

Lehrstuhl für Zellbiologie der Technischen Universität München
Wissenschaftszentrum Weihenstephan
Univ.-Prof. Dr. Bertold Hock

**Auswirkung verschiedener oestrogen wirksamer
endokriner Disruptoren auf die Genexpression des
Zebrafischlings (*Danio rerio*)**

Ulf Kausch

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für
Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur
Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. W. Huber
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. B. Hock, em.
2. Univ.-Prof. Dr. A. Melzer

Die Dissertation wurde am 25.10.2006 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für
Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 13.12.2006 angenommen.

"Irgendwann in diesem Jahrhundert wird eine Flasche mit reinem Wasser mehr kosten als eine Flasche Wein."

Viktor Schauberg (1885 – 1958)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung	9
1.1 Endokrine Disruptoren	10
1.2 Der Zebraärbling (<i>Danio rerio</i>)	12
1.3 Microarrays	13
1.4 Ziele der Arbeit	14
2 Material und Methoden	16
2.1 Material	16
2.1.1 Kits	16
2.1.2 Reagenzien	16
2.1.3 Material	18
2.1.4 Geräte	19
2.1.5 Puffer und Lösungen	20
2.1.6 Enzyme	23
2.1.7 Primer und Produktgrößen	23
2.2 Methoden	24
2.2.1 Haltung der Zebraärblinge	24
2.2.2 Konzentrationsmessungen mit dem Enzyme-Linked Receptor Assay (ELRA)	27
2.2.3 Isolierung von RNA	29
2.2.4 Gelelektrophorese	30
2.2.5 Reverse Transkription (RT)	30
2.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	31
2.2.7 One-Step RT-PCR	32

2.2.8	RT zur Fluoreszenzmarkierung von cDNA	33
2.2.9	Microarrays	34
2.2.10	Quantitative PCR	39
3	Ergebnisse	43
3.1	Messung der Konzentration im Expositionsbecken	43
3.2	Kontrolle der RNA Extraktion	45
3.3	Kontrolle der cDNA	45
3.4	Bestimmung der LightCycler Effizienz	47
3.5	qPCR Ergebnisse	49
3.6	Statistische Auswertung der qPCR Ergebnisse	53
3.7	Kontrolle der Expression der Referenzgene	55
3.8	ELISA-Untersuchung der mit NP exponierten Zebraabärblinge	57
3.9	Microarray Experimente	58
3.10	Einteilung der Gene in „Gene Ontology Classes (GO)“	67
4	Diskussion	70
4.1	Exposition von Zebraabärblingen	70
4.2	Chemikalien und Konzentrationen	73
4.3	Quantitative PCR	75
4.4	Microarray-Experimente	76
4.5	Gefährdung durch oestrogen wirksame endokrine Disruptoren	79
5	Zusammenfassung	82
	Literaturverzeichnis	83
	Anhang A	91
	Anhang B	101

Anhang C	112
Anhang D	115
Anhang E	118
Anhang F	121

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Vertreter der vier Klassen endokriner Disruptoren mit oestrogener Wirkung.....	11
Abb. 2: Zwei Zebrabärblinge: oben ♀, unten ♂.....	12
Abb. 4: Expositionsaufbau.....	25
Abb. 5: Schematische Darstellung der Expositionsanlage.....	26
Abb. 6: Schematische Darstellung des ELRA.....	27
Abb. 7: Affymetrix Array Scanner.....	35
Abb. 8: Mit dem ELRA gemessene Konzentrationen in verschiedenen E2 Expositionsbecken.....	43
Abb. 9: Mittels ELRA gemessene E2 Konzentrationen über einen Zeitraum von 9 Tagen.....	44
Abb. 10: Agarosegel mit RNA Proben.....	45
Abb. 11: Agarose-Gel mit Produkten der PCR.....	46
Abb. 12: Agarose-Gel mit Produkten der PCR mit <i>vtg1</i> -Primern.....	46
Abb. 13: Exemplarischer qPCR-Lauf zur Ermittlung der Effizienz.....	47
Abb. 14: Effizienzen der <i>vtg1</i> , <i>β-aktin</i> , <i>eflα</i> und <i>gapdh</i> qPCR.....	48
Abb. 15: Exemplarischer qPCR-Lauf mit 32 Proben.....	50
Abb. 16: Ergebnisse der qPCR Experimente.....	51
Abb. 17: Ergebnisse der qPCR der mit BPA exponierten Proben. Zielgen ist <i>β-aktin</i> , die Referenzgene sind <i>eflα</i> und <i>gapdh</i>	55
Abb. 18: Ergebnisse der qPCR der mit BPA exponierten Proben. Zielgen ist <i>eflα</i> , die Referenzgene sind <i>β-aktin</i> und <i>gapdh</i>	56
Abb. 19: Ergebnisse der qPCR der mit BPA exponierten Proben. Zielgen ist <i>gapdh</i> , die Referenzgene sind <i>eflα</i> und <i>β-aktin</i>	57
Abb. 20: Konzentration Vitellogenin in adulten Zebrabärbling-Männchen, gemessen im ELISA, nach Exposition gegenüber NP.....	58
Abb. 21: 14k Microarray mit Raster nach Hybridisierung.....	59
Abb. 22: Venn-Diagramm der von jeder Chemikalie in ihrer Expression regulierten Gene.....	63

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Reaktionsansatz für die Reverse Transkription.....	31
Tabelle 2: Reaktionsansatz der PCR	31
Tabelle 3: Reaktionsansatz der One-Step RT-PCR.....	32
Tabelle 4: Programm Parameter für die One-Step RT-PCR	33
Tabelle 5: Reaktionsansatz für die CyDye RT	34
Tabelle 6: Protokolle der verwendeten PCR-Programme	40
Tabelle 7: Ergebnisse des Tukey HSD für E2.....	53
Tabelle 8: Ergebnisse des Tukey HSD für Genistein.....	54
Tabelle 9: Ergebnisse des Tukey HSD für BPA.....	54
Tabelle 10: Anzahl der regulierten Gene und FDR bei verschiedenen p-Werten und fold-change cut-offs	60
Tabelle 11: Die am stärksten regulierten Gene und der biologische Prozess, an dem das jeweilige Genprodukt beteiligt ist.....	61
Tabelle 12: Gene, deren Expression von E2 und BPA in ihrer Expression reguliert wurden.....	63
Tabelle 13: ETs, deren Expression von E2 und Genistein in ihrer Expression reguliert wurden	64
Tabelle 14: Gene, deren Expression von BPA und Genistein in ihrer Expression reguliert wurden	66
Tabelle 15: Gene, deren Expression von E2 (500 ng/l), BPA (1.000 µg/l) und Genistein (5.000 µg/l) in ihrer Expression reguliert wurden	67
Tabelle 16: Vergleich verschiedener E2-Expositionen mit unterschiedlichen Fischen und Systemen.....	71
Tabelle 17: Vergleich zwischen den Konzentrationen in den Expositionsbecken und bereits gemessenen Konzentrationen	74

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
°dH	Grad deutsche Härte
A	Absorption
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
bp	Basenpaar(e) (base pairs)
BPA	Bisphenol A
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin)
c	Konzentration
cDNA	complementary DNA
CP	Crossing-Punkt
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DEPC	Diethylpyrocarbonat
df	Freiheitsgrad
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
E	Amplifikationseffizienz
E1	Oestron
E2	17 β -Oestradiol
ED	Endokrine Disruptoren
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EE2	Ethinylöestradiol
ef1 α	Elongationsfaktor 1, Untereinheit Alpha
ELISA	Enzym gebundener Immunoabsorbent Assay
ELRA	Enzym gebundener Rezeptor Assay
ET	Expressed Transcript
fc	fold change
FDR	False Discovery Rate
for	forward

g	Gramm
gapdh	Glyzerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GFP	Green Fluorescent Protein
GO	Gene Ontology
h	Stunde(n)
H ₂ O _{dd}	Bidest Wasser
HSD	Honestly Significant Difference
ID	Innendurchmesser
l	Liter
LOEC	lowest observed effect concentration
M	molar, Molarität (mol/L)
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	millimolar
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
MS	Mittelwert der Quadrate
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
N	normal, Normalität
NA	Not Applicables
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
NK	Negativkontrolle
Nm	Nanometer
nM	nanomolar
NP	4-Nonylphenol
OD	optische Dichte
ORF	Open Reading Frame
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (Phosphate Buffered Saline)

PBSE	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung mit EDTA
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaktion)
PK	Positivkontrolle
pmol	Picomol
POD	Peroxidase
qPCR	quantitative PCR
R	Pearsonsche Korrelationskoeffizient
rev	Reverse
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (rotations per minute)
rRNA	Ribosomale RNA
RT	als Temperaturangabe: Raumtemperatur
RT	in der Molekularbiologie: Reverse Transkription
s	Sekunden
S	Svedberg-Einheit
SDS	Natriumlaurylsulfat (Sodiumdodecylsulfate)
SS	Summe der Quadrate
SSC	Saline-Sodium-Citrate
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TC	Tentative Consensus Sequence
TE	Tris-EDTA
TIFF	Tagged Image File Format
TMB	Tetramethylbenzidin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer RNA
U	Units
UV	ultraviolett
V	Volt
vtg	Vitellogenin
YES	Yeast Estrogen Screen

1 Einleitung

Heute sind ungefähr 5.000.000 verschiedene chemische Verbindungen bekannt. Davon sind 80.000 in Gebrauch und jedes Jahr kommen 500 - 1000 dazu (Fent, 1998). Gleichzeitig wird aber eine Einschätzung der Gefährdungspotentiale dieser Verbindungen für Mensch und Tier kaum vorangetrieben; dagegen wurde die Umweltproblematik, die mit der genannten Entwicklung einhergeht, bereits in den siebziger Jahren erkannt. Heute gibt es in vielen Ländern Umweltschutzgesetze, die eine Ausweitung entsprechender Probleme verhindern sollen. Vorsorglich greifende Gesetze oder Maßnahmen sind nach wie vor selten. So wurden für die Umwelt relevante Auswirkungen einiger Chemikalien erst Jahre nach ihrem Einsatz festgestellt.

Ein konkretes Beispiel hierfür ist die oestrogene Wirksamkeit von Pflanzenschutzmitteln, die zunächst unbekannt war. In den fünfziger Jahren ging der Fischotterbestand in England drastisch zurück, was auf das Pestizid Dieldrin zurückgeführt wird (Mason et al., 1986). Heute weiß man um die endokrine Wirkung dieses Pestizids.

Die Anzahl der Substanzen, denen in den letzten Jahren eine Wirkung als endokrine Disruptoren zugeschrieben wurde, wächst stetig, da mittlerweile neue Testverfahren zur Verfügung stehen, die diese Wirkung feststellen können, so z.B. der Enzyme-Linked Receptor Assay (ELRA) (Seifert et al., 1999), ein kompetitiver Assay, der den humanen oestrogen Rezeptor verwendet, oder der Yeast Estrogen Screen (YES) Assay, der den Nachweis von oestrogenen Effekten mittels Hefezellen erlaubt, die das Green Fluorescent Protein (GFP) unter dem Einfluss oestrogen wirksamer Substanzen exprimieren (Beck et al., 2005).

Besonderes Augenmerk liegt dabei auf den Substanzen, die eine oestrogene Wirkung haben. Mehrere Untersuchungen haben bereits die „Verweiblichung“ oder den Rückgang der Individuenzahl in Wildtierpopulationen durch endokrine Disruptoren mit oestrogener Wirkung beschrieben (Shore et al., 1993; Colborn, 1995). Gauillette et al. (1995) beschrieben im Lake Apopka (Florida, U.S.A.) männliche Alligatoren mit einer stark eingeschränkten Penisentwicklung. Als Ursache hierfür gilt ein Chemieunfall, bei dem große Mengen des Pflanzenschutzmittels Dicofol, einem Insektizid, das strukturelle Ähnlichkeiten zu DDT aufweist und dem oestrogene Wirkungen zugeschrieben werden, in den See geraten sind (Woodward et al., 1993). Auch an Fischen wurde der negative Einfluss von oestrogen wirksamen endokrinen Disruptoren

auf die Population bereits beschrieben. Die auffällig hohe Rate von Hermaphroditismus bei Plötzen (*Rutilus rutilus*), die flussabwärts von Kläranlagen in England leben, ist bekannt (Sumpter und Jobling, 1995). Weiterhin wurde ein Einfluss des geklärten Abwassers auf die Reproduktionsfähigkeit der Neuseeländischen Zwergdeckelschnecke (*Potamopyrgus antipodarum*) und mehreren Süßwasserfischen festgestellt (Jobling et al., 2004). Eine weitere Arbeit belegt den Anstieg der Konzentration des Eidottervorläuferproteins Vitellogenin im Plasma von Regenbogenforellen, die für 1 bis 3 Wochen in Käfigen im Abwasser von Kläranlagen gehalten wurden, um den Faktor 500 bis 100.000 (Purdom et al., 1994). Das Vorkommen von oestrogen wirksamen Substanzen im gereinigten Kläranlagen-Abwasser ist mehrfach bewiesen. So fanden Ternes et al. (1999) Konzentrationen von 15 ng/l 17 β -Oestradiol und 27 ng/l Oestron im gereinigten Abwasser deutscher Kläranlagen, Todorov et al. (2002) 5 bis 13 ng/l Oestradiol und Oestron im Abwasser von Kläranlagen in der Nähe New Yorks.

Trotz des Bewusstseins einer Gefährdung von Wildtierpopulationen durch endokrine Disruptoren mit oestrogenen Wirkung ist deren genaue Wirkweise noch immer weitgehend unbekannt. Es ist somit also nötig, mehr über die Wirkweise, die relevanten Konzentrationen und eventuell zu treffende Maßnahmen zu lernen, um die Gefahr, die durch diese Chemikalien für Wildtiere und auch den Menschen ausgehen, einschätzen und auch eindämmen zu können.

1.1 Endokrine Disruptoren

1995 wurde ein endokriner Disruptor als „exogene Substanz definiert, die in die Produktion, die Freisetzung, den Transport, den Metabolismus, das Binden, die Wirkung oder die Elimination von natürlichen Hormonen eingreift, die im Körper für die Aufrechterhaltung der Homöostase und der Regulation von Entwicklungsprozessen verantwortlich sind“ (Kavlock et al., 1996).

Endokrine Disruptoren mit oestrogenen Wirkung werden in folgende vier Klassen unterteilt: (1) Endogene Oestrogene wie 17 β -Oestradiol (E2) oder Oestron (E1), (2) Phyto- und Mykooestrogene wie Genistein oder Coumestrol, (3) synthetische Oestrogene/Antioestrogene wie Ethinyloestradiol (EE2) oder Tamoxifen und (4) Xenooestrogene wie Bisphenol-A (BPA) oder 4-Nonylphenol (NP).

Vertreter dieser vier Klassen werden zunehmend in der Umwelt gefunden. Endogene Oestrogene werden in Wirbeltieren gebildet und gelangen über die

Ausscheidungen in die Umwelt. Synthetische Oestrogene wie Ethinyloestradiol finden Verwendung als Kontrazeptiva, Phytoestrogene werden von Pflanzen und Pilzen gebildet, und Xenooestrogene spielen z.B. bei industriellen Prozessen eine große Rolle.

Eine Belastung des Menschen wurde bereits festgestellt. So konnte Tsutsumi (2005) BPA im menschlichen Fruchtwasser nachweisen, und der negative Einfluss endokriner Disruptoren mit oestrogener Wirkung auf die Spermienkonzentration wird seit vielen Jahren diskutiert (Carlsen et al., 1992).

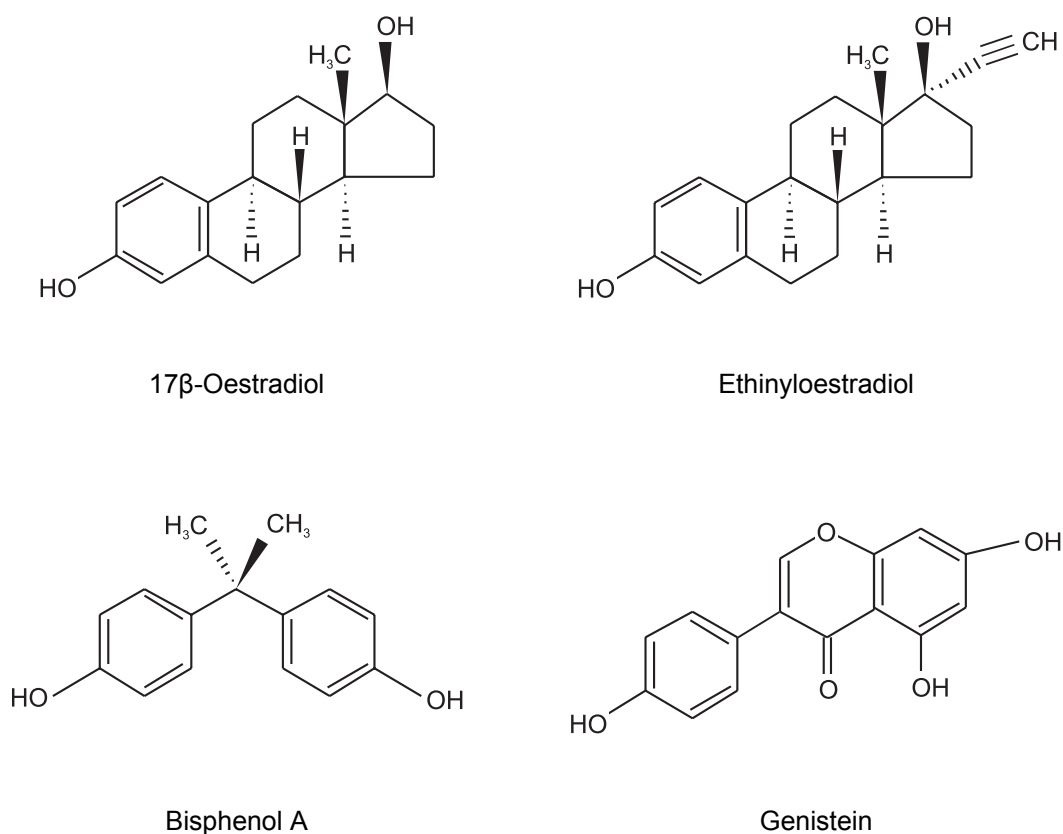


Abb. 1: Vertreter der vier Klassen endokriner Disruptoren mit oestrogener Wirkung.

