

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

**Förderkennzeichen (20 9605 02) und (20 9701 02)**

W. Kloas  
Zoologisches Institut II  
Universität Karlsruhe

### **Zusammenfassung**

Umweltchemikalien, die nach ökotoxikologischen Gesichtspunkten bisher als unbedenklich galten, können hormonähnliche Wirkungen entfalten. Diese sogenannten „endocrine disruptors“ stören die normalen hormongesteuerten Abläufe im Körper und da ihre bisher beobachteten Effekte in den verschiedenen Vertebratenklassen hauptsächlich auf östrogenartigen Wirkungen beruhten, wurden all diese Phänomene unter dem Begriff der „Verweiblichung“ zusammengefaßt.

Ziel des hier vorgestellten Forschungsvorhabens ist es mit Amphibien als Studienmodell zu klären, ob in Baden-Württemberg die Gewässerbelastung mit Umweltchemikalien zum Phänomen der Verweiblichung führen kann, was auch ein Indikator für eine potentielle Gefährdung des Menschen wäre.

Die Untersuchungen hierzu umfassen bei *Xenopus laevis* verschiedene Nachweisebenen zur östrogenen Potenz von Umweltchemikalien: (1) Nachweis der Bindung an den Östrogenrezeptor in der Leber, was die Voraussetzung für eine hormonähnliche Wirkung darstellt, (2) biologische Wirkung 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 zum Nachweis der Induktion der Vitellogeninsynthese bei adulten Tieren und der Beeinflussung der Geschlechtsdifferenzierung bei der Kaulquappenentwicklung. Die Ergebnisse belegen mit Amphibien als Studienmodell die verschieden gute Eignung der 3 Nachweisebenen zur Bestimmung östrogenartiger Wirkungen.

### **Summary**

Recently several studies showed that environmental chemicals without toxic risks exhibit humoral effects. These so called “endocrine disruptors“ disturb normal endocrine feed back mechanisms and mainly estrogenic effects were observed in all classes of vertebrates causing “feminization“ phenomena.

The aim of our present research using amphibians as a model is to study if environmental water pollution in Baden-Württemberg is able to cause feminization phenomena, which would also indicate a potential risk for humans.

The assessment of estrogenic potencies of environmental chemicals includes several levels of investigation using the amphib *Xenopus laevis*: (1) binding of environmental chemicals to liver estrogen receptor, (2) biological significance at cellular level by assaying vitellogenin synthesis in primary cultured hepatocytes, and (3) *in vivo* effects on intact animals by experiments determining induction of vitellogenin synthesis in adult animals and influences of sexual determination during larval development. Our

results indicate several suitabilities of all 3 levels of investigation for assessment of estrogenic effects using amphibs as model.

## 1 Einleitung

Die Belastung der Umwelt durch anthropogene Stoffe (SCHÄFER et al., 1996) hat gerade in den letzten Jahren eine gesteigerte Aktualität innerhalb der Umweltforschung gewonnen, da erkannt wurde, daß Umweltchemikalien, die in relativ hohen Konzentrationen in der Umwelt vorhanden sind, zwar keine direkten ökotoxikologischen Wirkungen auf Tiere haben, dafür aber indirekt deren Reproduktionsbiologie beeinflussen (COLBORN et al., 1993; MCLACHLAN & ARNOLD, 1996). 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 diese "endocrine disruptors" Störungen der normalen hormongesteuerten Abläufe bei Wirbeltieren hauptsächlich durch östrogenartige Wirkungen verursachen und weniger durch antiandrogene Eigenschaften, faßt man als Summation all diese Phänomene unter dem Begriff der "Verweiblichung" zusammen.

Da die meisten Beobachtungen und Untersuchungen in diesem Forschungsgebiet entweder auf ökologischen Freilanduntersuchungen oder auf zahlreichen in ihrer Sensitivität sehr unterschiedlichen *in vitro*-Testverfahren beruhen, ist es das Bestreben des hier vorgestellten Forschungsvorhabens 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. Das Ziel hierbei ist mit Amphibien als Studienmodell zu klären, 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: (1) Nachweis der Bindung an den Östrogenrezeptor in der Leber, was die Voraussetzung für eine hormonähnliche Wirkung darstellt, (2) biologische Wirkung 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 zum Nachweis der Induktion der Vitellogeninsynthese bei adulten Tieren und der Beeinflussung der Geschlechtsdifferenzierung bei der Kaulquappenentwicklung. Der Vergleich der Eignung dieser 3 Nachweisebenen zur Bestimmung östrogenartiger Wirkungen soll die Grundlage für eine differenziertere Bewertung der verschiedenen Methoden bilden, damit deren Anwendungen allein oder in Kombination für Screening-Tests von Umweltchemikalien bzw. –proben auch eine wissenschaftlich eindeutige Aussage über das Gefährdungspotential zulassen. Nach den im ersten Teil dieses Projektes Untersuchungen zur prinzipiellen Etablierung der Methoden für alle 3 Nachweisebenen von östrogenartigen Wirkungen durchgeführt wurden, beziehen sich die hier vorgestellten Ergebnisse vor allem auf eine weitergehende Charakterisierung und Validierung der Methoden zur Bestimmung der Östrogenrezeptoren und der Induktion der Vitellogeninsynthese *in vitro* sowie der ersten *in vivo* Experimente zur

