

## *Quae nocent, docent.* Vergleichende Untersuchung zur Wirkung endokriner Disruptoren im Tierreich

Schulte-Oehlmann, U.<sup>1</sup>, Bachmann, J.<sup>1</sup>, Candia Carnevali, D.<sup>2</sup>, Janer, G.<sup>3</sup>, Jobling, S.<sup>4</sup>, Kloas, W.<sup>5</sup>, Kusk, O.<sup>6</sup>, Lavado, R.<sup>3</sup>, Lutz, I.<sup>3</sup>, Porte, C.<sup>3</sup>, Sugni, M.<sup>2</sup>, Watermann, B.<sup>7</sup>, Wollenberger, L.<sup>6</sup> & Oehlmann, J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, Abteilung Ökologie und Evolution, Siesmayerstr. 70, D-60054 Frankfurt

<sup>2</sup> Universität Milano, Abteilung Biologie "Luigi Gorini", Via Caloria 26, I-20133 Milano

<sup>3</sup> CSIC Barcelona, Abteilung Umweltchemie, C/Jordi Girona 18-26, E-08034 Barcelona

<sup>4</sup> Universität Brunel, Abteilung Biologie und Biochemie, Kingston Lane, UK-UB83PH Uxbridge

<sup>5</sup> Leibniz-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei, Abteilung Binnenfischerei, Müggelseedamm 310, D-12587 Berlin

<sup>6</sup> Technische Universität Dänemarks, Institut für Umwelt und Rohstoffe, Bygningstorvet 115, DK-2800 Lyngby

<sup>7</sup> LimnoMar – Labor für Limnische/Marine Forschung und Vergleichende Pathologie, Bei der Neuen Münze 11, D-22145 Hamburg

## Endokrin aktive Chemikalien – Das Problem

Eine Vielzahl von Chemikalien anthropogener Herkunft befindet sich in regelmäßiger Anwendung und wird somit in nicht unerheblichem Ausmaß in die Umwelt eingetragen. Vielen dieser Substanzen wird eine hormonähnliche Wirkung unterstellt bzw. für viele Stoffe wurde in tierexperimentellen Studien eine Wechselwirkung mit dem Hormonsystem nachgewiesen. Bedenkt man die Komplexizität der endokrinen Systeme im Tierreich, ergeben sich zahlreiche Möglichkeiten, auf welchen Ebenen eine endokrin aktive Chemikalie das „Signalsystem des Körpers“ in seiner Funktionsweise beeinträchtigen kann. Aus diesem Grund sind die zugrunde liegenden Wirkmechanismen oftmals nur schwer zuzuordnen.

Die Tatsache, dass sich eine große Anzahl von Chemikalien mit hormonmimetischer Wirkung im Bereich niedriger Dosierungen und Umweltkonzentrationen als biologisch aktiv erwiesen hat, liefert Grund zur Besorgnis, denn wissenschaftliche Studien bekräftigen, dass der traditionelle Leitsatz der Toxikologie „Die Dosis macht das Gift“ nicht in jedem Fall zutrifft, da einige Xenohormone hinsichtlich ihrer Wirkung nicht dem Muster von monotonen Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen folgen.

In Zeiten verbesserter Umwelt- und Industriestandards, der Anwendung innovativer Technologien mit dem Ziel, Substanzen mit möglichst geringer Persistenz in der Umwelt zu entwickeln, mag es zunächst abwegig erscheinen, darauf zu verweisen, wir seien mit einer neuen Gruppe problematischer Substanzen in der Umwelt konfrontiert. Lange vergessen sind die Eindrücke großer Umweltkatastrophen, verbunden mit dem Massensterben von Fischen, Wasservögeln oder wasserlebenden Säugetieren – solche Szenarien gehören in Europa mehrheitlich der Vergangenheit an. Seit geraumer Zeit verdeutlichen die Wasserzustandsberichte vieler EU-Länder einen generellen Trend: der Status der Wasserqualität in Europa scheint sich zu verbessern (Nixon et al. 2003). Nicht vergessen sollte man jedoch, dass sich derartige Einschätzungen nicht auf den biologischen Status der Wasserqualität nach der neuen EU-Wasserrahmenrichtlinie (WRRL) beziehen.

In der heutigen Zeit sind problematische Schadstoffe nicht mehr zwangsläufig durch hohe Umweltkonzentrationen charakterisiert, sondern treten vielmehr im Ultraspurenbereich auf. In vielen Fällen sind selbst modernste analytische Techniken nicht so weit entwickelt, um

alle bedenklichen Substanzen in derart niedrigen Konzentrationsbereichen zu erfassen. Daughton und Ternes (1999) prägten den Begriff der "schleichenden Umweltgifte", wobei sie Endokrine Disruptoren, Pharmaka und Körperpflegemittel als integrale Bestandteile dieser Substanzgruppe identifizierten. Im Hinblick auf ihre allgemeine Verbreitung in der Umwelt, einer optimierten biologischen Aktivität und Effektivität in schon niedrigsten Konzentrationsbereichen verfügen sie ganz offensichtlich über einige ähnliche Merkmale.