Die oestrogene Wirkung lässt sich kaum an strukturellen Ähnlichkeiten der verschiedenen Chemikalien ablesen, d.h. dass herkömmliche chemische Analysemethoden zur Detektion dieser Wirkung nicht in Frage kommen. Auch der Effekt von Mischungen verschiedener Substanzen macht neue Testverfahren nötig.

Um einen schnellen Nachweis für eine Belastung mit oestrogen wirksamen Substanzen zu ermöglichen, war es nötig, einen Biomarker zu finden. Als Marker-

Protein hat sich bei eierlegenden Vertebraten das Vitellogenin (Vtg) durchgesetzt. Vtg ist ein Eidotter-Vorläufer-Protein und wird als solches unter normalen Bedingungen von weiblichen Tieren stark, von männlichen hingegen schwach oder gar nicht exprimiert. Sumpter und Jobling (1995) konnten zeigen, dass nach der Exposition mit Oestrogenen und Xenooestrogenen auch männliche Fische dieses Protein in starkem Ausmaß synthetisieren. Aquatische Organismen wie Fische eignen sich besonders gut für neue Biotests zur Detektion oestrogenen Wirkung: die Tiere sind den zu testenden Chemikalien direkt ausgesetzt, und somit ist eine stärkere Reaktion zu erwarten.

1.2 Der Zebrafisch (*Danio rerio*)

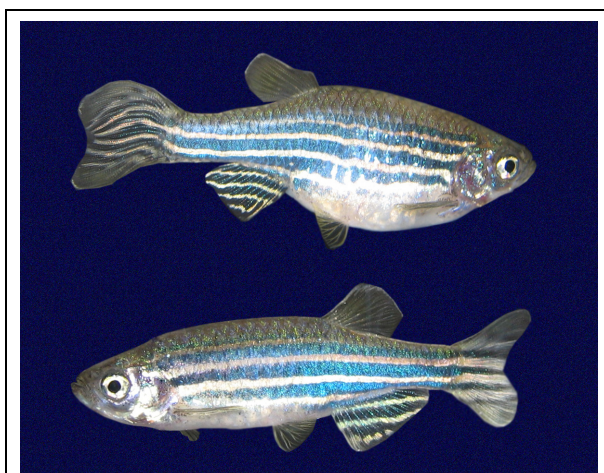


Abb. 2: Zwei Zebrafische: oben ♀, unten ♂

Der Zebrafisch (*Danio rerio*) findet in vielen forschenden Arbeitsgruppen weltweit Verwendung. Als Wirbeltier sind viele Organe vorhanden, die auch beim Menschen zu finden sind. Viele der Gene ähneln sowohl in der Basenfolge als auch der Funktion den Genen des Menschen oder anderen Wirbeltieren. Diese Ähnlichkeit erlaubt einen Vergleich mit dem

Menschen bis zu einem gewissen Grade. Weiterhin bietet dieser Fisch mehrere Vorteile:

(1) Er kann auf kleinem Raum gehalten und nachgezüchtet werden.

(2) Innerhalb von 24 Stunden nach der Befruchtung sind beim Embryo fast alle Organe vorhanden, und nach 72 Stunden schlüpft der Jungfisch. Nach insgesamt 60 Tagen ist der Zebrafisch bereits geschlechtsreif. Das heißt, der Zebrafisch entwickelt sich im Vergleich zum Menschen sehr schnell. Somit ist es möglich, die Entwicklung eines Wirbeltieres innerhalb weniger Tage zu verfolgen.

(3) Sowohl das Ei als auch die frei

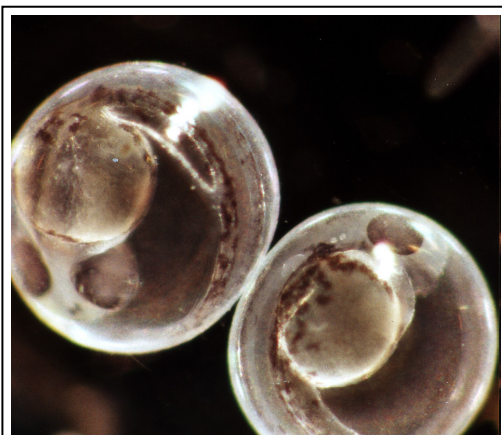


Abb. 3: Eier des Zebrafischs, 65 Stunden nach der Befruchtung. Deutlich sind die Anlagen der Augen und der Dottersack der Embryonen zu erkennen.

schwimmenden Larven sind durchsichtig. Das bedeutet, dass die Entwicklung einzelner Organe am lebenden Tier zu beobachten ist. Dadurch eröffnet sich nicht nur die Möglichkeit, die Entwicklung einzelner Organe zu beobachten, sondern auch die Chance, sogenannte „Knock-out“ Tiere, also Fische, bei denen die Transkription eines oder mehrere Gene ausgeschaltet ist, zu untersuchen und den Phänotyp und somit die Funktion des betreffenden Genprodukts zu charakterisieren. Homologien zu Genen anderer Lebewesen ermöglichen somit Rückschlüsse auf die Funktion der Genprodukte.

(4) Das Genom des Zebrafisches ist weitestgehend bekannt. Diese Tatsache ist vor allem für die Anwendung für Microarray-Experimente von Bedeutung, da für diese Untersuchungen sog. Sonden, also Ausschnitte der zu untersuchenden Gene, verwendet werden. Zur Herstellung dieser Sonden muss natürlich die Basenfolge im Genom bzw. im zu untersuchenden Gen bekannt sein. Vor allem für Gesamt-Genom-Arrays, also Experimente, bei denen Sonden jedes einzelnen Gens des Tieres verwendet werden, ist dies von großer Wichtigkeit.

1.3 Microarrays

Die Vorteile von Microarray Experimenten haben häufige Anwendungen in den letzten Jahren begünstigt. Auf einem Glasobjektträger können viele tausend Sonden immobilisiert werden, die dem Abschnitt eines Gens entsprechen. So gibt es Gesamt-Genom-Chips, die alle bis dato bekannten Gene eines Organismus umfassen. Im Falle des Zebrafisches sind dies zur Zeit 14.067¹ Gene bzw. Sonden, die detailliert Auskunft liefern können über Genexpressionsmuster, zum Beispiel in bestimmten Entwicklungsstadien oder nach Exposition mit bestimmten Chemikalien. Der große Vorteil ist die Möglichkeit, das gesamte Genom vergleichsweise schnell und kostengünstig auf Veränderungen zu untersuchen. Weiterhin muss die zu untersuchende DNA nicht amplifiziert werden, was eine Fehlerquelle bei der Erfassung von Genexpressionsmustern darstellen könnte. Microarrays bieten die Möglichkeit, Transkriptomanalysen mit nicht-amplifizierten Proben von Individuen durchzuführen.

Bislang lassen sich in der Literatur allerdings kaum angewandte Gesamt-Transkriptomanalysen im Zusammenhang mit einer Exposition gegenüber oestrogen

¹ Stand: August 2006, Quelle: http://www.ocimumbio.com/web/arrays/catalog_zebra_14k.asp

wirksamen Substanzen finden. Custodia et al. (2001) untersuchten die Veränderungen im Genexpressionsmuster bei *Caenorhabditis elegans* nach Exposition mit E2 und fanden 2435 Gene, die durch die Chemikalie reguliert wurden. Ansonsten beschränkt sich die Anwendung der Microarray-Technologie im Zusammenhang mit endokrinen Disruptoren bis heute hauptsächlich auf die Untersuchung der Regulation einzelner Gene bei der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 (Gruvberger et al., 2001; Omoto und Hayashi, 2002; Zhang et al., 2003). Lediglich die Veränderung des Genexpressionsmusters während der Entwicklung stehen bislang beim Zebrafisch - als Modell für die Entwicklung der Wirbeltiere - im Mittelpunkt des Interesses. So dokumentierten Ton et al. (2002) als Erste die Anwendbarkeit von Microarrays auf den Zebrafisch und gleichzeitig eine Veränderung der Genexpression während der ersten 120 Stunden nach der Befruchtung der Eizelle. Gleichzeitig dokumentieren mehrere Arbeiten die Expressionsmuster-Veränderungen während der embryonalen Entwicklung (Lo et al., 2003; Linney et al., 2004; Mathavan et al., 2005).

Zur Einschätzung des Gefährdungspotentials von Chemikalien, die als endokrine Disruptoren wirken, bieten sich Gesamt-Genom-Microarrays an: das Erfassen aller Genexpressionsmusteränderungen innerhalb eines Individuums erlaubt einen genauen Einblick in die Auswirkungen der Exposition gegenüber einer bestimmten Chemikalie und damit eine Abgrenzung verschiedener Chemikalien untereinander.

1.4 Ziele der Arbeit

Ziele dieser Arbeit sind es, die Wirkweise verschiedener oestrogen wirksamer endokriner Disruptoren zu charakterisieren, sie voneinander abzugrenzen und die Gefährdung von Wildtierpopulationen durch endokrine Disruptoren besser einzuschätzen.

Zunächst sollen männliche Zebrafische mit verschiedenen oestrogen wirksamen endokrinen Disruptoren in verschiedenen Konzentrationen exponiert werden. Die Transkriptomanalyse des Lebergewebes der Fische als Synthese-Ort von Vitellogenin (Czihak et al., 1992) und somit Zielorgan von Oestrogenen soll dann Aufschluss über die Wirkweise der getesteten Substanzen geben.

Dazu werden zwei verschiedene experimentelle Ansätze genutzt: (1) Die relative Quantifizierung der Expression des Gens *vitellogenin1* (*vtg1*) in männlichen Zebrafischen nach der Exposition mit oestrogen wirksamen Substanzen durch eine

quantitative Polymerase Kettenreaktion (qPCR). Mit Hilfe dieses Experiments sollen Konzentrationen bestimmt werden, bei denen die männlichen Tiere das Gen signifikant stärker exprimieren. Zu hohe Konzentrationen bergen die Gefahr, toxische Einflüsse der Chemikalien zu messen. Exponierte Proben dieser Konzentration sollen dann mittels Microarray – Experimenten genauer untersucht werden. (2) Das System der Microarray-Experimente mit Proben von Wirbeltieren soll etabliert werden und durch diese Experimente mit „whole genome“ Arrays, also Arrays, die das gesamte Genom des Zebrafisches repräsentieren, soll dann festgestellt werden, welche Gene in ihrer Expression durch die einzelnen oestrogen-wirksamen Substanzen reguliert werden. Schließlich soll eine Zuordnung dieser regulierten Gene zu bestimmten Klassen der biologischen Funktion, sog. „ontology classes“, eine Einschätzung des Gefährdungspotentials und eine Charakterisierung der Wirkweise der einzelnen Chemikalien erlauben.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Kits

1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR	Roche, 1483188
cMaster™ RTplusPCR System	Eppendorf, 0032 002.358
CyScribe First-Strand cDNA Labelling Kit	Amersham Biosciences, RPN6202X
LightCycler® FastStart DNA Master ^{PLUS} SYBR Green I	Roche, 03515885
RNeasy MinElute Cleanup Kit	Qiagen, 74204
Zebrafish 14k OciChip™	Ocimum Biosolutions, #2260-000000

2.1.2 Reagenzien

17β-Oestradiol [CAS # 50-28-2]	Sigma, E-8875
17β-Oestradiol-BSA-Konjugat	Sigma, E-0756
3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidin	Fluka, 87748
3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS)	Fluka, 69947
4-Nonylphenol, Mix aus Isomeren [CAS # 84852-15-3]	Acros, 416240010
Agarose NEEO	Roth, 2267.2
Biotin-POD-Konjugat	Sigma, P-9568
Bisphenol A [CAS # 80-05-7]	Sigma, I-0635
Blocking Reagent	Boehringer Mannheim, 1112589
Borsäure	Sigma, B-7901
Bromphenolblau	Merck, 159102
Chloroform	Sigma, C-7559
Desoxynukleotidtriphosphate (dNTP Set), je 10 mM	GeneCraft, GC-013001
Diethyl-pyrocarbonat (DEPC)	Sigma, D-5758

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, 102952
DNA-Längenmarker, 100bp GeneRuler	Fermentas, SM0243
Ethanol, absolut	Riedel-de Haën, 32205
Ethanol, vergällt, 75%	Zefa
Ethidiumbromid-Lösung 1 %	AppliChem, A1152,0025
Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz Dihydrat	Sigma, E-5134
Formamid	Sigma, F-7508
Formaldehyd 37 %	Fluka, 47629
Genistein [CAS # 446-72-0]	LCLaboratories, G-6055
Glycerol	Sigma, G-5516
Isopropanol	Roth, 7343.1
Kalziumchlorid, entwässert	Roth, A119.1
Kaliumdihydrogencitrat	Fluka, 60215
Maus-anti-human-Oestrogenrezeptor-Ak, biotinyliert	Dako, E7107
Methanol	Roth, 4627.2
Natriumacetat-Trihydrat	Merck, 6268
Natriumcarbonat	Merck, 106393
Natriumchlorid	J. T. Baker, 0278
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Fluka, 71402
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck, 106346
Natriumhydrogencarbonat	Merck, 106329
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, 106580
Natriumhydroxid	Roth, 6771.1
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Fluka, 71728
Oestrogenrezeptor α , human	MoBiTec, P2188
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, A-2153
Salzsäure, 37%	J. T. Baker, 6081
Schwefelsäure, $\geq 95\%$	Merck, 100732
Sorbinsäure	Fluka, 85510
Stickstoff, flüssig	Linde
Streptavidin	Vektor, SA-5000
TRI Reagent	Sigma, T-9424
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	J. T. Baker, 1414
Triton X-100	Sigma, T-8787

Tween [®] 20	Merck, 817072
Wasserstoffperoxid 30 %	Merck, 108597
Xylencyanol	Sigma-Aldrich, 335940

2.1.3 Material

Aquaristik

Kieselsteine Bodengrund	Dehner Zoo
Schieferplatten	Dehner Zoo
Sera Premium, Plankton-Futtertabletten	Dehner Zoo
Sera Vipar, Flockenfutter für Zierfische	Dehner Zoo
Sprudelsteine	Dehner Zoo
Tetra Aqua Safe, Dosierung 5 ml in 10 l Leitungswasser	Dehner Zoo
Tetra Fresh Delica, Rote Mückenlarven	Dehner Zoo
Tetra TetraMin Baby, Flockenfutter für Jungfische	Dehner Zoo
Tongefäße	Dehner Zoo

Labor

Biopur Safe-Lock Reaktionsgefäße, 2,0 ml	Eppendorf, 0030 121.597
Filterspitzen:	
DF30ST, 30 µl	Gilson, F161933
Biozym Safe-Seal-Tips [®] Premium, 10 µl	Biozym, 693010
Biozym Safe-Seal-Tips [®] PreCision [®] , 100 µl	Biozym, 692086
Biozym Safe-Seal-Tips [®] Plus200, 200 µl	Biozym, 796201
Biozym Safe-Seal-Tips [®] Plus1000, 1000 µl	Biozym, 796501
Flasche, Braunglas, 2,5 l, GL45	Fisher Scientific, 3123670
Glasperlen, 4 mm	Diagonal, 9012404
LightCycler [®] Kapillaren	Roche, 11909339001
Mikrotiterplatten (F-Form, Bindungskapazität hoch)	Greiner, 655 061
PCR-Reaktionsgefäße (Micro PCR-Tubes), 0,2 ml	Sigma-Aldrich, Z374873
Pipettenspitzen Diamond D200, 200 µl	Gilson, F167103
Pipettenspitzen Diamond DL10, 10 µl	Gilson, G67102
Pipettenspitzen Diamond D1000, 1000 µl	Gilson, F167104
Phase Lock Gel Heavy, 2,0 ml	Eppendorf, 0032 005.152
Phase Lock Gel Heavy, Syringe 10 x 3,0 ml	Eppendorf, 0032 007.970

Präparierschere, Baby Metzenbaum, gebogen 145 mm	Heiland, 13-793
Safe-Lock Reaktionsgefäße, 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Eppendorf, 0030 121.023
Safe-Lock Reaktionsgefäße, 1,5 ml, ambra	Eppendorf, 0030 120.191
Schlauch, 3-Stopper-Schlauch, Tygon® SI, ID 1,42 mm	Ismatec, SC0607
Schlauch, Tygon® SI, ID 1,6 mm	Ismatec, SC0580
Schlauchverbinder, gerade	Ismatec, ISM 556
Schlauchverbinder, T-Verbinder	Ismatec, ISM 693
UVette®	Eppendorf, 0030 106.300
Sterilisationsklebeband	Heiland, 326 202
Zentrifugen-Röhrchen, 50 ml	TPP, 38008

2.1.4 Geräte

Aquarieninnenfilter 2012, 2052	Eheim
Autoklav, 3870 ELV	Tuttenauer
Array-Scanner GMS 418	Affymetrix
Brutschrank 2771	Köttermann
Dreieckfilter mit Ausströmer	Lapis
Eismaschine AF-10	Scotsman
Elektrophoresekammern GNA 100	Pharmacia
Elektrophoresestation EPS 600	Pharmacia
Feinwaage R 160 P	Sartorius
Gel-Dokumentationssystem	LTF-Labortechnik
Heizstab 25W TSRH 25	Jäger
Heizstab 50W TSRH 50	Jäger
Hybridisier-Ofen Hybaid	MWG Biotech
Hybridisierungskammer	Peqlab
Kühlschrank KTR-14100	Bosch
LightCycler®	Roche
Magnetrührer RET	Janke und Kunkel
Membran-Luftpumpe 7500	Lapis
Mikrotiterplattenphotometer SpectraFluor Plus	Tecan
Mikrotiterplattenschüttler	Virion, Würzburg
Mikrotiterplattenwaschgerät 96PW	SLT

Mikrowellengerät 8019	Privileg
Peristaltikpumpen, analog & digital	Ismatec
pH-Meter Microprocessor	WTW
Photometer GeneQuant 80-2115-05	Amersham Biosciences
Schüttler, Vortex VF 2	Janke und Kunkel
Schwingmühle MM 2	Retsch
SpeedVac Concentrator	Bachhofer
Sterilbank Holten ELT	UniEquip
Thermocycler Primus 25/96	MWG Biotech
Tisch-Waage	Sartorius
Tisch-Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus
Wasserbad F3	Haake
Zentrifuge Labofuge 6000	Heraeus
Zentrifuge Sorvall RC-5B	DuPont

2.1.5 Puffer und Lösungen

Blockierungslösung für den ELRA

- 1,5 g BSA
- 0,8 g Boehringer Blocking Reagent
- PBS ad 30 ml.

