

Programm Lebensgrundlage Umwelt
und ihre Sicherung (BWPLUS)

Zwischenbericht anlässlich des
Statusseminars des BWPLUS am 9. und 10. März 1999 im
Forschungszentrum Karlsruhe

**Können Umweltchemikalien durch Interferenz mit endokrinen
Funktionen (endocrine disruptors) zur Verweiblichung führen? –
Ökotoxikologische Untersuchungen zur
Wirkung von Wasserproben aus Baden-Württemberg auf Amphibien**

W. Kloas, I. Lutz
Zoologisches Institut II
Universität Karlsruhe

Förderkennzeichen: PAÖ Ö98007

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

Können Umweltchemikalien durch Interferenz mit endokrinen Funktionen (endocrine disruptors) zur Verweiblichung führen? – Ökotoxikologische Untersuchungen zur Wirkung von Wasserproben aus Baden-Württemberg auf Amphibien Förderkennzeichen (PAÖ 9701.02) und (Ö 98007)

W. Kloas, I. Lutz
Zoologisches Institut II
Universität Karlsruhe

Zusammenfassung

Eine der wichtigsten Entdeckungen der letzten Jahre im Bereich der Umweltforschung ist die Tatsache, daß Umweltchemikalien, die nach ökotoxikologischen Gesichtspunkten bisher als unbedenklich galten, hormonähnliche Wirkungen entfalten können. Diese sogenannten „endocrine disruptors“ wirken als Hormon bzw. Antihormon und stören so die normalen hormongesteuerten Abläufe im Körper. Da die meisten der bisher in den verschiedenen Vertebratenklassen beobachteten Effekte auf die Reproduktionsbiologie zum Phänomen der „Verweiblichung“ geführt haben, ist es notwendig geeignete Methoden zu etablieren, die sowohl die Wirkmechanismen aufdecken als auch die tatsächliche Belastung der Umwelt erfassen. Bisherige Untersuchungen konzentrierten sich auf die Erfassung östrogenen Wirkungen, obwohl auch antiandrogene Effekte zur Verweiblichung führen.

Ziel des hier vorgestellten Forschungsvorhabens ist es mit Amphibien als Studienmodell eine Methodik zu entwickeln zur Klärung der Frage, ob umweltrelevante Stoffe nicht nur durch östrogene sondern auch durch antiandrogene Wirkungen zum Phänomen der Verweiblichung führen können. Die Validierung und Anwendung dieser Methoden haben den Zweck nachzuweisen, wie hoch die Gewässerbelastungen in Baden-Württemberg mit „endocrine disruptors“ sind und ob diese relevant für die darin lebenden Wirbeltiere ist, was auch ein Indikator für eine potentielle Gefährdung des Menschen wäre.

Die bereits etablierten Methoden zum Nachweis einer östrogenen Potenz umfassen bei dem Amphib, *Xenopus laevis*, verschiedene Nachweisebenen: (1) Nachweis der Bindung an den Östrogenrezeptor in der Leber, (2) biologische Wirkung *in vitro* durch Bestimmung des östrogenen Biomarkers Vitellogenin-mRNA in Hepatocyten-Primärzellkulturen und (3) Wirkung *in vivo* auf die Geschlechtsdifferenzierung während der Larvalentwicklung. Für den Nachweis der Östrogenität *in vitro* ist die Induktion der Östrogenrezeptor-mRNA ebenso geeignet. Zum Nachweis (anti)androgenen Wirkungen dienen die Etablierung eines Radiorezeptorassays für die Bindung von [³H]-Testosteron an den Androgenrezeptor in der Leber sowie der semiquantitativen RT-PCR für die Induktion der Retinol-binding-Protein-mRNA *in vitro* als Biomarker für (anti)androgene Wirkungen.

Summary

One of the most important recent findings in the field of ecological research is the fact that environmental chemicals without toxic risks exhibit humoral effects. These so called “endocrine disruptors“ act as hormones or antihormones by disturbing normal endocrine feedback mechanisms of an organism. Most of the effects observed up to now affect reproductive

biology of several classes of vertebrates leading to the “feminization“ phenomenon. Thus it is necessary to establish adequate methods for detecting the basic mechanisms of actions as well as assaying relevant contaminations in the environment. Recent investigations focused mainly on determinations of estrogenic effects despite the fact that antiandrogenic effects could lead also to feminization.

The aim of our present research is to establish a methodology using amphibians as a model to answer the question whether environmental compounds may lead to feminization not only via estrogenic but also via antiandrogenic actions. Validation and approach of the methods under development should allow to assess the aquatic contamination with “endocrine disruptors“ in surface waters of Baden-Württemberg and to demonstrate its physiological significance for the vertebrates living in such an environment, which would also indicate a potential risk for humans.

