D.J., 1990. Insights into hormonal control of messenger RNA stability. Mol. Endocrinol. 4, 953-957.
- Nimrod, A.C. und Benson, W.H., 1996. Environmental estrogenic effects of alkylphenol ethoxylates. Crit. Rev. Toxicol. 26, 335-364.
- Norberg, B. und Haux, C., 1985. Induction, isolation and a characterization of the lipid content of plasma vitellogenin from two *Salmo* species: Rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and sea trout (*Salmo trutta*). Comp. Biochem. Physiol. B 81, 869-876.
- Núñez, S.B., Medin, J.A., Braissant, O., Kemp, L., Wahli, W., Ozato, K. und Segars, J.H., 1997. Retinoid X receptor and peroxisome proliferator-activated receptor activate an estrogen responsive gene independent of the estrogen receptor. Mol. Cell. Endocrinol. 127, 27-40.
- Odum, J., Lefevre, P.A., Tittensor, S., Paton, D., Routledge, E.J., Beresford, N.A., Sumpter, J.P. und Ashby, J., 1997. The rodent uterotrophic assay: critical protocol features, studies with nonyl phenols, and comparison with a yeast estrogenicity assay. Regul. Toxicol. Pharmacol. 25, 176-188.
- Ogawa, S., Lubahn, D.B., Korach, K.S. und Pfaff, D.W., 1997. Behavioral effects of estrogen receptor gene disruption in male mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 1476-1481.
- Ohlson, C.G. und Hardell, L., 2000. Testicular cancer and occupational exposures with a focus on xenoestrogens in polyvinyl chloride plastics. Chemosphere 40, 1277-1282.
- Olivereau, M. und Olivereau, J., 1979a. Effect of estradiol-17 beta on the cytology of the liver, gonads and pituitary, and on plasma electrolytes in the female freshwater eel. Cell Tiss. Res. 199, 431-454.
- Olivereau, M. und Olivereau, J., 1979b. Effect of estradiol-17 β on the cytology of the liver of the

- zebrafish, *Brachydanio rerio*, related to vitellogenin synthesis. *Cell Tiss. Res.* 186, 431-454.
- Olsson, P.-E., Kling, P., Petterson, C. und Silverstrand, C., 1995. Interaction of cadmium and oestradiol-17 β on metallothionein and vitellogenin synthesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biochem. J.* 307, 197-203.
- Oostenbrink, B.C., Pitera, J.W., Lipzig, M.M.H., Meerman, J.H.N. und Gunsteren, W.F., 2000. Simulations of the estrogen receptor ligand-binding domain: Affinity of natural ligands and xenoestrogens. *J. Med. Chem.* 43, 4594-4605.
- Oppen-Berntsen, D.O., Gram-Jensen, E. und Walther, B.T., 1992a. Zona radiata proteins are synthesized by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes in response to oestradiol-17 beta. *J. Endocrinol.* 135, 293-302.
- Oppen-Berntsen, D.O., Hyllner, S.J., Haux, C., Helvik, J.V. und Walther, B.T., 1992b. Eggshell zona radiata-proteins from cod (*Gadus morhua*): extra-ovarian origin and induction by estradiol-17 beta. *Int. J. Dev. Biol.* 36, 247-254.
- Oppen-Berntsen, D.O., Olsen, S.O., Rong, C.J., Taranger, G.L., Swanson, P. und Walther, B.T., 1994. Plasma levels of eggshell Zr-proteins, estradiol-17-beta, and gonadotropins during an annual reproductive cycle of atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Exp. Zool.* 268, 59-70.
- Pace, P., Taylor, J., Suntharalingam, S., Coombes, R.C. und Ali, S., 1997. Human estrogen receptor beta binds DNA in a manner similar to and dimerizes with estrogen receptor alpha. *J. Biol. Chem.* 272, 25832-25838.
- Pakdel, F., Feon, S., Le-Gac, F., Le-Menn, F. und Valotaire, Y., 1991. *In vivo* estrogen induction of hepatic estrogen receptor mRNA and correlation with vitellogenin mRNA in rainbow trout. *Mol. Cell. Endocrinol.* 75, 205-212.
- Palanza, P., Morellini, F., Parmigiani, S. und Vom Saal, F.S., 1999. Prenatal exposure to endocrine disrupting chemicals: effects on behavioral development. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 23, 1011-1027.
- Palmer, B.D., Huth, L.K., Pioto, D.L. und Selcer, K.W., 1998. Vitellogenin as a biomarker for xenobiotic estrogens in an amphibian model system. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 30-36.
- Palmer, B.D. und Palmer, S.K., 1995. Vitellogenin induction by xenobiotic estrogens in the red eared turtle and the African clawed frog. *Environ. Health Perspect.* 103, 19-25.
- Pan, M.L., Bell, W.J. und Telfer, W.H., 1969. Vitellogenic blood protein synthesis by insect fat body. *Science* 165, 393-294.
- Pandian, T.J., 1993. Endocrine and chromosome manipulation techniques for the production of all-male and all-female populations in food and ornamental fishes. *Proc. Indian Natn. Sci. Acad. B* 59, 549-566.
- Pankhurst, N.W. und Van Der Kraak, G., 2000. Evidence that acute stress inhibits ovarian steroidogenesis in rainbow trout *in vivo*, through the action of cortisol. *Gen. Comp. Endocrinol.* 117, 225-237.
- Pannevis, M.C. und Hoolihan, D.F., 1992. The energetic cost of protein synthesis in isolated hepatocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Comp. Physiol. [B]* 162, 393-400.
- Papoulias, D.M., Noltie, D.B. und Tillitt, D., 2000. An *in vivo* model fish system to test chemical effects on sexual differentiation and development: Exposure to ethinyl estradiol. *Aquat. Toxicol.* 48, 37-50.
- Parazzini, F., Bortolotti, A. und Colli, E., 1998. Declining sperm count and fertility in males: an epidemiological controversy. *Arch. Androl.* 41, 27-30.
- Parks, L.G., Cheek, A.O., Denslow, N.D., Heppell, S.A., Mclachlan, J.A., Leblanc, G.A. und Sullivan, C.V., 1999. Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin - Purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. *Comp. Biochem. Physiol C* 123, 113-125.
- Parrish, A.R., Gandolfi, A.J. und Brendel, K., 1995. Precision-cut tissue slices: applications in pharmacology and toxicology. *Life Sci.* 57, 1887-1901.
- Patino, R., Xia, Z., Gale, W.L., Wu, C., Maule, A.G. und Chang, X., 2000. Novel transcripts of the estrogen receptor alpha gene in Channel Catfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 120, 314-325.
- Patyna, P.J., Davi, R.A., Parkerton, T.F., Brown, R.P. und Cooper, K.R., 1999. A proposed multi-generation protocol for Japanese medaka (*Oryzias*