DEPC behandeltes H₂O_{dd}

- 1 ml DEPC (0,1 %)
- H₂O_{dd} ad 1000 ml.
- Über Nacht rühren, dann autoklavieren.

Carbonat-Puffer, pH 9,6

- 1,59 g Na₂CO₃ (15 mM)
- 2,93 g NaHCO₃ (25 mM)
- H₂O_{dd} ad 1000 ml.

Na₂EDTA, pH 8,0

- 186,1 g Na₂EDTA • 2 H₂O (0,5 M)
- pH 8,0 mit NaOH.
- H₂O_{dd} ad 1000 ml.

Ladepuffer für RNA/DNA – Agarosegele (10 x)

- 5 ml 100 mM Tris (pH 7,6) (50 mM)
- 5 ml Glycerol (50 %)
- 20 µl 0,5 M Na₂EDTA (pH 8,0) (1 mM)
- 30 mg Bromphenolblau (0,3 %)
- 30 mg Xylencyanol (0,3 %)

MOPS-Puffer (10 x), pH 7,0

- 41,9 g MOPS, freie Säure (0,2 M)
- 6,8 g NaOAc • 3 H₂O (50 mM)
- 20 ml 0,5 M Na₂EDTA (pH 8,0) (10 mM)
- pH 7,0 mit 10 M NaOH.
- H₂O_{dd} (DEPC behandelt) ad 1000 ml.

PBS-Puffer, pH 7,6

- 1,38 g NaH₂PO₄ • H₂O (10 mM)
- 12,46 g Na₂HPO₄ • 2 H₂O (70 mM)
- 8,5 g NaCl (145 mM)
- H₂O_{dd} ad 1000 ml.

PBSE-Puffer, pH 7,6

- 1,38 g NaH₂PO₄ • H₂O (10 mM)
- 12,46 g Na₂HPO₄ • 2 H₂O (70 mM)
- 8,5 g NaCl (145 mM)
- 10 ml 0,5 M Na₂EDTA (pH 8,0) (5 mM)
- H₂O_{dd} ad 1000 ml.

PBS-Waschpuffer (10 x), pH 7,6

- 1,38 g NaH₂PO₄ • H₂O (10 mM)
- 12,46 g Na₂HPO₄ • 2 H₂O (70 mM)
- 8,5 g NaCl (145 mM)
- 5 ml Tween 20 (0,5 %)
- H₂O_{dd} ad 1000 ml.

RNA-Probenpuffer

10 ml Formamid
3,5 ml 37 % Formaldehyd
2 ml 5 x MOPS

SDS-Lösung (10 %)

100 g SDS
H₂O_{dd} ad 1000 ml.

SSC-Puffer (20 x), pH 7,0

175,3 g NaCl (3 M)
88,2 g tri-Natriumcitrat • 2 H₂O (0,3 M)
pH 7,0 mit HCl.
H₂O_{dd} ad 1000 ml.

Substrat für POD

30 ml Substrat Puffer
500 µl TMB Stammlösung
100 µl Wasserstoffperoxid-Lösung

Substrat-Puffer, pH 3,8

46,04 g KH₂-Citrat (0,2 M)
0,1 g Sorbinsäure (0,9 mM)
H₂O_{dd} ad 1000 ml.

TBE-Puffer (5 x)

54 g Tris (0,9 M)
27,5 g Borsäure (0,9 M)
20 ml 0,5 M Na₂EDTA (pH 8,0) (10 mM)
H₂O_{dd} ad 1000 ml.

TMB Stammlösung

0,3 g 3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidin
5 ml DMSO
Methanol ad 20 ml.

Waschpuffer 1 für Ocimum Biosolutions Zebrafish OciChip™

100 ml 20 x SSC (2 x)
 10 ml 10 % SDS (0,1 %)
 H₂O_{dd} ad 1000 ml.

Waschpuffer 2 für Ocimum Biosolutions Zebrafish OciChip™

50 ml 20 x SSC (1 x)
 H₂O_{dd} ad 1000 ml.

Waschpuffer 3 für Ocimum Biosolutions Zebrafish OciChip™

25 ml 20 x SSC (0,5 x)
 H₂O_{dd} ad 1000 ml.

Wasserstoffperoxid-Lösung (1 %)

3,3 ml H₂O₂ (30 %)
 H₂O_{dd} ad 100 ml.

2.1.6 Enzyme

DNA-Polymerase BioTherm™ (5 U/μl)	GeneCraft, GC-002-1000
Protector (RNase Inhibitor)	Roche, 333 5399

2.1.7 Primer und Produktgrößen

β-aktin (NCBI accession number: AF057040; Produktgröße: 278 bp)

forward (5'-AAG CAG GAG TAC GAT GAG TCT G-3')

reverse (5'-GGT AAA CGC TTC TGG AAT GAC-3')

ef1α (NCBI accession number: L23807; Produktgröße: 208 bp)

forward (5'-CAG CTG ATC GTT GGA GTC AA-3')

reverse (5'-TCT TCC ATC CCT TGA ACC AG-3')

gapdh (NCBI accession number: BC083506; Produktgröße: 285 bp)

forward (5'-TTG AGA AAC CTG CCA AGT ATG A-3')

reverse (5'-AGA AAC AGC AAA GGG GTC AC-3')

vtgI (NCBI accession number: AF406784; Produktgröße: 210 bp)

forward (5'-GCC AAA AAG CTG GGT AAA CA-3')

reverse (5'-AGT TCC GTC TGG ATT GAT GG-3')

Die Primersequenzen wurden mit dem Internetprogramm „Primer3“¹ erstellt. Alle Primer wurden von MWG Biotech, Ebersberg synthetisiert und liegen in einer Konzentration von 100 pmol/µl vor.

2.2 Methoden

2.2.1 Haltung der Zebrabärblinge

Die Zebrabärblinge (*Danio rerio*) werden in Aquarien mit 160 l Wasservolumen gehalten. Verwendet wird Freisinger Leitungswasser (Gesamthärte 18,1 °dH, pH ≈ 7,7)², das alle 14 Tage zu 50 % ausgewechselt wird. Heizstäbe gewährleisten eine konstante Wassertemperatur von 24°C. Die Beleuchtungsdauer beträgt 12 Stunden am Tag. Alle Hälterungsbecken sind mit Wasserfiltern versehen. Luftpumpen versorgen das Wasser über Sprudelsteine mit Sauerstoff (300 l Luft/h). Um das Aufkommen von Phytohormonen im Wasser auszuschließen, befinden sich keine Pflanzen in den Becken, Algen werden regelmäßig mit einem Schwamm von den Scheiben entfernt. Der Boden der Becken ist mit dunklen Kieselsteinen bedeckt, einige Schieferplatten und Tongefäße dienen als Verstecke für die Fische. Zwei Mal täglich bekommen die Zebrabärblinge Flockenfutter. Rote Mückenlarven dienen ein bis zwei Mal pro Woche als Zusatznahrung. Neben den Zebrabärblingen befinden sich noch Marmorierte Panzerwelse (*Corydoras paleatus*) in den Becken. Die Panzerwelse fressen Futterreste, die auf den Grund fallen, beeinflussen die Zebrabärblinge jedoch nicht.

Nachzucht der Jungfische

Die Nachzucht der Zebrabärblinge erfolgt in 20 l Becken. Jeweils 2 männliche und 3 weibliche Fische werden in das Becken gesetzt, dessen Boden mit Glasperlen bedeckt

¹ http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi

² Quelle: <http://www.stw-freising.de/index.php?id=53>

ist. Diese Glasperlen verhindern, dass die Elterntiere die Eier nach der Befruchtung auffressen, da sie diese zwischen den Perlen nicht mehr finden können. Nach 48 Stunden werden die Elterntiere wieder in das Hälterungsbecken zurückgesetzt. Drei Tage später schlüpfen die Jungfische und werden mit Staubfutter (fein gemahlenes Flockenfutter und getrocknete Mückenlarven) versorgt. Fünf Tage nach der Befruchtung sind die Jungfische in der Lage, frei zu schwimmen. Nach drei Monaten erlangen die Tiere Geschlechtsreife.

Exposition der Zebrafische mit den Chemikalien

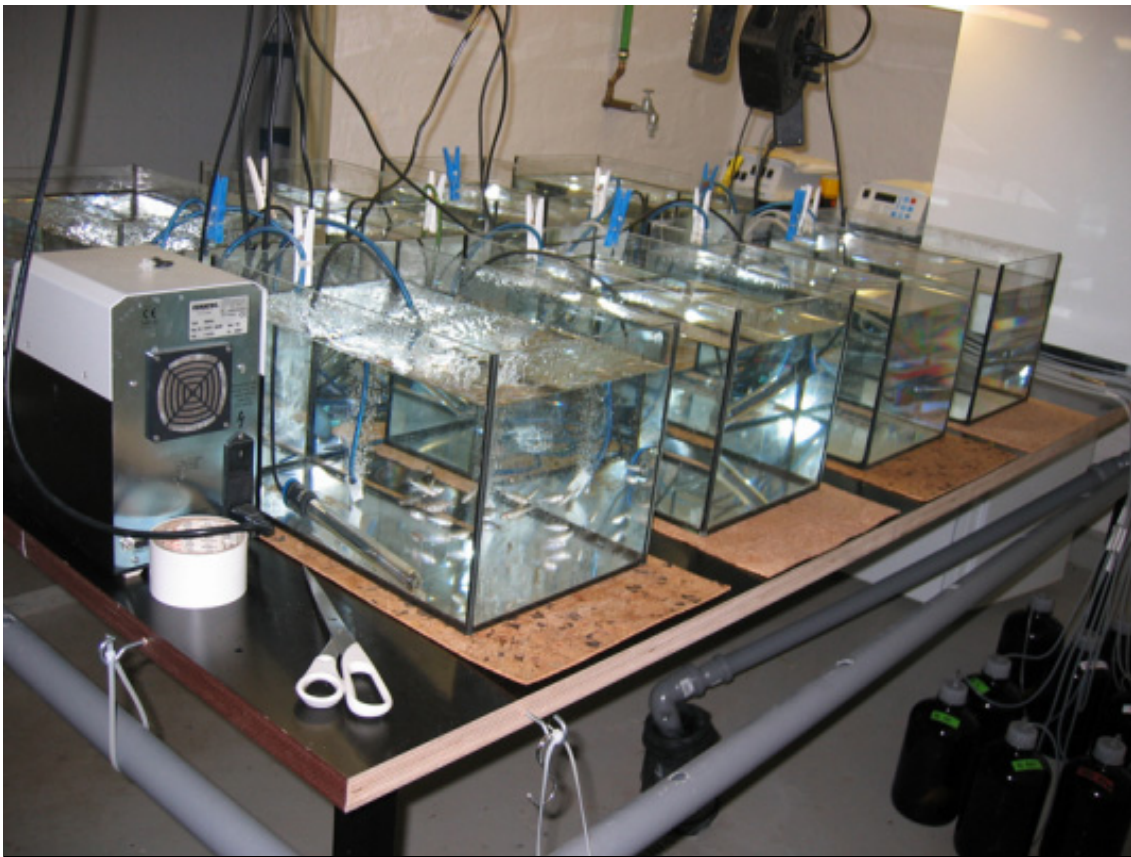


Abb. 4: Expositionsaufbau

Bis zu 12 Versuchstiere werden in 20 l Becken umgesetzt, die unter ständigem Wasserdurchlauf stehen. Eine Peristaltikpumpe pumpt 21 ml/min Wasser aus einem beheizten Vorratsbecken in jedes Becken, eine weitere Pumpe pumpt das Wasser an einer anderen Stelle im Aquarium wieder ab. So wird ein ständiger Wasserwechsel und eine gleich bleibende Wasserqualität gewährleistet.

Eine dritte Pumpe pumpt die in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ gelösten Chemikalien aus 2,5 l Braunglasflaschen, die in Kühlschränken bei 4°C aufbewahrt werden, in die Aquarien. Die

Pumprate und die Konzentration in den Vorratsflaschen sind so eingestellt, dass die gewünschte Endkonzentration in jedem Becken gehalten wird und jede Flasche nach 72 Stunden erneuert werden muss. Sämtliche verwendeten Schläuche bestehen aus dem Material „Silikon 3350 (Platinum)“. Dieser Platin-ausgehärtete Silikonschlauch mit einer ultraglaten Innenfläche reduziert die Partikelbindung und gibt keine Weichmacher an das Wasser ab. Zu Beginn der Exposition wird die berechnete Chemikalienkonzentration im Becken durch Zugabe der entsprechenden Menge aus der Stammlösung erreicht. Ein Heizstab hält die Temperatur auf 24°C, eine Luftpumpe versorgt durch einen Sprudelstein das Wasser mit Sauerstoff. Die Beleuchtungsdauer beträgt 12 h am Tag. Die Endkonzentrationen der jeweiligen Expositionen betragen:

BPA: 0,1 / 2 / 20 / 200 / 400 / 1.000 / 2.000 µg/l.

E2: 1 / 10 / 100 / 200 / 300 / 400 / 500 ng/l.

Genstein: 1 / 10 / 100 / 500 / 1.000 / 5.000 µg/l.

NP: 1 / 5 / 10 / 50 / 100 / 250 / 500 µg/l.

EE2: 30 ng/l (als Positiv-Kontrolle).

Als Negativ-Kontrolle dienen Becken, denen H_2O_{dd} anstelle einer Testsubstanz zugesetzt wird.

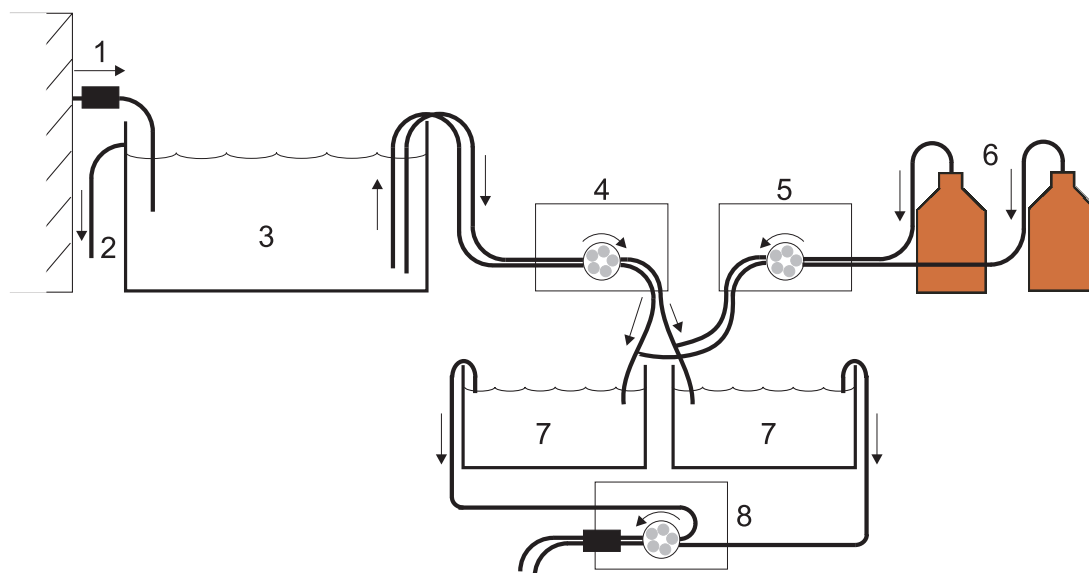


Abb. 5: Schematische Darstellung der Expositionsanlage. 1: Frischwasserzulauf mit Aktivkohlefilter; 2: Überlauf; 3: Beheiztes Vorlaufbecken; 4: Peristaltikpumpe für Frischwasserzulauf; 5: Peristaltikpumpe zum Zudosieren der Chemikalien; 6: Flaschen mit Chemikalienlösungen; 7: Expositionsbecken; 8: Peristaltikpumpe für das Abpumpen des Wasser in einen Aktivkohlefilter.

Das kontaminierte Wasser passiert, bevor es in die Kanalisation gelangen kann, einen Aktivkohlefilter, der die Chemikalien bindet.

Am Ende der Exposition werden die Fische entnommen, betäubt, getötet, einzeln in Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und sofort weiter verwendet, um eine ausreichende Qualität der RNA zu gewährleisten.