Ein Kennzeichen der Umwelthormone ist, dass sie chemisch nicht einheitlich charakterisierbar sind. So lassen sich in die Gruppe hormonell aktiver Substanzen diverse Verbindungen anthropogener und natürlicher Herkunft (z.B. Weichmacher, Pestizide, Alkylphenolethoxylate, Organozinnverbindungen, PCBs, Phytoöstrogene, natürliche Steroide, Pharmaka wie Ethinylöstradiol, Methyltestosteron, Trebolon) einordnen. Zudem zeichnet die endokrinen Modulatoren aus, dass ihnen eine große Bandbreite biophysikalischer Eigenschaften - von persistent bis hin zu leicht abbaubar, hydrophil zu lipophil und nicht-toxisch zu hochtoxisch - zugeordnet werden kann.

Auch bezüglich der mechanistischen Aspekte zur Wirkungsweise endokriner Disruptoren, lassen sich keine einheitlichen Aktionsmuster beschreiben. Während sich einige Substanzen durch eine Bindung an den Rezeptor, nicht aber durch dessen Aktivierung (antagonistischer Effekt) auszeichnen, imitieren andere eine hormonelle Aktivität durch eine direkte Bindung an den Rezeptor (agonistischer Effekt). Indirekte, nicht-rezeptorvermittelte Wirkungen können aus der Bindung von Hormonmimetika an (Transport)proteine (z.B. CBG, SHGB, TBG, GHBP) und damit deren Blockade resultieren. Letzteres kann zu einer Steigerung oder auch Hemmung von Enzymaktivitäten führen. Auch eine Unterbindung oder Hemmung der Synthese endogener Hormone kann die Stoffwechselaktivitäten im Organismus beeinträchtigen.

Zudem gibt es eine Vielzahl von hormonproduzierenden Systemen im tierischen Organismus (Hypothalamus, Hypophyse, Schilddrüse, Thymus, Nebenniere, Pankreas bei den meisten Wirbeltieren - Corpora cardiaca, Corpora allata, Medulla accessoria der Insekten, X-Organ-Sinusdrüse, androgene Drüse bei Kriebstieren). Die Mehrheit aller Publikationen hat jedoch vorwiegend die Betrachtung schädigender Einflüsse hormonell wirksamer Substanzen auf sexualsteroidvermittelte Vorgänge der Fortpflanzung, sexuellen Entwicklung und Differenzierung zum Thema (Colborn et al. 1993; Duft et al. 2003; Jobling et al. 2004).

Endokrine Disruption stellt ein globales Phänomen dar. In allen Teilen der Welt wurde von hormonell gesteuerten Fehlfunktionen im Tierreich, verbunden mit Fortpflanzungsstörungen bis hin zum Niedergang von Populationen, berichtet (Candia Carnevali et al. 2001; Guilette et al. 1994; Kloas 2002; Lavado et al. 2004, Oehlmann et al. 1996). Die beschriebenen Effekte umfassen sowohl die Verweiblichung männlicher Individuen als auch der Vermännlichung weiblicher Tiere, die Schwächung von Schilddrüsen- und Immunfunktionen sowie die Störung von Entwicklungsvorgängen (de Fur et al. 1999).

Ein eindeutige Kausalbeziehungen zwischen der Exposition gegenüber einer Umweltchemikalie und einer androgenen Wirkung im Organismus wurde über die Beschreibung von Maskulinisierungseffekten weiblicher Vorderkiemerschnecken, verursacht durch Organozinnverbindungen, hergestellt (Bettin et al. 1996; Horiguchi et al. 1997, Oehlmann and Schulte-Oehlmann 2003). Am Beispiel der Vorderkiemerschnecken ließ sich nachweisen, dass Tributyl- und Triphenylzinnverbindungen Schlüsselenzyme des Sexualsteroidmetabolismus und damit endogene Hormonkonzentrationen der Tiere beeinflussten. Darüber hinaus konnte durch weitere Untersuchungen nachgewiesen werden, dass diese Substanzen auch bei anderen Taxa, einschließlich dem Menschen, in der Lage waren, ähnliche oder

vergleichbare molekulare „Angriffsziele“ zu beeinträchtigen (Doering et al. 2002; Heidrich et al. 2001). Aus diesem Grund war es nahe liegend, den Schwerpunkt der Forschungsaktivitäten im Rahmen des EU-Projektes COMPRENDO (Comparative Research on Endocrine Disrupters; <http://www.comprendo-project.org>) auf Substanzen zu legen, denen bei Mensch und Tier eine (anti-)androgene Wirkung unterstellt wurde.