- latipes*) to evaluate effects of endocrine disruptors. *Sci. Total Environ.* 233, 211-220.
- Pedersen, S.N., Christiansen, L.B., Pedersen, K.L., Korsgaard, B. und Bjerregaard, P., 1999. *In vivo* estrogenic activity of branched and linear alkylphenols in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Sci. Total Environ.* 233, 89-96.
- Pelissero, C., Flouriot, G., Foucher, L., Bennetau, B., Dunoguès, J., Le Gac, F. und Sumpter, J.P., 1993. Vitellogenin synthesis in cultured hepatocytes; an *in vitro* test for the estrogenic potency of chemicals. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 44, 263-272.
- Pelissero, C., Le Menn, F. und Kaushick, S., 1991. Estrogenic effect of dietary soya bean meal on vitellogenesis in cultured siberian sturgeon *Acipenser baeri*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 83, 447-457.
- Pennie, W.D., Aldridge, T.C. und A.N., B., 1998. Differential activation by xenoestrogens of ER α and ER β when linked to different response elements. *J. Endocrinol.* 158, R11-R14.
- Perlman, A.J., Wolffe, A.P., Champion, J. und Tata, J.R., 1984. Regulation by estrogen receptor of vitellogenin gene transcription in *Xenopus* hepatocyte cultures. *Mol. Cell. Endocrinol.* 38, 151-161.
- Petit, F., Le Goff, P., Cravedi, J.-P., Kah, O., Valotaire, Y. und Pakdel, F., 1999. Trout oestrogen receptor sensitivity to xenobiotics as tested by different bioassays. *Aquaculture* 177, 353-365.
- Petit, F., Le-Goff, P., Cravedi, J.P., Valotaire, Y. und Pakdel, F., 1997. Two complementary bioassays for screening the estrogenic potency of xenobiotics: recombinant yeast for trout estrogen receptor and trout hepatocyte cultures. *J. Mol. Endocrinol.* 19, 321-335.
- Peute, J., Huiskamp, R. und Van Oordt, P.G.W.J., 1985. Quantitative analysis of estradiol-17 β -induced changes in the ultrastructure of the liver of the male zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Cell Tiss. Res.* 242, 377-382.
- Peute, J., Van Der Gaag, M.A. und Lambert, J.G.D., 1978. Ultrastructure and lipid content of the liver of the zebrafish, *Brachydanio rerio*, related to vitellogenin synthesis. *Cell Tiss. Res.* 186, 297-308.
- Peyon, P., Baloche, S. und Burzawa-Gérard, E., 1996. Potentiating effect of growth hormone on vitellogenin synthesis induced by 17 β -estradiol in primary culture of female silver eel (*Anguilla anguilla* L.) hepatocytes. *Gen. Comp. Endocrinol.* 102, 263-273.
- Piferrer, F., Zanuy, S., Carrillo, M., Solar, I.I., Devlin, R.H. und Donaldson, E.M., 1994. Brief treatment with an aromatase inhibitor during sex differentiation causes chromosomally female salmon to develop as normal, functional males. *J. Exp. Zool.* 270, 255-262.
- Pirie, D., Steven, L., Mcgrory, S. und Best, G., 1996. Survey of hormone disrupting chemicals. SEPA-Report.
- Pomp, D. und Medrano, J.F., 1991. Organic solvents as facilitators of polymerase chain reaction. *Biotechniques* 10, 58-59.
- Portelli, M.J., De Solla, S.R., Brooks, R.J. und Bishop, C.A., 1999. Effect of dichlorodiphenyltrichloroethane on sex determination of the common snapping turtle (*Chelydra serpentina serpentina*). *Ecotoxicol Environ Saf* 43, 284-291.
- Prall, O.W.J., Rogan, E.M. und Sutherland, R.L., 1998. Estrogen regulation of cell cycle progression in breast cancer cells. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 65, 169-174.
- Purdom, C.E., Hardiman, P.A., Bye, V.J., Eno, N.C., Tyler, C.R. und Sumpter, J.P., 1994. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem. Ecol.* 8, 275-285.
- Qiao, P., Gobas, F.A. und Farrell, A.P., 2000. Relative contributions of aqueous and dietary uptake of hydrophobic chemicals to the body burden in juvenile rainbow trout. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 39, 369-377.
- Ranney, R.E., 1977. Comparative metabolism of 17 α -ethynyl steroids used in oral contraceptives. *J. Toxicol. Environ. Health* 3, 139-166.
- Redshaw, M.R., Follet, B.K. und Nicholls, T.J., 1969. Comparative effects of oestrogens and other steroid hormones on serum lipids and proteins in *Xenopus laevis* Daudin. *J. Endocrinol.* 43, 47-53.
- Redshaw, M.R. und Follett, B.K., 1971. The crystalline yolk-platelet proteins and their soluble plasma precursor in an amphibian, *Xenopus laevis*. *Biochem. J.* 124, 759-766.