2.2.2 Konzentrationsmessungen mit dem Enzyme-Linked Receptor Assay (ELRA)

Die E2-Konzentrationen in den Expositionsbecken werden bei mehreren Expositionen mit dem *Enzyme-Linked Receptor Assay* (ELRA) gemessen. Dieser Assay entspricht prinzipiell einem indirekten, kompetitiven Enzymimmunoassay (ELISA), wobei statt des Primärantikörpers der humane Oestrogenrezeptor verwendet wird (Seifert et al., 1999). Abb. 6 stellt den Ablauf schematisch dar:

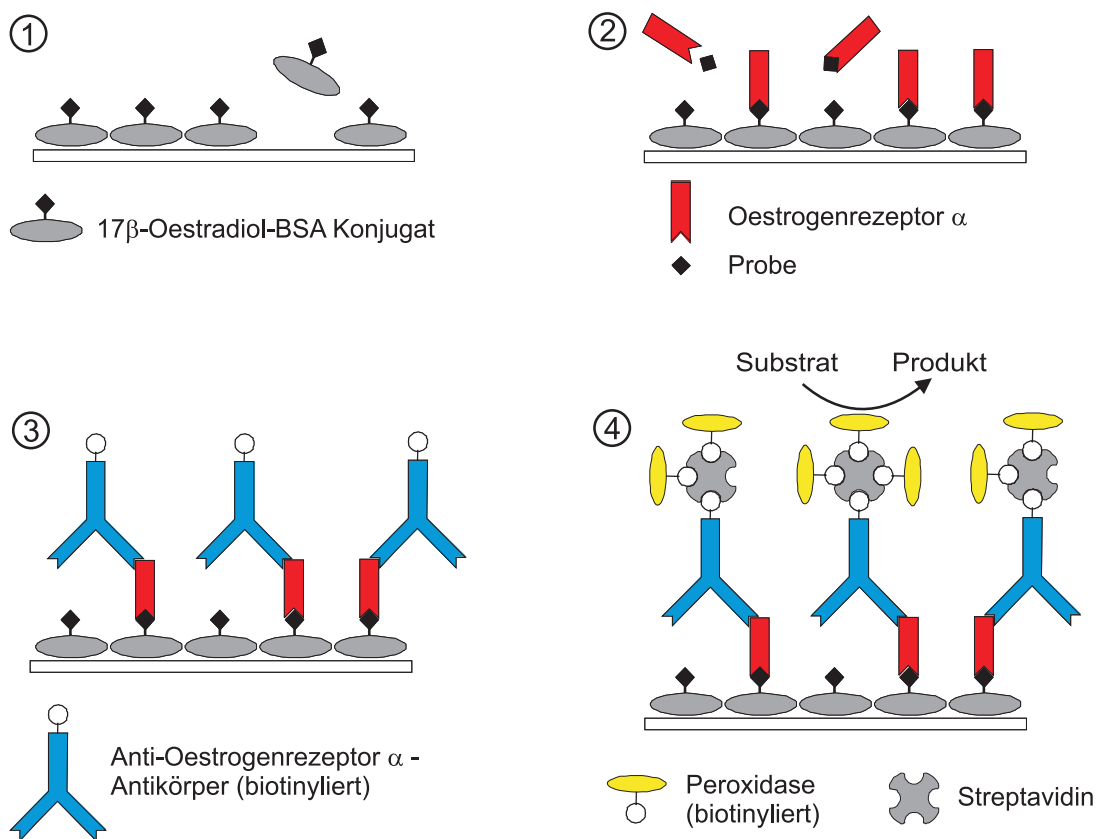


Abb. 6: Schematische Darstellung des ELRA. 1: Beschichten der festen Phase mit 17β -Oestradiol-BSA Konjugat. 2: Rezeptorreaktion. 3: Binden des biotinylierten Anti-Oestrogenrezeptor- α -Antikörper an den Oestrogenrezeptor. 4: Einbringen des Streptavidin-Biotin-Verstärkersystems mit anschließender Substratreaktion.

Die einzelnen Arbeitsschritte sind: ① Eine 96er-Mikrotiterplatte wird über Nacht bei 4°C mit 150 µl 17β-Oestradiol-BSA-Konjugat in Carbonat-Puffer (0,67 µg/ml) beschichtet. Am Morgen des nächsten Tages werden durch Zugabe von 300 µl Blockierungslösung und einer Inkubation von 2h die freien Bindungsstellen blockiert, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Im nächsten Schritt findet die Rezeptorreaktion statt ②. Dafür wird eine 17β-Oestradiol Kalibrationsreihe in Konzentrationen von 0,01 – 1.000 µg/L erstellt. Von diesen Lösungen bzw. von den genommenen Wasserproben werden je Kavität 100 µl in Triplikaten auf die Platte aufgetragen. Dazu werden 100 µl der Oestrogenrezeptor-Lösung in einer Verdünnung von 1:1.000 in PBSE-Puffer je Kavität pipettiert und für 1 ½ h inkubiert. Zwischen dem an der Platte gebundenen Oestradiol-Konjugat und dem freien Oestradiol in der Kavität findet nun die Konkurrenz um die freien Rezeptorbindungsstellen statt. Hierbei gilt: Je mehr freier Ligand in der Lösung vorhanden ist, desto mehr Rezeptor wird in Lösung gebunden und desto weniger Rezeptor kann an das Konjugat an der Festphase binden. 200 µl eines monoklonalen, gegen den humanen Oestrogenrezeptor α gerichteten Antikörpers (1:500 in PBS) wird im dritten Schritt aufgetragen und 30 min inkubiert ③. Der Antikörper ist biotinyliert, um im nächsten Schritt das Streptavidin-Biotin Verstärkersystem binden zu können ④. Dieses Verstärkersystem besteht aus einer Lösung aus Streptavidin (10 ng/ml) und Biotin-POD (2,5 ng/ml) in PBS und muss 30 min vorinkubieren, damit sich ein Komplex bilden kann. Danach werden 200 µl in die Kavitäten pipettiert und wiederum 1 h inkubiert. Im letzten Schritt findet die Substratreaktion statt. Dabei wird in ca. 20 min das chromogene Substrat von der Peroxidase umgesetzt. Substrat in Kavitäten, in denen Proben mit niedrigen Konzentrationen waren und viel Rezeptor an die feste Phase binden konnte, wird blau. Durch das Abstoppen der Substratreaktion mittels 2 N Schwefelsäure, entsteht die letztendlich gelbe Farbe, die im Plattenphotometer bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen wird. Eventuell erhöhte Absorptionswerte durch unspezifische Trübungen werden mittels einer Referenzmessung bei 620 nm eliminiert. Zwischen allen Schritten wird ein Waschschrift durchgeführt, um ungebundene Substanzen zu entfernen. Gewaschen wird je 3x mit je 350 µl PBS-Waschpuffer. Soweit nicht anders erwähnt, finden sämtlich Inkubationsschritte bei Raumtemperatur auf einem Schüttler statt.

2.2.3 Isolierung von RNA

Die getöteten Fische werden vorsichtig mit einer Schere am Bauchraum aufgeschnitten. Die Leber wird entnommen und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Die Probe wird sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -70°C gelagert. Für das Arbeiten mit RNA werden ausschließlich zertifiziert RNase-freie Materialien verwendet.

Die RNA-Extraktion aus dem Lebergewebe erfolgt mittels des TRI REAGENT™ RNA Isolierungssystems von Sigma. Zunächst werden die gefrorenen Proben mit 1 ml TRI REAGENT™ versetzt. Es werden 3 Glasperlen hinzugegeben und 10 min in der Schwingmühle bei voller Leistung homogenisiert. Alle weiteren Schritte erfolgen nach Anleitung des Herstellers.

Diese Isolierungsmethode beruht auf einer Phenolisierung. TRI REAGENT™ enthält Guanidin-Thiocyanat und Phenol. Guanidin-Thiocyanat denaturiert Proteine, also auch Zellwände und inhibiert RNasen. Nach der Zugabe von Chloroform wird zentrifugiert. Hierbei kommt es zu einer Phasentrennung. In der wässrigen Phase befindet sich die gelöste RNA, in der Interphase die DNA, die untere organische Phase enthält die Proteine. Um die erhaltenen Phasen besser zu trennen, wird zudem Phase Lock Gel verwendet, das sich beim Zentrifugieren zwischen die wässrige Phase und die Interphase Phase legt und eine feste Zwischenschicht bildet. Der Phenolisierungsschritt wird zwei Mal wiederholt. So wird die Reinheit der RNA erhöht.

Nach dem Fällen der RNA mit Isopropanol wird diese zweimal mit 75 %igem Ethanol gewaschen, und das erhaltene RNA-Pellet wird in der SpeedVac getrocknet. Anschließend wird die RNA in 300 μl DEPC- $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ im Wasserbad bei 65°C gelöst. 0,5 μl RNase Inhibitor schützen die empfindliche RNA vor Degradation. Die RNA wird 1:20 in DEPC- $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ verdünnt und bei 260 nm im Spektrophotometer quantifiziert. Eine Absorption von 1 entspricht 40 μg RNA pro ml. Parallel wurde die Verunreinigung mit Proteinen über die OD bei 280 nm bestimmt. Das Verhältnis der Absorptionswerte bei einer Wellenlänge von 260 nm zu 280 nm beschreibt die Reinheit der Gesamt-RNA und soll zwischen 1,8 und 2,1 liegen. Schließlich werden die 28S und 18S rRNA-Banden in einem Agarosegel kontrolliert. Die so gewonnene Gesamt-RNA kann über einen langen Zeitraum bei -70°C gelagert werden und übersteht auch mehrere Auftau- und Einfriervorgänge ohne messbare Verluste.

2.2.4 Gelelektrophorese

RNA-Elektrophorese

0,5 g Agarose wird in 50 ml 1x MOPS gelöst. Dies geschieht durch kurzes Aufkochen in der Mikrowelle. Nach dem Abkühlen auf ca. 45°C werden 3 µl Ethidiumbromid (1 %) und 1,5 ml Formaldehyd (37,5 %) hinzu gegeben, und das Gel wird in einen Gelschlitten mit Kamm gegossen, wo es in etwa 20 min fest wird. 3 µl RNA Probe werden mit 6 µl RNA-Probenpuffer und 1 µl Ladepuffer vermischt. Formamid und Formaldehyd im RNA-Probenpuffer und im Agarosegel denaturieren und lösen die Sekundärstrukturen der RNA auf. Als Laufpuffer dient 1 x MOPS. Nach 30 min bei einer Spannung von 100 V wird das Gel aus der Kammer genommen und ausgewertet. Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basen und wird durch UV-Strahlung angeregt, wodurch die RNA-Banden sichtbar werden.

DNA-Gelelektrophorese

0,5 g Agarose wird in 50 ml 1x TBE gelöst. Dies geschieht durch kurzes Aufkochen in der Mikrowelle. Nach dem Abkühlen auf ca. 45°C werden 3 µl Ethidiumbromid (1%) hinzu gegeben und das Gel in einen Gelschlitten mit Kamm gegossen, wo es nach etwa 20 min fest ist. 9 µl PCR-Produkt und 1 µl 10x Ladepuffer werden gemischt und in die Taschen gefüllt. Auf jedes Gel wird zusätzlich in mind. eine Tasche 5 µl Marker pipettiert. Als Laufpuffer dient 1 x TBE. Nach 45 min bei einer Spannung von 100 V wird das Gel aus der Kammer genommen und ausgewertet. Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basen und wird unter UV-Strahlung angeregt, wodurch die DNA-Banden sichtbar werden.

2.2.5 Reverse Transkription (RT)

Bei der Reversen Transkription (RT) wird die mRNA in cDNA (complementary DNA) umgeschrieben. Oligo-(dT)₁₅ Primer erkennen das 3'-Ende der Poly(A)-mRNA und dienen als Startpunkt für die Reverse Transkriptase. Pro Ansatz werden 2 µg RNA in 8,2 µl DEPC-H₂O_{dd} eingesetzt. Der Reaktionsansatz einer Probe ist nach Anleitung des Herstellers in folgender Tabelle aufgeführt:

Tabelle 1: Reaktionsansatz für die Reverse Transkription

Reagenz	Volumen pro Probe	Endkonzentration
10 x Reaktionspuffer	2 µl	1 x
25 mM MgCl ₂	4 µl	5 mM
10 mM dNTPs	2 µl	1 mM
Oligo-(dT)15 Primer	2 µl	1,6 µg
RNase Inhibitor	1 µl	50 units
AMV Reverse Transkriptase	0,8 µl	20 units
RNA in DEPC-H ₂ O _{dd}	8,2 µl	2 µg
Endvolumen	20 µl	

Die Ansätze werden im Thermocycler zunächst 10 min bei 25°C inkubiert. Hierbei binden die Primer an die mRNA. Darauf folgt bei 42°C (Temperaturoptimum der AMV Reversen Transkriptase) die RT. Die Synthesephase dauert 1 h. Im Anschluss wird das Enzym 5 min bei 99°C denaturiert, um eventuelle Interferenzen mit anderen Reagenzien im späteren Versuchsverlauf zu unterbinden. Schließlich werden die Proben auf 4°C abgekühlt und bis zum Einsatz im LightCycler bei -20°C gelagert.

2.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Kontrolle der erhaltenen cDNA wird ein Aliquot zunächst amplifiziert. Hierbei kann z.B. die Qualität überprüft werden oder festgestellt werden, ob die Expression eines Zielgens stattgefunden hat. Um die Qualität der cDNA zu überprüfen, werden sog. Housekeeping-Gene amplifiziert. Housekeeping-Gene werden in jeder Zelle konstant exprimiert und sind daher in jeder Probe vorhanden.

Der PCR-Ansatz pro Probe sieht folgendermaßen aus:

Tabelle 2: Reaktionsansatz der PCR

Reagenz	Volumen pro Probe	Endkonzentration
10 x PCR-Puffer	2,5 µl	1 x
50 mM MgCl ₂	1,25 µl	2,5 mM
10 mM dNTPs	1,25 µl	500 µM
DMSO	1 µl	4 %

Taq-Polymerase, 5 U/ μ l	0,5 μ l	0,1 U/ μ l
Primer forward/revers (100 pmol/ μ l)	je 0,25 μ l	1 μ M
cDNA Template	1 μ l	
H ₂ O _{dd} (molecular biology grade)	17 μ l	
Endvolumen	25 μ l	

Zunächst wird die cDNA zwei min bei 94°C denaturiert. Daraufhin folgen 30 Zyklen, bestehend aus Denaturierung (94°C, 15 s), Annealing der Primer (54°C, 20 s) und Elongationsphase (68°C, 45 s). Der letzte Zyklus endet mit einer Elongationsphase von 10 min. Die PCR-Produkte werden mittels DNA-Agarosegel ausgewertet.

2.2.7 One-Step RT-PCR

Die One-Step RT-PCR ist eine geeignete Methode zum schnellen Screenen der erhaltenen RNA Proben auf Funktionalität der RNA und Expression der Zielgene. Wie der Name schon sagt, werden hierbei zwei Schritte zu einem Schritt zusammengefasst; die Reverse Transkription und die anschließende PCR erfolgen im gleichen Ansatz. Pro Ansatz werden 2 μ g RNA in 5 μ l DEPC-H₂O_{dd} eingesetzt. Der Reaktionsansatz für eine Probe setzt sich nach Herstellerangaben folgendermaßen zusammen:

Tabelle 3: Reaktionsansatz der One-Step RT-PCR

Reagenz	Volumen pro Probe	Endkonzentration
10 x RT _{plus} PCR-Puffer + Mg ²⁺	2 μ l	1 x; 2,5 mM Mg ²⁺
10 mM dNTPs	0,4 μ l	200 μ M
cMaster RT Enzyme	0,25 μ l	0,15 U/ μ l
cMaster PCR Enzyme Mix	0,2 μ l	0,04 U/ μ l
Prime RNase Inhibitor Solution	0,2 μ l	0,01 U/ μ l
Primer forward / revers (100 pmol/ μ l)	je 0,25 μ l	1,25 μ M
RNA in DEPC-H ₂ O _{dd}	5 μ l	2 μ g
H ₂ O _{dd} (molecular biology grade)	11,45 μ l	
Endvolumen	20 μ l	

Die Proben werden gut durchmischt und unter folgenden Bedingungen im Thermocycler inkubiert:

Tabelle 4: Programm Parameter für die One-Step RT-PCR

Reverse Transkription	50°C	50 min
Denaturierung	94°C	2 min
Zyklenzahl	30 x	
Denaturierung	94°C	15 s
Annealing	54°C	20 s
Elongation	68°C	45 s

Anschließend werden die Proben auf Raumtemperatur gekühlt, auf ein DNA-Agarosegel aufgetragen und ausgewertet.

2.2.8 RT zur Fluoreszenzmarkierung von cDNA

Wie bei der Reversen Transkription (RT) wird die mRNA in cDNA umgeschrieben. Dabei werden fluoreszenzmarkierte dCTPs (CyDye™ dCTPs) in die cDNA eingebracht. Zum unterschiedlichen Markieren von Test- und Kontrollorganismus werden zwei Fluoreszenzfarbstoffe, Cy3 und Cy5, verwendet. Je die Hälfte der exponierten bzw. Kontrollproben wird mit Cy3 markiert und die andere mit Cy5. Dieser Wechsel des Farbstoffes wird durchgeführt, um auszuschließen, dass der unterschiedliche Einbau der unterschiedlich markierten Nukleotide ein falsches Signal liefert.

Pro Ansatz werden 45 µg Gesamt-RNA in einem Volumen von 12 µl eingesetzt. Da die ursprüngliche Konzentration der RNA wesentlich geringer ist, wird sie zuerst aufkonzentriert. Dies erfolgt nach Herstellerangaben mit dem RNeasy MinElute Cleanup Kit. 45 µg RNA werden an eine Silicamembran gebunden, gewaschen und anschließend mit Wasser eluiert. Das gesamte Eluat wird nun für die RT mit dem CyScribe First-Strand cDNA Labelling Kit eingesetzt. Dabei wird wiederum nach Herstellerangaben vorgegangen. Zuerst erfolgt das Primer Annealing, dazu wird die konzentrierte RNA mit 1 µl anchored oligo(dT) Primer vermischt und 5 min bei 70°C, danach 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ansatz wird auf Eis gestellt, und die weiteren Komponenten werden wie in Tabelle 5 beschrieben dazu pipettiert.

Tabelle 5: Reaktionsansatz für die CyDye RT

Reagenz	Volumen pro Probe
5 x Reaktionspuffer	4 μ l
0,1 M DTT	2 μ l
dCTP nucleotide mix	1 μ l
CyDye markierte dCTPs	1 μ l
CyScript Reverse Transkriptase	1 μ l
Endvolumen	20 μ l

Die Ansätze werden zum Umschreiben in cDNA im Thermocycler 90 min bei 42°C inkubiert. Anschließend wird die verbleibende mRNA durch Zugabe von 2 μ l 2,5 M NaOH und einer Inkubation für 15 min bei 37°C, denaturiert. Der pH wird mit 10 μ l 2 M HEPES wieder neutralisiert.

Die nun fluoreszenzmarkierte cDNA muss von überschüssigem Farbstoff und Primer gereinigt werden. Mittels des CyScribe GFX Purification Kits wird nach Herstellerangaben die cDNA an die Silicamembran in den Säulchen gebunden, mehrmals gewaschen und mit Elutionspuffer eluiert. Danach wird in der Speed-Vac das Wasser entzogen und die getrockneten Proben werden bei -20°C gelagert.

2.2.9 Microarrays

Zehn männliche Zebrafische aus folgenden Konzentrationen werden für Microarray-Experimente verwendet: E2 500 ng/l, BPA 1.000 μ g/l und Genistein 5.000 μ g/l, zusätzlich je zehn nicht-exponierte Kontrolltiere. Dies ergibt eine Gesamtzahl von 60 Microarray-Experimenten.