The methods established already to assess estrogenicity of environmental chemicals using the amphib *Xenopus laevis* as a model include: (1) binding to liver estrogen receptor, (2) biological significance *in vitro* by assaying induction of the estrogenic biomarker vitellogenin-mRNA in primary cultured hepatocytes, and (3) *in vivo* effects on sexual differentiation during larval development. Estrogenicity can be determined *in vitro* as well by assessment of estrogen receptor-mRNA induction as biomarker. The determination of (anti)androgenic effects is ongoing research by establishing a radioreceptorassay for [³H]-testosterone binding to liver androgen receptors and by introducing a semiquantitative RT-PCR (reverse transcriptase – polymerase chain reaction) technique to determine *in vitro* induction of retinol binding protein-mRNA as biomarker of (anti)androgenic actions.

1 Einleitung

Die Erkenntnis, daß umweltrelevante Chemikalien (SCHÄFER et al., 1996) zwar keine direkten ökotoxikologischen Wirkungen auf Tiere haben, dafür aber indirekt deren Reproduktionsbiologie beeinflussen (COLBORN et al., 1993; MCLACHLAN & ARNOLD, 1996) hat gerade in den letzten Jahren eine gesteigerte Aktualität gewonnen. Hauptsächlich betroffen hierdurch sind die verschiedenen Klassen der Wirbeltiere, da die ihrem chemischen Aufbau nach recht heterogenen Substanzen als sogenannte "endocrine disruptors" hormonähnliche Wirkungen entfalten, die denen der männlichen (Androgene) bzw. weiblichen Sexualsteroiden (Östrogene) entsprechen oder entgegenwirken. Da die Störungen der normalen hormongesteuerten Abläufe zum Phänomen der "Verweiblichung" führen, konzentrierte sich die Forschung auf diesem Gebiet, unsere Arbeitsgruppe eingeschlossen, nahezu ausschließlich auf die Detektion östrogenartiger Wirkungen durch “endocrine disruptors“. Da die ihrem chemischen Aufbau nach recht heterogenen “endocrine disruptors“ aufgrund ihrer Lipophilie prinzipiell wie Östrogene bzw. Androgene oder als aber als Antiöstrogene bzw. Antiandrogene wirken können, ist es notwendig eine Methodik zu etablieren, die nicht nur (anti)östrogene sondern auch (anti)androgene Wirkungen zu erfassen vermag.

Das Bestreben des hier vorgestellten Forschungsvorhabens ist es ein umfassendes Gesamtmodell zu etablieren, um nicht nur *in vitro* die größtmögliche Sensitivität für den Nachweis hormoneller Wirkungen zu erreichen, sondern auch durch *in vivo* Untersuchungen die tatsächliche physiologische Relevanz der *in vitro* erhaltenen Resultate für den Gesamtorganismus erkennen zu können. Hierbei soll mit Amphibien als Studienmodell geklärt werden, ob auch in Baden-

Württemberg die Gewässerbelastung mit Umweltchemikalien zum Phänomen der Verweiblichung führen kann, was ebenfalls ein Indikator für eine potentielle Gefährdung des Menschen wäre.

Die Untersuchungen hierzu umfassen bei *Xenopus laevis* verschiedene Nachweisebenen zur östrogenen Potenz von Umweltchemikalien (KLOAS, 1998; KLOAS & LUTZ, 1998): (1) Nachweis der Bindung an den Östrogenrezeptor in der Leber, was die Voraussetzung für eine hormonähnliche Wirkung darstellt, (2) biologische Wirkung *in vitro* auf zellulärer Ebene durch Bestimmung der Vitellogeninsynthese in Hepatocyten-Primärzellkulturen, die durch Östrogene spezifisch induziert wird, und (3) Wirkung *in vivo* auf das Gesamttier mit Experimenten zur Beeinflussung der Geschlechtsdifferenzierung während der Larvalentwicklung. Die Etablierung aller 3 Nachweisebenen zur Bestimmung östrogenartiger Wirkungen ist so weit abgeschlossen, daß nun deren Umsetzung zur Anwendung für die Bewertung von Umweltproben erfolgen kann.

Da die "Verweiblichung" nicht nur durch östrogene sondern auch durch antiandrogene Effekte von Umweltchemikalien bewirkt werden kann, ist es das Ziel des laufenden Forschungsvorhabens, analog zur bereits etablierten Methodik zur Bestimmung der Östrogenität, Methoden zu etablieren, die (1) die potentielle Bindung von (anti)androgenen Umweltchemikalien an die Androgenrezeptoren, (2) deren biologische Wirkung *in vitro* durch Einflüsse auf die Induktion eines geeigneten androgenen Biomarkers in Hepatocyten-Primärzellkulturen und (3) *in vivo* Wirkungen auf die Geschlechtsdifferenzierung untersuchen. Ein geeigneter Kandidat als Biomarker zum Nachweis (anti)androgener wie auch für (anti)östrogene Wirkungen dürfte das Retinol Binding Protein (RBP) sein, dessen Sequenz bei *Xenopus laevis* bestimmt ist (MCKEARIN et al., 1987) und von dem bekannt ist, daß seine Synthese durch Östrogene stimuliert und durch Androgene inhibiert wird (MCKEARIN & SHAPIRO, 1988). ür den

2 Material und Methoden

Alle hier beschriebenen Untersuchungen werden aus Gründen des Artenschutzes und der ganzjährigen Verfügbarkeit und Reproduktionsmöglichkeit an dem südafrikanischen Krallenfrosch *Xenopus laevis* durchgeführt. Die Tiere entstammen der Zucht des Zoologischen Instituts II der Universität Karlsruhe und werden unter kontrollierten Bedingungen gehalten (vgl. KLOAS & LUTZ, 1997).

