

Können Umweltchemikalien zur Verweiblichung führen?

W. Kloas, I. Lutz

Zoologisches Institut II
Universität Karlsruhe

1 Einleitung

Die Tatsache, daß Umweltchemikalien, die in relativ hohen Konzentrationen in der Umwelt vorhanden sind (SCHÄFER et al., 1996), zwar keine direkten ökotoxikologische 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 innerhalb der Umweltforschung gewonnen. Hauptsächlich betroffen hierdurch sind die verschiedenen Klassen der Wirbeltiere, da die ihrem chemischen Aufbau nach recht heterogenen chemischen 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 Eigenschaften verursachen, faßt man als Summation all diese Phänomene unter dem Begriff der "Verweiblichung" zusammen. Zu den chemischen Stoffklassen, die östrogen wirken können und expositionsrelevant in der Umwelt vorhanden sind, gehören Alkylphenole (Octylphenol, Nonylphenol), Hydroxyanisole, Bisphenol A, DDT und seine Metabolite, Tetrachlorbiphenyl (eine von 209 PCB-Verbindungen), Diethylphthalat u. a.. Beobachtungen und Untersuchungen zu diesen Substanzen sind bisher bei allen Vertebratenklassen gemacht worden mit Ausnahme der Amphibien, was erstaunlich ist, da gerade der weltweit dramatische Rückgang der Amphibienpopulationen (BLAUSTEIN, 1994) noch nicht befriedigend erklärt werden kann und den "endocrine disruptors" hierbei eine tragende Rolle zukommen könnte.

Da die meisten Forschungsergebnisse in diesem Bereich entweder auf ökologischen Feldstudien 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. Neben der grundsätzlich interessanten Frage, ob durch Umweltchemikalien die Reproduktionsbiologie der Amphibien geschädigt und so das Amphibiensterben zumindest teilweise erklärt werden kann, bietet die Biologie der Amphibien zahlreiche Besonderheiten, die gerade die Amphibien im Vergleich zu anderen Vertebraten als besonders geeignet erscheinen lassen, um Einflüsse von Umweltchemikalien auf die Fortpflanzung zu untersuchen.

Ein Hauptzielorgan für Östrogene ist auch bei Amphibien die Leber. Das weibliche Sexualsteroid Estradiol gelangt in die Leberzelle, wird an cytosolische Östrogenrezeptoren gebunden, die dann das Genom aktivieren, welches die Transkription der Vitellogenin-mRNA von der DNA bewirkt. Daran schließt sich die Translation der Vitellogenin-mRNA, d. h. die Proteinsynthese von Vitellogenin selbst, an, was in der Leberzelle zu einer erhöhten Bildungsrate des Eidotterproteins Vitellogenin führt. Vitellogenin gelangt von der Leberzelle ins Blut und von dort zum Ovar, wo es der Anlage von Dotterreserven dient. Bei männlichen Tieren findet unter natürlichen Umständen aufgrund der sehr niedrigen Estradiolkonzentration keine bzw. eine kaum nachweisbare Vitellogeninsynthese statt; wird den Tieren jedoch Östradiol oder eine östrogenartige Substanz zugeführt, wird auch hier der Östrogenrezeptor besetzt und aktiviert die Expression des Vitellogenin-Gens. Dies bedeutet, daß östrogene Effekte bei Amphibien durch die vermehrte Bildung des östrogenen Biomarkers, dem Eidotterprotein Vitellogenin, nachweisbar sind. Darüber hinaus ist die Gonadenbildung und damit die Geschlechtsdetermination während der Larvalentwicklung völlig hormonabhängig, so daß trotz genetisch determinierter Geschlechtsentwicklung durch künstliche Zugabe von Androgenen oder Östrogenen irreversibel eine Vermännlichung bzw. Verweiblichung herbeigeführt werden kann. Aufgrund dieser Besonderheiten bieten sich die Amphibien geradezu an als ein umfassendes Studienmodell zum Nachweis einer östrogenen Potenz von Umweltchemikalien etabliert zu werden. Unsere Untersuchungen hierzu umfassen bei dem Südafrikanischen Krallenfrosch *Xenopus laevis* verschiedene Nachweisebenen: (1) Nachweis *in vitro* der Bindung an den Östrogenrezeptor in der Leber, was die Voraussetzung für eine hormonähnliche Wirkung darstellt, (2) biologische Wirkung auf zellulärer Ebene *in vitro* durch Bestimmung der Vitellogenin-Synthese in Hepatocyten-Primärzellkulturen und (3) Wirkung *in vivo* auf das Gesamttier mit Experimenten zur 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 für die Populationsebene zulassen.