Die RNA-Extraktion erfolgt wie oben beschrieben. Um eine kompetitive Hybridisierung auf Zwei-Farben-Microarrays zu ermöglichen, werden 45 μ g RNA jeder Probe entsprechend dem Protokoll (vgl. 2.2.8) revers transkribiert. Die cDNA wird in diesem Schritt gleichzeitig mit Cy3- bzw. Cy5-markierten Nukleotiden versehen. Um dem unterschiedlichen Einbau der unterschiedlich markierten Nukleotide Rechnung zu tragen, werden bei 5 der 10 Arrays jeder Konzentration Cy3-markierte Nukleotide für die Kontrollproben und Cy5-markierte für die exponierten Proben verwendet. Für die zweite Hälfte der Arrays jeder Konzentration wurde die Farbmarkierung umgedreht. Die markierte cDNA wird in 120 μ l Hybridisierungspuffer gelöst und eine kompetitive

Hybridisierung der exponierten und Kontrollprobe auf dem Gesamtgenomchip durchgeführt. Auf diesen Chips sind 14.067 Sonden, also Oligonukleotide mit einer Länge von 50 Basen, immobilisiert, die den bis dato sequenzierten open reading frames (ORFs) des Zebrafährblings entsprechen. Diese ORFs setzen sich aus Sequenzen zusammen, deren Funktion im Zebrafährbling bereits beschrieben wurde (expressed transcripts, ETs) oder in anderen Organismen beschrieben wurde (tentative consensus sequences, TCs).

Die Hybridisierung wird nach dem Protokoll der *Zebrafish 14k OciChipTM* (Ocimum Biosolutions) durchgeführt. Ein Kunststoffrahmen und die Hybridisierungskammern schützen beim Hybridisieren die Sonden und die markierte cDNA. Die Hybridisierung erfolgt in einem Hybridisierungsöfen bei 42°C für 18 h. Anschließend folgen 3 Waschschrirte, bei denen die Objektträger nacheinander in Waschpuffer 1, 2 und 3 kurz gewaschen und dann zum Trocknen bei 1500 rpm für 4 min zentrifugiert werden. Um die Fluoreszenz der nun hybridisierten und markierten cDNA nicht abzuschwächen, werden die Microarrays bis zum Scannen lichtgeschützt gelagert. Schließlich werden die Microarrays im Arrayscanner (Abb. 7) bei den Wellenlängen 532 und 635 nm gescannt. Die verschiedenen Wellenlängen sind nötig, um die zwei verschiedenen Farbstoffe anzuregen. Bei 532 nm wird die Fluoreszenz der Cy3-dCTPs und bei 635 nm die der Cy5-dCTPs angeregt.



Abb. 7: Affymetrix Array Scanner.

Die gemessenen Fluoreszenzen werden nun in TIFF-Dateien abgespeichert und die verschiedenen Bilder zur Auswertung übereinander gelegt, wobei den Kontrollproben immer die grüne Farbe und den exponierten Proben immer die rote Farbe zugewiesen wird.

Somit ergibt sich bei der Auswertung der übereinander gelegten Dateien folgender Farbcode: rotes Signal: dieses Gen wurde im exponierten Tier stärker exprimiert als im Kontrolltier, die Chemikalie verstärkte die Expression; grünes Signal: dieses Gen wurde im Kontrolltier stärker exprimiert, die Chemikalie verringerte die Expression; gelbes Signal: dieses Gen erfuhr keine Veränderung in der Expression durch die Chemikalie; kein Signal: dieses Gen wurde nicht exprimiert.

Auswertung

Die Bilder der Microarrays werden mit der Microarray Analysis Software ImaGene 5.0 (BioDiscovery) ausgelesen. Zunächst wird ein Gitter aus Punkten um die einzelnen Sonden gelegt, so dass jede Sonde als einzelner Punkt oder Spot gesehen wird - das Grid entspricht also der Anordnung der immobilisierten Sonden (vgl. Abb. 21, S. 59). Nachdem nun jeder Spot in Größe und Form erfasst ist, werden die Leuchtintensität jedes Spots und die des Hintergrunds, also der Fläche, auf der sich kein Spot befindet, erfasst. Jeder einzelne Spot wird in Pixel aufgeteilt, wobei die Anzahl und die Stärke der Fluoreszenz jedes Pixels zusammengenommen die hybridisierte cDNA Menge repräsentiert. Nachdem ein unterschiedlich starkes Hintergrundsignal der einzelnen Arrays aufgrund der verwendeten Chemikalien und der eventuellen Unregelmäßigkeiten im Glas des Objektträgers erwartet wird, wird das durchschnittliche Hintergrundsignal als der Mittelwert der Leuchtintensitäten der Pixel zwischen den Spots definiert. Mittels der Gene ID werden die Sonden den entsprechenden Spots zugeordnet, d.h. jeder Spot lässt sich nun einer Sonde und somit einem ORF zuordnen.

Die Methode der Datenauswertung hängt vor allem von der Anzahl der Sonden auf dem Microarray ab, da eine Normalisierung der Daten erforderlich ist. Zweck der Normalisierung ist es, Variationen durch die Versuchsanordnung zu minimieren und diese nicht als einen durch die Exposition verursachten Effekt zu werten. Dazu gehören der unterschiedlich gute Einbau der verschiedenen markierten Nukleotide, wie auch deren Verhalten beim Scannen. Bei Gesamtgenom-Arrays erfolgt die Normalisierung über die gesamte Anzahl von Signalen auf dem Array, da davon ausgegangen werden kann, dass

die Mehrzahl der an die Sonden bindenden ORFs nicht reguliert wird („most genes unchanged setting“) und sich somit bei diesen die Signalintensität nicht ändert.

Für jede Substanz wird ein Datensatz generiert, der zehn Hybridisierungen bei 14067 Sonden umfasst. Die Datenverarbeitung erfolgt dabei mit der Statistik-Programmiersprache R (Ihaka et al., 1996; Gentleman et al., 2004). Diese, auf den Computersprachen C, C++ und Fortran basierende Programmiersprache wird benutzt, um den Mittelwert der Intensitäten der Hintergrund-Pixel von dem Mittelwert der einzelnen Spot-Pixel Intensitäten abzuziehen. Bei Spots, bei denen das Hintergrundsignal das Intensitätssignal übersteigt, ergeben sich negative Werte. Durch Berechnung des Logarithmus zur Basis 2 (\log_2) für alle Expressionswerte werden aus diesen negativen Werten sog. NAs (not applicable, nicht verwendbare) generiert. Für jeden Datensatz wird eine Statistik über die Anzahl der NAs zu jeder Sonde erstellt. Bei mehr als vier NAs der zehn Microarrays zu einer Sonde wird diese aus dem Datensatz entfernt. Bei bis zu vier NAs werden die eventuell fehlenden Werte mit Hilfe des transcan algorithm (Little et al., 1987) kalkuliert, da eine zuverlässige Statistik nur über die gleiche Anzahl von Proben, in diesem Falle 10, durchgeführt werden kann. Dieser Algorithmus geht von einer symmetrischen Verteilung der Werte aus und ersetzt fehlende Werte durch Werte, die dieser Verteilung entsprechen.

Nun werden die Daten normalisiert. Es erfolgt eine Intra- und Interchip-Normalisierung. Bei der Intrachip-Normalisierung (Normalisierung auf einem Microarray) werden die Intensitäten von Cy3 gegen die zugehörigen Intensitäten von Cy5 nach einer nicht-linearen Methode normalisiert (scatterplot smoother lowess nach Cleveland, 1979). Durch dieses Verfahren wird die Verteilung der Daten „geglättet“, um zu starke Signale, die z.B. durch Verunreinigungen oder unterschiedlichen Einbau der Markierungen entstehen können, abzuschwächen. Bei der Interchip-Normalisierung (Normalisierung zwischen den Microarrays) erfolgt eine Einstellung beider Kanäle auf den gleichen Mittelwert und die gleiche Varianz nach linearer Methode.

Die normalisierten Daten werden dann statistisch ausgewertet. Dabei werden für jede Sonde zwei Werte berechnet: der mean fold change (f.c.) sowie der p-value. Der mean fold change beschreibt den tatsächlich gemessenen Unterschied zwischen exponiertem und Kontrolltier als n-fache Änderung des Mittelwertes der gemessenen Fluoreszenzintensität. Der p-value (p-Wert) wird durch einen statistischen Test (Student's 1-sample t-test) berechnet und gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der Kontrollproben sich von den exponierten Proben unterscheiden. Bei einem p-Wert von

0,05 liegt die Wahrscheinlichkeit, dass sich die exponierten Proben aufgrund der Exposition und nicht zufällig von den Kontrollproben unterscheiden bei 95%, bei $p = 0,01$ bei 99%. Durch die Kombination von p-value und mean fold change werden die Sonden ausgewählt, die durch die oestrogenen Substanzen reguliert werden. Der p-value wird für die Selektion auf $< 0,05$ und der mean fold change auf > 2 gesetzt.

Innerhalb dieses Ansatzes werden 14.067 Sonden getestet. Jede einzelne Sonde muss auf 10 einzelnen Arrays getestet werden. Um diese Datenmenge bewältigen zu können, wird eine Permutationsberechnung durchgeführt. Diese erlaubt eine Abschätzung der Anzahl von falsch Positiven, also Sonden, die als reguliert erscheinen, es aber nicht sind, in der Kandidatenliste. Für jeden Datensatz werden alle $\frac{1}{2} \times \binom{10}{5} = 126$ informativen Permutationen der Sonden durchgeführt und die Anzahl der regulierten Sonden für oben genannte Grenzwerte berechnet. Anschließend wird die False Discovery Rate (FDR) abgeschätzt. Diese ist der Quotient aus der durchschnittlichen Anzahl von Sonden, die über die permutierten Daten selektiert wurden (n_{exp} ; number of expected, Anzahl statistisch erwarteter) und der Anzahl von Sonden, die eine tatsächliche Antwort zeigen (n_{obs} ; number of observed, Anzahl beobachteter):

$$\text{FDR} \approx n_{\text{exp}} / n_{\text{obs}}$$

Außerdem wird die statistische Signifikanz für die selektierten n_{obs} über die Nullverteilung, die über die Permutationen generiert wurde, abgeschätzt.

So wird eine Liste mit regulierten expressed transcripts (ETs) und tentative consensus sequences (TCs) erstellt. Dann erfolgt eine Zuordnung der ETs und TCs zu Proteinen, die in einem biologischen Prozess entsprechend der Gen-Ontologie-Datenbank¹ beteiligt sind. Die Zuordnung erfolgt dabei mit Hilfe der Datenbank des Zebrafish Information Network², die dem GO Konsortium zur Verfügung gestellt wurde. Ein Abgleich dieser Zuordnung erfolgt abschließend mit der „Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, DAVID“ (Dennis et al., 2003)³.

¹ <http://www.geneontology.org/>

² http://zfin.org/cgi-bin/webdriver?MIval=aa-ZDB_home.apg

³ <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>

2.2.10 Quantitative PCR

Das LightCycler[®]-System ist ein sehr schnelles Real-time PCR-System und dient zur relativen Quantifizierung der Expression eines bestimmten Gens. In diesem Fall ist eine absolute Quantifizierung nicht notwendig, da die Expression eines Gens in Geweben aus exponierten Tieren mit Kontrolltieren verglichen werden soll.

Die Probenvorbereitung findet unter der Sterilbank statt. Die cDNA-Proben werden mit DEPC-H₂O_{dd} 1:20 verdünnt. Die Kalibrator-cDNA besteht aus der gepoolten cDNA aus Lebergewebe von vier adulten Zebrabärbling-Weibchen. Sie wird ebenfalls verdünnt, in 10 µl Aliquots aufgeteilt und bei -20°C gelagert. Dadurch wird ein Verlust von cDNA durch wiederholtes Auftauen und Einfrieren vermieden. Die Primer werden 1:10 vorverdünnt, zu je 100 µl aliquotiert und ebenfalls bei -20°C gelagert. Der Mastermix für die PCR-Versuche wird wie folgt vorbereitet: 10 µl H₂O_{dd}, 1 µl Forward-Primer, 1 µl Reverse-Primer und 4 µl Fast Start DNA Master SYBR[®] Green I (Roche) werden angesetzt. In jede Kapillare werden 16 µl Mastermix und 4 µl der verdünnten cDNA pipettiert. Von jeder Expositionskonzentration werden 4 bzw. 9 verschiedene Proben je zwei Mal gemessen. Zudem werden bei jedem qPCR Lauf eine Kalibratorprobe und eine Negativkontrolle mitgeführt. Verschiedene PCR-Läufe werden durch einen Kalibrator miteinander vergleichbar. Zielgen bei allen qPCR Messungen ist *vtg1*. Als Referenzgen dient *ef1α* für die Proben der E2-Exposition und *β-aktin* für die Proben der BPA-, NP- und Genistein-Expositionen, da die Expression des *β-aktin* durch E2 beeinflusst wird (Yadatie et al., 2001).

Die Ergebnisse der Microarray-Experimente zeigten, dass auch das für die Glyceraldehyde-3-Phosphat Dehydrogenase (*gapdh*) kodierende Gen durch BPA in seiner Expression reguliert wird. Aus diesem Grunde werden die Expressionsraten der Referenzgene *ef1α*, *β-aktin* und *gapdh* in BPA Proben untersucht und miteinander verglichen.

Je nach Größe des amplifizierten Gens und der Schmelztemperatur der zugehörigen Primer werden verschiedene PCR-Programme verwendet, um annähernd optimale PCR Bedingungen zu gewährleisten und somit eine hohe PCR Effizienz zu erhalten. Eine Übersicht der verwendeten PCR-Programme zeigt Tabelle 6.

Tabelle 6: Protokolle der verwendeten PCR-Programme

Primerkombination	<i>ef1a</i> / <i>vtg1</i>	β - <i>aktin</i> / <i>vtg1</i>	<i>gapdh</i> / β - <i>aktin</i>
Präinkubation	95°C 10 min	95°C 10 min	95°C 10 min
Zyklenzahl	40 x	40 x	40 x
Denaturierung	95°C 0 s	95°C 0 s	95°C 0 s
Annealing	56°C 5 s	56°C 5 s	54°C 5 s
Elongation	72°C 9 s	72°C 10 s	72°C 11 s

Während der Präinkubationsphase wird die FastStart DNA-Polymerase aktiviert und die cDNA denaturiert. In der darauffolgenden, 40 Zyklen währenden Quantifizierungsphase wird die DNA amplifiziert und gleichzeitig der Farbstoff SYBR Green I implementiert. SYBR Green I bindet an doppelsträngige DNA. Der daraus resultierende DNA-Farbstoff-Komplex absorbiert blaues Licht bei $\lambda_{\max} = 498$ nm und emittiert grünes Licht bei $\lambda_{\max} = 522$ nm. Die Emission wird automatisch am Ende jedes Zykluses gemessen. Nach der qPCR wird zusätzlich eine Schmelzkurve zur Bestimmung der Schmelztemperatur und Identifikation der PCR-Produkte erstellt. Hierzu werden zunächst alle Proben durch Erhitzen auf 95°C denaturiert. Dann wird für zwei Minuten auf 60°C gekühlt. Die komplementären DNA Stränge hybridisieren wieder. Während das Gerät schrittweise mit 0,1°C/s auf 95°C heizt, schmilzt die doppelsträngige DNA, was mit einer kontinuierlichen Abnahme der Fluoreszenz einhergeht. Aus dieser kann dann die jeweilige Schmelztemperatur ermittelt werden.

Die Berechnung der Crossing-Punkte (CP) und Schmelztemperaturen der PCR-Produkte erfolgt über die LightCycler® Software 3.5 (Roche). Die Fluoreszenzsignale der einzelnen Proben während der Quantifizierung ergeben eine Kurve. Auf der Abszisse ist die Zykluszahl aufgetragen, auf der Ordinate die Fluoreszenz. Die Funktion der Kurve kann näherungsweise durch logistisches Wachstum beschrieben werden. Die erste Ableitung der Kurve ist die Geschwindigkeit des Wachstums, die zweite beschreibt die Beschleunigung des Wachstums. Als Crossing-Punkt wird der Zyklus bezeichnet, ab dem die Intensität des Fluoreszenzsignals der Probe exponentiell zunimmt. Je mehr zu amplifizierende DNA in der Probe vorhanden ist, desto früher

steigt das Fluoreszenzsignal an und desto kleiner ist der Crossing-Punkt. Zur Ermittlung des Crossing-Punkts wird die „Second Derivation Maximum Methode“ gewählt.¹

Auswertung

Die Auswertung der LightCycler Ergebnisse erfolgt durch die effizienz-korrigierte relative Quantifizierung, die laut Pfaffl (2004), die „bis dato ... genaueste Form der mRNA Quantifizierung“ darstellt. Dazu muss zunächst die Effizienz der qPCR bestimmt werden. Es werden verschiedene Verdünnungen des Kalibrators gemessen. Bei einer Effizienz von 2 würde eine Verdoppelung der DNA innerhalb eines Zyklus erfolgen, d.h. der CP einer 1:2 Verdünnung wäre im Vergleich zur unverdünnten Probe einen Zyklus später. Bei einer 1:10 Verdünnung wäre er 3,32 Zyklen später. Aus den tatsächlichen Abständen der CPs bei den gemessenen Standardverdünnungen 1:10, 1:100, 1:1.000 und 1:10.000 lässt sich so eine Standardkurve erstellen. Aus deren Steigung kann die Effizienz (E) berechnet werden (Rasmussen, 2001). Es gilt:

$$E = 10^{-1/\text{Steigung}}$$

Die relative Quantifizierung basiert auf einer Normalisierung der Expression des Zielgens *vtg1* mit einem nicht-regulierten Referenzgen *ef1a* bzw. *β-aktin*. Dadurch werden Unterschiede von Probe zu Probe, beispielsweise Gewebe- und Matrixeffekte, unterschiedliche RNA Extraktions- und RT-Effizienzen ausgeglichen. Unterschiede zwischen einzelnen qPCR Läufen werden durch Normalisierung gegen den Kalibrator korrigiert. Die relative Expression des Zielgens im Probenmaterial exponierter Fische wird auf die nicht-exponierten Kontrollen bezogen. Dabei wird mittels der sogenannten „delta-delta CP“ ($\Delta\Delta\text{CP}$) Methode der relative Expressionsunterschied (Ratio) berechnet:

$$\Delta\text{CP} = \text{CP (Zielgen)} - \text{CP (Referenzgen)}$$

$$\Delta\Delta\text{CP} = \Delta\text{CP (Exponierte Probe)} - \Delta\text{CP (Kontrolle)}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{CP}}$$

Bei der $\Delta\Delta\text{CP}$ -Methode geht man davon aus, dass die Amplifikationseffizienzen des Zielgens (*vtg1*) und des Referenzgens (*ef1a* bzw. *β-aktin*) identisch sind und setzt diese gleich zwei. Dies entspricht jedoch nicht der Praxis. Unter optimierten Bedingungen

¹ Quelle: Operator Manual of the LightCycler Software
<https://www.roche-applied-science.com/sis/rtqcr/lightcycler/index.jsp>

bewegen sich die Effizienzen im Bereich von 1,7 - 1,9. Um diese Schwankungen auszugleichen wurde das effizienz-korrigierte relative Quantifizierungsmodell entwickelt (Pfaffl, 2001):

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta\text{CP}_{\text{Zielgen}}(\text{Kontrolle} - \text{Behandlung})}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta\text{CP}_{\text{Referenzgen}}(\text{Kontrolle} - \text{Behandlung})}}$$

Die statistische Auswertung der Ratios erfolgt mittels einer Varianzanalyse ANOVA (Analysis Of Variance) gefolgt von einem „post hoc Test“, dem Tukey HSD (honestly significant difference) Test.