In diesem Zusammenhang zielt COMPRENDO auf die vergleichende Untersuchung potentieller Gesundheitsprobleme verursacht durch (anti-)androgenartige Hormonmimetika. Vor diesem Hintergrund sollen allgemeine Wirkprinzipien (anti-)androgenen Verbindungen vor allem über die Analyse und Bewertung von Unterschieden und Gemeinsamkeiten auf der Effektebene bei Stellvertreterorganismen im Tierreich (von Nicht-Wirbeltieren bis zu den Wirbeltieren) aufgezeigt werden.

## Testsysteme und Testsubstanzen

Im Rahmen des Projektes wurden über 20 Modellsysteme wie diverse Vorderkiemerschnecken (*Marisa cornuarietis*, *Potamopyrgus antipodarum*, *Nassarius reticulatus*), Krebstiere (*Acartia tonsa*, *Hyalella azteca*), Stachelhäuter (*Antedon mediterranea*, *Paracentrotus lividus*), Amphibien (*Xenopus laevis*), Fisch- (*Rutilus rutilus*, *Pimephales promelas*), Vogel- (*Gallus domesticus*), und Säugerspezies (*Rattus norvegicus*) sowie menschliche Zelllinien (MCF-10A, MCF-7, SK-BR-3, PC-3, LNCaP-FGC, JEG-3, L56-Br-C1, Placenta-, Prostata-, Leberzelllinien) gegenüber 15 Testsubstanzen (Mono-, Di-, Tributylzinn, Triphenylzinn, Fenarimol, Vinclozolin, Linuron, Diuron, p,p'-DDE, Prochloraz, Methyltestosteron, Letrozol, Cyproteronacetat, Flutamid und native Umweltproben als Beispiel für komplexe Mischungen) bei durchschnittlich 5 Testkonzentrationen im Labor exponiert.

Endpunkte aus den Bereichen Vitalität (Gewicht, Wachstum, Sterblichkeit), Reproduktion (Geschlechterverhältnis, Reifegrad der Keimdrüsen, Größe der Sexualdrüsen und Geschlechtsorgane, Missbildungen, Vermännlichung weiblicher Tiere, Spermienbeweglichkeit und -qualität, Spermato- und Oogenesestörungen, Befruchtungserfolg, Anzahl produzierter Eier/Gelege, Gelegegröße, Regeneration), Entwicklung (Schlupferfolg, Larvalentwicklung, Zeit bis zur sexuellen Reife) und Physiologie (Sexualsteroid-Konzentrationen, Vitellogenin-Konzentrationen, Enzym-Aktivitäten, Apoptose, Proteingehalt) wurden, sofern anwendbar, bei allen Testmodellen hinsichtlich pathologischer Veränderungen analysiert.

## Wirkungen und Effekte

Die Testorganismen wurden möglichst gegenüber identischen Testkonzentrationen exponiert; lediglich bei besonders sensitiven Arten mussten aufgrund der niedrigen Akuttoxizitätswerte die Konzentrationen z.T. niedriger gewählt werden. Alle Testmodelle wurden in semi-statischen Systemen (Ausnahme: *Pimephales promelas* im Durchflusssystem) exponiert. Die eingesetzten Nominalkonzentrationen der Testsubstanzen wurden in regelmäßigen Abständen chemisch-analytisch überprüft.

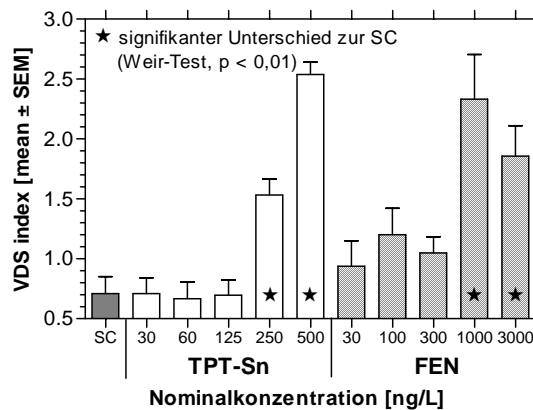
Nicht alle Resultate können hier dargestellt werden, so dass anhand einer exemplarischen Auswahl von Ergebnissen aus Triphenylzinn- und Fenarimol-Expositionsversuchen mit Schnecken, Krebsen und Stachelhäutern ein kurzer Überblick gegeben werden soll. Methyltestosteron diente bei diesen Versuchsreihen als Positivkontrolle.

Sowohl Triphenylzinn als auch Fenarimol werden in der Landwirtschaft als Pestizid mit fungizider Wirkung angewendet. Beiden Chemikalien wird, unter anderem, eine indirekte, nicht rezeptorvermittelte maskulinisierende Wirkung unterstellt, die auf die Hemmung der CytP450-abhängigen Aromatase zurückgeführt wird. Als Konsequenz wird letztlich die Produktion endogener Östrogene im Steroidmetabolismus beeinträchtigt. Im Organismus kommt es schließlich zu einer Erhöhung des Androgentiters und zumeist zu einer Verringerung des Östrogentiters.