2 Material und Methoden

Alle 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 gezüchtet und gehältert. Die adulten Tiere wurden künstlich zum Ablachen gebracht, indem ihnen humanes Choriongonadotropin injiziert wurde. Für die Durchführung der Methoden zur Bestimmung der Östrogenrezeptoren durch Radiorezeptorassay wurden adulte Tiere von 2-3 Jahren verwendet. Die Herstellung von Hepatocyten-Primärzellkulturen zum Nachweis der Vitellogenin-Induktion erfolgte nur aus 2-3 Jahre alten Männchen (vgl. LUTZ&KLOAS, 1998; KLOAS et al., 1998).

2.1 Radiorezeptorassay für Östrogenrezeptoren

Für Untersuchungen der Bindung von Umweltchemikalien an den Östrogenrezeptor, was die Voraussetzung für eine potentielle östrogene Wirkung ist, wurde erstmalig bei Amphibien ein Radiorezeptorassay für Östrogenrezeptoren etabliert (LUTZ&KLOAS, 1998). Das Prinzip der Methode beruht darauf, daß die im Cytosol der Leberzellen befindlichen Östrogenrezeptoren isoliert werden. Hierzu wird durch verschiedene Zentrifugationsschritte aus einem Leberhomogenat mit dem Inkubationspuffer das Cytosol mit den darin befindlichen Östrogenrezeptoren von allen anderen zellulären Bestandteilen getrennt. Die Östrogenrezeptoren werden dadurch bestimmt, daß bestimmte Cytosolmengen mit dem durch Tritium ($[^3\text{H}]$) markierten Estradiol inkubiert werden. Hierbei erfolgt die Bindung von $[^3\text{H}]$ -Estradiol an den Rezeptor. Die Separation von rezeptorgebundenem und nicht gebundenem $[^3\text{H}]$ -Estradiol wird erreicht durch eine Inkubation mit Aktivkohle, die das freie $[^3\text{H}]$ -Estradiol adsorbiert und durch einen Zentrifugationsschritt sedimentiert wird, so daß das rezeptorgebundene $[^3\text{H}]$ -Estradiol im Überstand verbleibt. Die Messung der Radioaktivität des Überstandes mittels eines Liquid Scintillation Counters erlaubt anhand der spezifischen Aktivität des eingesetzten $[^3\text{H}]$ -Estradiol die rezeptorgebundene $[^3\text{H}]$ -Estradiol-Menge zu bestimmen. Für die Untersuchung einer Bindung von Umweltchemikalien an den Östrogenrezeptor dienen die kompetitiven Verdrängungsexperimente, bei denen in Parallelansätzen gleichbleibende Mengen an Cytosol und $[^3\text{H}]$ -Estradiol eingesetzt werden sowie steigende Konzentrationen an unmarkierten Umweltchemikalien bzw. Estradiol selbst.

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

Zum Nachweis der Vitellogenin-Induktion wurde im Rahmen dieses Projektes erstmals der Einsatz der molekularbiologischen Methode der semiquantitativen RT-PCR (Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction) in Zellkulturen erprobt (KLOAS et al., 1998). Der Bestimmung der Vitellogenin-Induktion erfolgte nach 36 Stunden Inkubation in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen (10^{-10} bis 10^{-5} M) von 17β -Estradiol, Nonylphenol und Bisphenol A aus Hepatocyten-Primärzellkulturen von *Xenopus laevis*. Mit der RT-PCR wird nicht das fertige Protein selbst sondern die für dessen Translation notwendige mRNA nachgewiesen. Das Prinzip der Methode funktioniert folgendermaßen: Die Gesamt-RNA aus den Zellkulturen wird durch eine phenolische Extraktion isoliert und danach mit dem Enzym Reverse Transcriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Hierbei wird auch die Vitellogenin-mRNA in Vitellogenin-cDNA umgesetzt. Durch Einsatz spezifischer Primer wird ein bekannter Abschnitt der cDNA durch die PCR vervielfältigt. Diese Amplifikation kann mehr als 10^6 -fach erfolgen. Anschließend wird die vorhandene spezifisch vermehrte Teilsequenz der Vitellogenin-cDNA mittels Gelelektrophorese in einem Ethidiumbromid-haltigen Agarosegel aufgetrennt. Die amplifizierte cDNA fluoresziert unter UV-Licht entsprechend der vorhandenen cDNA-Menge, in die sich Ethidiumbromid eingelagert hat und kann so densitometrisch mit einem Imageanalyzer semiquantitativ bestimmt werden. Um die eingesetzte RNA-Menge zu erfassen muß als interner Standard ein sogenanntes "housekeeping protein", dessen mRNA durch keine Behandlung beeinflusst wird, parallel zur Bestimmung der Vitellogenin-PCR