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden adulte männliche Zebraärblinge (*Danio rerio*) mit vier verschiedenen Substanzen mit oestrogener Wirkung exponiert und anschließend Veränderungen im Genexpressionsmuster des Lebergewebes analysiert. Dazu wurden zwei verschiedene Ansätze genutzt: (1) die relative Quantifizierung der Expression des Vitellogenin1-Gens mittels einer quantitativen PCR und (2) die Veränderung des Genexpressionsmusters auf Ebene des Gesamtgenoms mittels Microarrays.

Die Fische wurden in 20 l Aquarien im Durchfluss für 11 Tage exponiert. Die Aquarien wurden während der gesamten Expositionsdauer mit frischem Leitungswasser und den Chemikalien versorgt, was eine gleichbleibende Konzentration ermöglichte.

3.1 Messung der Konzentration im Expositionsbecken

Um zu gewährleisten, dass die Chemikalienkonzentration den errechneten Wert über mehrere Tage beibehält, wurden regelmäßig Wasserproben entnommen und im ELRA analysiert. Abb. 8 zeigt die Konzentrationen in fünf verschiedenen E2-Becken, wobei die Proben aus allen Becken an einem Tag genommen wurden.

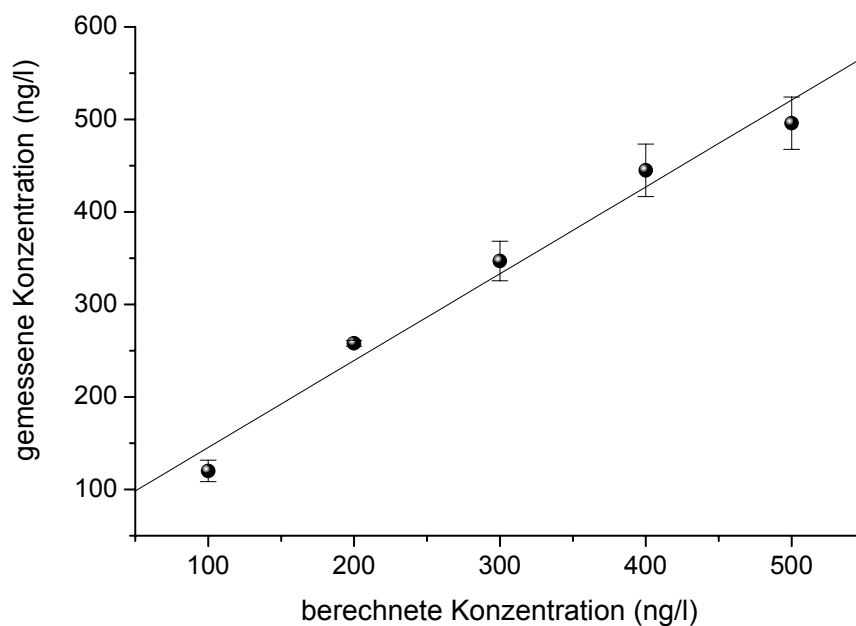


Abb. 8: Mit dem ELRA gemessene Konzentrationen in verschiedenen E2 Expositionsbecken.

Die gemessenen Werte stimmten mit den berechneten weitgehend überein. Lediglich der Wert im 200 ng/l Becken lag etwas über dem errechneten Wert. Die eingezeichnete Linie ist bei einer Übereinstimmung der gemessenen und errechneten Werte eine Winkelhalbierende mit einer Steigung von 1. Die tatsächliche Linie berücksichtigt die Standardabweichungen der gemessenen Proben und hat eine Steigung von 0,939. Der Pearson'sche Korrelationskoeffizient R beträgt 0,98813 und das Bestimmtheitsmaß R^2 somit 0,9764. Bei einem Bestimmtheitsmaß von 1 wäre es eine 100%ige Übereinstimmung.

Abb. 9 zeigt einen Zeitverlauf. Die zu messenden Wasserproben wurden an verschiedenen Tagen aus dem Becken mit der E2 Konzentration von 500 ng/l entnommen.

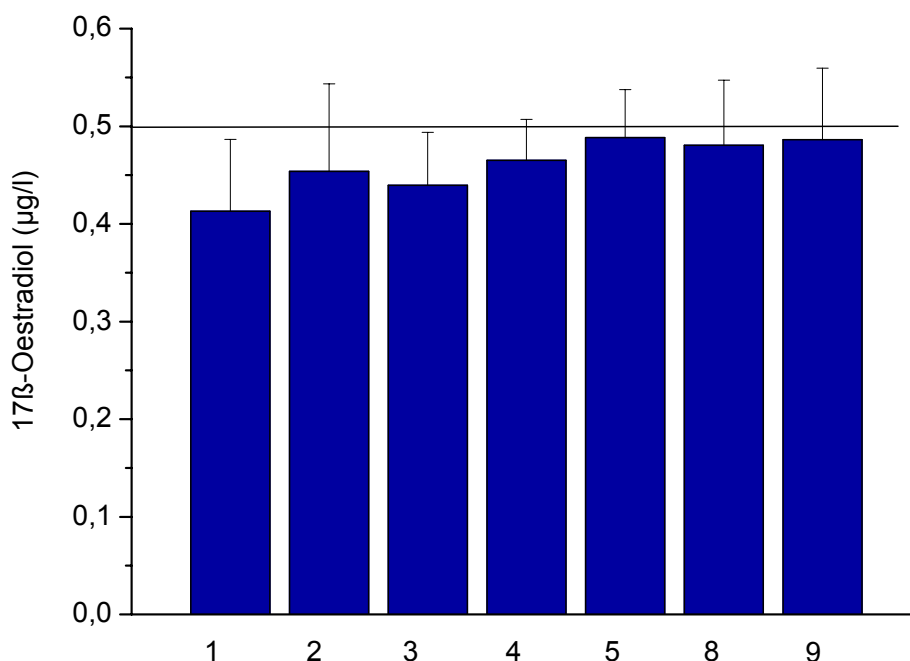


Abb. 9: Mittels ELRA gemessene E2 Konzentrationen über einen Zeitraum von 9 Tagen.

Am ersten Tag der Exposition lag die E2 Konzentration bei etwa 400 ng/l, also etwas unter der angestrebten Konzentration. Ab dem vierten Expositionstag war die tatsächliche Konzentration dann bei 500 ng/l und wurde in der Nähe des angestrebten Wertes gehalten.

3.2 Kontrolle der RNA Extraktion

Um die Extraktion der RNA aus dem Lebergewebe der Fische und die Qualität der RNA zu kontrollieren, wurde die RNA auf ein 1% Agarosegel aufgetragen und mit Ethidiumbromid angefärbt. Abb. 10 zeigt ein typisches Agarosegel unter UV-Licht.

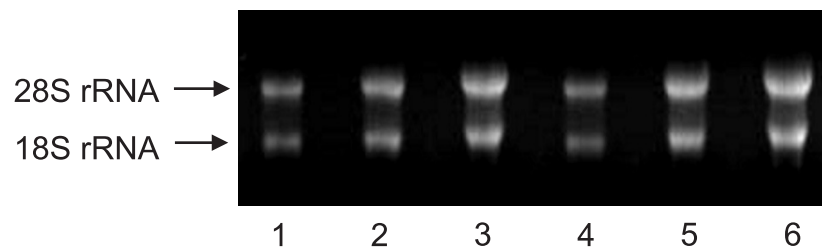


Abb. 10: Agarosegel mit RNA Proben. 1: nicht exponiertes Männchen, 1 μg RNA aufgetragen; 2: nicht exponiertes Männchen, 2 μg RNA aufgetragen; 3: nicht exponiertes Männchen, 3 μg RNA aufgetragen; 4-6: gegenüber 500 ng/l E2 exponierte Männchen, aufgetragen sind 1, 2 und 3 μg RNA.

Im Gel sind zwei Banden sichtbar, die 18 S und 28 S rRNA, da diese den größten Anteil an der Gesamt-RNA in der Zelle hat. Folglich gibt auch die Intensität dieser beiden Banden Aufschluss über die Qualität und die Konzentration der RNA der jeweiligen Probe. Bei einem Verdau der RNA durch RNasen wären die Banden nicht scharf gegeneinander abgegrenzt. Die oben gezeigten RNA-Proben eignen sich für die reverse Transkription.

3.3 Kontrolle der cDNA

Ein Teil cDNA wurde für eine Kontrolle der reversen Transkription amplifiziert und auf einem Agarosegel sichtbar gemacht. Die Wahl der *vgt1* Primer bietet noch einen weiteren Vorteil: Veränderungen in der Expression von *vgt1* werden sichtbar. Zwar erlaubt dieser Versuch noch keine genaue relative Quantifizierung, aber zusätzlich zur Kontrolle der reversen Transkription eine erste Einschätzung, ab welcher Konzentration sich Auswirkung auf die Synthese des Eidottervorläuferproteins zu erkennen sind.

Abb. 11 zeigt in einem Agarosegel aufgetragene PCR-Amplifikate von Proben der E2-Exposition.

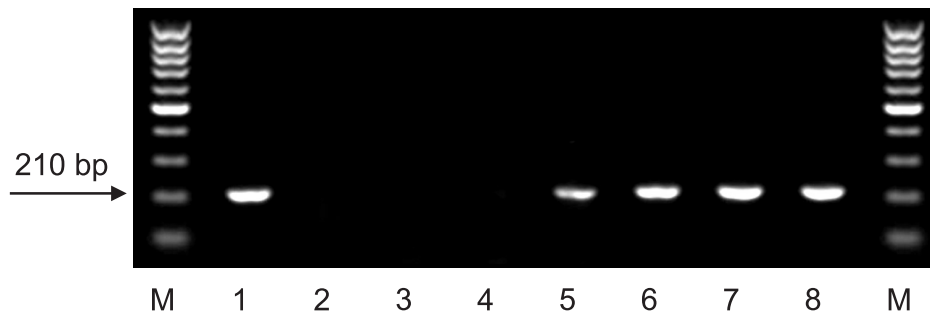


Abb. 11: Agarose-Gel mit Produkten der PCR mit *vtg1*-Primern. M: Marker; 1: Nicht exponiertes Weibchen. 2-8: Männchen, exponiert gegenüber: 2: 1 ng/l E2; 3: 10 ng/l E2; 4: 100 ng/l E2; 5: 200 ng/l E2; 6: 300 ng/l E2; 7: 400 ng/l E2; 8: 500 ng/l E2.

Das nicht exponierte Weibchen zeigt eine deutliche Expression des *vtg1* Gens. Bei den exponierten Männchen beginnt die Vitellogenin-Synthese ab einer Konzentration von 200 ng/l E2. Mit ansteigender Konzentration wird die Bande bei 210 bp immer deutlicher. Diese Schwellenkonzentration von 200 ng/l wurde auch durch die qPCR Experimente bestätigt (vgl. 3.5, S. 49).

Abb. 12 zeigt in einem Agarosegel aufgetragene PCR Amplifikate von Proben der Genistein Exposition.

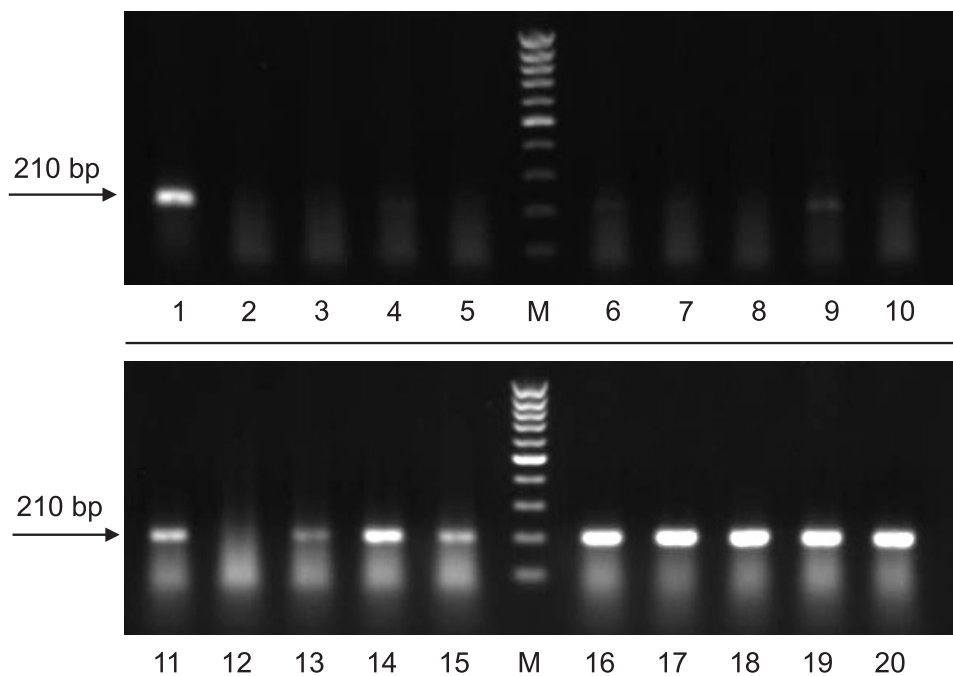


Abb. 12: Agarose-Gel mit Produkten der PCR mit *vtg1*-Primern. 1: nicht exponiertes Weibchen; 2-5: Männchen, exponiert gegenüber 100 µg/l Genistein; 6-10: Männchen, exponiert gegenüber 500 µg/l Genistein; 11-15: Männchen, exponiert gegenüber 1.000 µg/l Genistein; 16-20: Männchen, exponiert gegenüber 5.000 µg/l Genistein; M: Marker.

Die Probe des nicht exponierten Weibchens (Spur 1) dokumentiert eine deutliche Expression des *vtgI* Gens. Bei den exponierten Männchen ist eine *vtgI* Expression ab 1.000 µg/l zu erkennen, bei den Proben der 100 und 500 µg/l Expositionen ist entweder keine *vtgI* Bande zu erkennen oder eine sehr schwache Bande. Vier der 5 1.000 µg/l Proben zeigen eine mehr oder weniger deutliche Bande bei 210bp. Ab einer Exposition mit 1.000 µg/l Genistein beginnen die männlichen Tiere, Vitellogenin zu synthetisieren. Bei 5.000 µg/l exprimieren alle der untersuchten Männchen *vtgI* und das in einer stärkeren Intensität als nicht exponierte Weibchen, da die Banden heller sind und somit eine größere Menge des Amplifikats vorliegt.

3.4 Bestimmung der LightCycler Effizienz

Um das Verhältnis der *vtgI*-Expression verschiedener exponierter Proben im Vergleich zu nicht exponierten Proben zu ermitteln, musste zunächst die Effizienz der qPCR bestimmt werden. Dazu wurden verschiedene Verdünnungen der cDNA mit allen Primerpaaren gemessen und die Effizienz für jedes Primerpaar berechnet.

In Abb. 13 sind die Fluoreszenz-Kurven der mit den *β-aktin*-Primern amplifizierten Kalibrator-cDNA abgebildet.

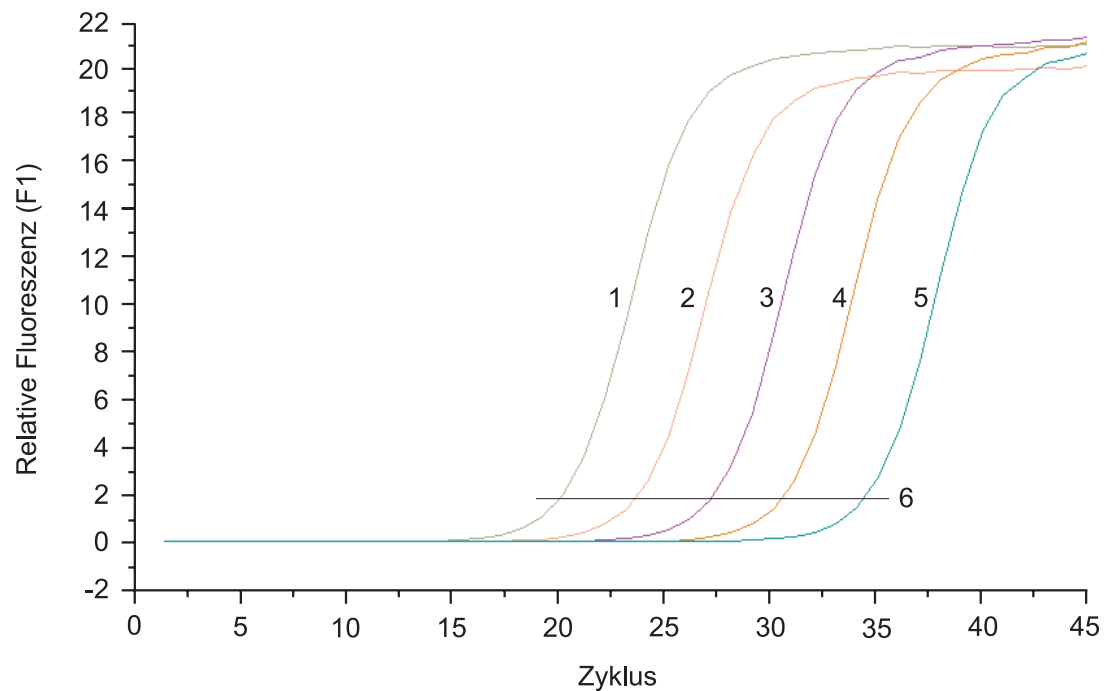


Abb. 13: Exemplarischer qPCR-Lauf zur Ermittlung der Effizienz. 1: Unverdünnter Kalibrator, CP=19,97; 2: 1:10 Verdünnung, CP=23,55; 3: 1:100 Verdünnung, CP=27,20; 4: 1:1.000 Verdünnung, CP=30,60; 5: 1:10.000 Verdünnung, CP=34,55; 6: Linie, auf deren Höhe sich die CPs befinden.