Feststellung der Beeinflussung der Geschlechtsdetermination durch Umweltchemikalien während der Kaulquappenentwicklung. Da die "Verweiblichung" nicht nur über östrogene sondern auch über antiandrogene Effekte von Umweltchemikalien erfolgen kann, ist es ein weiteres Ziel dieses Forschungsvorhabens zusätzlich deren potentielle Bindung an die Androgenrezeptoren zu untersuchen und hier erste Versuche zur Etablierung der hierfür erforderlichen Methodik vorzustellen.

## **2 Material und Methoden**

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

### **2.1 Rezeptoruntersuchungen**

#### **2.1.1 Radiorezeptorassay für Östrogenrezeptoren *in vitro***

Entsprechend der Methodik zur Bestimmung der Östrogenrezeptoren aus Leberhomogenaten von *Xenopus laevis* (KLOAS & LUTZ, 1997) werden die Zeitverläufe der Konzentrationen der freien cytosolischen Östrogenrezeptoren in den Hepatocyten-Primärzellkulturen (KLOAS & LUTZ, 1997) bei Behandlung mit  $10^{-6}$  M  $17\beta$ -Estradiol,  $10^{-7}$  M Nonylphenol und  $10^{-7}$  M Bisphenol A im Vergleich zu Kontrollen bestimmt.

#### **2.1.2 Radiorezeptorassay für Androgenrezeptoren**

Zur Etablierung dieser Methodik werden analog zu den Untersuchungen zur Etablierung des Radiorezeptorassays für Östrogenrezeptoren (vgl. KLOAS et al., 1996) verschiedene Puffersysteme sowie Inkubationstemperaturen getestet sowie kinetische Experimente zur Ermittlung der optimalen Inkubationsbedingungen zum Nachweis einer spezifischen Androgenrezeptorbindung von [ $^3$ H]-Testosteron in Leberhomogenaten von *Xenopus laevis* durchgeführt.

### **2.2 Nachweis der Vitellogenininduktion *in vitro* mittels semiquantitativer RT-PCR**

Die prinzipielle Durchführung des Nachweises der durch Estradiol induzierbaren Vitellogenin-mRNA mittels RT-PCR (Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction) in Hepatocyten-Primärzellkulturen von *Xenopus laevis* (KLOAS & LUTZ, 1997) wird durch Experimente zur Validierung einer semiquantitativen Bestimmung ergänzt. Hierbei wird die Anwendbarkeit der RT-PCR für die mRNA dreier sogenannter "housekeeping proteins" (Ubiquitin, Cyclophylin und Elongationsfaktor  $1\alpha$ ) als interner Standard im Vergleich zur induzierbaren Vitellogenin-mRNA getestet. Densitometrische Messungen verschiedener Vitellogenin-cDNA-Konzentrationen mittels computerisierter Mikrodensitometrie in Ethidiumbromid-Agarosegelen dienen der Eichung und Standardisierung der semiquantitativen Auswertung der Induktion der Vitellogenin-mRNA *in vitro*. Die ersten Bestimmungen der Konzentrationsabhängigkeiten der Vitellogenin-mRNA-Induktion *in vitro* erfolgt mit

17 $\beta$ -Estradiol, Nonylphenol und Bisphenol A in Konzentrationen von 10<sup>-11</sup> bis 10<sup>-5</sup> M nach 36 Stunden Inkubation.

### **2.3 Einfluß von Umweltchemikalien auf die Geschlechtsdifferenzierung *in vivo***

Kaulquappen von *Xenopus laevis* werden ab Stadium 44 (NIEUWKOOP & FABER, 1975) exponiert mit 17 $\beta$ -Estradiol (10<sup>-8</sup> und 10<sup>-9</sup> M), Nonylphenol (10<sup>-10</sup> und 10<sup>-11</sup> M), Bisphenol A (10<sup>-8</sup> und 10<sup>-9</sup> M), Octylphenol (10<sup>-8</sup> und 10<sup>-9</sup> M), Butylhydroxyanisol (10<sup>-8</sup> und 10<sup>-9</sup> M) und mit der entsprechenden Menge Lösungsmittel (96% Ethanol) als Kontrolle. Nach 3 Monaten werden die Gonaden der Tiere für die Bestimmung des Geschlechterverhältnisses mit dem Binokular untersucht.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Rezeptorassays**

#### **3.1.1 Zeitverläufe der Östrogenrezeptoren *in vitro***

Die Behandlung von Hepatocyten-Primärzellkulturen mit 10<sup>-6</sup> M 17 $\beta$ -Estradiol, 10<sup>-7</sup> M Nonylphenol und 10<sup>-7</sup> M Bisphenol A ergab im Zeitverlauf (Abb.1), daß alle 3 Substanzen nach 3 und 6 Stunden geringere Östrogenrezeptorkonzentrationen aufwiesen als die Kontrollen während nach 36 Stunden eine Erhöhung der Rezeptoranzahl festgestellt wurde (P < 0,07; Wilcoxon-Test für abhängige Stichproben).