### *Marisa cornuarietis* (Mollusca: Gastropoda)

Die tropische Apfelschnecke *Marisa cornuarietis* besiedelt stehende bis mäßig turbulente limnische Gewässer (Süd-)amerikas, Afrikas und Asiens, ist jedoch mit den bei uns heimischen Sumpfdeckelschnecken (Viviparidae) näher verwandt und, ebenso wie diese, getrenntgeschlechtlich.

In unseren Expositionsversuchen zeigte sich, dass weibliche Apfelschnecken unter dem Einfluss beider Testsubstanzen (sowie der Positivkontrolle) Anteile des männlichen Geschlechtssystems (Imposex) ausbilden (Abbildung 1). Bei der Virilisierung der Weibchen handelt es sich um eine graduelle Entwicklung, die sich bei *Marisa cornuarietis* in vier Stadien vollzieht. In Abbildung 1 ist die Entwicklung des Vermännlichungsparameters VDSI am Ende einer fünfmonatigen TPT- und Fenarimol-Exposition dargestellt. In den beiden höchsten Konzentrationsgruppen von 250 und 500 ng TPT-Sn/L bzw. von 1000 und 3000 ng Fenarimol/L kommt es zu einem signifikanten Anstieg des VDSI gegenüber der Kontrolle, nicht jedoch für die niedrigeren Konzentrationen. In den Expositionsversuchen konnten mit der Organozinnverbindung die höchsten VDSI-Werte, für die höchste Testkonzentration nahe dem Maximalwert von 3,0 bei dieser Art, induziert werden.



**Abbildung 1.** *Marisa cornuarietis*: VDSI bei TPT- und Fenarimol-Exposition.

Beide Testsubstanzen hatten ferner einen Effekt auf die Fruchtbarkeit der Apfelschnecke und führten in einem 5-monatigen Experiment zu einer zeit- und konzentrationsabhängigen Reduktion der Eizahl/Weibchen im Vergleich zu den Kontrolltieren (Abbildung 2). Schon die geringsten eingesetzten Konzentration von jeweils 30 ng TPT-Sn und Fenarimol/L hatten einen signifikanten Effekt gegenüber der Kontrolle. Weibchen aus der höchsten TPT-Konzentrationsgruppe produzieren am Ende 70% weniger Eier und bei Fenarimol 60% weniger Eiern als Weibchen aus der Kontrolle.

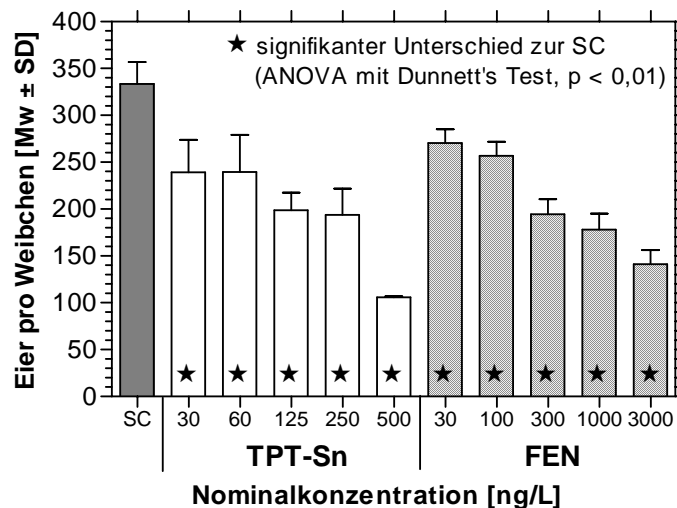


Abbildung 2. *Marisa cornuarietis*: Eizahl pro Weibchen bei TPT- und Fenarimol-Exposition.

### *Acartia tonsa* (Arthropoda: Copepoda)

Bei *Acartia tonsa* handelt es sich um einen marinen und getrenntgeschlechtlichen Ruderfußkreb mit einer durchschnittlichen Länge von bis zu 1,2 mm. Bevor die Tiere das Adultstadium erreichen, durchlaufen sie eine komplexe Larvalentwicklung, die sechs Nauplien- und fünf Copepoditstadien umfasst und hormonell durch Ecdysterioide, Juvenil-hormone sowie Neuropeptide gesteuert wird. Die Normogenese ist bei dieser Art sehr gut dokumentiert. Es bietet sich daher an, den Einfluss von Testsubstanzen auf die Larvalentwicklung als endokrin regulierten Endpunkt zu überprüfen. Als Testparameter wird hierbei die LDR (Larval Development Ratio gemessen als Fraktion von Copepoditen gegenüber der Totalanzahl von Larven) ermittelt. Unter den für unsere Versuche gewählten Testbedingungen sind am fünften Tag der Entwicklung mindestens 50% der Kontrolltiere in ein Copepoditstadium übergegangen. Dieser Zeitpunkt ist optimal, um im LDR-Test eine Hemmung oder Beschleunigung der Larvalentwicklung exponierter Gruppen im Vergleich zur Kontrolle festzustellen, wobei vollständige Konzentrations-Wirkungsbeziehungen einschliesslich effektiver Konzentrationen ermittelt werden.