Eine Verzehnfachung der vorhandenen cDNA-Menge findet bei Effizienz von 2 nach 3.32 Zyklen statt. Bei dieser Effizienzmessung liegen zwischen den einzelnen Verdünnungen im Durchschnitt 3,645 CPs, was der negativen Steigung der Gerade in Abb. 14 b entspricht. Diese Steigung entspricht einer Effizienz von 1,88, also fast einer Verdoppelung der zu amplifizierenden cDNA in jedem Zyklus.

Die Abb. 14 a bis f zeigen die so ermittelten Effizienzen für alle in der qPCR verwendeten Primerpaare.

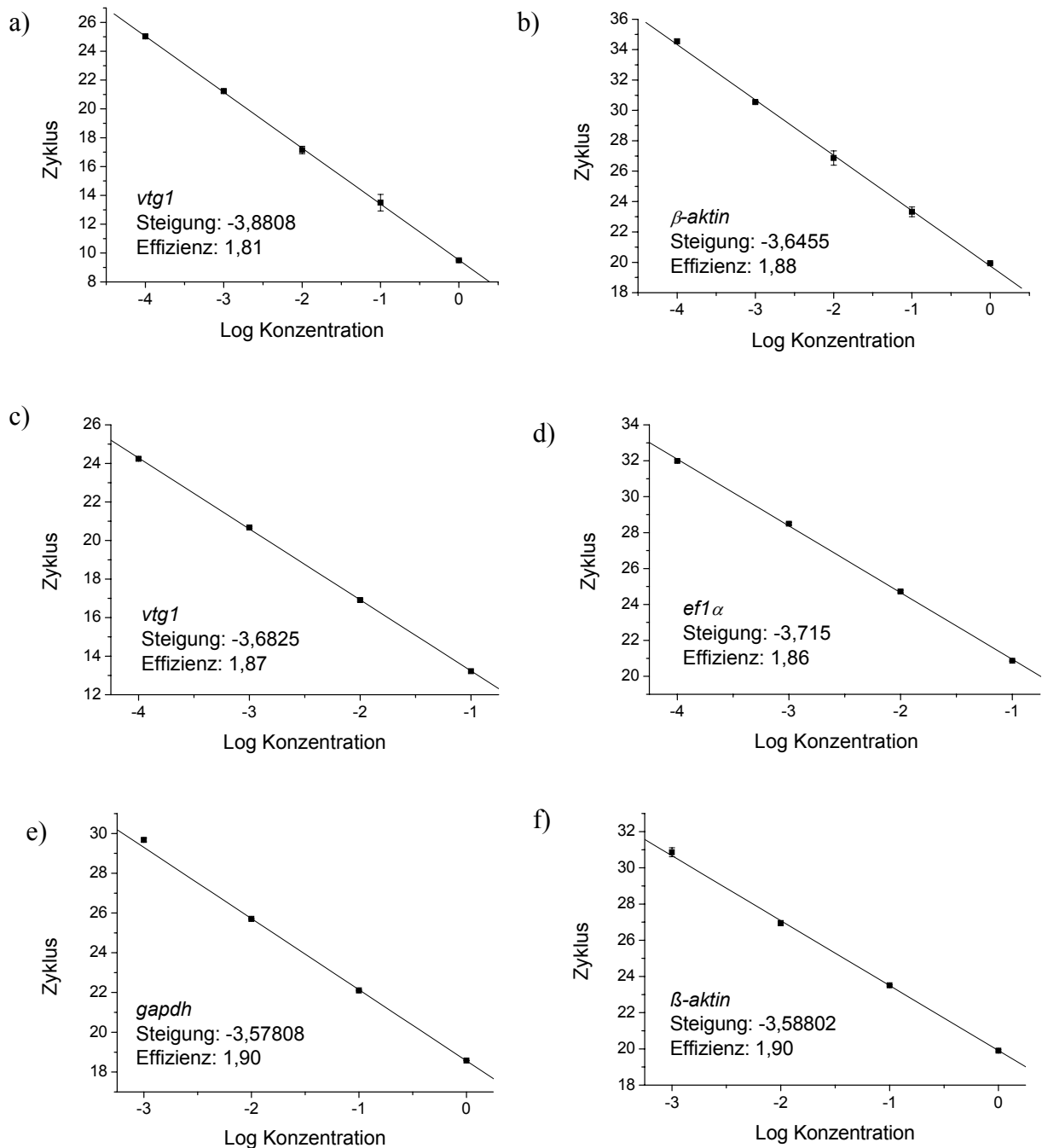


Abb. 14: Effizienzen der *vtg1*, β -aktin, *efl α* und *gapdh* qPCR.

Die sechs ermittelten Effizienzen sind nötig, um die Ratios der Expression des *vtg1*-Gens und die der Housekeeping Gene zu errechnen.

Für das *vtg1*-Primerpaar (BPA- und Genistein-Proben) liegt eine Effizienz von 1,81 vor, für β -*aktin* 1,88, für *vtg1* (E2 und NP) 1,87 und für *ef1 α* 1,86, für *gapdh* und β -*aktin* (BPA) jeweils eine Effizienz von 1,90. Die unterschiedliche Effizienzen für *vtg1* bzw. β -*aktin* liegen an den in der Tabelle 6 (S. 40) dargestellten unterschiedlichen Elongationszeiten. Die um eine Sekunde kürzere Elongationszeit führt zu einer höheren Effizienz der qPCR. Die Effizienzen der β -*aktin*-PCR sind mit 1,88 und 1,90 nahezu identisch: die 2 Sekunden kürzere Elongationszeit wird durch die niedrigere Annealing-Temperatur ausgeglichen.

3.5 qPCR Ergebnisse

Im nächsten Schritt wurden nun aus den verschiedenen qPCR-Läufen mit Proben von unterschiedlich exponierten Fischen die relativen Expressionsunterschiede (Ratios) berechnet.

In Abb. 15 ist ein exemplarischer qPCR-Lauf mit 32 verschiedenen Proben zu sehen. Die Anzahl der zu messenden Proben ist durch die Anzahl der im LightCycler vorhandenen Kapillaren auf 32 limitiert.

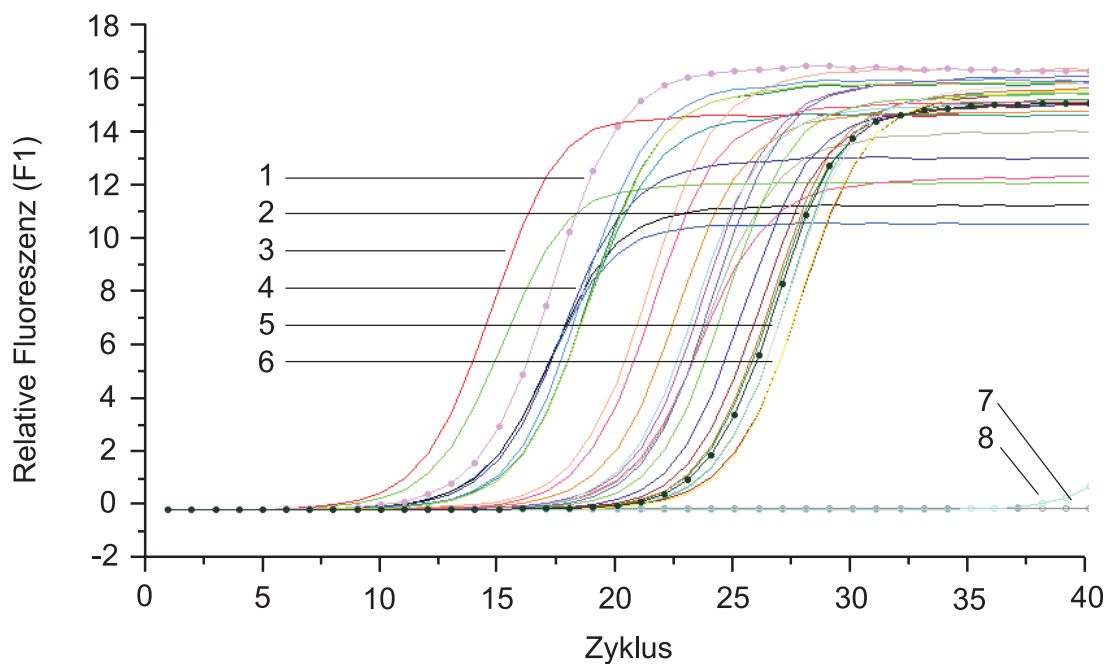


Abb. 15: Exemplarischer qPCR-Lauf mit 32 Proben, exponiert mit Genistein und EE2. Um die Abbildung übersichtlich zu halten, sind lediglich 8 Kurven beschriftet. 1: *vtg1*-Kalibrator, der den Vergleich unterschiedlicher Läufe ermöglicht; 2: *β-aktin*-Kalibrator, der den Vergleich unterschiedlicher Läufe ermöglicht; 3: Probe exponiert mit 30 ng/l EE2 als Positivkontrolle, *vtg1*-Primer; 4: Probe exponiert mit 5.000 µg/L Genistein, *vtg1*-Primer; 5: Probe exponiert mit 30 ng/L EE2, *β-aktin*-Primer; 6: Probe exponiert mit 5.000 µg/L Genistein, *β-aktin*-Primer; 7: *vtg1*-Primer, ohne cDNA, Negativkontrolle; 8: *β-aktin*-Primer, ohne cDNA, Negativkontrolle. Die restlichen unbeschrifteten Kurven stammen von weiteren Proben, die mit Genistein oder EE2 exponiert wurden.

Bis auf die Kurven der Negativkontrollen ähneln sich die Fluoreszenzkurven der Proben stark: nach einem zunächst schwachen Anstieg der Fluoreszenz wächst die Menge an doppelsträngiger DNA mit angelagertem SYBR Green Farbstoff exponentiell. Die Fluoreszenzkurven erreichen nach einigen Zyklen ein Plateau, auf dem die Fluoreszenz nicht weiter ansteigt, da entweder die vorhandenen Nukleotide aufgebraucht wurden oder die Polymerase nicht mehr aktiv ist.

Die Negativkontrolle (Kurve 8) in Abb. 15 zeigt ab Zyklus 38 einen leichten Anstieg der Fluoreszenz, was an der Bildung von Primerdimeren liegt. Dieser Anstieg ist aber für die weitere Auswertung der Daten ohne Bedeutung.

Die Ergebnisse der verschiedenen qPCR Läufe sind in Abb. 16 zu sehen, wobei der Wert der Negativkontrolle, der Mittelwert von 4 nicht-exponierten Männchen, gleich 1 gesetzt wurde.

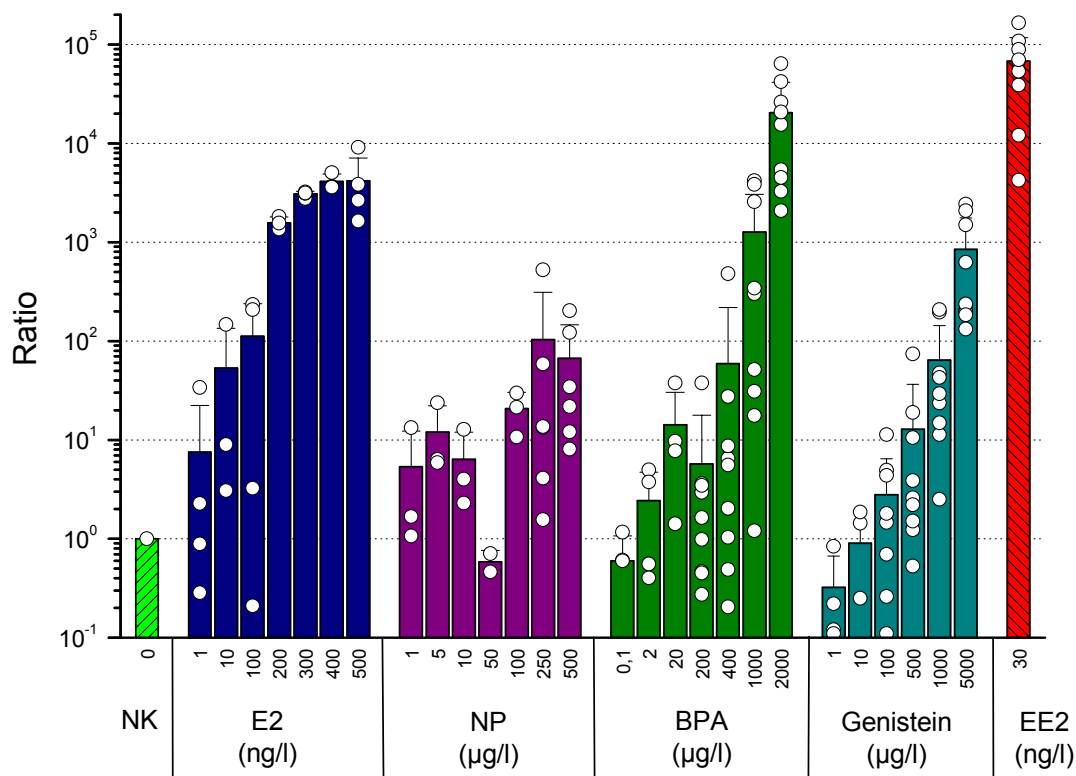


Abb. 16: Ergebnisse der qPCR Experimente. An der Abszisse sind die Chemikalien und ihre Konzentrationen eingetragen, an der Ordinate die Ratio. NK: Negativkontrolle (4 nicht exponierte, adultes Männchen pro Chemikalie). Jeder Punkt repräsentiert eine Probe, also ein männliches Tier.

Die Expression des Eidottervorläuferproteins Vitellogenin1 zeigt in den mit E2 exponierten Proben ein eindeutiges Bild: bis zu einer Konzentration von 200 ng/l ist keine signifikante Veränderung des Expressions-Niveaus zu erkennen. Die Signifikanz wird später noch ausführlich behandelt. Ab 200 ng/l ist die Expression von *vtg1* um mehr als den Faktor 1.000 erhöht. Bei der höchsten Konzentration von 500 ng/l ist die Expression um den Faktor 4.000 erhöht. Die einzelnen Punkte, also die Werte der einzelnen Fische liegen ab 200 ng/l nahe beieinander, die Streuung, bedingt durch das Untersuchen einzelner Individuen, nicht von zusammengefasster RNA mehrerer Tiere, ist hier sehr gering. Deswegen ist die eingezeichnete Standardabweichung bei den Balken ab 200 ng/l sehr klein. Die stark erhöhte Expression von *vtg1* ist ab 200 ng/l sehr deutlich.

Anders ist die Expressionsänderung in den gegenüber NP exponierten Tieren. Bei keiner Konzentration ist ein deutlicher Anstieg der *vtg1*-Expression zu erkennen. Die Expression bei 500 µg/l liegt unterhalb der bei 250 µg/l. Auffällig ist die große Streuung der Werte der Individuen, die auch an der großen Standardabweichung zu

erkennen ist. Die schwach oestrogene Wirkung des NPs ist nicht bei allen Tieren im gleichen Maße zu erkennen oder nicht so deutlich an der Expression des *vtg1* zu erkennen. Die höchste mittlere Steigerung der *vtg1*-Expression ist bei 250 µg/l zu finden ist etwa 100 mal höher als die der Negativkontrolle, doch nicht alle exponierten Tiere zeigen einen Anstieg der Expression. Aus diesem Grunde wurde eine weitere Untersuchung von Tieren, die gegenüber NP exponiert wurden, vorgenommen (vgl. 3.8, S. 57, ELISA-Untersuchung der mit NP exponierten Zebrabärblinge).

Die Ergebnisse der BPA-Expositionen sind eindeutiger. Ab 1.000 µg/l ist ein deutlicher Anstieg der *vtg1*-Expression zu erkennen. Die Expression ist 1.000-fach höher als in der Negativkontrolle – vergleichbar mit den Proben der 200 ng/l E2-Exposition. Die Streuung der Werte ist bei dieser Konzentration noch sehr groß, offensichtlich handelt es sich um eine Schwellenkonzentration für den Zebrabärbling bei einer Expositionsdauer von 11 Tagen. Anders ist dies bei 2.000 µg/l. Die gemittelte Expression ist um den Faktor 20.000 höher als bei den nicht exponierten Kontrolltieren, einige Individuen exprimieren sogar 80.000 mal mehr. Die oestrogene Wirkung des Xenooestrogens BPA ist bei dieser Konzentration gut zu erkennen.

Die mit Genistein exponierten Tiere erhöhen die Expression des *vtg1* in Abhängigkeit von der Konzentration. Mit jeder zunehmenden Konzentration wird die Expression erhöht und die Streuung der einzelnen Werte geringer. Die stärkste Expression wird bei der höchsten Konzentration von 5.000 µg/l erreicht und ist vergleichbar mit der Expression der mit 200 ng/l E2 exponierten Tiere.

Bemerkenswert ist die Expression des *vtg1*-Gens bei den Positivkontrollen, die gegenüber EE2 exponiert wurden: keine andere Chemikalie konnte in dieser oder einer vergleichbar niedrigen Konzentration einen ähnlichen Anstieg der Expression verursachen. Zwei der Tiere steigerten die Expression um den Faktor 100.000, was bei keiner anderen Substanz der Fall war. Als Positivkontrollen sind Kontrollen, die mit EE2 exponiert werden, sehr gut geeignet.

Bei allen Chemikalien ist in der niedrigsten Konzentration, bei der keine Änderung der *vtg1*-Expression zu erwarten ist, eine Schwankung um den Faktor 8 bis 9 zu erkennen. Es handelt sich wohl hierbei um individuelle Unterschiede der Zebrabärblinge und nicht um Auswirkungen der getesteten Chemikalien.