- Reed, M.J., Fotherby, K., Steele, S.J. und Addison, J., 1972. *In vivo* and *in vitro* metabolism of ethinylestradiol. *J. Endocrinol.* 53, 28-29.
- Ren, L., Lattier, D. und Lech, J.J., 1996a. Estrogenic activity in rainbow trout determined with a new estrogenic probe for vitellogenesis, pSG5Vg1.1. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 56, 287-294.
- Ren, L., Lewis, S.K. und Lech, J.J., 1996b. Effects of estrogen and nonylphenol on the post-transcriptional regulation of vitellogenin gene expression. *Chem. Biol. Interact.* 100, 67-76.
- Ren, L., Marquardt, M.A. und Lech, J.J., 1997. Estrogenic effects of nonylphenol on pS2, ER and MUC1 gene expression in human breast cancer cells-MCF-7. *Chem. Biol. Interact.* 104, 55-64.
- Ren, L., Meldahl, A. und Lech, J.J., 1996c. Dimethyl formamid (DMFA) and ethylene glycol (EG) are estrogenic in rainbow trout. *Chem. Biol. Interact.* 102, 63-67.
- Reynolds, E.S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17, 208-212.
- Richard-Mercier, N., Dorizzi, M., Desvages, G., Girondot, M. und Pieau, C., 1995. Endocrine sex reversal of gonads by the aromatase inhibitor Letrozole (CGS 20267) in *Emys orbicularis*, a turtle with temperature-dependent sex determination. *Gen. Comp. Endocrinol.* 100, 314-326.
- Rickard, D.J., Subramaniam, M. und Spelsberg, T.C., 1999. Molecular and cellular mechanisms of estrogen action on the skeleton. *J. Cell. Biochem. Suppl.* 32-33, 123-132.
- Rijhsinghani, A.G., Thompson, K., Bhatia, S.K. und Waldschmidt, T.J., 1996. Estrogen blocks early T cell development in the thymus. *Am. J. Reprod. Immunol.* 36, 269-277.
- Roos, A., Bergman, A., Grayerz, E. und Olsson, M., 1998. Time trend studies on SDDT and PCB in juvenile gray seals (*Halichoerus grypus*), fish and guillemot eggs from the Baltic Sea. *Organohalogen Compounds* 39, 109-112.
- Rosner, W., 1991. In: Strauss, J.F. (Ed.), *Plasma Steroid-Binding Proteins.* 697-720.
- Routledge, E.J., Sheahan, D., Desbrow, C., Brighty, G.C., Waldoock, M. und Sumpter, J.P., 1998. Identification of estrogenic chemicals in Stw effluent - 2 - *In vivo* responses in trout and roach. *Environ. Sci. Technol.* 32, 1559-1565.
- Routledge, E.J. und Sumpter, J.P., 1996. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 241-248.
- Routledge, E.J., White, R., Parker, M.G. und Sumpter, J.P., 2000. Differential effects of xenoestrogens on coactivator recruitment by estrogen receptor (ER) α and ER β . *J. Biol. Chem.* 275, 35986-35993.
- Roy, A.K. und Chatterjee, B., 1983. Sexual dimorphism in the liver. *Annu. Rev. Physiol.* 45, 37-50.
- Rozen, S. und Skaletsky, H.J., 1998. *Primer 3.* Whitehead Institute, Cambridge, USA.
- Sabbah, M., Radanyi, C., Redeuilh, G. und Baulieu, E.-E., 1996. The 90 kDa heat-shock protein (hsp90) modulates the binding of the oestrogen receptor to its cognate DNA. *Biochem. J.* 314, 205-213.
- Safe, S., Connor, K. und Gaido, K., 1998a. Methods for Xenoestrogen Testing. *Toxicol. Lett.* 103, 665-670.
- Safe, S., Wang, F., Porter, W., Duan, R. und Mcdougal, A., 1998b. Ah receptor agonists as endocrine disruptors: antiestrogenic activity and mechanisms. *Toxicol. Lett.* 103, 343-347.
- Safe, S.H. und Gaido, K., 1998. Phytoestrogens and Anthropogenic Estrogenic Compounds. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 119-126.
- Saidi, J.A., Chang, D.T., Goluboff, E.T., Bagiella, E., Olsen, G. und Fisch, H., 1999. Declining sperm counts in the United States? A critical review. *Journal of Urology* 161, 460-462.
- Sarkar, G., Kapelner, S. und Sommer, S.S., 1990. Formamide can dramatically improve the specificity of PCR. *Nucleic Acids Res.* 18, 7465.
- Saunders, P.T., Majdic, G., Parte, P., Millar, M.R., Fisher, J.S., Turner, K.J. und Sharpe, R.M., 1997. Fetal and perinatal influence of xenoestrogens on testis gene expression. *Adv Exp Med Biol* 424, 99-110.
- Schlenk, D., Stresser, D.M., Mccants, J.C., Nimrod, A.C. und Benson, W.H., 1997. Influence of beta-naphthoflavone and methoxychlor pretreatment on

- the biotransformation and estrogenic activity of methoxychlor in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 145, 349-56.
- Schmeckpeper, B.J. und Smith, K.D., 1973. Use of formamide in nucleic acid reassociation. *Biochemistry* 11, 1319-1326.
- Schmieder, P., Tapper, M., Linnum, A., Denny, J., Kolanczyk, R. und Johnson, R., 2000. Optimization of a precision-cut trout liver tissue slice assay as a screen for vitellogenin induction: comparison of slice incubation techniques. *Aquat. Toxicol.* 49, 251-268.
- Scholz, S. und Gutzeit, H.O., 2000. 17- α -ethinylestradiol affects reproduction, sexual differentiation and aromatase gene expression of the medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat. Toxicol.* 50, 363-373.
- Selman, K. und Wallace, R.A., 1982. The inter- and intracellular passage of proteins through the ovarian follicle in teleosts. In: Richter, C.J.J., Goos, H.J.T. (Eds.), *Reproductive Physiology of Fish*. Pudoc, Wageningen. 151-154.
- Shapiro, D., 1982. Steroid hormone regulation of vitellogenin gene expression. *Crit. Rev. Biochem.* 12, 187-203.
- Shapiro, D.J., Baker, H.J. und Stitt, D.T., 1976. In vitro translation and estradiol-17 β induction of *Xenopus laevis* vitellogenin messenger RNA. *J. Biol. Chem.* 251, 3105-3111.
- Sharer, J.E., Shipley, L.A., Vandenbranden, M.R., Binkley, S.N. und Wrighton, S.A., 1995. Comparisons of phase I and phase II in vitro hepatic enzyme activities of human, dog, rhesus monkey, and cynomolgus monkey. *Drug Metab Dispos* 23, 1231-1241.
- Sharrock, W.J., Rosenwasser, T.A., Gould, J., Knott, J., Hussey, D., Gordon, J.I. und Banaszak, L.J., 1992. Sequence of lamprey vitellogenin. Implications for the lipovitellin crystal structure. *J. Mol. Biol.* 226, 903-907.
- Sheahan, D.A., Bucke, D., Matthiessen, P., Sumpter, J.P., Kirby, M.F., Neall, P. und Waldock, M., 1994. The effects of low levels of 17 α -ethinylestradiol upon plasma vitellogenin levels in male and female rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* held at two acclimation temperatures. In: Müller, R., Lloyd, R. (Eds.), *Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish*. Fishing News Books, FAO, Oxford, London, Edinburgh, Cambridge, Carlton. 99-112.
- Sheehan, D.M., Branham, W.S., Medlock, K.L. und Shanmugasundaram, E.R., 1984. Estrogenic activity of zearalenone and zearalanol in the neonatal rat uterus. *Teratology* 29, 383-392.
- Shelby, M.D., Newbold, R.R., Tully, D.B., Chae, K. und Davis, V.L., 1996. Assessing environmental chemicals for estrogenicity using a combination of *in vitro* and *in vivo* assays. *Environ. Health Perspect.* 104, 1296-1300.
- Shibata, N. und Hamaguchi, S., 1988. Evidence for the sexual bipotentiality of spermatogonia in the fish, *Oryzias latipes*. *J. Exp. Zool.* 245, 71-77.
- Shilling, A.D. und Williams, D.E., 2000. Determining relative estrogenicity by quantifying vitellogenin induction in rainbow trout liver slices. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 164, 330-335.
- Shimada, A.K., Yoshida, K. und Saito, N., 1996. Effects of aromatase inhibitor on sex differentiation and levels of P450 (17 α) and P450 aromatase messenger ribonucleic acid of gonads in chicken embryos. *Gen. Comp. Endocrinol.* 102, 241-246.
- Shimizu, M., Fukada, H., Fujita, T., Hiramatsu, N. und Hara, A., 2000. Serum levels of precursors to vitelline envelope proteins (choriogenins) in Sakhalin taimen after treatment with oestrogen and during oocyte growth. *J. Fish Biol.* 57, 170-181.
- Shioda, T. und Wakabayashi, M., 2000. Effect of certain chemicals on the reproduction of medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 40, 239-243.
- Shore, L.S., Gurevitz, M. und Shemesh, M., 1993. Estrogen as an environmental pollutant. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 51, 361-366.
- Shughrue, P.J. und Merchenthaler, I., 2000. Evidence for novel estrogen binding sites in the rat hippocampus. *Neuroscience* 99, 605-612.
- Silversand, C., Hyllner, S.J. und Haux, C., 1993. Isolation, immunochemical detection and observations of the instability of vitellogenin from four teleosts. *J. Exp. Zool.* 267, 587-597.
- Simerly, R.B., Zee, M.C., Pendleton, J.W., Lubahn, D.B. und Korach, K.S., 1997. Estrogen receptor-dependent sexual differentiation of dopaminergic