ebenfalls in einer PCR vermehrt und gemessen werden. Für unsere Untersuchungen haben wir als "housekeeping protein" den Elongationsfaktor 1 α benutzt.

2.3 Einfluß von Umweltchemikalien auf die Geschlechtsdifferenzierung *in vivo*

Kaulquappen von *Xenopus laevis* wurden mit Stadium 38/42 (NIEUWKOOP & FABER, 1975) 2-3 Tage nach dem Schlüpfen exponiert mit 17 β -Estradiol (10^{-8} und 10^{-9} M), Nonylphenol (10^{-10} und 10^{-11} M), Bisphenol A (10^{-8} und 10^{-9} M), Octylphenol (10^{-8} und 10^{-9} M), Butylhydroxyanisol (10^{-8} und 10^{-9} M) und mit der entsprechenden Menge Lösungsmittel (96% Ethanol) als Kontrolle. Nach 3 Monaten wurden die Gonaden der Tiere für die Bestimmung des Geschlechterverhältnisses mit dem Binokular untersucht (KLOAS et al., 1998).

3 Ergebnisse

3.1 Bindung von Umweltchemikalien an den Östrogenrezeptor

Die Abb. 1 zeigt, daß alle Chemikalien, die hier eingesetzt wurden, eine kompetitive Verdrängung von [3 H]-Estradiol vom Östrogenrezeptor bewirken. Die berechneten IC₅₀-Werte (inhibiting concentration 50 %: Angabe der Konzentration des kompetitiven unmarkierten Stoffes, bei der 50 % des [3 H]-Estradiol von den Rezeptoren verdrängt sind) ergeben als Maß für die Bindungsaffinität zum Östrogenrezeptor folgende Reihenfolge: 17 β -Estradiol < Tetrachlorbiphenyl < Diethylphthalat < Bisphenol A \leq Nonylphenol \leq Hydroxyanisol \leq Octylphenol < DDT. In weiteren Experimenten konnte mit dieser Methode dargestellt werden, daß auch Wasserproben von Kläranlagenausläufen eine kompetitive Verdrängung von [3 H]-Estradiol vom Östrogenrezeptor verursachen können (LUTZ&KLOAS, 1998)

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

Die Durchführung der RT-PCR für die semiquantitative Bestimmung der Vitellogenin-mRNA aus Hepatocyten-Primärzellkulturen erwies sich als erfolgreich (vgl. KLOAS et al., 1998), da die amplifizierte Vitellogenin-cDNA-Sequenz von 509 Basenpaaren gut nachweisbar war (Abb. 2). Die Konzentrationsabhängigkeit bei Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von 17 β -Estradiol im Vergleich zur Kontrolle ist offensichtlich, wenn man im Vergleich dazu die Ergebnisse der parallel durchgeführten PCR des internen Standards, des "housekeeping proteins" Elongationsfaktor 1 α , vergleicht, die alle, unabhängig von der Behandlung, eine sehr gleichmäßige mRNA-Menge in allen Proben zeigen. Die semiquantitative densitometrische Auswertung im Vergleich mit der Kontrolle ergaben bei 3 unabhängigen Experimenten klare Dosis-Wirkungsbeziehungen für 17 β -Estradiol, Nonylphenol und Bisphenol A (Abb. 3). Die stärksten Wirkungen erzielte hierbei 17 β -Estradiol, gefolgt von Nonylphenol und Bisphenol A, wobei 17 β -Estradiol mit 10^{-6} M schon eine Sättigung der östrogenen Wirksamkeit aufweist.