2.1 Rezeptoruntersuchungen

2.1.1 Radiorezeptorassay für Östrogenrezeptoren

Zur Bestimmung der Bindungsaktivität an die Östrogenrezeptoren werden die Extrakte aus 3 Kläranlagenausläufen (Vergleichsanlage, ZENON-Anlage, WABAG-Anlage; zur Verfügung gestellt von Frau Dr. Behnke, Universität Stuttgart) in einer Konzentration des 17,5-fachen der im Kläranlagenauslauf vorhandenen lipophilen Substanzen in einem Competitionsexperiment, in dem parallel hierzu die Verdrängung durch 17 β -Estradiol (E2) von 10⁻⁹ bis 10⁻⁵ M bestimmt wird, eingesetzt. Die Transformation der Verdrängungskurve für E2 und der für die Extrakte erhaltenen Verdrängungswerte in den logit-log-Plot erlaubt die Quantifizierung der an den Östrogenrezeptor bindenden Substanzen als E2-Äquivalente.

2.1.1 Radiorezeptorassay für Androgenrezeptoren

Entsprechend der Methodik zur Bestimmung der Östrogenrezeptoren aus Leberhomogenaten von *Xenopus laevis* (LUTZ & KLOAS, 1999) werden in Assoziationsversuchen unter Verwendung verschiedener Puffersysteme die Versuchsbedingungen für die Bindung von [³H]-Testosteron an die cytosolischen Androgenrezeptoren im Lebercytosol optimiert. Die Durchführung der kompetitiven Verdrängungsexperimente von [³H]-Testosteron (10^{-8} M) erfolgt mit Testosteron und den beiden als Antiandrogene charakterisierten Umweltchemikalien p,p'-DDE und Vinclozolin im Konzentrationsbereich von 10^{-9} bis 10^{-5} M.

2.2 Nachweis der Induktion von Biomarkern *in vitro* mittels semiquantitativer RT-PCR

2.2.1 Vitellogenininduktion als östrogenen Biomarker

Der Nachweis des östrogenen Biomarkers Vitellogenin-mRNA mittels semiquantitativer RT-PCR (Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction) in Hepatocyten-Primärzellkulturen von *Xenopus laevis* erfolgt nach KLOAS et al. (1998). Die 3 Kläranlagenextrakte, die zur Bestimmung der E2-Äquivalente im Radiorezeptorassay für Östrogenrezeptoren eingesetzt werden, werden in den Primärzellkulturen jeweils in 10-, 5- und 2-facher Konzentration gegenüber der Ausgangskonzentration der Ausläufe eingesetzt und verglichen mit der dosisabhängigen östrogenen Wirkung von E2.

2.2.2 Regulation der Induktion des Retinol Binding Proteins (RBP) durch Androgene und Östrogene

In mehreren Vorversuchen werden die Bedingungen zur Bestimmung der RBP-mRNA aus Hepatocyten-Primärzellkulturen geschaffen. Zum Nachweis androgener bzw. östrogenen Beeinflussung *in vitro* werden jeweils einzelne Versuchsansätze zur Ermittlung von Dosis-Wirkungsbeziehungen mit E2 und Testosteron in Konzentrationen von 10^{-10} bis 10^{-5} M durchgeführt. Desweiteren werden Kombinationsversuche unternommen, die die antiandrogene Wirkungen von p,p'-DDE und Vinclozolin (von 10^{-10} bis 10^{-5} M) bei gleichzeitiger Gabe von 10^{-5} M Testosteron zeigen sollen.

2.3 Einfluß von Umweltchemikalien auf die Geschlechtsdifferenzierung *in vivo*

Zur Wirkung von Umweltchemikalien auf die Geschlechtsdifferenzierung erfolgt folgender Versuchsansatz: Kaulquappen von *Xenopus laevis* werden ab Stadium 44 (NIEUWKOOP & FABER, 1975) exponiert mit: E2 (10^{-7} und 10^{-8} M), Nonylphenol (10^{-7} und 10^{-8} M), Bisphenol A (10^{-7} und 10^{-8} M), Octylphenol (10^{-7} und 10^{-8} M), Butylhydroxyanisol (10^{-7} und 10^{-8} M) und der entsprechenden Menge Lösungsmittel (96% Ethanol) als Kontrolle. Nach 3 Monaten werden die Gonaden der Tiere für die Bestimmung der Geschlechterverhältnisse mit dem Binokular untersucht.