- neurons in the preoptic region of the mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 14077-14082.
- Sinowatz, F., Kolle, S. und Topfer-Petersen, E., 2001. Biosynthesis and expression of zona pellucida glycoproteins in mammals. Cells Tissues Organs 168, 24-35.
- Sire, M.-F., Babin, P.J. und Vernier, J.-M., 1994. Involvement of the lysosomal system in yolk protein deposit and degradation during vitellogenesis and embryonic development in trout. J. Exp. Zool. 269, 69-83.
- Skipper, J.K. und Hamilton, T.H., 1977. Regulation by estrogen of the vitellogenin gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 2384-2388.
- Smeets, J.M.W., Van Holsteijn, I., Giesy, J.P., Seinen, W. und Van Den Berg, M., 1999a. Estrogenic potencies of several environmental pollutants, as determined by vitellogenin induction in a carp hepatocyte assay. Toxicol. Sci. 50, 206-213.
- Smeets, J.M.W., Van Holsteijn, I., Giesy, J.P., Seinen, W. und Van Den Berg, M., 1999b. Estrogenic potencies of several environmental pollutants, as determined by vitellogenin induction in a carp hepatocyte assay. Toxicol. Sci. 50, 206-213.
- Smith, J.S. und Thomas, P., 1991. Changes in hepatic estrogen-receptor concentrations during the annual reproductive and ovarian cycles of a marine teleost, the spotted seatrout, *Cynoscion nebulosus*. Gen. Comp. Endocrinol. 81, 234-45.
- Smith, T.K., Long, C.M., Bowman, B. und Manos, M.M., 1990. Using cosolvents to enhance PCR amplification. Amplifications 5, 16-17.
- Sohoni, P. und Sumpter, J.P., 1998. Several environmental estrogens are also anti-androgens. J. Endocrinol. 158, 327-339.
- Sonnenschein, C. und Soto, A.M., 1998. An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. J. Steroid Biochem. Molec. Biol. 65, 143-150.
- Soto, A.M., Justicia, H., Wray, J.W. und Sonnenschein, C., 1991. *p*-Nonylphenol: An estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene. Environ. Health Perspect. 92, 167-173.
- Soto, A.M., Lin, T.M., Justicia, H., Silvia, R.M. und Sonnenschein, C., 1992. An "in culture" bioassay to assess the estrogenicity of xenobiotics. In: Colborn, T., Clement, C. (Eds.), Chemically-induced alterations in sexual development: the wildlife/human connection. Princeton Scientific Publishing, Princeton, NJ. 259-309.
- Soto, A.M., Sonnenschein, C., Chung, K.L., Fernandez, M.F., Olea, N. und Olea Serrano, F., 1995. The E-SCREEN Assay as a tool to identify estrogens: An update on estrogenic environmental pollutants. Environ. Health Perspect. 103, 113-122.
- Spolski, R.J., Schneider, W. und Wangh, L.J., 1985. Estrogen-dependent DNA synthesis and parenchymal cell proliferation in the liver of adult male *Xenopus* frogs. Dev. Biol. 108, 332-340.
- Spolski, R.J. und Wangh, L.J., 1987. Liver parenchymal cell proliferation during secondary induction with estradiol-17 beta in *Xenopus*. Dev. Biol. 121, 301-305.
- Spurr, A.R., 1969. A low viscosity embedding medium for electron microscopy. J. Ultrastruct. Res. 26, 31-43.
- Standeven, A.M., Shi, Y.E., Sinclair, J.F., Sinclair, P.R. und Yager, J.D., 1990. Metabolism of the liver tumor promoter ethinyl estradiol by primary cultures of rat hepatocytes. Toxicol. Appl. Pharmacol. 102, 486-496.
- Stefano, G.B., Prevot, V., Beauvillain, J.C., Cadet, P., Fimiani, C., Welters, I., G.L., F., Breton, C., Lassalle, P., Salzert, M. und Bilfinger, T.V., 2000. Cell-surface estrogen receptors mediate calcium-dependent nitric oxide release in human endothelia. Circulation 101, 1594-1597.
- Stumpf, M., Ternes, T.A., Haberer, K. und Baumann, W., 1996. Nachweis von natürlichen und synthetischen Östrogenen in Kläranlagen und Fließgewässern. Vom Wasser 87, 251-261.
- Sumpter, J.P., 1985. The purification, radioimmunoassay and plasma levels of vitellogenin from the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. In: Lofts, B., Holmes, W.N. (Eds.), Current Trends in Comparative Endocrinology. Hong Kong University Press, Hong Kong. 355-357
- Sun, J., Meyers, M.J., Fink, B.E., Rajendran, R., Katzenellenbogen, J.A. und Katzenellenbogen, B.S., 1999. Novel ligands that function as selective estrogens or antiestrogens for estrogen receptor-