#### **3.1.2 Nachweis von Androgenrezeptoren im Lebercytosol**

Die Durchführung der Experimente zur Etablierung eines Radiorezeptorassays für Androgenrezeptoren im Lebercytosol von *Xenopus laevis* mit [<sup>3</sup>H]-Testosteron als markiertem Liganden ergab, daß der Nachweis von Androgenrezeptoren möglich ist. Analog zu den Experimenten für die Optimierung des Radiorezeptorassays der Östrogenrezeptoren ist sowohl der Saccharose-Tris-HCl-Puffer als auch die Inkubationstemperatur von 4°C für die Androgenrezeptorbindung am besten geeignet, während die optimale Inkubationszeit kürzer ist und zwischen 6 und 16 Stunden liegt.

### **3.2 Semiquantitative RT-PCR zum Nachweis der Vitellogenin-mRNA *in vitro***

Die vergleichende Durchführung der RT-PCR für die 3 "housekeeping proteins" Ubiquitin, Cyclophylin und Elongationsfaktor 1 $\alpha$  als interner Standard im Vergleich zur induzierbaren Vitellogenin-mRNA ergab aufgrund der gleichmäßigen cDNA-Banden, die schon bei nur 20 bis 22 PCR-Zyklen klar und deutlich auswertbar waren, daß der Elongationsfaktor 1 $\alpha$  hierfür eindeutig am besten geeignet ist. Die verwendeten Primer für Ubiquitin ergaben nach ca. 30 PCR-Zyklen 3 unterschiedlich starke cDNA-Banden deren densitometrische Auswertung im Vergleich zum Elongationsfaktor 1 $\alpha$  wesentlich höhere Abweichungen aufwies. Der Nachweis von Cyclophylin konnte trotz angeblicher Eignung der benutzten Primer für *Xenopus* auch nach mehreren Veränderungen bei den PCR-Bedingungen selbst mit mehr als 35 PCR-Zyklen nicht erbracht werden. Deshalb wurde für alle weiteren Experimente der Elongationsfaktor

1 $\alpha$  (Abb.2 und Abb.3) als "housekeeping protein" zur Validierung bzw. Korrekturfaktor für die semiquantitative Messung der Vitellogenin-mRNA herangezogen.

Die densitometrischen Messungen verschiedener Vitellogenin-cDNA-Konzentrationen mittels computerisierter Mikrodensitometrie in Ethidiumbromid-Agarosegelen zeigten, daß die optische Dichte exponentiell mit steigender cDNA-Konzentration abnimmt und eine doppelt logarithmische Auftragung von optischer Dichte und von cDNA-Konzentration für die Eichung und Standardisierung der semiquantitativen Auswertung am besten geeignet ist.