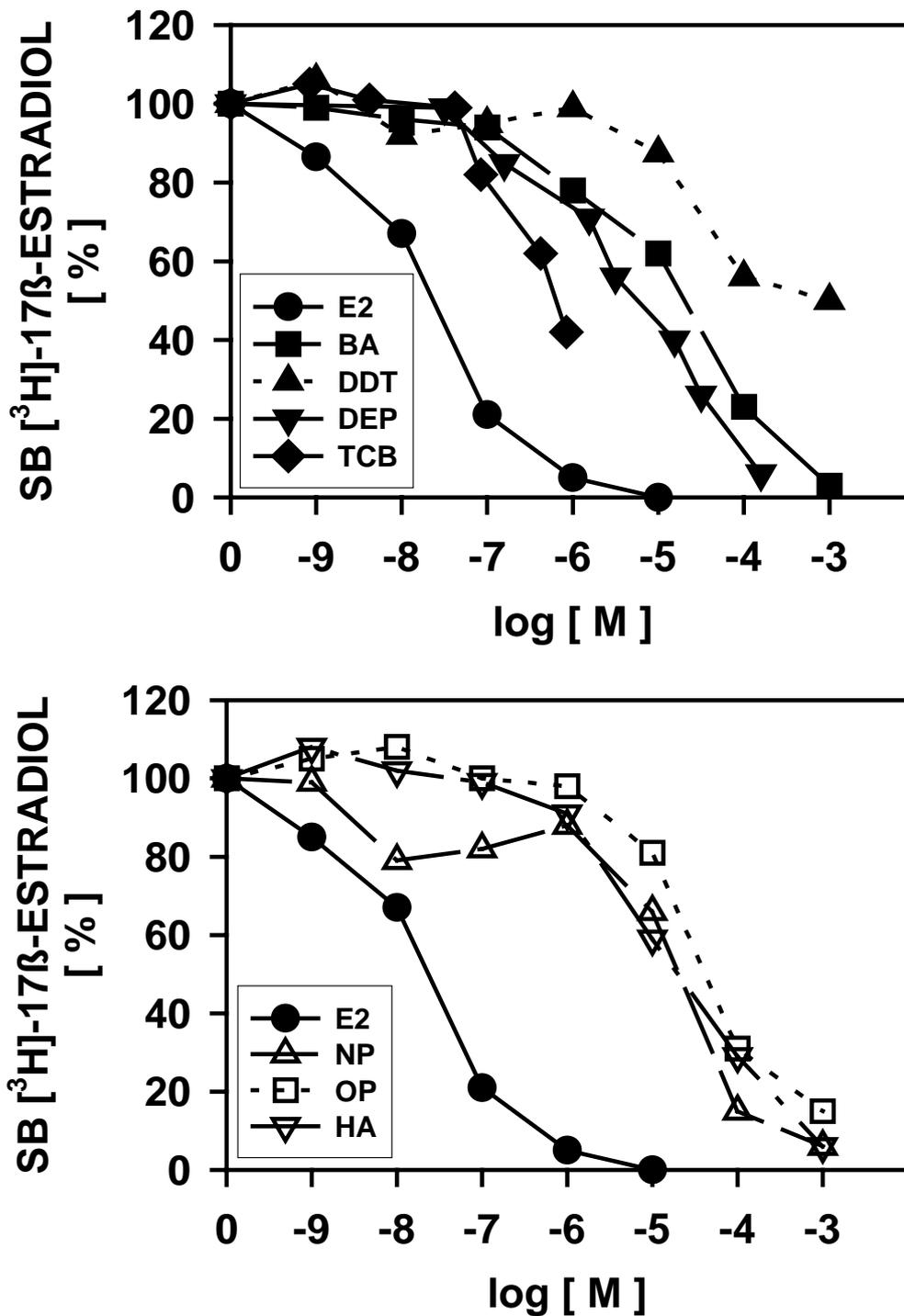


Abb. 1: Kompetitive Verdrängungsexperimente zum Nachweis der Bindung von Umweltchemikalien an den Östrogenrezeptor von *Xenopus laevis* (Mittelwerte, n=6). Die spezifische Bindung (SB) von [³H]-Estradiol wird mit steigenden Mengen an nicht markierten Substanzen wie dem 17β-Estradiol (E2) selbst verdrängt. Die Umweltchemikalien Bisphenol A (BA), DDT, Diethylphthalat (DEP), Tetrachlorbiphenyl (TCB) (s. obere Darstellung), Nonylphenol (NP), Octylphenol (OP) und Butylhydroxyanisol (HA) (s. untere Darstellung) zeigen alle eine kompetitive Verdrängung und damit eine Bindung an den Östrogenrezeptor.