3 Ergebnisse

3.1 Rezeptorassays

3.1.1 Bindung der Extrakte von Kläranlagenausläufen an die Östrogenrezeptoren

Die Extrakte der 3 Kläranlagenausläufen (Vergleichsanlage, ZENON-Anlage, WABAG-Anlage) weisen alle eine kompetitive Verdrängung des [³H]-E2 von den Östrogenrezeptoren (abb. 1). Die Darstellung im logit-log-Plot ergibt nach Umrechnung der eingesetzten Konzentration (17,5-fach) der Extrakte für die in den Kläranlagenausläufen vorhandene Bindungsaktivität an die Östrogenrezeptoren E2-Äquivalente von 0,82 nM (Vergleichsanlage), 0,27 nM (ZENON-Anlage) und 0,07 nM (WABAG-Anlage), wobei die Gehalte von natürlichen und künstlichen E2-Derivaten jeweils < 0,01 nM betragen, so daß diese Bindung auf die Belastung der Kläranlagenausläufe durch Umweltchemikalien zurückzuführen ist.

3.1.2 Radiorezeptorassay zum Nachweis der Bindung an Androgenrezeptoren

Die Durchführung der Experimente zur Etablierung eines Radiorezeptorassays für Androgenrezeptoren im Lebercytosol von *Xenopus laevis* mit [³H]-Testosteron als markiertem Liganden ergibt, daß der Nachweis von Androgenrezeptoren möglich ist. Die kompetitiven Verdrängungsexperimente von [³H]-Testosteron (10^{-8} M) mit Testosteron und den beiden als Antiandrogene charakterisierten Umweltchemikalien, p,p'-DDE und Vinclozolin, ergeben nur für Testosteron eine Verdrängung während die Zugaben von p,p'-DDE und Vinclozolin nicht nur keine Verdrängung von [³H]-Testosteron zeigen, sondern sogar bei den höchsten eingesetzten Konzentrationen eine Erhöhung der [³H]-Testosteron-Bindung.

3.2 Semiquantitative RT-PCR zum Nachweis von Biomarkern *in vitro*

3.2.1 Induktion der Vitellogenin-mRNA durch Extrakte von Kläranlagenausläufen

Die 3 Kläranlagenextrakte, deren E2-Äquivalente im Radiorezeptorassay für Östrogenrezeptoren bestimmt sind, zeigen eine deutliche Dosis-Wirkungsbeziehung in bezug auf die Induktion der Vitellogenin-mRNA in den Primärzellkulturen (Abb. 2). Entsprechend der Ergebnisse des Östrogenrezeptorassays zeigt sich auch hier die gleiche Reihenfolge der Östrogenität: Vergleichsanlage > ZENON-Anlage > WABAG-Anlage. Allerdings ist festzustellen, daß die biologische Wirkung *in vitro* wesentlich höher ausfällt (ca. 100-fach) als die aus dem Radiorezeptorassay erhaltenen Werte der E2-Äquivalente vermuten lassen. Die 10-fache Konzentration des Vergleichsanlagen-Extraktes bewirkt die ungefähr maximal mögliche Induktion der Vitellogenin-mRNA, wobei hier auch die normale Belastung des Auslaufs noch signifikant östrogen wirksam sein dürfte.

3.2.2 Induktion des Retinol Binding Proteins (RBP) durch Androgene und Östrogene

Die Ergebnisse aus den Vorversuchen zeigen, daß die RBP-mRNA aus Hepatocyten-Primärzellkulturen mittels semiquantitativer RT-PCR nachgewiesen werden kann. Erste Versuche zur Bestimmung androgener bzw. östrogenen Beeinflussung der RBP-Induktion anhand von Dosis-Wirkungsbeziehungen mit E2 und Testosteron in Konzentrationen von 10^{-10}