- alpha or estrogen receptor-beta. *Endocrinology* 140, 800-804.
- Suntio, L.R., Shiu, W.Y. und Mackay, D., 1988. A review of the nature and properties of chemicals in pulp mill effluents. *Chemosphere* 17, 1249-1290.
- Swan, S.H. und Elkin, E.P., 1999. Declining semen quality: can the past inform the present? *BioEssays* 21, 614-621.
- Takahashi, H., 1977. Juvenile hermaphroditism in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.* 28, 57-65.
- Takamatsu, N., Kanda, H., Ito, M., Yamashita, A., Yamashita, S. und Shiba, T., 1997. Rainbow trout SOX9: cDNA cloning, gene structure and expression. *Gene* 202, 167-170.
- Tam, P.P., Ng, T.B. und Woo, N.Y., 1983. Effects of oestradiol-17 beta and testosterone on the histology of pituitary, liver, ovary and skin of previtellogenic *Epinephelus akaara* (Teleostei, Serranidae). *Cell Tiss. Res.* 231, 579-592.
- Tamura, M., Yamamoto, H. und Onitake, K., 1994. Cloning of Protamine cDNA of the Medaka (*Oryzias latipes*) and Its Expression During Spermatogenesis. *Dev. Growth Differ.* 36, 419-425.
- Tan, N.S., Lam, T.J. und Ding, J.L., 1996. The first contiguous estrogen receptor gene from a fish, *Oreochromis aureus*: evidence for multiple transcripts. *Mol. Cell. Endocrinol.* 120, 177-192.
- Tata, J.R., Baker, B.S., Machuca, I., Rabelo, E.M. und Yamauchi, K., 1993. Autoinduction of nuclear receptor genes and its significance. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 46, 105-19.
- Tata, J.R., James, T.C., Watson, C.S., Williams, J.L. und Wolffe, A.P., 1983. Hormonal regulation and expression of vitellogenin multigene family. *Ciba Found Symp* 98, 96-110.
- Tchoudakova, A., Pathak, S. und Callard, G.V., 1999. Molecular cloning of an estrogen-receptor beta subtype from the goldfish, *Carassius auratus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 113, 388-400.
- Teitsma, C., Lethimonier, C., Tujague, M., Anglade, I., Saligaut, D., Bailhache, T., Pakdel, F., Kah, O. und Ducouret, B., 1998. Identification of potential sites of cortisol actions on the reproductive axis in rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol C* 119, 243-249.
- Tena-Sempere, M., Navarro, J., Pinilla, L., Gonzalez, L.C., Huhtaniemi, I. und Aguilar, E., 2000. Neonatal exposure to estrogen differentially alters estrogen receptor alpha and beta mRNA expression in rat testis during postnatal development. *J. Endocrinol.* 165, 345-357.
- Tenniswood, M.P., Searle, P.F., Wolffe, A.P. und Tata, J.R., 1983. Rapid estrogen metabolism and vitellogenin gene expression in *Xenopus* hepatocyte cultures. *Mol. Cell. Endocrinol.* 30, 329-45.
- Ternes, T.A., Stumpf, M., Mueller, J., Haberer, K., Wilken, R.D. und Servos, M., 1999. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Sci. Total Environ.* 225, 81-90.
- Thomas, P. und Smith, J., 1993. Binding of xenobiotics to the estrogen receptor of spotted seatrout: A screening assay for potential estrogenic effects. *Marine Environ. Res.* 35, 147-151.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. und Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.
- Thorpe, K.L., Hutchinson, T.H., Hetheridge, M.J., Sumpter, J.P. und Tyler, C.R., 2000. Development of an in vivo screening assay for estrogenic chemicals using juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 2812-2820.
- Toppari, J., Larsen, J.C., Christiansen, P., Givercman, A., Grandjean, P., Guillette, L.J., Jégou, B., Jensen, T.K., Jouannet, P., Keiding, N., Leffers, H., Mclachlan, J.A., Meyer, O., Müller, J., Rajpert-De Meyts, E., Scheike, T., Sharpe, R., Sumpter, J.P. und Skakkebaek, N.E., 1996. Male reproductive health and environmental estrogens. *Environ. Health Perspect.* 104, 741-803.
- Toppari, J. und Skakkebaek, N.E., 1998. Sexual differentiation and environmental endocrine disruptors. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.* 12, 143-156.
- Toran-Allerand, C.D., 1996. The estrogen/neurotrophin connection during neural development: Is co-localization of estrogen receptors with the neu-