## TIME COURSE E2-RECEPTOR BINDING

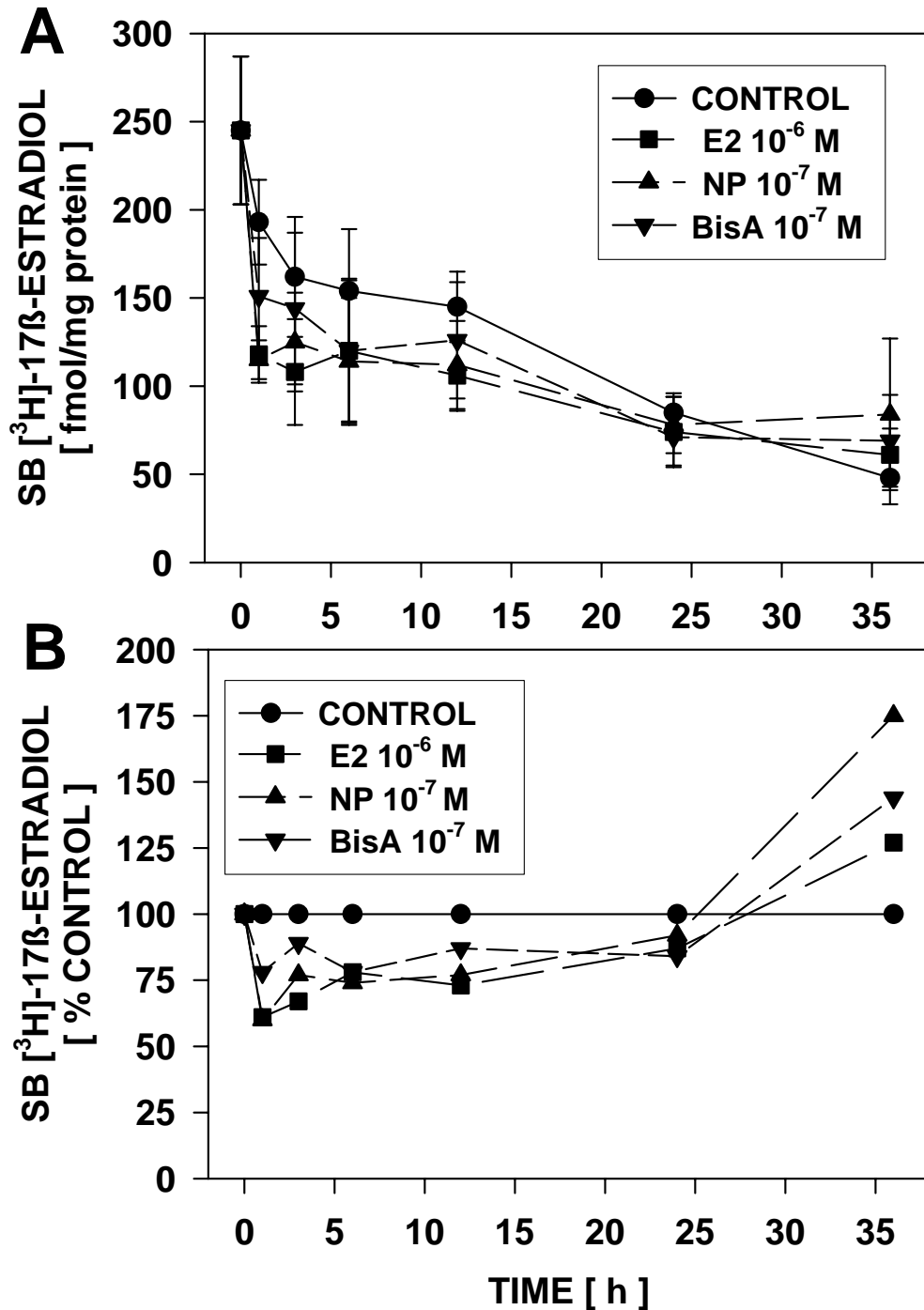


Abb.1: A: Zeitverläufe der spezifischen [<sup>3</sup>H]-17β-Estradiol-Bindung als Maß für die Konzentration an freien Östrogenrezeptoren in Hepatocytan-Primärzellkulturen von *Xenopus laevis* ohne und nach Zugabe von 10<sup>-6</sup> M 17β-Estradiol, 10<sup>-7</sup> M Nonylphenol und 10<sup>-7</sup> M Bisphenol A. Dargestellt sind die Mittelwerte von 4 unabhängigen Experimenten ± SEM. B: Prozentualer Vergleich der Rezeptorkonzentrationen von Abb.1A mit der jeweiligen Kontrolle.

Die Untersuchungen zur Konzentrationsabhängigkeit von 17 $\beta$ -Estradiol, Nonylphenol und Bisphenol A mit Konzentrationen von 10<sup>-10</sup> bis 10<sup>-5</sup> M für die Vitellogenin-mRNA-Induktion *in vitro* nach 36 Stunden Inkubation sind in Abb.2 bis Abb.4 zusammengefaßt. 17 $\beta$ -Estradiol, Nonylphenol und Bisphenol A sind in der Lage die Induktion von Vitellogenin-mRNA hervorzurufen, was sich jeweils in einer dosisabhängigen Abnahme der optischen Dichte ausdrückt (Abb.2 und Abb.3). Die gleichmäßige Expression des "housekeeping proteins" Elongationsfaktor 1 $\alpha$  zeigt sich bei den Gelen in Abb.2b und 3b. Die entsprechenden densitometrischen Auswertungen zur semiquantitativen Darstellung der Vitellogenin-mRNA nach Korrektur um die Werte des Elongationsfaktor 1 $\alpha$  gibt die Abb.4 wieder.

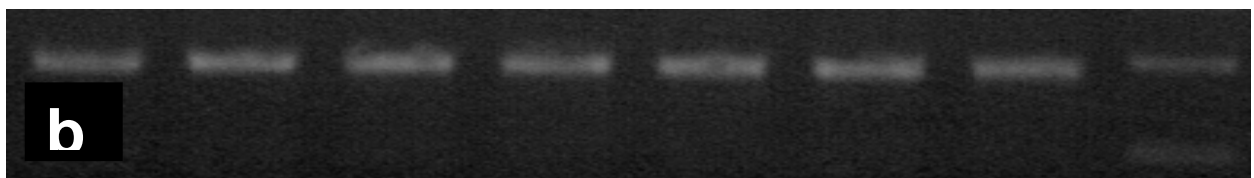
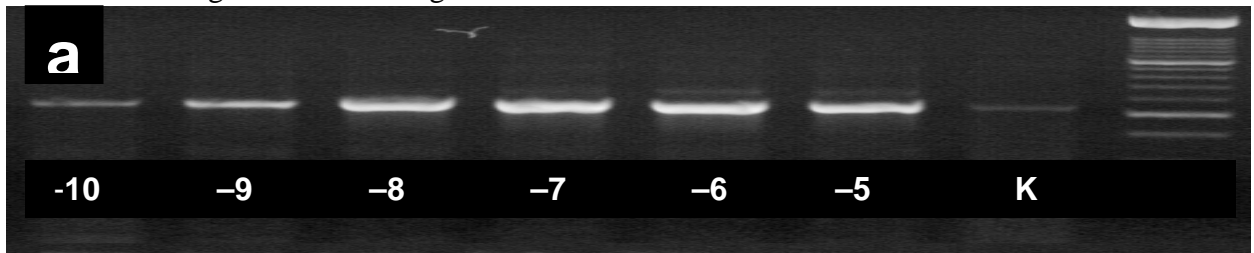