Exponiert man *Acartia* Eier gegenüber TPT, kommt es schon in der F0-Generation mit Zunahme der Biozidkonzentration im Umgebungswasser zu einer signifikanten Hemmung der Larvalentwicklung (Abbildung 3). Exponiert man im Life-Cycle-Test Eier der F1-Generation, d.h. Eier, die von Weibchen produziert wurden, welche selbst während ihrer gesamten Lebenszeit TPT ausgesetzt waren, ist dieser Effekt noch ausgeprägter, denn die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung ist in Richtung niedrigerer TPT-Konzentrationen verschoben, was verdeutlicht, dass die Sensitivität der Filialgenerationen gegenüber der Testsubstanz zunimmt. In einem weiteren Experiment mit Fenarimol konnten wir für *Acartia tonsa* vergleichbare Effekte auf die LDR feststellen, wobei die Sensitivität der F1-Generation gegenüber der F0-Generation um den Faktor 10 erhöht war (Ergebnisse nicht dargestellt).

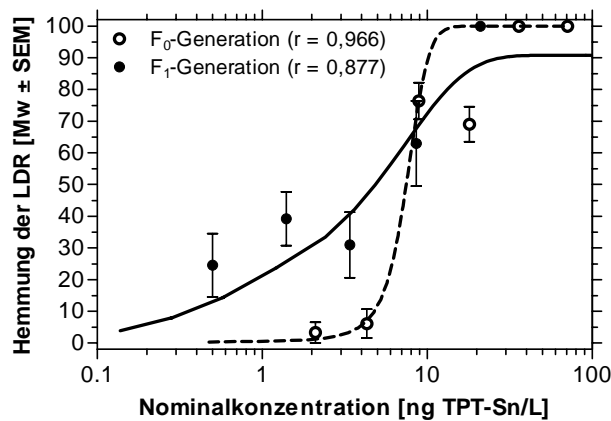


Abbildung 3. *Acartia tonsa*: Hemmung der Larvalentwicklung bei TPT-Exposition.

### *Antedon mediterranea* (Echinodermata: Crinoidea)

*Antedon mediterranea* ist ein im Mittelmeer lebender Federstern (Crinoidea), zählt zu den Stachelhäutern und ist folglich mit den Seeigeln und Seesternen verwandt. Der Organismus besitzt federartige Ärmchen, mit denen er Nahrung aus dem Umgebungswasser filtern kann. Federsterne sind getrenntgeschlechtlich, ihre Geschlechtszellen sind im Bereich der Genitalpinnulae als besonders differenzierte Bereiche an den Armen lokalisiert. Als Schutz vor Fressfeinden sind sie in der Lage, sich ihrer Arme mitsamt der Keimzellen an Sollbruchstellen zu entledigen, diese aber später wieder zu regenerieren. Im Labortest kann man die Arme artifizuell amputieren und anschließend, über entsprechende Messungen, die Regenerationsfähigkeit der Tiere überprüfen. Diese außerordentliche Regenerationsleistung der Crinoiden wird auch für die vegetative Vermehrung genutzt und steht unter endokriner Kontrolle (Candia Carnevali 2004).

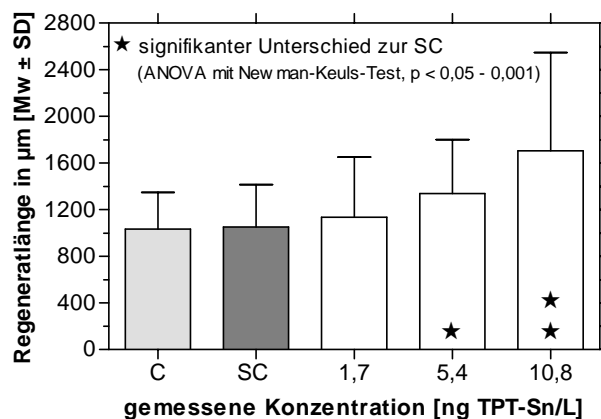
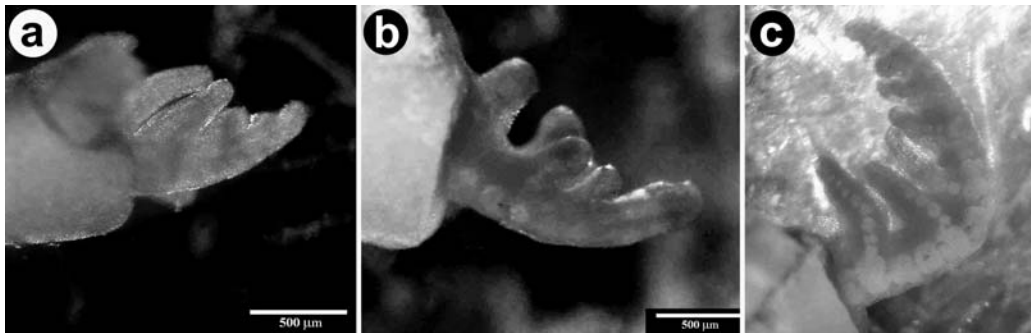