- rotrophins and their receptors biologically relevant? *Dev. Neurosci.* 18, 36-48.
- Trayhurn, P., Thomas, M.E., Duncan, J.S., Black, D., Beattie, J.H. und Rayner, D.V., 1995. Ultra-rapid detection of mRNAs on northern blots with digoxigenin-labelled oligonucleotides and 'CDP-Star', a new chemiluminescence substrate. *Biochemical Society Transactions* 23, 494S.
- Tsuda, T., Takino, A., Kojima, M., Harada, H., Muraki, K. und Tsuji, M., 2000. 4-nonylphenols and 4-tert-octylphenol in water and fish from rivers flowing into Lake Biwa. *Chemosphere* 41, 757-762.
- Tyler, C.R., Jobling, S. und Sumpter, J.P., 1998. Endocrine disruption in wildlife: a critical review of the evidence. *Crit. Rev. Toxicol.* 28, 319-361.
- Tyler, C.R., Sumpter, J.P. und Bromage, N.R., 1988. *In vivo* ovarian uptake and processing of vitellogenin in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J. Exp. Zool.* 246, 171-179.
- Tyler, C.R., Sumpter, J.P. und Bromage, N.R., 1990. An *in vitro* culture system for studying vitellogenin uptake into ovarian follicles of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J. Exp. Zool.* 255, 216-231.
- Tyler, C.R., Van Aerle, R., Hutchinson, T.H., Maddix, S. und Trip, H., 1999. An *in vivo* testing system for endocrine disruptors in fish early life stages using induction of vitellogenin. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 337-347.
- Urusitani, H., Sato, T., Shimizu, A. und Iguchi, T., 1999. Developmental expression and cloning of estrogen receptor mRNA in mummichog (*Fundulus heteroclitus*). *Zool. Sci.* 16, 14.
- US Environmental Protection Agency, 1998. Endocrine Disrupting Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Report. Office of Pesticides Protection and Toxic Substances, Washington, DC.
- Vaillant, C., Le Guellec, C., Pakdel, F. und Valotaire, Y., 1988. Vitellogenin gene expression in primary culture of male rainbow trout hepatocytes. *Gen. Comp. Endocrinol.* 70, 284-290.
- Van Bohemen, C.G., Lambert, J.G.D., Goos, H.J.T. und Oordt, P.G.W.J., 1982. Estrone and estradiol participation during exogenous vitellogenesis in the female rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 46, 81-92.
- Van Den Hurk, R. und Slof, G.A., 1981. A morphological and experimental study of gonadal sex differentiation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Cell Tiss. Res.* 218, 487-497.
- Varadaraj, K. und Skinner, D.M., 1994. Denaturants or cosolvents improve the specificity of PCR amplification of a G+C-rich DNA using genetically engineered DNA polymerases. *Gene* 140, 1-5.
- Villalobos, M., Olea, N., Brotons, J.A., Olea-Serrano, M.F., Ruiz De Almodovar, J.M. und Perdraza, V., 1995. The E-Screen Assay: A comparison of different MCF7 cell stocks. *Environ. Health Perspect.* 103, 844-850.
- Villalpando, I. und Merchant-Larios, H., 1990. Determination of the sensitive stages for gonadal sex-reversal in *Xenopus laevis* tadpoles. *Int. J. Dev. Biol.* 34, 281-285.
- Vom Saal, F.S., Finch, C.E. und Nelson, J.F., 1994. Natural history and mechanisms of reproductive aging in humans, laboratory rodents and other selected vertebrates. In: Knobil, E., Neill, J.D. (Eds.), *The Physiology of Reproduction*, 2nd Edition. Raven Press, Ltd., New York. 1213-1313.
- Vonier, P.M., Crain, D.A., Mclachlan, J.A., Guillette, L.J., Jr. und Arnold, S.F., 1996. Interaction of environmental chemicals with the estrogen and progesterone receptors from the oviduct of the American alligator. *Environ. Health Perspect.* 104, 1318-1322.
- Waagboe, R. und Sandnes, K., 1988. Determination of vitellogenin in serum of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) by high performance gel permeation chromatography. *J. Chromatogr.* 427, 138-143.
- Wahli, W., Dawid, I.B., Ryffel, G.U. und Weber, R., 1981. Vitellogenesis and the vitellogenin gene family. *Science* 212, 298-304.
- Wallace, R.A., 1970. Studies on amphibian yolk. IX. *Xenopus* vitellogenin. *Biochim. Biophys. Acta* 215, 176-183.
- Wallace, R.A., 1985. Vitellogenesis and oocyte growth in nonmammalian vertebrates. In: Browder, L. (Eds.), *Developmental Biology*. 1. Plenum Press, New York. 127-177.
- Wallace, R.A. und Jared, D.W., 1968. Studies on amphibian yolk. VII. Serum-phosphoprotein synthesis by vitellogenic females and estrogen-treated

- males of *Xenopus laevis*. Can. J. Biochem. 46, 953-959.
- Wang, H. und Gong, Z., 1999. Characterization of two zebrafish cDNA clones encoding egg envelope proteins ZP2 and ZP3. Biochim. Biophys. Acta 1446, 156-160.
- Wang, J., Medeiros, L.J., Longo, D.L., Mansoor, A., Raffeld, M., Duffey, P.L., Jaffe, E.S. und Stetler-Stevenson, M., 1996. Use of the polymerase chain reaction technique to determine c-myc expression in follicular center cell lymphoma. Diagn. Mol. Pathol. 5, 20-25.
- Waring, C.P., Stagg, R.M., Fretwell, K., Mclay, H.A. und Costella, M.J., 1996. The impact of sludge exposure on the reproduction of the sand goby, *Pomatoschistus minutus*. Environ. Poll. 93, 17-25.
- Watson, C.S., Campbell, C.H. und Gametchu, B., 1999. Membrane oestrogen receptors on rat pituitary tumour cells: immuno-identification and responses to oestradiol and xenoestrogens. Exp. Physiol. 84, 1013-1022.
- Watson, C.S., T.C., P. und Gametchu, B., 1995. The other estrogen receptor in the plasma membrane: Implications for the actions of environmental estrogens. Environ. Health Perspect. 103, 41-50.
- Webb, P., Lopez, G.N., Greene, G.L., Baxter, J.D. und Kushner, P.J., 1992. The limits of the cellular capacity to mediate an estrogen response. Mol. Endocrinol. 6, 157-167.
- Weidner, I.S., Moller, H., Jensen, T.K. und Skakkebaek, N.E., 1998. Cryptorchidism and hypospadias in sons of gardeners and farmers. Environ. Health Perspect. 106, 793-796.
- Weigel, N.L., 1996. Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. Biochem. J. 319, 657-667.
- Weishaar, D., Gossrau, E. und Faderl, B., 1975. Normbereiche von alpha-HBDH, LDH, AP und LAP bei Messung mit substratorientierten Testansätzen. Med. Welt 26, 387-390.
- Welch, R.M., Levin, W. und Conney, A.H., 1969. Estrogenic action of DDT and its analogs. Toxicol. Appl. Pharmacol. 14, 358-367.
- Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. Physiology Reviews 77, 591-625.
- Westphal, U., 1986. Steroid-protein interactions II. Springer Verlag, New York.
- White, R., Jobling, S., Hoare, S.A., Sumpter, J.P. und Parker, M.G., 1994. Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. Endocrinology 135, 175-182.
- Whitfield, G.K., Jurutka, P.W., Haussler, C.A. und Haussler, M.R., 1999. Steroid hormone receptors: evolution, ligands, and molecular basis of biologic function. J. Cell. Biochem. Suppl. 32/33, 110-122.
- Whitten, P.L. und Naftolin, F., 1992. Effects of a phytoestrogen diet on estrogen-dependent reproductive processes in immature female rats. Steroids 57, 56-61.
- Whittle, D.M., Mageau, C., Duncan, R.K., Sergeant, D.B., Nassichuk, M.D., Morrisson, J. und Piuze, J., 1993. Canadian national dioxin sampling program - dioxins and furans in biota near 46 pulp and papermills using the chlorine bleaching process. Chemosphere 27, 279-286.
- Wiegand, M.D., 1982. Vitellogenesis in fishes. In: Richter, C.J.J., Goos, H.J.T. (Eds.), Reproductive physiology of fish. Pudoc, Wageningen. 136-146.
- Willingham, E. und Crews, D., 1999. Sex reversal effects of environmentally relevant xenobiotic concentrations on the red-eared slider turtle, a species with temperature-dependent sex determination. Gen. Comp. Endocrinol. 113, 429-435.
- Wittbrodt, J., Meyer, A. und Scharl, M., 1998. More genes in fish? BioEssays 20, 511-515.
- Wolffe, A.P., Glover, J.F. und Tata, J.R., 1984a. Culture shock. Synthesis of heat-shock-like proteins in fresh primary cell cultures. Exp. Cell Res. 154, 581-90.
- Wolffe, A.P., Perlman, A.J. und Tata, J.R., 1984b. Transient paralysis by heat shock of hormonal regulation of gene expression. EMBO J. 3, 2763-70.
- Wormke, M., Castro-Rivera, E., Chen, I. und Safe, S., 2000. Estrogen and aryl hydrocarbon receptor expression and crosstalk in human Ishikawa endometrial cancer cells. J. Steroid Biochem. Molec. Biol. 72, 197-207.
- Xia, Z., Gale, W.L., Chang, X., Langenau, D., Patiño, R., Maule, A.G. und Densmore, L.D., 2000. Phylogenetic sequence analysis, recombinant ex-