bis

10^{-5}

M

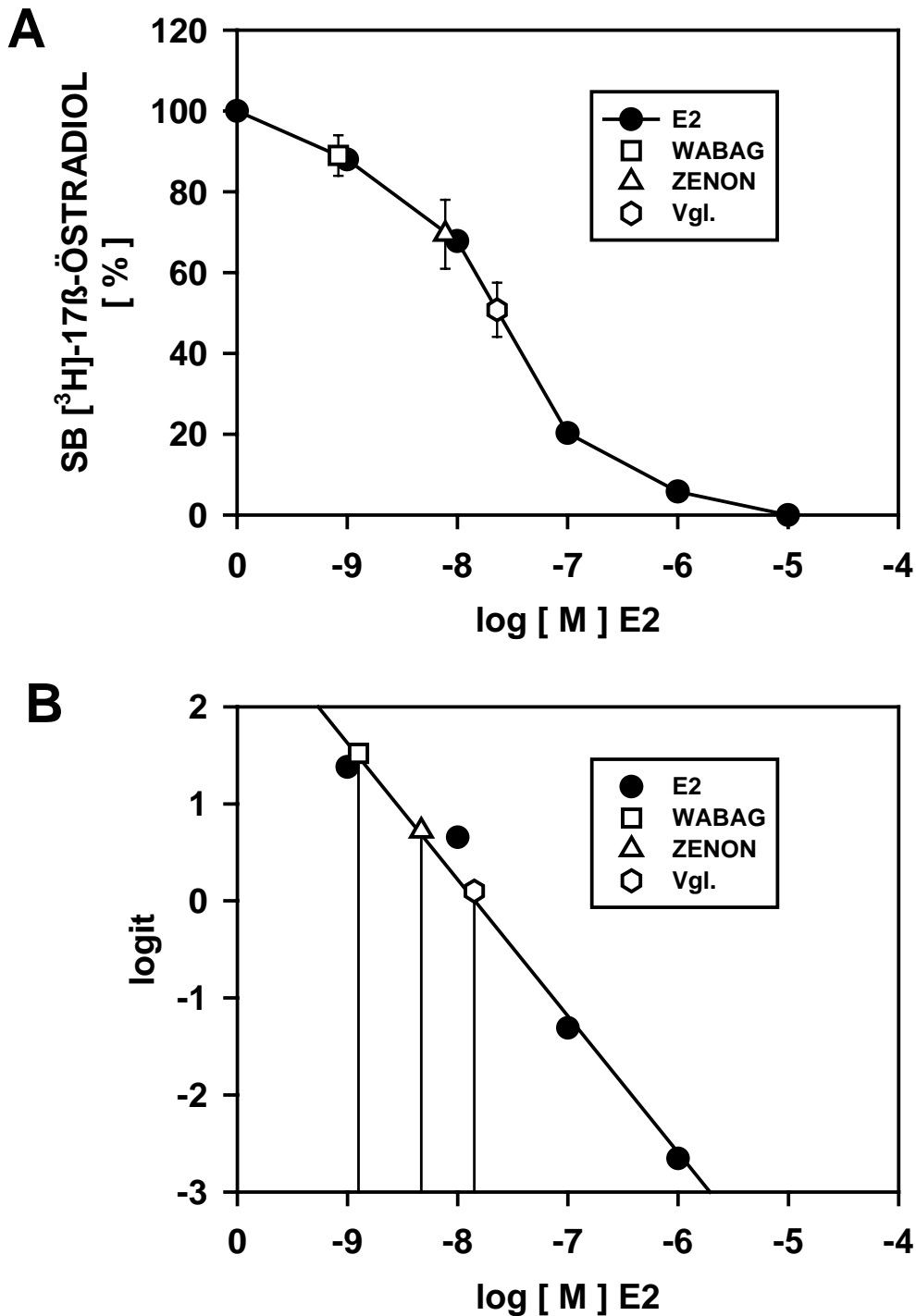


Abb. 1: Konkurrenzexperimente mit Extrakten von Kläranlagenausläufen im Vergleich zur parallel durchgeführten Verdrängung mit unmarkiertem E2. **A:** Mittelwerte \pm SEM (n=5) der spezifischen E2-Bindung. **B:** Korrespondierender logit-log-Plot zu A. Die mit dem Verdrängungsexperiment erhaltenen logit-Werte der Extrakte der Kläranlagenausläufe ergeben im Vergleich zur E2-Verdrängung (lineare Regression) für die in den Kläranlagenausläufen vorhandenen E2-Äquivalente Werte von 0,82 nM (Vergleichsanlage, Vgl.), 0,27 nM (ZENON) und 0,07 nM (WABAG) E2, wobei die Gehalte von natürlichen und künstlichen E2-Derivaten jeweils < 0,01 nM betragen.

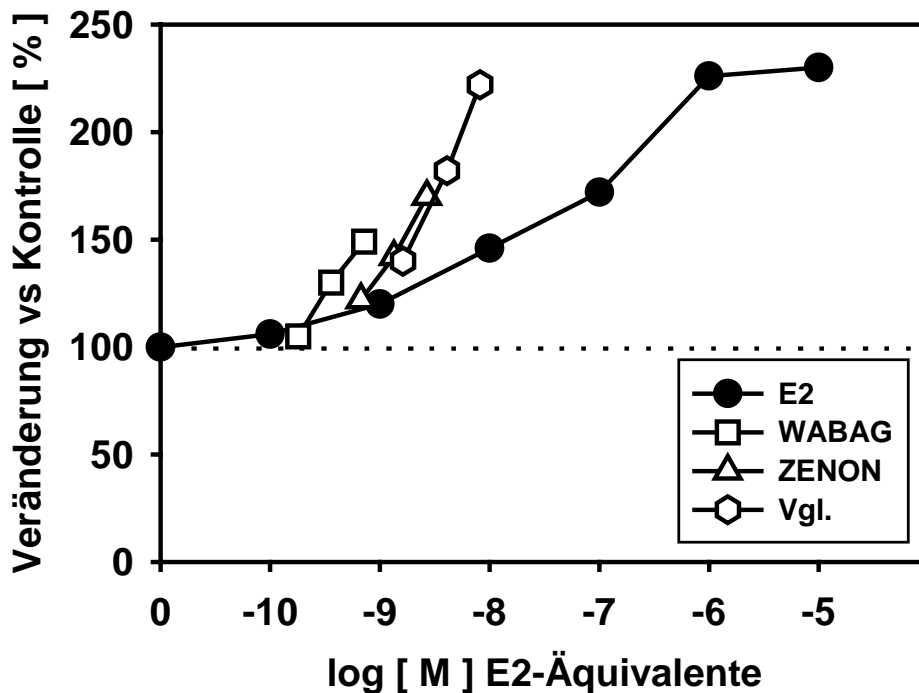


Abb. 2: Vergleichsanlage (Vgl.): 8,17 nM, 4,09 nM und 1,63 nM; ZENON: 2,67 nM, 1,34 nM, 0,67 nM; WABAG: 0,72 nM, 0,36 nM, 0,14 nM E2-Äquivalente und ihre biologische Wirkung entsprechend der 10-, 5- und 2-fachen Konzentrierung der Kläranlagenauslauf-Extrakte. E2-Äquivalente bestimmt mittels Östrogenradiorezeptorassay (vgl. Abb. 1).

