

Endokrine Disruption in Fischen – neues Testkonzept mit molekularen Markern

Umweltschadstoffe stellen für Lebewesen in Gewässern eine bedeutende Gefahr dar. Sogenannte »endokrine Disruptoren« können in den Hormonhaushalt eingreifen und sich bei Fischen negativ auf Entwicklung und Fortpflanzung auswirken. Um Maßnahmen gegen diese Substanzen ergreifen zu können, müssen sie sicher identifiziert werden. Schnell reagierende molekulare Biomarker eröffnen hier vielversprechende Perspektiven.

Die Identifizierung endokriner Disruptoren ist meist sowohl zeitaufwändig als auch teuer und benötigt sehr viele Versuchstiere. Zugleich wächst die Zahl an möglichen endokrinen Disruptoren, die registriert werden müssen. Deshalb besteht ein großes Interesse daran, neue Konzepte zu entwickeln, die diese Anforderungen erfüllen. Ein solches Konzept ist zum Beispiel das des Adverse Outcome Pathways (AOP). Mithilfe des AOP-Konzepts kann aufgedeckt werden, was zwischen einem initialen molekularen Ereignis und einer negativen Folge für das einzelne Lebewesen oder die gesamte Population passiert. Dieses Konzept in die Ökotoxikologie zu übertragen, ist vielversprechend. Der Hintergrund: Schädigende Stoffe können auf molekularer Ebene Ereignisketten in Gang setzen, die dann beispielsweise negativ auf die Entwicklung eines Lebewesens wirken. Dabei sind »Molekulare Biomarker« messbare Parameter des Organismus, die sehr schnell auf Giftstoffe reagieren und somit Aufschluss geben können über die negative Wirkung eines Stoffes im Rahmen dieser Ereigniskette.

»Daher ist es ein vielversprechender Ansatz, molekulare Marker in existierenden Tests zum Aufspüren endokriner Disruptoren zu integrieren«, so Elke Muth-Köhne aus der Abteilung Ökotoxikologie. »Im Einzelnen kann das so aussehen: Das initiale Ereignis ist zum Beispiel die Interaktion eines endokrinen Disruptors oder einer anderen Substanz mit einem der Grundbausteine

einer Zelle, wie DNS, RNS oder Proteine. Diese Grundbausteine bilden die molekulare Ebene eines jeden Lebewesens. Auf dieser ersten Ebene entfaltet eine Substanz ihre spezifische Wirkweise. Diese erste Interaktion löst dann eine Kaskade von Ereignissen aus, die weitergetragen wird über die Zellen und die Organe bis hin zum ganzen Organismus oder sogar zur gesamten Population.« Um

für die Umsetzung des AOP-Konzepts nutzbar zu sein, müssen die erfassten Ereignisse in direkter Verbindung zueinander stehen und mit Hilfe verfügbarer Methoden messbar sein. Sind diese Voraussetzungen erfüllt, kann auch die Bestimmung einer Reaktion auf molekularer Ebene für die Identifizierung endokriner Disruptoren und zur Bestimmung einer spezifischen Wirkweise herangezogen werden.

Fische reagieren besonders empfindlich auf Störungen des Sexualhormonhaushalts. Die bestehenden Testrichtlinien zur Identifizierung von endokrinen Disruptoren beinhalten im Moment allerdings noch nicht die Untersuchung molekularer Ereignisse, spezielle Richtlinien zur Testung von moleku-

laren Markern sind noch nicht entwickelt. Daher stellte sich die Frage, wie molekulare Informationen über endokrine Disruptoren in schneller und zuverlässiger Weise mit einem experimentellen Design erfasst werden können, das auch in existierende, standardisierte ökotoxikologische Testprotokolle integrierbar ist. Elke Muth-Köhne: »Die Lösung ist, die Expression der Gene zu untersuchen, die an

An hormonellen Prozessen beteiligte Gene als Biomarker – wichtige Informationen über schädigende Einflüsse durch hormonelle Wirkungen