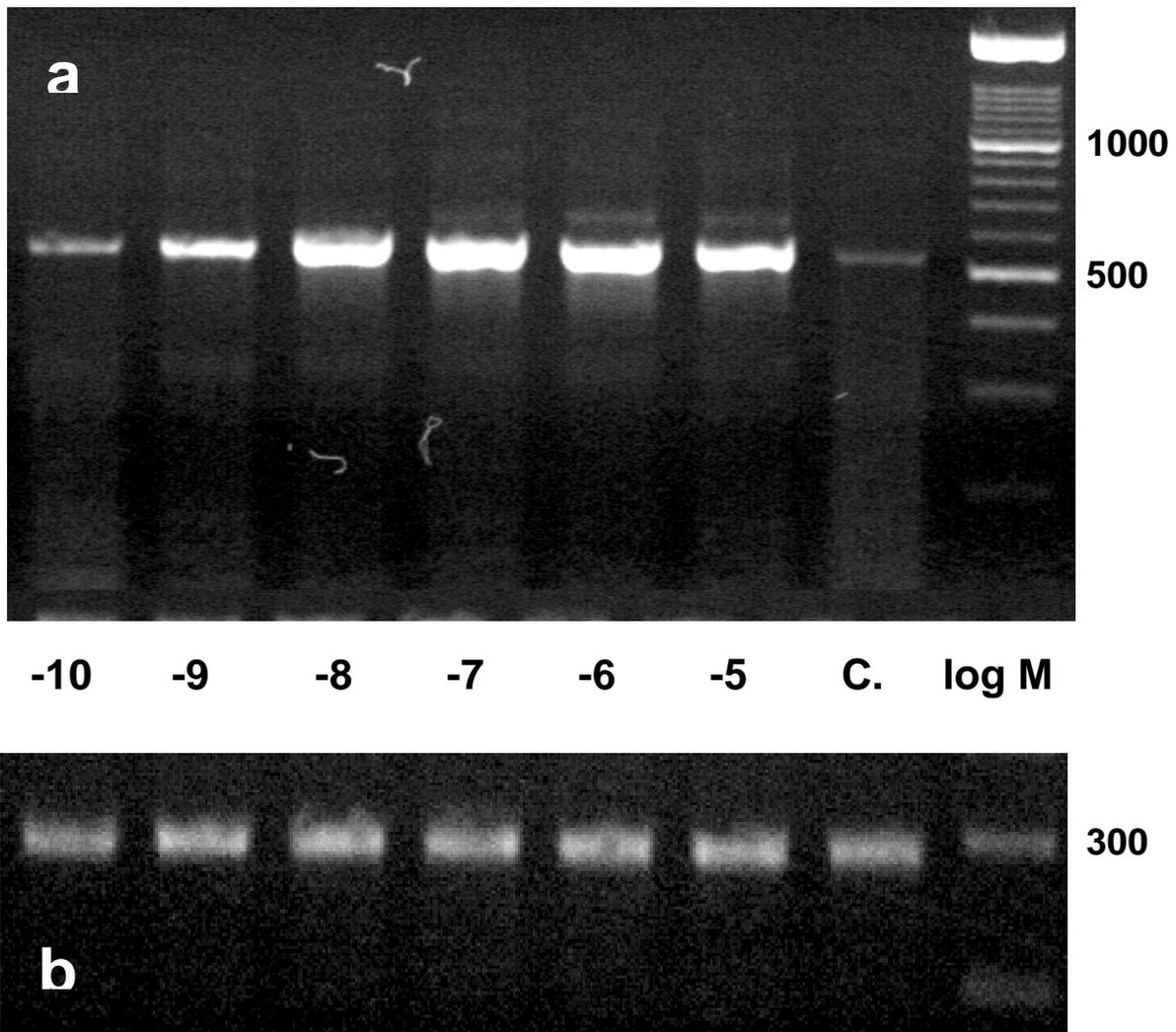


Abb. 2: Vitellogenin-cDNA-Banden (mit 509 Basenpaaren) aufgetrennt durch Gelelektrophorese in einem Ethidiumbromid-haltigen Agarosegel erhalten durch RT-PCR aus Hepatocyten-Primärzellkulturen von *Xenopus laevis* bei 36 Stunden Inkubation ohne (C) und mit 17β-Estradiol mit Konzentrationen von 10^{-10} bis 10^{-5} M als Maß für die östrogene Induktion der Vitellogenin-mRNA *in vitro*. Abb.2b: Korrespondierende cDNA-Banden (mit 285 Basenpaaren) zu Abb.2a für den Elongationsfaktor 1α als "housekeeping protein" Standard.