Abbildung 4. *Antedon mediterranea*: Regenerationslänge der Arme bei TPT-Exposition.

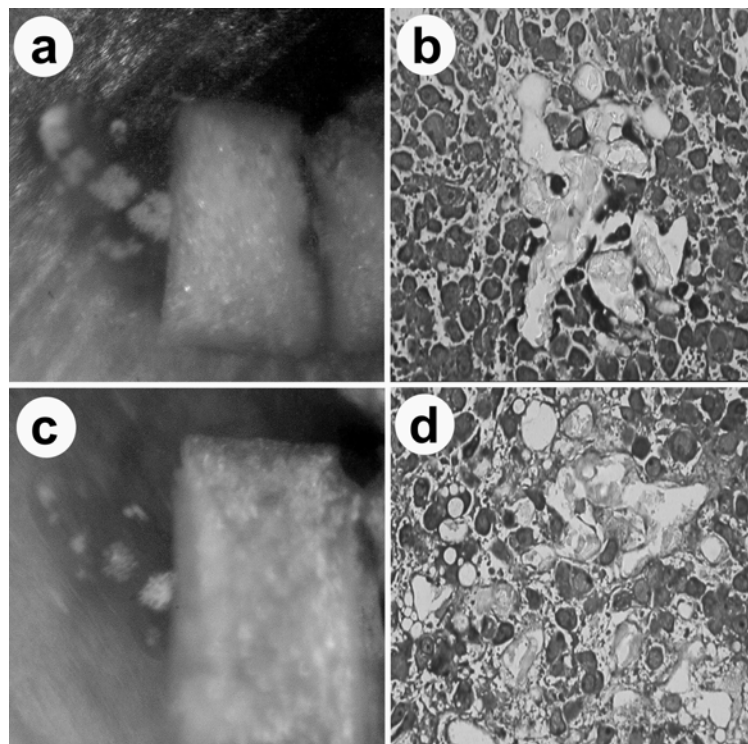
In einem vierwöchigen Experiment bewirkte eine Triphenylzinn-Exposition mit nominalen Konzentrationen von 125, 225 und 500 ng als Sn/L (entspricht den analytisch gemessene Konzentrationen von 1,7, 5,4 und 10,8 ng TPT-Sn/L) bei den Tieren in den beiden höchsten Konzentrationsgruppen einen signifikant erhöhten Längenzuwachs an den amputierten Armregionen (Abbildung 4).

Begleitende Untersuchungen zeigten, dass die durch das Biozid induzierte erhöhte Proliferationsrate in den betroffenen Regionen mit Missbildungen, wie z.B. atypische Verkrümmungen und Verwachsungen an den Armen (Abbildung 5a-c), einhergingen.



**Abbildung 5.** *Antedon mediterranea*: Regenerierte Armabschnitte im TPT-Expositionsexperiment. (a) Kontrolle, (b) 1,7 ng TPT-Sn/L, (c) 10,8 ng TPT-Sn/L.

Eine andere Form von Aberrationen, jedoch kein Einfluss auf den Längenzuwachs der Arme, konnte unter Fenarimol-Exposition beobachtet werden: Echinodermaten besitzen ein kalkiges Endoskelett, dass bei erhöhten Fenarimol-Konzentrationen im Umgebungswasser der Tiere an "Knochendichte" verliert, bzw. nicht den Dichtegrad der Kontrolltiere erreicht (Abbildung 6). Die nachgebildeten Sklerite exponierter Tiere sind im Bau fragiler (Abbildung 6c), wobei die Kalkeinlagerungen im histologischen Präparat diffus erscheinen (Abbildung 6d), wenn sie mit den massiven Bildungen bei Kontrolltieren verglichen werden (Abbildung 6 a, b).



**Abbildung 6.** *Antedon mediterranea*: Regenerierte Armabschnitte im Fenarimol-Expositions-experiment. (a) und (b) Kontrolle, (c) und (d) 300 ng Fenarimol/L.

Fehlbildungen dieser Art traten zumindest bei den beiden höchsten eingesetzten Expositionsguppen signifikant häufiger als in der Kontrollgruppe auf (Abbildung 7).