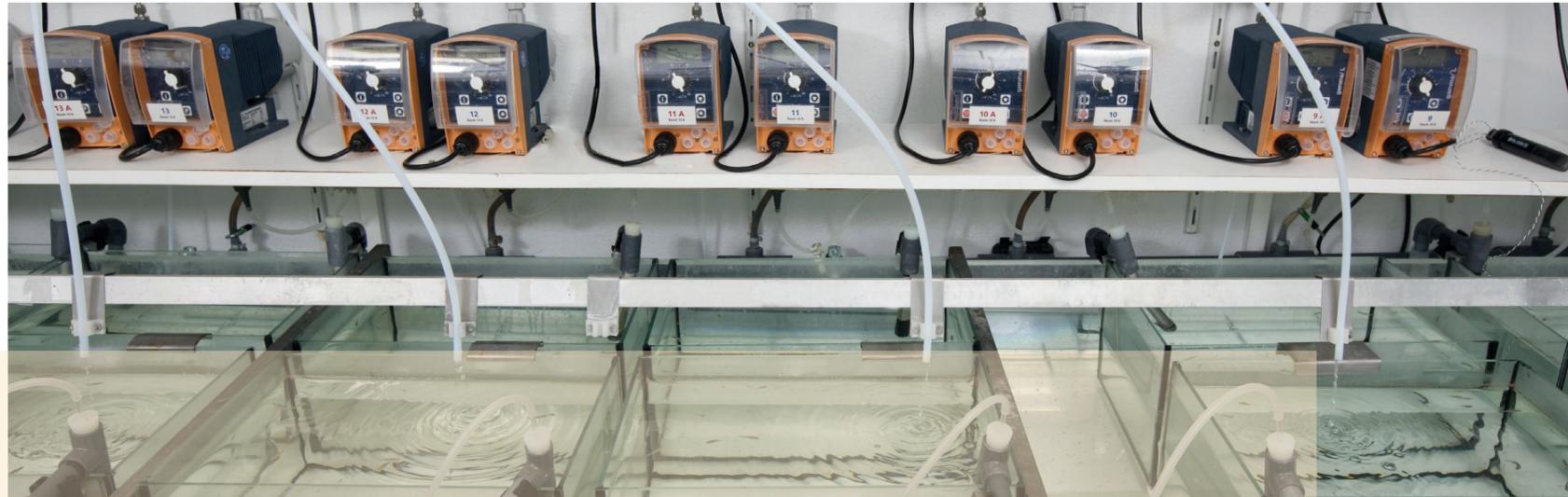
Die »Hauptdarsteller« der Studie: Zebraquärlinge (*Danio rerio*) sind der ideale Kandidat für den »Fish Sexual Development Test«, da ihr hormonelles System während der sexuellen Entwicklung besonders empfindlich auf Umweltschadstoffe reagiert.

endokrinen, also hormonellen Prozessen beteiligt sind. Diese Gene dienen hier als molekulare Biomarker. Die Untersuchung solcher Genexpressionen erfüllt die Voraussetzungen, um in einen AOP integriert zu werden, da sie in direkter Konsequenz zu der initialen Wirkung eines endokrinen Disruptors stehen, sehr schnell auf solche Wirkungen reagieren und durch gängige molekularbiologische Methoden zu detektieren sind.«

Basierend auf bereits vorhandenen Ergebnissen und einer intensiven Literaturrecherche wurde eine Liste von zirka 30 Genen zusammengestellt, die die Voraussetzungen als Biomarker erfüllen. Die ausgewählten Gene spielen eine Rolle in unterschiedlichen Prozessen der Steroidbiosynthese, die wiederum einen wichtigen Signalweg zur Aufrechterhaltung der normalen Hormonfunktion darstellt. Als Standard-Fischtest wurde der Fish Sexual Development Test ausgesucht, der die sexuelle Entwicklung der Fische bis zur Geschlechtsreife umfasst, ein validierter Test aus dem Richtlinienprogramm der OECD. Als Testspezies diente der Zebraquärling (*Danio rerio*), ein Modellorganismus in der ökotoxikologischen Testung. Dieser Test wurde durch die Untersuchung von Genexpressionsmustern verfeinert. Bestimmt wird dabei die Menge der Boten-RNS an unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung, wie zum Beispiel Embryonal- und Larvalentwicklung, und früher und später juveniler Entwicklung. Die



Die Studie wurde in einer Durchflussanlage ausgeführt, die eine genaue und stabile Dosierung der Testsubstanz ermöglicht.



Dr. Elke Muth-Köhne, Abteilung Ökotoxikologie: »Schadstoffe können sehr spezifische Effekte auf einen Organismus bewirken, die wiederum auf Genexpressionsänderungen auf molekularer Ebene beruhen können.«

Boten-RNS ist die Blaupause der genetischen Information, die direkt in Proteine übersetzt wird. Die Genexpression wurde somit zusätzlich ermittelt zu den Standard-Endpunkten des Fish Sexual Development Tests, wie Schlupf, Wachstum und Geschlechterverhältnis.