Abb.2a: Vitellogenin-cDNA-Banden nach der RT-PCR bei 36 Stunden Inkubation ohne (K) und mit 17 $\beta$ -Estradiol mit Konzentrationen von 10<sup>-10</sup> bis 10<sup>-5</sup> M als Maß für die östrogene Induktion der Vitellogenin-mRNA *in vitro*. Abb.2b: Korrespondierende cDNA-Banden zu Abb.2a für den Elongationsfaktor 1 $\alpha$  als "housekeeping protein" Standard.

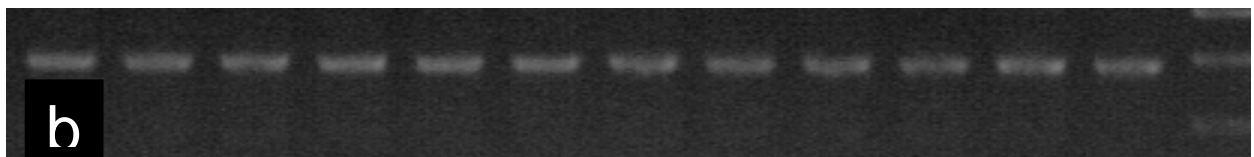
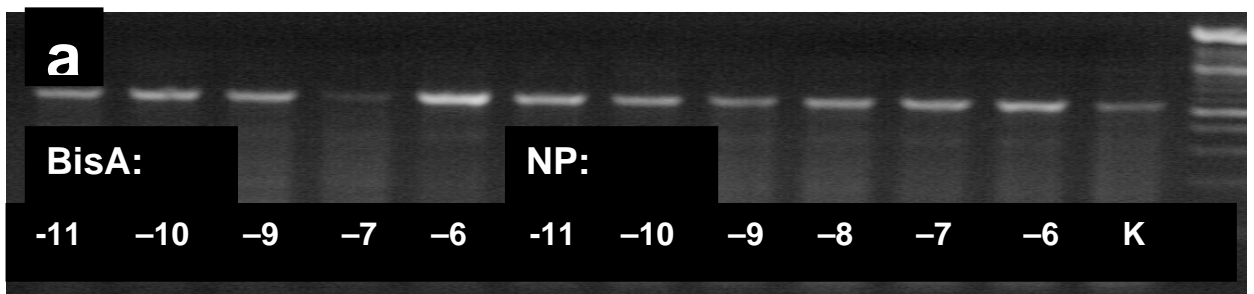


Abb.3a: Vitellogenin-cDNA-Banden nach 36 Stunden Inkubation mit Nonylphenol (NP) und Bisphenol A (BisA) bei Konzentrationen von 10<sup>-11</sup> bis 10<sup>-6</sup> M. Abb.3b: Korrespondierende cDNA-Banden zu Abb.3a für den Elongationsfaktor 1 $\alpha$  als "housekeeping protein" Standard.