ergeben, daß E2 die Induktion der RBP-mRNA steigert (Abb. 3), während Testosteron einen hemmenden Einfluß (Abb. 4) hat. Die Kombinationsversuche zur Bestimmung antiandrogener Wirkungen von p,p'-DDE und Vinclozolin demonstrieren, daß hohe Konzentrationen der Antiandrogene die durch 10^{-5} M Testosteron induzierte Hemmung der RBP-mRNA-Synthese aufheben.

3.3 Einfluß von Umweltchemikalien auf die Geschlechtsdifferenzierung *in vivo*

Der verweiblichende Einfluß aller eingesetzten östrogen wirkenden Substanzen auf die Geschlechtsdifferenzierung belegt eine deutliche Dosis-Wirkungsbeziehung, wobei alle eingesetzten Umweltchemikalien zumindest mit der höchsten Konzentration zu einer signifikanten Verweiblichung führen. Die Wirksamkeit im Vergleich zu E2 ist allerdings ca. zwei Zehnerpotenzen niedriger.

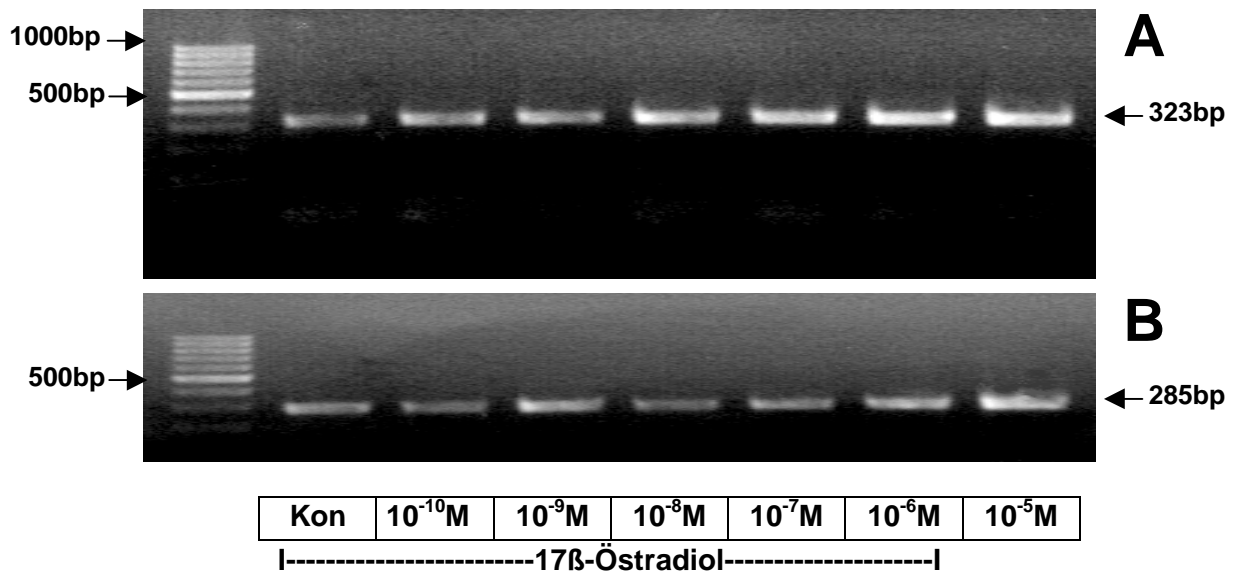


Abb. 3: Agarose-Gel mit den RT-PCR-Produkten der RBP-mRNA bei 323 bp (A) und der parallel dazu amplifizierten EF 1 α -mRNA (als interner Standard) bei 285 bp (B) aus Hepatozyten von *Xenopus laevis*, die mit Konzentrationen von 10^{-10} M bis 10^{-5} M E2 behandelt sind. Die densitometrische Auswertung ergibt einen deutlichen Anstieg der RBP-Induktion auf ca. 220% der Kontrolle.