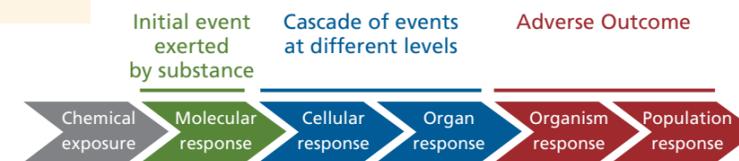
Als Testsubstanz wurde der Aromatase-Blocker Fadrozol gewählt – ein idealer Kandidat für diese Aufgabe, denn dieser Stoff agiert sehr spezifisch als endokriner Disruptor und entfaltet seine Wirkung während der Steroidbiosynthese. Er blockiert die Funktion des Enzyms Aromatase. Ohne Blockade triggert Aromatase den Umbau der Androgene zu Östrogenen, also der männlichen zu den weiblichen Hormonen. Ein ausgeglichener Hormon-

Zebrafische sind besonders empfindlich gegenüber androgenisierenden Substanzen – Fadrozol führt zu erhöhter Anzahl an Männchen

haushalt ist für den Zebrafisch besonders wichtig, da sowohl junge weibliche als auch männliche Zebrafische erst einmal eine Eierstock-ähnliche Gonade besitzen. Wenn nun der Spiegel an männlichen Hormonen erhöht ist, entwickelt sich der Fisch unabhängig vom genetischen Geschlecht zum Männchen aus. »Daher lag nahe, dass die Behandlung mit Fadrozol einen sehr spezifischen Effekt auf der Organismen-Ebene bewirkt, der wiederum sehr

wahrscheinlich auf einer Reihe von Genexpressionsänderungen auf molekularer Ebene beruht«, so Muth-Köhne.

Die Behandlung mit Fadrozol während der Entwicklung führte wie erwartet zu einer erhöhten Anzahl an Männchen. Dieser spezielle Effekt wurde von einem veränderten Genexpressionsmuster begleitet. Viele der untersuchten Gene reagierten an mindestens einem der untersuchten Entwicklungsstadien, was die Sensitivität der Entwicklung des Zebrafischs gegenüber endokrinen Disruptoren bestätigte. Die Effekte waren bereits beim ersten Untersuchungszeitpunkt 48 Stunden nach der Befruchtung erkennbar, als sich der Zebrafischembryo sogar noch in der Eihülle befand und vom Dottersack ernährt wurde. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Zebrafisch schon weit vor seiner Geschlechtsentwicklung auf Eingriffe in den Hormonhaushalt reagiert. Die Genexpression des Dotterproteins Vitellogenin zum Beispiel war bereits beeinträchtigt, obwohl es erst benötigt



Das Adverse Outcome Pathway (AOP)-Konzept: Der AOP beschreibt eine Kaskade von Ereignissen, die durch die Behandlung mit einer Chemikalie und ihrer speziellen Wirkweise ausgelöst wird und mit einer negativen Folge auf ein Lebewesen oder eine Population endet.

wird, wenn die Weibchen mit der Eiproduktion beginnen. Insgesamt wurden fünf Gene identifiziert, deren Expression zu mehr als einem Zeitpunkt durch Fadrozol beeinflusst war. Diese Gene sind somit vielversprechende Biomarker-Kandidaten für die Hemmung der Aromatase. Einer dieser Prozesse ist zum Beispiel die Regulation von Transkriptionsfaktoren, Proteinen, die direkt an die DNS binden und somit die Umschreibung von DNS in Boten-RNS regulieren. Ein weiteres

Molekulare Daten erweitern einen Standardtest – neben die Untersuchung der Wirkung tritt die Aufklärung der Ursache

Beispiel ist der Cholesteroltransport und die anschließende Steroidsynthese. Außerdem stehen einige der identifizierten Gene unter direkter Kontrolle der Östrogenrezeptor-Aktivierung und sind somit direkt durch den verminderten Spiegel des weiblichen Geschlechtshormons betroffen. Die Vielfalt der Prozesse der Steroidbiosynthese, die durch die identifizierten Gene abgedeckt wird, verdeutlicht ihre Funktionalität als molekularer Biomarker für Aromatase Inhibition. Ihre Integration in bestehende Testabläufe bietet daher hervorragende Möglichkeiten dafür, sehr früh Aufschluss zu erhalten über die mögliche negative Wirkung von Hormonschadstoffen auf Fische und die gesamte Fischpopulation. Somit können sowohl Zeit als auch Kosten gespart werden. Und vor allem reduziert sich auch die Zahl der Versuchstiere, die für die Zulassung einer Chemikalie benötigt werden.

Das Projekt wurde vom Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz, Gebäude- und Reaktorsicherheit (FKZ 3712 63 418) finanziert.

Ökotoxikologie

Dr. Elke Muth-Köhne
elke.muth-koehe@ime.fraunhofer.de