## SEMIQUANTITATIVE RT-PCR

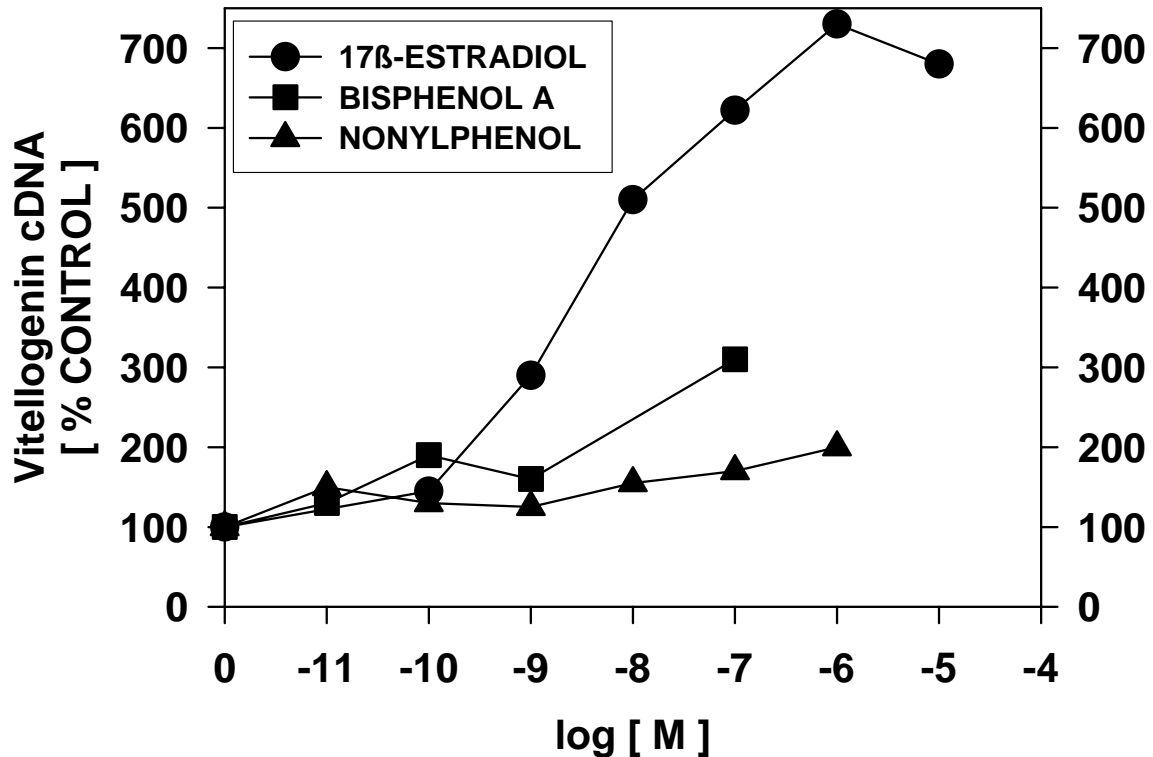


Abb.4: Bestimmung der relativen Vitellogenin-cDNA-Gehalte nach der RT-PCR für die Konzentrationsabhängigkeit von 17β-Estradiol, Bisphenol A und Nonylphenol als Maß für die östrogenartige Wirkung durch Induktion der Vitellogenin-mRNA.

### 3.3 Geschlechtsdifferenzierung *in vivo* durch Umweltchemikalien

Die Bestimmung der Geschlechtsdetermination nach der Kaulquappenentwicklung bei Behandlung mit Umweltchemikalien ergab, daß die Estradiolkonzentrationen von  $10^{-8}$  und  $10^{-9}$  M eine signifikante Erhöhung des Anteils an Weibchen verursachten (Abb.5). Dies zeigte sich ebenso bei der Nonylphenolkonzentration von  $10^{-10}$  M. Alle anderen Umweltchemikalien wiesen ebenfalls erhöhte prozentuale Anteile an Weibchen auf, die jedoch nur eine Tendenz aber keine Signifikanz ( $p < 0,05$ ) zeigten.