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. 4). 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 ($p < 0,05$; Mann-Whitney U-Test) zeigten.

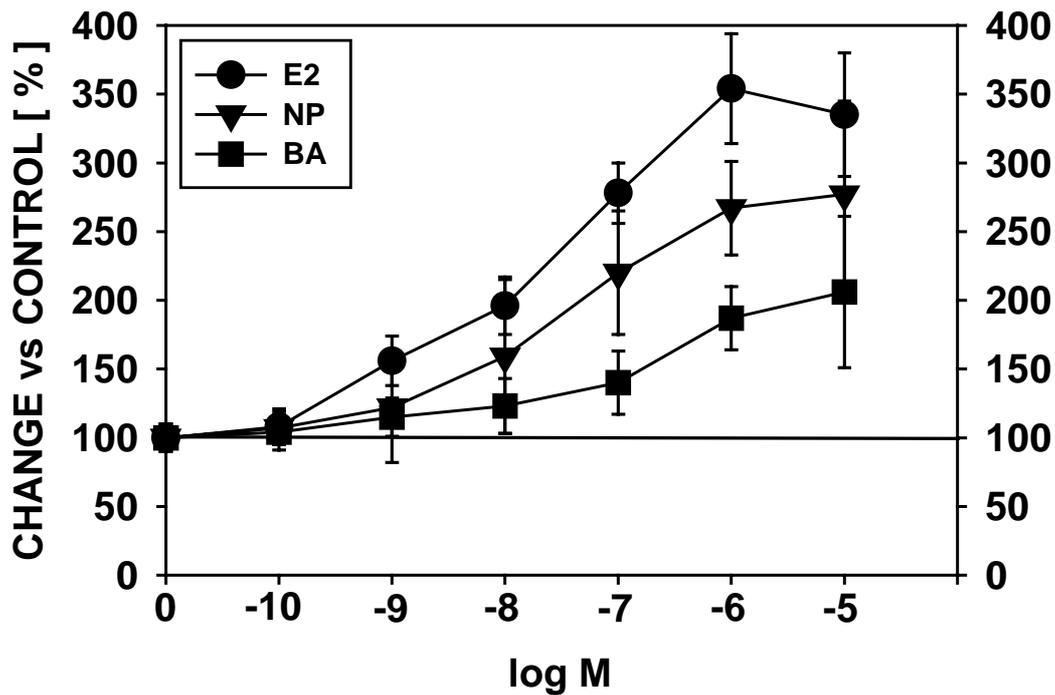


Abb. 3: Semiquantitative Bestimmung der Vitellogenin-cDNA-Gehalte nach der RT-PCR (Mittelwerte \pm SEM, n=3) als Maß für die Induktion der Vitellogenin-mRNA durch 17 β -Estradiol, Bisphenol A und Nonylphenol.