- pression, and tissue distribution of a channel catfish estrogen receptor β . *Gen. Comp. Endocrinol.* 118, 139-149.
- Xia, Z., Patiño, R., Gale, W.L., Maule, A.G. und Densmore, L.D., 1999. Cloning, *in vitro* expression, and novel phylogenetic classification of a channel catfish estrogen receptor. *Gen. Comp. Endocrinol.* 113, 360-368.
- Yamamoto, T., 1975. *Medaka (Killifish): Biology and strains*. Keigaku, Tokyo, Japan.
- Yellayi, S., Teuscher, C., Woods, J.A., Welsh, T.H., Jr, Tung, K.S., Nakai, M., Rosenfeld, C.S., Lubahn, D.B. und Cooke, P.S., 2000. Normal development of thymus in male and female mice requires estrogen/estrogen receptor- α signaling pathway. *Endocrine* 12, 207-213.
- Yoshikawa, K. und Aizawa, T., 1988. Transient increases and individual variations in preprocholecystokinin gene expression in rat telencephalic regions during postnatal development: a quantitative comparison between preprocholecystokinin mRNA and preproenkephalin mRNA. *Brain Res.* 4, 87-96.
- Younglai, E.V., Collins, J.A. und Foster, W.G., 1998. Canadian semen quality: an analysis of sperm density among eleven academic fertility centers. *Fertil. Steril.* 70, 76-80.
- Yu, N.W., Hsu, C.Y., Ku, H.H., Chang, L.T. und Liu, H.W., 1993. Gonadal differentiation and secretions of estradiol and testosterone of the ovaries of *Rana catesbeiana* tadpoles treated with 4-hydroxyandrostenedione. *J. Exp. Zool.* 265, 252-257.
- Zajc Kreft, K., Kreft, S., Komel, R. und Grubic, Z., 2000. Nonradioactive northern blotting for the determination of acetylcholinesterase mRNA. Comparison to the radioactive technique. *Pflugers Arch.* 439, R66-R67.
- Zava, D.T., Blen, M. und Duwe, G., 1997. Estrogenic activity of natural and synthetic estrogens in human cancer cells in culture. *Environ. Health Perspect.* 105, 637-645.
- Zeemann, M., Auer, C.M., Clements, R.G. und Boethling, R.S., 1995. U.S. EPA regulatory practices on the use of QSAR for new and existing chemical evaluations. *SAR QSAR Environ. Res.* 3, 179-201.
- Zhan, J., Fahimi, H.D. und Voelkl, A., 1997. Sensitive nonradioactive dot blot/ribonuclease protection assay for quantitative determination of mRNA. *Biotechniques* 22, 500-5.
- Zohar, Y., Breton, B. und Fostier, A., 1982. Gonadotropic function during the reproductive cycle of the female rainbow trout, *Salmo gairdneri*, in relation to ovarian steroid secretion: *in vivo* and *in vitro* studies. In: Richter, C.J.J., Goos, H.J.T. (Eds.), *Reproductive physiology of fish*. Pudoc, Wageningen. 14-18.

8. Publikationen und Tagungsbeiträge

Internationale Journals

- Islinger, M., Pawlowski, S., Hollert, H., Völkl, A. und Braunbeck, T., 1999. Measurement of vitellogenin-mRNA expression in primary cultures of rainbow trout hepatocytes in a non-radioactive dot blot/RNase protection-assay. *Sci. Total Environ.* 233, 109-122.
- Bieberstein, U., Berbner, T., Islinger, M. und Braunbeck, T., 1999. Immunohistochemical localization of vitellogenin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes using immunofluorescence. *Sci. Total Environ.* 233, 67-75.
- Pawlowski, S., Islinger, M., Völkl, A. und Braunbeck, T., 2000. Temperature-dependent vitellogenin-mRNA expression in primary cultures of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes at 14 and 18 °C. *Toxicol. in vitro* 14, 531-540.
- Islinger, M., Yuan, H., Völkl, A. und Braunbeck, T., 2001. Measurement of vitellogenin gene expression by RT-PCR as a toll to identify endocrine disruption in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Biomarkers*, submitted.
- Islinger, M., Willimski, D., Völkl, A. und Braunbeck, T., 2001. Gene expression of estrogen-regulated genes associated with reproduction after exposure to 17 α -ethinylestradiol in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.*, submitted.
- Islinger, M., Buschhorn, S., Völkl, A. und Braunbeck, T., 2001. Estrogen-regulated genes implicated in reproduction: Comparative *in vivo* measurement in zebrafish and medaka and *in vitro* determination in rainbow trout. *Environ. Toxicol. Chem.*, submitted.

Buchbeiträge

- Islinger, M., Pawlowski, S. und Braunbeck, T., 1999. Vitellogenin als Marker für östrogen wirksame Stoffe im Wasser. *ATV-Schriftenreihe* 15, 125-152.
- Braunbeck, T., Islinger, M., Pawlowski, S. und Segner, H. (2000) Endokrin wirksame Substanzen als Umweltschadstoffe. In: Kochen, W. (ed.) *Umweltbedingte Gesundheitsschäden*. Thieme Verlag, Stuttgart, in press.
- Hollert, H., Islinger, M., Dürr, M., Schnurstein, A., Ochsenbein, U. und Braunbeck, T. (2000) Möglichkeiten und Grenzen von *in vitro*-Biotestverfahren zur Erklärung einer gestörten Bachforellen-Reproduktion im Einzugsgebiet der Aare (Schweiz). In: Fomin, A., Arndt, U. (ed.) *Bioindikation - Biologische Testverfahren*. Heimbach Verlag, Stuttgart, p. 209-214.

Berichte

- Islinger, M. und Braunbeck, T., 1998. Östrogene Wirkung von Umweltchemikalien, Teilthema 2: Entwicklung und Erprobung eines *In vitro*-Testsystems an primären Leberzellen von Regenbogenforellen – Abschlussbericht UBA – F & E Vorhaben 108 02 899/02, 163 pp.