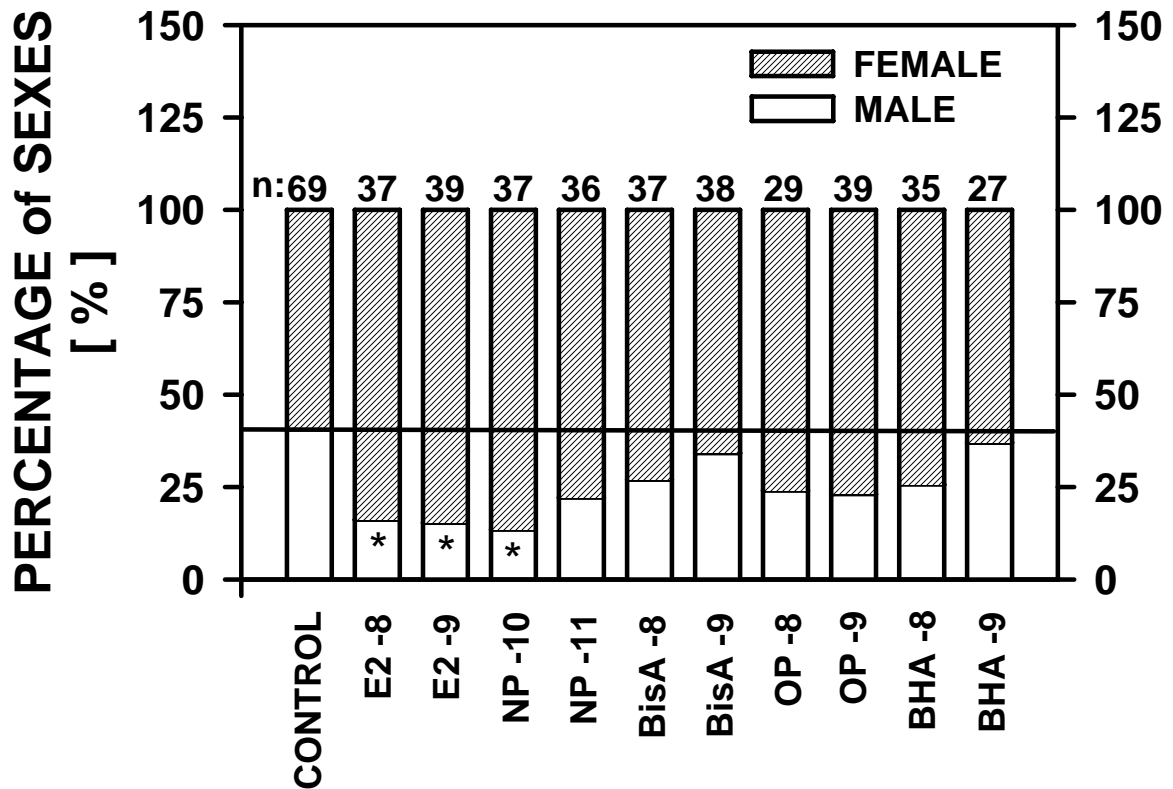


Abb.5: Prozentualer Anteil der Männchen und Weibchen eines Versuchsansatzes zur Kaulquappenentwicklung bei Behandlung mit Umweltchemikalien. Signifikante Unterschiede (Mann-Whitney U-Test) zur Kontrolle sind mit \* markiert ( $p < 0,05$ ).

## 4 Diskussion

### 4.1 Rezeptoruntersuchungen

Die Resultate bei den Bestimmungen der Östrogenrezeptormengen im Zeitverlauf nach Zugabe von  $17\beta$ -Estradiol, Nonylphenol und Bisphenol A (Abb.1) belegen, daß auch in den Hepatocyten-Primärzellkulturen die Östrogenrezeptoren einer *in vivo* ähnlichen Regulation unterliegen. Bei Besetzung der freien Rezeptoren durch östrogenartige Liganden gehen diese in den Zellkern, so daß die zur Verfügung stehenden freien Rezeptoren zunächst signifikant abnehmen. Im weiteren Verlauf wird aufgrund der östrogenartigen Wirkungen der hier eingesetzten Liganden die Östrogenrezeptor-Neusynthese angeregt, was sich in der Erhöhung der Östrogenrezeptoren nach 36 Stunden zeigt. Somit bestehen in diesem *in vitro*-System Bedingungen, wie sie auch *in vivo* vorhanden sind, was die gute Eignung dieser Versuchsansätze für deren Verwendung zum Nachweis östrogenen Biomarker wie der Induktion der Vitellogenin-mRNA aufzeigt. Die hier aufgeführten Ergebnisse lassen weiterhin darauf schließen, daß analog zum Nachweis der Induktion der Vitellogenin-mRNA ebenso die Bestimmung der Östrogenrezeptor-mRNA *in vitro* ein geeigneter Biomarker für östrogenartige Wirkungen sein könnte. Zukünftige vergleichende Untersuchungen zur Induktion von Östrogenrezeptor-mRNA und Vitellogenin-mRNA sollten klären, welcher Nachweis der bessere Biomarker für östrogene Wirkungen ist.

Die Vorversuche zum Nachweis der Androgenrezeptoren mittels Radiorezeptorassay mit [ $^3$ H]-Testosteron als markiertem Liganden verliefen erfolgreich, da bei  $4^\circ\text{C}$  zwischen 6 und 16 Stunden Inkubationszeit eine deutliche spezifische Bindung erhalten

wurde. Die Verwendung des gleichen Puffersystems wie für die Östrogenrezeptorbestimmungen erlauben nach einer weiteren Optimierung der Methode in bezug auf die optimale Inkubationszeit sogar Paralleluntersuchungen zur Messung von Östrogen- sowie Androgenrezeptoren in denselben Versuchsansätzen *in vivo* und *in vitro*. Somit sind hierdurch die methodischen Grundlagen geschaffen nicht nur "Verweiblichungsphänomene" aufgrund östrogenen Aktivitäten sondern auch wegen antiandrogener Wirkungen von Umweltchemikalien zu untersuchen. Antiandrogene Eigenschaften bedingen die Bindung an den Androgenrezeptor wobei durch diese Interaktion mit dem Rezeptor die bei Androgenen normalerweise erfolgenden spezifischen biologischen Wirkungen blockiert werden. Die Suche nach einem entsprechend geeigneten Biomarker für Androgene bzw. Antiandrogene und dessen Etablierung ist nun die wichtigste Aufgabe in diesem Forschungsbereich, um damit Effekte von Umweltchemikalien bzw. Umweltproben auf den kompletten Bereich der Reproduktionsbiologie untersuchen zu können. Innerhalb unserer Arbeitsgruppe sind deshalb auch schon Vorversuche zur Etablierung geeigneter Biomarker angelaufen, die zum Teil sehr erfolgversprechend zu sein scheinen.