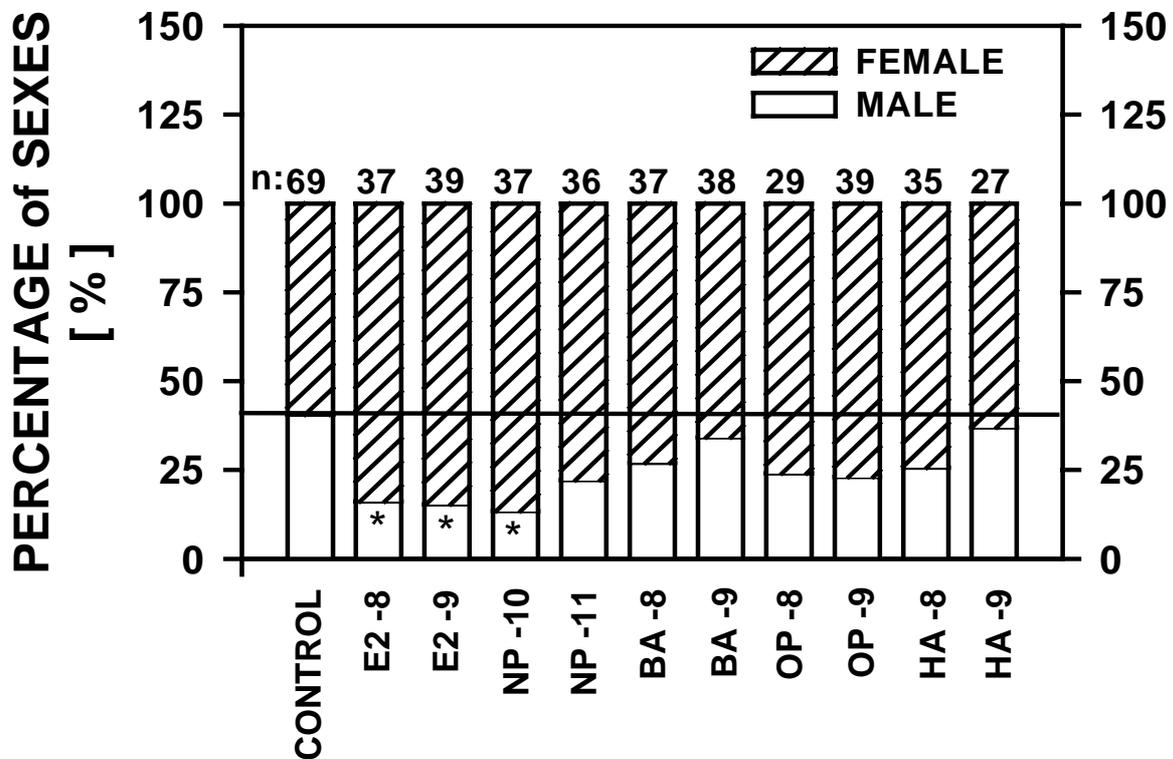


Abb. 4: Prozentualer Anteil der Männchen und Weibchen eines Versuchsansatzes zur Kaulquappenentwicklung bei Behandlung mit Umweltchemikalien. Signifikante Unterschiede (Mann-Whitney U-Test) zur Kontrolle sind mit * markiert ($p < 0,05$).

4 Diskussion

Die Ergebnisse der kompetitiven Verdrängungsexperimente zur Bestimmung der Bindung an den Östrogenrezeptor mit dem Radiorezeptorassay (LUTZ&KLOAS, 1998) zeigen, daß diese Methode eingesetzt werden kann, um sowohl Umweltchemikalien in Reinform als auch Umweltproben mit Gemischen verschiedenster Substanzen auf ihre Bindungsfähigkeit an den Östrogenrezeptor zu untersuchen. Die Bindung an den Rezeptor ist die Voraussetzung für eine biologische Wirkung jedoch kann dadurch auch der Rezeptor für die weitere Signaltransduktion blockiert werden, so daß bei der Feststellung einer Östrogenrezeptorbindung als Folge sowohl östrogene als auch antiöstrogene Effekte auftreten können. Deshalb ist dieser Versuchsansatz alleine nicht ausreichend, um auch östrogene Wirkungen vorherzusagen, sondern gibt nur einen Hinweis darauf, weshalb die Östrogenität dann in weiteren Experimenten zur biologischen Wirkung nachgewiesen werden muß. Der Vorteil dieser Methode ist allerdings, daß viele Proben relativ rasch innerhalb von 2 Tagen untersucht werden können, so daß man rasch Aufschlüsse darüber bekommt welche Proben mit weiteren Methoden untersucht werden müssen.

Zur Bestimmung der biologischen Wirkung östrogenen Substanzen wurde die Methode der RT-PCR zur semiquantitativen Bestimmung der Vitellogenin-mRNA etabliert (KLOAS et al., 1998). Die Methode ist geeignet zum Nachweis der Dosis-Wirkungsbeziehungen von östrogenen Substanzen wie für 17 β -Estradiol, Nonylphenol und Bisphenol A gezeigt wurde. Die semiquantitative Auswertung der densitometrischen Messungen (Abb. 3) ergibt, daß 17 β -Estradiol die höchste Vitellogenin-mRNA-Induktion verursacht gefolgt von Nonylphenol und danach von Bisphenol A, was ungefähr den Ergebnissen der kompetitiven Verdrängungsexperimente bei der Östrogenrezeptorbindung entspricht. Dennoch scheint die hier angewandte Methodik zur Bestimmung der östrogenen Wirksamkeit in der Primärzellkultur eine sensiblere Unterscheidung zwischen den östrogenartigen Substanzen Nonylphenol und Bisphenol A zu erlauben, was allerdings auch durch eine unterschiedliche Metabolisierung dieser Substanzen in der Zellkultur hervorgerufen werden könnte, so daß die Resultate mit den Hepatocyten-Kulturen auch den tatsächlichen Verhältnissen *in vivo* besser entsprechen. In gerade erst durchgeführten Untersuchungen zum Testen von gereinigten Kläranlagenausläufen konnte mit dieser Methodik die Induktion des östrogenen Biomarkers Vitellogenin nachgewiesen werden, so daß auch mit dieser innerhalb dieses Forschungsprojektes entwickelten Methode eine praxisorientierte Anwendung gegeben ist. Die Durchführung dieser Technik zur Bestimmung der Östrogenität von Substanzen ist mit einer Zeitdauer von 3-4 Tagen also nur unwesentlich langsamer als die Methode des Radiorezeptorassays.