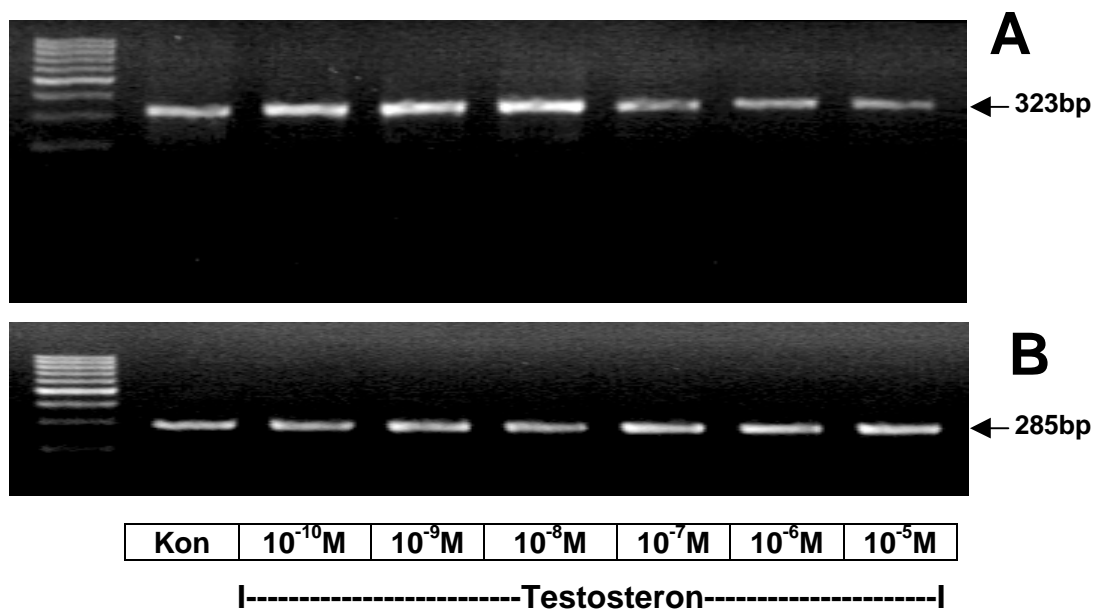


Abb. 4: Agarose-Gel mit den RT-PCR-Produkten der RBP-mRNA bei 323 bp (A) und der EF 1 α -mRNA bei 285 bp (B) aus Hepatozyten von *Xenopus laevis*, die mit Konzentrationen von 10^{-10} M bis 10^{-5} M Testosteron behandelt sind. Die densitometrische Auswertung zeigt eine dosisabhängige Hemmung der RBP-mRNA-Synthese durch Testosteron auf ca. 40% der Kontrolle.

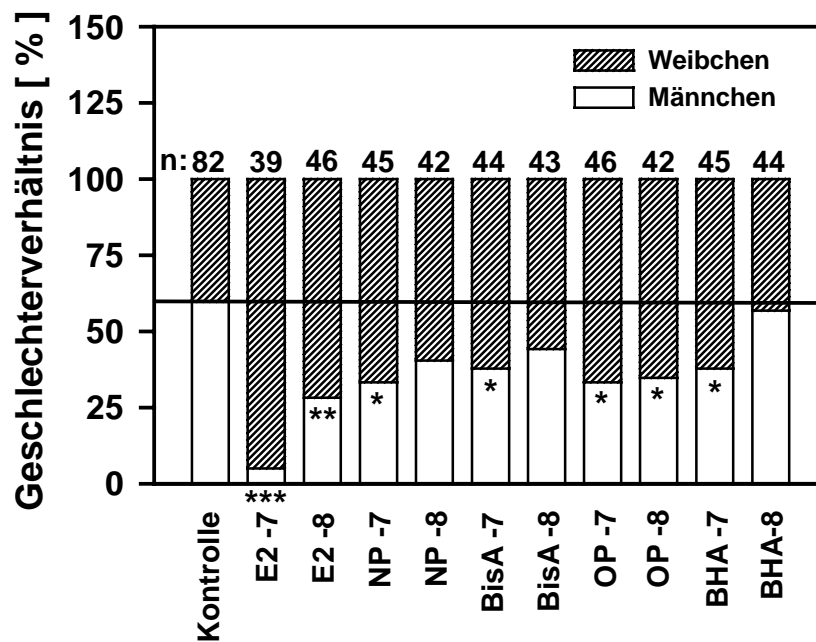


Abb. 5: Dosis-Wirkungsbeziehung von E2 und östrogen wirkenden Umweltchemikalien auf die Geschlechtsdifferenzierung bei Kaulquappen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Geschlechter bei Exposition der Kaulquappen mit E2, Nonylphenol (NP), Bisphenol A (BisA), Octylphenol (OP) und Butylhydroxyanisol (BHA). Signifikante Unterschiede sind mit * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) und *** ($p < 0,001$) gekennzeichnet und mit dem U-Test nach Mann-Whitney ermittelt.