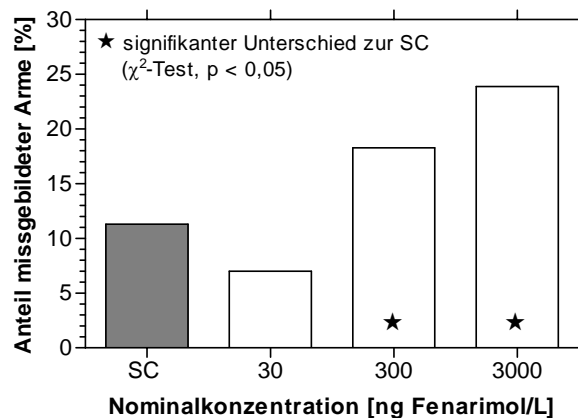


Abbildung 7. *Antedon mediterranea*: prozentualer Anteil an Missbildungen bei Fenarimol-Exposition.

## Zusammenfassung

Eine Zusammenstellung der Ergebnisse anhand von EC<sub>10</sub> (fett), NOEC- und LOEC-Werten (Tabelle 1) für alle drei Arten unter Androgen-Expositionen verdeutlicht, dass:

- alle Testchemikalien zu signifikanten Effekten bei allen untersuchten Arten (*Marisa*: Imposex und Fekundität, *Acartia* Inhibition der Larvalentwicklung *Antedon* Regeneration & Missbildungen,) führen
- nicht alle Arten vergleichbar sensitiv gegenüber einer applizierten Testsubstanz reagieren. Während für Triphenylzinn für alle Arten EC<sub>10</sub> und NOEC/LOEC-Werte in vergleichbaren Bereichen liegen, ergibt sich für Fenarimol ein anderes Bild. Hier erweist sich z.B. die Apfelschnecke mit einem EC<sub>10</sub>-Wert von 31 ng/L als wesentlich sensitiver als der Ruderfußkrebs mit einer EC<sub>10</sub> von im Minimum 5,5 µg/L.
- einzelne Endpunkte empfindlichere und weniger empfindliche Parameter darstellen – so ist z.B. die Fekundität bei der Apfelschnecke ein empfindlicherer Parameter als die Imposexentwicklung.

**Tabelle 1.** EC<sub>10</sub> (fett), NOEC/LOEC-Werten in ng/L (gemessene Konzentrationen) bei den verschiedenen Testspezies.

Spezies/Endpunkt	TPT	Fenarimol
<i>M. cornuarietis</i> Imposex (VDSI)	<b>15,9</b>	<b>31,0</b>
<i>M. cornuarietis</i> Fekundität	<b>2,48</b>	<b>11,4</b>
<i>A. tonsa</i> Inhibition Larvalentwicklung	<b>0,3 (F1)</b>	<b>5500 (F1)</b>
<i>A. mediterranea</i> Regeneration	1,7/5,4	kein Effekt
<i>A. mediterranea</i> Missbildungen	1,7/5,4	30/300

Weitere physiologische Messungen ergaben, dass die Effekte der Testsubstanzen auf der entwicklungsbiologischen und reproduktionsbiologischen Ebene ebenfalls mit Änderungen im Steroidtiter und Aktivitätsmuster von wichtigen Schlüsselenzymen in der Sexualsteroidbiosynthese einhergingen (Janer et al. eingereicht). Durch kompetitive Verdrängungs-Assays ließen sich ferner für die untersuchten Invertebraten-Spezies *Marisa cornuarietis*, *Hyalella azteca*, *Paracentrotus lividus* und *Antedon mediterranea* androgen- und östrogen-spezifische (für *H. azteca* nur androgenspezifische) Bindungsstellen nachweisen.

Damit ist natürlich nicht geklärt, ob es die den humanen ER und AR vergleichbaren Rezeptoren auch bei den von uns untersuchten Invertebraten gibt – für *Marisa cornuarietis* gelang jedoch die Sequenzierung eines östrogenspezifischen Bindungsäquivalents (Jobling et al. in prep).

## Ausblick

Im Hinblick auf die Testung von Alt- und Neustoffen bezüglich einer endokrinen Wirkung können im Rahmen von COMPRENDO zwei der untersuchten Invertebraten-Spezies (*Acartia tonsa*, *Potamopyrgus antipodarum*) als OECD-Standardtests für die Chemikaliertestung vorgeschlagen werden. Der larvale Entwicklungs- und Reproduktionstest mit *A. tonsa* liegt im zweiten Entwurfstadium vor und ist mittlerweile in der Validierungsphase. *P. antipodarum* (Resultate hier nicht dargestellt) wurde von der „Ad hoc Expert Group On Invertebrate Testing“ der OECD als weiteres Testsystem in das „OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disruptive Chemicals“ aufgenommen.