#### **4.2 Semiquantitative RT-PCR der Vitellogenin-mRNA *in vitro***

Die Methodik zur semiquantitativen Bestimmung der Vitellogenin-mRNA durch computerisierte Mikrodensitometrie (vgl. KLOAS & LUTZ, 1997) wurde weiter optimiert und mit dem Elongationsfaktor  $1\alpha$  wurde nun ein leicht nachzuweisendes und messbares "housekeeping protein" gewissermaßen als interner Standard für die spezifisch durch Östrogene induzierbare Vitellogenin-mRNA gefunden. Die Abb.2 bis 4 belegen die Durchführbarkeit der RT-PCR zum Nachweis der Dosis-Wirkungsbeziehungen von  $17\beta$ -Estradiol, Nonylphenol und Bisphenol A. Die semiquantitative Auswertung der densitometrischen Messungen (Abb.4) scheint zu ergeben, daß  $17\beta$ -Estradiol eine höhere Vitellogenin-mRNA Induktion verursacht als vergleichbare Konzentrationen an Nonylphenol und Bisphenol A. Da die Ergebnisse jedoch nicht innerhalb derselben Zellkultur erhalten wurden und weitere Vorversuche innerhalb einer Zellkultur beim direkten Vergleich weniger Konzentrationen für Nonylphenol bzw. Bisphenol A höhere östrogene Wirkungen als für  $17\beta$ -Estradiol gemessen wurden, muß die Frage nach der biologischen Wirksamkeit von  $17\beta$ -Estradiol im Vergleich mit Umweltchemikalien im Moment noch offen gelassen werden und kann nur durch die mehrfache Durchführung vergleichender Experimente innerhalb einer Zellkultur geklärt werden. Die hierfür notwendige Optimierung der RT-PCR in Verbindung mit der Zellkulturtechnik erlaubt uns diese Untersuchungen gegenwärtig durchzuführen und eine weitere Erhöhung der Sensitivität sollte durch Einführung eines PCR-ELISAS durch die Verwendung von Zellkulturen in 96-Well-Mikrotiterplatten möglich sein.

#### **4.3 Einfluß von Umweltchemikalien auf die Geschlechtsdifferenzierung**

Die ab Stadium 44 exponierten Kaulquappen von *Xenopus laevis* zeigten bei der Geschlechtsbestimmung nach dreimonatiger Entwicklung eine deutliche "Verweiblichung" bei Behandlung mit  $17\beta$ -Estradiol ( $10^{-8}$  und  $10^{-9}$  M) sowie mit  $10^{-10}$  M Nonylphenol. Alle weiteren Umweltchemikalien wie Bisphenol A, Octylphenol und Butylhydroxyanisol wiesen zumindest eine dosisabhängige Tendenz zur Verweiblichung auf. Die hier erhobenen Ergebnisse belegen, daß dieser Versuchsansatz

als Endpunktmethode geeignet ist zur Untersuchung östrogenen Wirkungen von Umweltproben am Gesamttier und damit die letztendlich wichtigste biologische Relevanz für die Population selbst aufzeigen kann.

Beim Vergleich der 3 unterschiedlichen Methoden zum Nachweis östrogenen Potenz ergibt sich ganz klar ein deutlicher Vorteil für die biochemisch-molekularbiologischen Techniken bei der Rezeptorbindung und der Induktion biologischer Wirkungen *in vitro*, was den Zeitaufwand und die Quantifizierbarkeit angeht, da hier innerhalb von 3 bis 5 Tagen die Ergebnisse für eine relativ hohe Probenzahl mit hoher Genauigkeit vorliegen können. Der zeitliche Nachteil von ca. 2 bis 3 Monaten Dauer für die Untersuchungen zur Geschlechtsdetermination muß allerdings wegen seiner klaren Aussage für die Reproduktionsbiologie der Population in Kauf genommen werden, da alle noch so guten *in vitro*-Systeme *in vivo* auf ihre tatsächliche Bedeutung hin überprüft werden müssen. Deshalb wird der Vergleich unserer Versuchsansätze für diese 3 Nachweisebenen innerhalb eines Labors auch Aussagen über die jeweilige Eignung für die Anwendung zulassen, wobei sich schon jetzt abzeichnet, daß für eine wissenschaftlich fundierte Aussage über ein Gefährdungspotential von Substanzen oder Umweltproben die Kombination aller Nachweismethoden das Optimum ist. Die Durchführung unseres Forschungsvorhabens dürfte hierzu Schrittmacherfunktion leisten und gleichzeitig Handlungsrichtlinien aufzeigen, wie die für die jeweilige Bearbeitung einer Fragestellung optimale Kombination an Methoden zusammengesetzt sein sollte.

## 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., I. LUTZ (1997): Umweltchemikalien mit hormoneller Wirkung: Amphibien als Studienmodell. *Veröff. PAÖ* 22, 231-240.
- KLOAS, W., LUTZ, I., H. SEGNER (1996): Können Umweltchemikalien durch Interferenz mit endokrinen Funktionen (endocrine disruptors ) zur Verweiblichung führen? - Ökotoxikologische Untersuchungen zur Wirkung von Wasserproben aus Baden-Württemberg auf Amphibien - Projektskizze. *Veröff. PAÖ* 16, 567-576.
- 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-PLESSSEN, N., K. SCHNEIDER (1996): Anthropogene Substanzen mit unerwünschter Östrogenwirkung: Auswahl von expositionsrelevanten Stoffen. *Zeitschrift für Umweltmedizin*, 210-215.