Hollert, H., Islinger, M., Dürr, M., Schnurstein, A. und Braunbeck, T., 1998. Ökotoxikologische Belastung von Abwasserproben aus dem Kanton Bern/Schweiz - Abschlußbericht - Zoologisches Institut I, Universität Heidelberg, Aquatische Ökotoxikologie, Heidelberg.

Nationale und internationale Tagungsbeiträge

Islinger, M., Halbauer, J., Holzschuh, J. und Braunbeck, T., 1997. Produktion polyklonaler Antikörper für die Quantifizierung von Vitellogenin in ELISA-Systemen. Proc. 2th Annual Meeting German Speaking Branch of SETAC-Europe, Aachen, February 1997.

Islinger, M., Halbauer, J. und Braunbeck, T., 1997. Vitellogenin als Biomarker für endokrin wirksame Umweltschadstoffe. Proc. 1. Tagung der Gesellschaft für Ichthyologie e.V. (GfI), Düsseldorf, Oktober 1997, 25.

Islinger, M., Pawlowski, S., Völkl, A. und Braunbeck, T., 1998. Measurement of vitellogenin-mRNA expression in primary cultures of rainbow trout hepatocytes in a non-radioactive dot blot-assay. Proc. 8th Annual Meeting SETAC-Europe, Bordeaux, 247.

Islinger, M., Pawlowski, S., Völkl, A. und Braunbeck, T. 1999. Expression von Vitellogenin-mRNA in Hepatocytenprimärkulturen aus der Regenbogenforelle: Bewertung eines Biomarkersystems. Proc. 3th Annual Meeting German Speaking Branch of SETAC-Europe, Zittau, Mai 1998, 98.

Islinger, M., Knörr, S., Völkl, A. und Braunbeck, T., 1999. Measurement of vitellogenin expression in two different model fish species: Japanese medaka and rainbow trout. Proc. 9th Annual Meeting SETAC-Europe, Leipzig, 47.

Islinger, M., Willimski, D. und Braunbeck, T., 2000. Differential expression of genes implicated in reproductive physiology in zebrafish and Japanese medaka following estrogen/xenoestrogen exposure. Proc. 3th SETAC World Congress, Brighton, 26.

Holzschuh, J., Hollert, H., Islinger, M., Bieberstein, U., Rahman, N., Ruff, N. und Braunbeck, T., 1995. Akute Cytotoxizitätstests mit permanenten Fischzelllinien aus der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) - ein Vergleich von Methoden und Zelllinien. Verh. Dtsch. Zool. Ges. 88, 258.

Hollert, H., Islinger, M., Dürr, M., Schnurstein, A., Ochsenbein, U. und Braunbeck, T., 1998. Possibilities and limitations of *in vitro* assays to explain disturbances of brown trout reproduction in the river Aare (Switzerland). Zoology 101, Suppl. 1, 78.

Hollert, H., Islinger, M., Dürr, M., Froschauer, A., Schnurstein, A., Erdinger, L., Sägesser, M., Ochsenbein, U. und Braunbeck, T., 1999. Risk assessment of sewage and sediments with *in vitro* assays to explain disturbances of brown trout reproduction in Switzerland. Proc. 9th Annual Meeting SETAC-Europe, Leipzig, 125.

Hollert, H., Dürr, M., Winn, N., Islinger, M., Holtey-Weber, I., Haag, I., Kern, U., Färber, H., Karrasch, H., Erdinger, L. und Braunbeck, T., 1999. Risk assessment of a flood event, part 1: Cyto- and genotoxicity as well as endocrine-disrupting potential of suspended matter. Proc. 9th Annual Meeting SETAC-Europe, Leipzig, 154.

Hollert, H., Dürr, M., Karas, U., Siebert, I., Winn, N., Islinger, M., Schöler, H., Gratzner, H., Holtey-Weber, I., Färber, H., Ahlf, W., Erdinger, L. und Braunbeck, T., 1999. Integrated sediment assessment in the Neckar catchment area (Germany) with analysis of *in vitro* toxicity, chemistry and macrozoobenthos. Proc. 9th Annual Meeting SETAC-Europe, Leipzig, 156.

Braunbeck, T., Bieberstein, U., Islinger, M. und Knörr, S., 2000. Endocrine effects in small aquarium fish and isolated hepatocytes: *in vitro* versus *in vivo* exposure. Proc. Int. Symposium on endocrine-disrupting substance testing in medaka. Nagoya, March 2000.

9. Abkürzungen

ARP-1	– Apolipoprotein A1 Regulatory Protein 1	Concentration
BSA	– Bovine Serum Albumin	Lv – Lipovitellin
CBP	– CREB (cAMP Response Element Binding Protein) Binding Protein	MAP – Mitogen Activated Phosphorylase
Chg	– Choriogenin	Muc1 – Mucin 1
COUP-TF	– Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factor	MuLV – Murine Leukemia Virus
CYP	– Cytochrome P450	PBS – Phosphate Buffered Saline
dbEST	– Database of Expressed Sequence Tags	PPAR – Peroxisome Proliferator Activating Receptor
DIG	– Digoxigenin	pS2 – Presenilin 2
DMSO	– Dimethylsulfoxid	RACE – Rapid Amplification of cDNA Ends
DRIP	– Vitamin D Receptor Interacting Protein	RAR – Retinoic Acid Receptor
ECLIA	– Electrochemiluminescent Immunoassay	RPA – Ribonuclease Protection Assay
ELF 1 α	– Elongation Factor 1 α	RT-PCR – Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
ELISA	– Enzyme Linked Immunosorbent Assay	RXR – Retinoid X Receptor
ERE	– Estrogen Responsive Element	SAR – Structure Activity Relationship
ER α	– Estrogenrezeptor α	SDS – Sodiumdodecylsulfate
ER β	– Estrogenrezeptor β	SHBG – Steroid Hormone Binding Globulin
FKS	– fötales Kälberserum	SRC-1 – Steroid Receptor Co-Activator 1
FSH	– Follikel stimulierendes Hormon	SSC – Sodium Chloride-Sodium Citrate-Buffer
HPTE	– 2,2-Bis(<i>p</i> -hydroxyphenyl)-1,1,1-trichlorethan	Taq – <i>Thermus aquaticus</i>
Hsp	– Heat Shock Protein	TBE – Tris/Borat/EDTA-Puffer
LDH	– Lactatdehydrogenase	TE – Tris/EDTA-Puffer
LH	– Luteinisierendes Hormon	TRAP – Thyroid Hormone Receptor Associated Protein
LOEC	– Lowest Observed Effect	Vg – Vitellogenin
		ZP – Zona pellucida

STAT ROSA PRISTINA NOMINE,
NOMINA NUDA TENEMUS.

(Umberto Eco, 1980)