Die *in vivo* Versuche zur sexuellen Differenzierung von mit Umweltchemikalien exponierten Kaulquappen von *Xenopus laevis* zeigten bei der Geschlechtsbestimmung nach dreimonatiger Entwicklung eine deutliche "Verweiblichung" bei Behandlung mit 17 β -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.

Während der Einsatz der Methodik zur Untersuchung von Einflüssen auf die sexuelle Differenzierung während der Larvalentwicklung auf relativ alten grundlegenden Arbeiten zur

hormonellen Regulation der Sexualentwicklung bei Amphibien basiert (WITSCHI, 1971), sind die beiden *in vitro*-Methoden zum Nachweis der Östrogenrezeptor-Bindung sowie der östrogenen Wirkung in Primärzellkulturen neu etablierte Techniken für Arbeiten mit Amphibien. Die Einführung der semiquantitativen RT-PCR zur Bestimmung des östrogenen Biomarkers Vitellogenin-mRNA in der Zellkultur ist hiermit bisher nach unserem Wissen erstmalig auch im Vergleich mit anderen Arbeitsgruppen erfolgt und wird in diesem Bereich sicher auch mit anderen Modellen breitere Anwendung finden. Beim Vergleich der 3 unterschiedlichen Methoden zum Nachweis der 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 2 bis 4 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. Das hier vorgestellte Amphibienmodell stellt somit mit seinen 3 Nachweisebenen die Grundlage für die Anwendung in der Praxis zum Nachweis eines östrogenen Gefährdungspotentials dar.

5 Ausblick

Die hier vorgestellten Ergebnisse stellen mit dem Amphib *Xenopus laevis* ein 3 Nachweisebenen umfassendes Modell zur Bestimmung der östrogenen Wirkung von Umweltchemikalien bzw. –proben dar. Einflüsse von Umweltchemikalien auf die Reproduktionsbiologie existieren jedoch nicht nur aufgrund östrogenen Wirkungen, sondern es können auch antiöstrogene, androgene oder antiandrogene Effekte auftreten. Deshalb ist es unser Bestreben dieses Amphibienmodell durch weiterführende Methoden wie die Einführung eines Radiorezeptors für Androgenrezeptoren und eines Nachweises für einen androgenen Biomarker in unserer Primärzellkultur zu ergänzen, damit gerade Umweltproben, die immer ein komplexes Gemisch verschiedenartig wirkender Substanzen beinhalten können, vollständig auf ihr Gefährdungspotential für die Fortpflanzung untersucht werden können. Aufgrund der hohen Ähnlichkeiten der humoralen Regelkreise für die Östrogene und Androgene bei Amphib und Mensch könnte unser dann komplettiertes Studienmodell mit Amphibien nicht nur als Indikator für Ökosysteme sondern auch für den Menschen selbst eingesetzt werden.

6 Literatur

- BLAUSTEIN, A. (1994): Amphibian in a bad light. *Natural History* **10**, 32-39.
- 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, R. EINSPANIER (1998): Amphibians as model to study endocrine disruptors: II. Estrogenic activity of environmental chemicals *in vitro* and *in vivo*. *Sci. Total Environ.* (accepted)
- LUTZ, I., W. KLOAS (1998): Amphibians as model to study endocrine disruptors: I. Environmental pollution and estrogen receptor binding. *Sci. Total Environ.* (accepted)
- 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.
- WITSCHI, E. (1971): Mechanisms of sexual differentiation. In: *Hormones in Development* (eds. Hamburg, M. and Barrington, E.). Appleton Century Crofts, New York, 601-618.

Gefördert durch BW-PLUS (Baden-Württemberg-Projekt Lebensgrundlage Umwelt und ihre Sicherung) (20 0605.02 und 20 9702.02) vom Ministerium für Umwelt und Verkehr Baden-Württemberg.