Die Standardisierung eines Reproduktions- und Entwicklungstests mit *Marisa cornuarietis* wäre ohne größere Probleme möglich, denn es handelt sich bei der Apfelschnecke um eine robuste Spezies, die sich im Labor einfach hält und reproduzieren lässt. *Marisa* hat sich in allen Experimenten als überaus sensitiv gegenüber Xenohormonen erwiesen; die Raumansprüche dieser Art sowie die Kosten der Experimentdurchführung liegen bei der Apfelschnecke jedoch um ein vielfaches höher als bei der Zwergdeckelschnecke (*P. antipodarum*).

*Antedon mediterranea* wie auch *Paracentrotus lividus* (Resultate hier nicht dargestellt) haben sich zwar für die Chemikaliertestung im Labor, nicht aber für die Entwicklung eines Standardtests zur routinemäßigen Erfassung hormoneller Wirkungen von Umweltchemikalien als geeignet erwiesen, da sich beide Arten im Labor nicht zur Fortpflanzung bringen lassen.

## Literatur

- Bettin C, Oehlmann J, Stroben E (1996). TBT induced imposex in marine neogastropods is mediated by an increasing androgen level. Helgoländer Meeresuntersuchungen 50:299-317
- Candia Carnevali MD (2004). Regenerative response and endocrine disrupters in crinoid echinoderms: An old experimental model, a new ecotoxicological test. In: Matranga V (Hrsg.): Echinodermata - Progress in Molecular and Subcellular Biology - Marine Molecular Biotechnology. Springer-Verlag Heidelberg, 1-30
- Candia Carnevali MD, Galassi S, Bonasoro F, Patruno M and Thorndyke MC (2001). Regeneration and endocrine disrupters in crinoid echinoderms: Arm regeneration in *Antedon mediterranea* after experimental PCB exposure. Journal of Experimental Biology 204:835-842

- Colborn T, vom Saal FS, Soto AM (1993). Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental Health Perspectives* 101:378-384
- Daughton CG, Ternes TA (1999). Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change? *Environmental Health Perspectives* 107:907-938
- de Fur PL, Crane M, Ingersoll C, Tattersfield L (Hrsg.) (1999). Endocrine disruption in invertebrates: Endocrinology, testing, and assessment. Proceedings of the Workshops on Endocrine Disruption in Invertebrates, 12-15 December 1998, Noordwijkerhout, The Netherlands. SETAC Press: Pensacola
- Doering DD, Steckelbroeck S, Doering T and Klingmüller D (2002). Effects of butyltins on human 5-alpha-reductase type 1 and type 2 activity. *Steroids* 67:859-87
- Duft M, Schulte-Oehlmann U, Weltje L, Tillmann M, Oehlmann J (2003). Stimulated embryo production as a parameter of estrogenic exposure via sediments in the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum*. *Aquatic Toxicology* 64:437-449
- Guillette LJ JR, Gross TS, Masson GR, Matter JM, Percival HF, Woodward AR (1994). Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environmental Health Perspectives* 102:680-688
- Heidrich DD, Steckelbroeck S & Klingmüller D (2001). Inhibition of human cytochrome P450 aromatase activity by butyltins. *Steroids* 66:763-769
- Horiguchi T, Shiraiishi H, Shimizu M, Morita M. (1997). Effects of triphenyltin chloride and five other organotin compounds on the development of imposex in the rock shell, *Thais clavigera*. *Environmental Pollution* 95:85-91
- Janer G, Bachmann J, Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Porte C: The effect of organotin compounds on gender specific androstenedione metabolism in *M. cornuarietis* (eingereicht)
- Janer G, Lyssimachou A, Bachmann J, Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Porte C: Sexual dimorphism in esterified steroid levels in the gastropod *Marisa cornuarietis*: The effect of xenoandrogenic compounds (eingereicht)
- Jobling S, Casey D, Rodgers-Gray T, Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Pawlowski S, Braunbeck T, Turner AP, Tyler CR (2004). Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. *Aquatic Toxicology* 66:207-222
- Kloas W. (2002). Amphibians as model for the study of endocrine disruptors. *International Review of Cytology* 216:1-57
- Lavado R, Thibaut R, Raldua D, Martin R, Porte C (2004). First evidence of endocrine disruption in feral carp from the Ebro River. *Toxicology and Applied Pharmacology* 196:247-257
- Nixon S, Trent Z, Marcuello C, Lallana C (2003). Europe's water: An indicator-based assessment. European Environment Agency Copenhagen: Topic report number 1/2003
- Oehlmann J, Fioroni P, Stroben E, Markert B (1996). Tributyltin (TBT) effects on *Ocinebrina aciculata* (Gastropoda: Muricidae): imposex development, sterilization, sex change and population decline. *Science of the Total Environment* 188:205-223
- Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U. (2003). Endocrine disruption in invertebrates. *Pure and Applied Chemistry* 75:2207-2218