4. Diskussion

Die mit den Extrakten der Kläranlagenausläufe erhaltenen Ergebnisse der Bindung an die Östrogenrezeptoren bzw. der *in vitro*-Induktion der Vitellogenin-mRNA belegen, daß mit dem hier etablierten Studienmodell *Xenopus laevis* die Detektion östrogenartiger Substanzen aus Gewässerproben möglich ist. Entsprechend den Verhältnissen zur östrogenen Wirkung von bekannten Umweltchemikalien auf die Vitellogenin-Induktion (KLOAS et al., 1999) ist auch hier der biologische Effekt wesentlich deutlicher als die Werte für die E2-Äquivalente bei der Rezeptorbindung vermuten lassen. Dies deutet darauf hin, daß die in den Kläranlagenausläufen vorhandenen Stoffe eine schlechtere Metabolisierbarkeit aufweisen als das natürliche E2. Daß der größte Anteil der extrahierten östrogenen Substanzen aus Umweltchemikalien besteht und nicht aus Derivaten natürlicher oder künstlicher Östrogene, ergibt sich aus den parallel vorgenommenen Bestimmungen dieser Substanzen, die mit einer Konzentration von weniger als 0,91 nM vorhanden sind. Der Vergleich der Abläufe einer herkömmlichen kommunalen Kläranlage (Vergleichsanlage) und zweier Prototypen, die durch neue Membranfiltrertechnologien lipophile Substanzen entfernen, demonstriert deutlich mit beiden Versuchsansätzen deren Funktionsfähigkeit, die sich in einer verstärkten Elimination östrogenen Substanzen dokumentiert. Die letzte Überprüfung der tatsächlichen physiologischen Relevanz dieser Wasserproben in *in vivo*-Experimenten auf die Geschlechtsdifferenzierung, wie sie für östrogene Stoffe hier bewiesen ist, steht noch aus und ist in der Vorbereitung.

Mit der erstmaligen Detektion der RBP-mRNA aus Hepatocyten-Primärzellkulturen ist die Grundlage geschaffen deren Regulation als Biomarker für (anti)östrogene wie für (anti)androgene Wirkungen von Umweltchemikalien einzusetzen. Die ersten Ergebnisse belegen klar, daß die RBP-mRNA-Synthese durch E2 stimuliert und durch Testosteron gehemmt wird. Die durch Testosteron vermittelte Hemmung kann durch die gleichzeitige Zugabe von Antiandrogenen, wie pp`-DDE und Vinclozolin, aufgehoben werden. Somit ist dies eine vielversprechende Methodik zur umfassenden Detektion aller denkbaren Einflüsse der "endocrine disruptors" auf die Reproduktionsbiologie, während die Anwendung des Androgen-Radiorezeptorassays wohl eher zur Detektion androgener Liganden geeignet ist als für die antiandrogene Stoffe.

5. Literatur

- COLBORN, T., VOM SAAL, F.S., A.M. SOTO (1993): Developmental effects of Endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect* **101**, 378-384.
- KLOAS, W. (1998): Können Umweltchemikalien durch Interferenz mit endokrinen Funktionen (endocrine disruptors) zur Verweiblichung führen? Statusseminar der Projektträgerschaft BW-PLUS, web-page: <http://bwplus.fzk.de/paö/disk98/kloas/kloas.htm>, 1-8.
- KLOAS, W., I. LUTZ (1997): Umweltchemikalien mit hormoneller Wirkung: Amphibien als Studienmodell. *Veröff. PAÖ* 22, 231-240.
- KLOAS, W., I. LUTZ (1998): Können Umweltchemikalien zur Verweiblichung führen? BW-PLUS-Statuskolloquium, Umweltforschung in Baden-Württemberg, web-page: <http://bwplus.fzk.de/ettlingen/kloas/kloas.htm>, 1-9.
- KLOAS, W., EINSPANIER, R., I. LUTZ (1999): Amphibians as a model to study endocrine disruptors: II. Estrogenic activity of environmental chemicals *in vitro* and *in vivo*. "Drugs and Hormones as Pollutants of the Aquatic Environment – Determination and Ecotoxicological Impacts", *Sci Total Environ*, 225, 59-68.
- LUTZ, I., W. KLOAS (1999): Amphibians as a model to study endocrine disruptors: I. Environmental pollution and estrogen receptor binding. "Drugs and Hormones as Pollutants of the Aquatic Environment – Determination and Ecotoxicological Impacts", *Sci Total Environ*, 225, 49-57.
- McKEARIN, D.M., D.J. SHAPIRO (1988): Persistent estrogen induction of hepatic *Xenopus laevis* serum retinol binding protein mRNA. *J Biol Chem* 263, 3261-3265.
- McKEARIN, D.M., BARTON, M.C., KELLER, M.J., D.J. SHAPIRO (1987): Estrogens induce transcription of the *Xenopus laevis* serum retinol binding protein gene. *J Biol Chem* 11, 4939-4942. McKearin
- MCLACHLAN, J.A., S.F. ARNOLD (1996): Environmental estrogens. *American Scientist* 84, 452-461.
- NIEUWKOOP, P.D., J. FABER (1975): Normal table of *Xenopus laevis* Daudin. North-Holland, Amsterdam.
- SCHÄFER, W.R., ZAHRADNIK, H.P., FRIJUS-PLESSEN, N., K. SCHNEIDER (1996): Anthropogene Substanzen mit unerwünschter Östrogenwirkung: Auswahl von expositionsrelevanten Stoffen. *Zeitschrift für Umweltmedizin*, 210-215.