3.6 Statistische Auswertung der qPCR Ergebnisse

Die gemessenen CP der qPCR wurden nun für alle Chemikalien und Konzentrationen mit der ANOVA-Varianzanalyse untersucht. Dieser Test ermittelt lediglich die Qualität des Experiments und ob es Gruppen von Proben gibt (eine Gruppe entspricht allen Proben einer Konzentration), die in der Expression von *vtgI* signifikant voneinander abweichen. Dies ist bei der E2, BPA und Genistein Exposition der Fall. Bei der NP Exposition konnte kein signifikanter Anstieg der *vtgI*-Expression festgestellt werden.

Anschließend wurde mit dem Tukey HSD Test festgestellt, welche der verschiedenen Gruppen zu welchen Gruppen signifikant unterschiedlich sind.

Tabelle 7 zeigt die Ergebnisse für die E2-Exposition.

Tabelle 7: Ergebnisse des Tukey HSD für E2. Aufgetragen ist die Δ Ratio zwischen den Gruppen. Der errechnete HSD beträgt 1.478,24 bei einem Signifikanzlevel von 0,01.

ng/l	0	1	10	100	200	300	400
1	-0,12						
10	39,39	39,51					
100	110,80	110,93	71,42				
200	1.639,16	1.639,28	1.599,77	1.528,36			
300	3.064,44	3.064,56	3.025,05	2.953,64	1.425,28		
400	4.005,86	4.005,99	3.966,48	3.895,06	2.366,70	941,42	
500	2.942,17	2.942,29	2.902,78	2.831,36	1.303,01	-122,27	-1.063,70

Ab einer Konzentration von 200 ng/l ist der Anstieg der *vtgI*-Expression signifikant. Die Expressionsveränderungen bei den Konzentrationen 200, 300, 400 und 500 ng/l sind signifikant gegenüber 0,1, 10 und 100 ng/l. Lediglich der Anstieg bei 400 ng/l ist auch noch signifikant gegenüber der Expression bei 200 ng/l. Offensichtlich ist die größtmögliche Auswirkung von E2 auf das Expressionslevel von *vtgI* ab ca. 400 ng/l beim Zebraäbrbling erreicht.

Die Ergebnisse für die Genistein-Exposition sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Ergebnisse des Tukey HSD für Genistein. Aufgetragen ist die Δ Ratio zwischen den Gruppen. Der errechnete HSD beträgt 752,82 bei einem Signifikanzlevel von 0,01.

$\mu\text{g/l}$	0	1	10	100	500	1000
1	-0,68					
10	-0,10	0,58				
100	1,79	2,47	1,89			
500	11,85	12,53	11,95	10,06		
1000	63,09	63,77	63,19	61,30	51,24	
5000	843,01	843,69	843,10	841,21	831,16	779,92

Der Anstieg der *vtg/l* Expression nach der Exposition gegenüber Genistein ist lediglich bei der höchsten verwendeten Konzentration von 5.000 $\mu\text{g/l}$ signifikant und das gegenüber allen anderen Gruppen. Aufgrund der großen Streuung der Werte bei 1.000 $\mu\text{g/l}$ (vgl. Abb. 16) ist der Anstieg nicht signifikant, einige der Fische haben nur mit einem sehr geringen Anstieg auf die Exposition geantwortet. Der Schwellenwert der Konzentration bei einer Expositionsdauer von 11 Tagen ist bei 1.000 $\mu\text{g/l}$ zu vermuten. Für die Microarray-Experimente wurden die Proben der 1.000 $\mu\text{g/l}$ Exposition verwendet, die mit einem starken Expressionsanstieg geantwortet haben.

In Tabelle 9 sind die Ergebnisse des Tukey HSD Test für die Werte der BPA-Exposition dargestellt.

Tabelle 9: Ergebnisse des Tukey HSD für BPA. Aufgetragen ist die Δ Ratio zwischen den Gruppen. Der errechnete HSD beträgt 17.155,35 bei einem Signifikanzlevel von 0,01.

$\mu\text{g/l}$	0	0,1	2	20	200	400	1000
0,1	0,60						
2	2,43	1,83					
20	14,18	13,58	11,75				
200	5,73	5,13	3,30	-8,45			
400	59,43	58,84	57,01	45,25	53,71		
1000	1.266,78	1.266,18	1.264,35	1.252,60	1.261,05	1.207,35	
2000	20.509,22	20.508,62	20.506,79	20.495,04	20.503,49	20.449,79	19.242,44

Auch bei der BPA Exposition sind lediglich die Werte der qPCR der höchsten Konzentration von 1.000 µg/l signifikant angestiegen. Dieser Anstieg ist signifikant gegenüber allen anderen Gruppen. Zwar ist ein stetiger Anstieg der *vtg1* Expression auch bei niedrigeren Konzentrationen zu erkennen (vgl. Abb. 16), jedoch ist er erst bei der höchsten Konzentration signifikant. Der Schwellenwert für eine 11 tägige Exposition ist für BPA bei 1.000 µg/l zu vermuten.

3.7 Kontrolle der Expression der Referenzgene

Die Ergebnisse der Microarray-Experimente zeigten, dass die Expression des Gens kodierend für Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (*gapdh*) durch E2 und BPA reguliert wird (vgl. Tabelle 12, S. 63). Die Gene *ef1α*, *β-aktin* und *gapdh* finden häufig Verwendung als „Housekeeping Gene“ oder Referenzgene und sollten in ihrer Expression nicht oder kaum durch Chemikalien reguliert werden. Aus diesem Grund wurden die Expression dieser drei Referenzgene in den gegenüber BPA exponierten Proben mittels qPCR untersucht. Dabei wurde jedes einzelne Gen als Zielgen verwendet und die beiden anderen Gene als Referenzgene. Abb. 17 zeigt die Ergebnisse der qPCR-Messungen, die die Expression von *β-aktin* im Vergleich zu *ef1α* und *gapdh* zeigen. Die zu amplifizierende DNA stammt von Zebrafärblingen, die mit verschiedenen Konzentrationen von BPA exponiert wurden. Der gemittelte Wert von 4 nicht exponierten Männchen diente als Negativkontrolle (0 µg/l) und wurde auf 1 gesetzt.

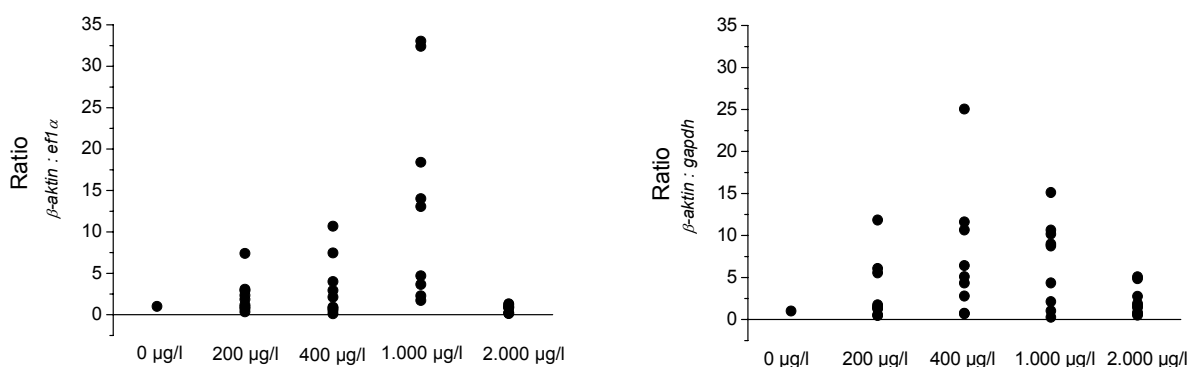


Abb. 17: Ergebnisse der qPCR der mit BPA exponierten Proben. Zielgen ist *β-aktin*, die Referenzgene sind *ef1α* und *gapdh*.

Beim Vergleich mit *eflα* steigt die Expression von *β-aktin* zunächst proportional mit der Konzentration von BPA. Allerdings ist bei der höchsten Konzentration von 2.000 µg/l keine verstärkte Expression mehr zu beobachten. Auch die große Streuung der einzelnen Werte bei 1.000 µg/l zeigt, dass die Expression von *β-aktin* im Vergleich zu der von *eflα* keiner Konzentrationsabhängigkeit von BPA unterliegt. Das Gleiche gilt für die Expression von *β-aktin* im Vergleich zu der von *gapdh*: die große Streuung der Werte und die stärkste Expression bei einer mittleren Konzentration von 400 µg/l lässt ein Verknüpfen der Expressionsrate von *β-aktin* mit der Konzentration von BPA nicht zu. Auffällig ist die relativ große Streuung der Werte: eine Streuung um den Faktor 15 scheint normal zu sein, einige Ausnahmen liegen sogar um den Faktor 30 höher als die Kontrollen.

Abb. 18 zeigt die Expression von *eflα* im Vergleich zu *β-aktin* und *gapdh* in Proben, die mit verschiedenen Konzentrationen von BPA exponiert wurden. Die Negativkontrolle ist der gemittelte Wert von 4 nicht-exponierten Männchen.

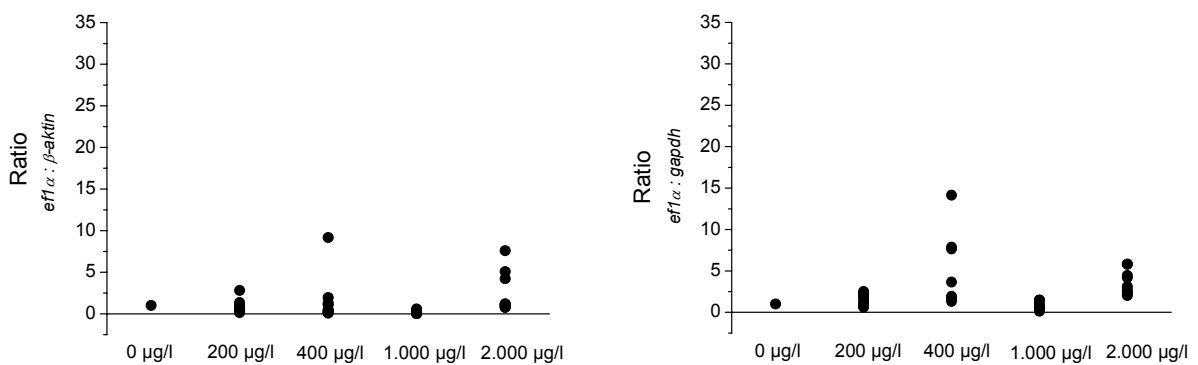


Abb. 18: Ergebnisse der qPCR der mit BPA exponierten Proben. Zielgen ist *eflα*, die Referenzgene sind *β-aktin* und *gapdh*.

Auch die Expression von *eflα* ist nicht abhängig von der BPA-Konzentration. Ein Anstieg der Expressionsstärke mit der Konzentration ist weder im Vergleich zur Expression von *β-aktin* oder *gapdh* zu erkennen. Es zeigt sich, dass die Expression von *eflα* variiert, jedoch ist die Streuung geringer als die der *β-aktin*-Werte. Die Streuung liegt etwa bei Faktor 10, in Ausnahmen bei Faktor 15. Dies ist eine etwas kleinere Streuung als die der *β-aktin* Expression.

Abb. 19 zeigt die Expression von *gapdh* im Vergleich zu *efl α* und *β -aktin* in Proben, die mit verschiedenen Konzentrationen von BPA exponiert wurden. Die Negativkontrolle ist der gemittelte Wert von 4 nicht-exponierten Männchen.

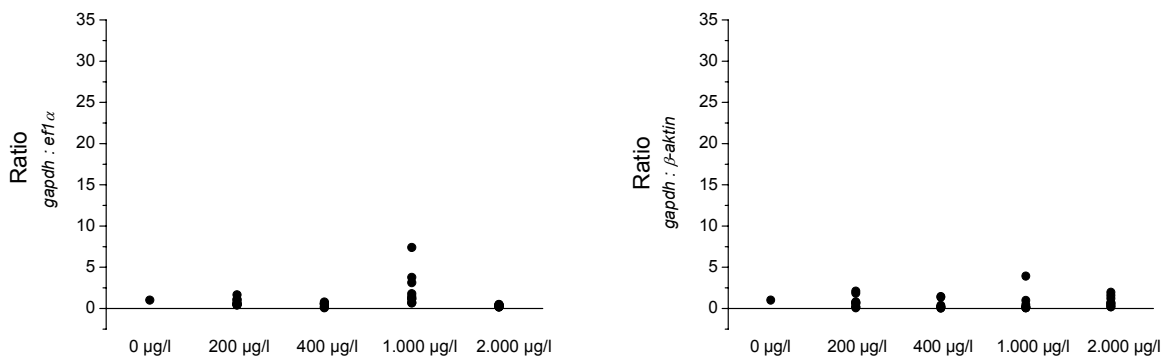


Abb. 19: Ergebnisse der qPCR der mit BPA exponierten Proben. Zielgen ist *gapdh*, die Referenzgene sind *efl α* und *β -aktin*.

Die Expression von *gapdh* im Vergleich zu *efl α* und *β -aktin* ist nicht von der BPA-Konzentration abhängig. Bei keiner Konzentration ist eine auffällige Änderung der Expression zu beobachten.

Im Vergleich zu den Housekeeping Genen *β -aktin* und *efl α* ist die Streuung bei *gapdh* am geringsten. Bei allen qPCR Experimenten blieb sie unter dem Faktor 10.

3.8 ELISA-Untersuchung der mit NP exponierten Zebrabärblinge

Um auszuschließen, dass die Ergebnisse der qPCR der NP Proben auf einen Fehler im Design der Primerpaare oder einen anderen Fehler zurückzuführen sind, wurden andere Fische der NP-Exposition an ein Partnerlabor in Schweden (Swedish University of Agricultural Sciences, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Department of Biomedicine and Veterinary Public Health, Division of Pathology, Pharmacology and Toxicology, Uppsala) geschickt, um dort mittels ELISA die Konzentration des Vitellogenins in den Fisch messen zu lassen. Fünf Fische jeder Konzentration wurden verschickt.

Die Vitellogenin-Messung in den mit NP exponierten Fischen zeigt ein ähnliches Ergebnis wie die qPCR Experimente: einen signifikanten Anstieg der Vitellogenin-

Konzentration im Fisch lässt sich bei keiner getesteten Konzentration feststellen. Die großen Standardabweichen deuten auch hier daraufhin, dass die Tiere sehr individuell auf die Exposition mit NP reagieren. Einige der Fische synthetisieren das Eidottervorläuferprotein in größerer Menge, andere nur sehr schwach.

Aufgrund dieser individuellen Unterschiede in der Reaktion auf NP wurde darauf verzichtet, mit NP exponierte Zebraabärblinge für Microarray-Experiment zu verwenden.

Abb. 20 zeigt die Ergebnisse der ELISA Messungen.

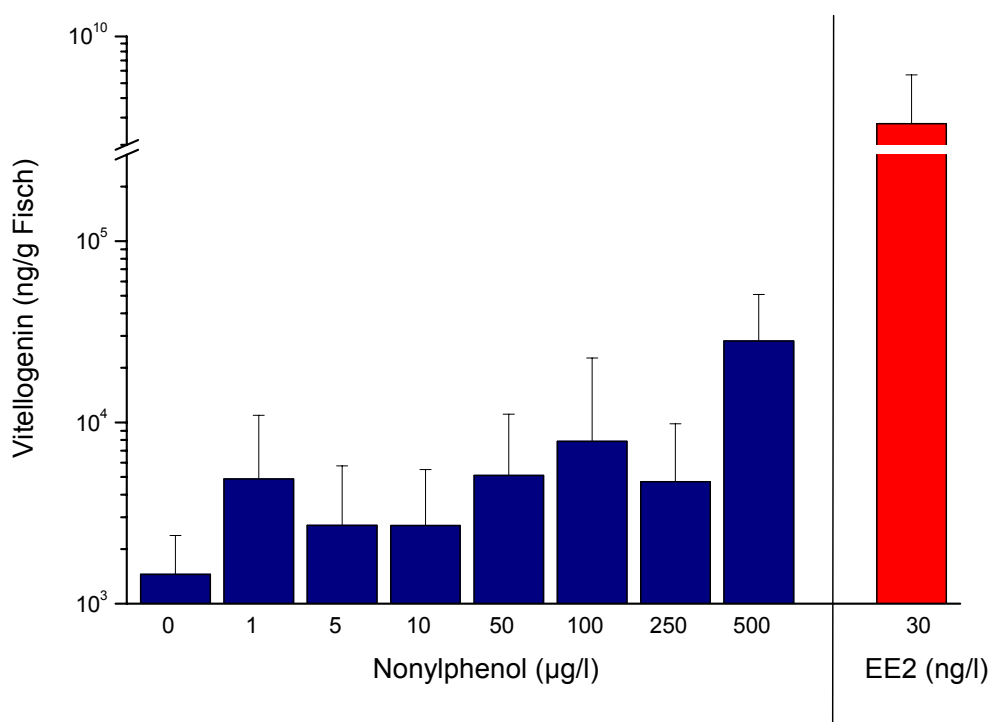


Abb. 20: Konzentration Vitellogenin in adulten Zebraabärbling-Männchen, gemessen im ELISA, nach Exposition gegenüber NP. Exposition gegenüber EE2 als Positivkontrolle.

3.9 Microarray Experimente

Die Microarray-Experimente mit den 14k Gesamtgenom-Chips ermöglichen einen Blick auf Expressionsveränderungen des gesamten Zebraabärbling-Genoms nach der Exposition gegenüber oestrogen wirksamen endokrinen Disruptoren. Nachdem die Schwellenkonzentrationen für die Chemikalien durch die qPCR ermittelt wurden, wurden Proben dieser Konzentrationen für die Microarray Experimente eingesetzt. Zehn

Proben jeder Konzentration wurden verwendet. Im Einzelnen sind dies: E2 500 ng/l, BPA 1.000 µg/l und Genistein 5.000 µg/l.

Abb. 21 zeigt das gescannte Spottingmuster eines Gesamtgenom-Chips mit dem Raster, das der Microarray Analysis Software ImaGene 5.0 die Auswertung erlaubt.

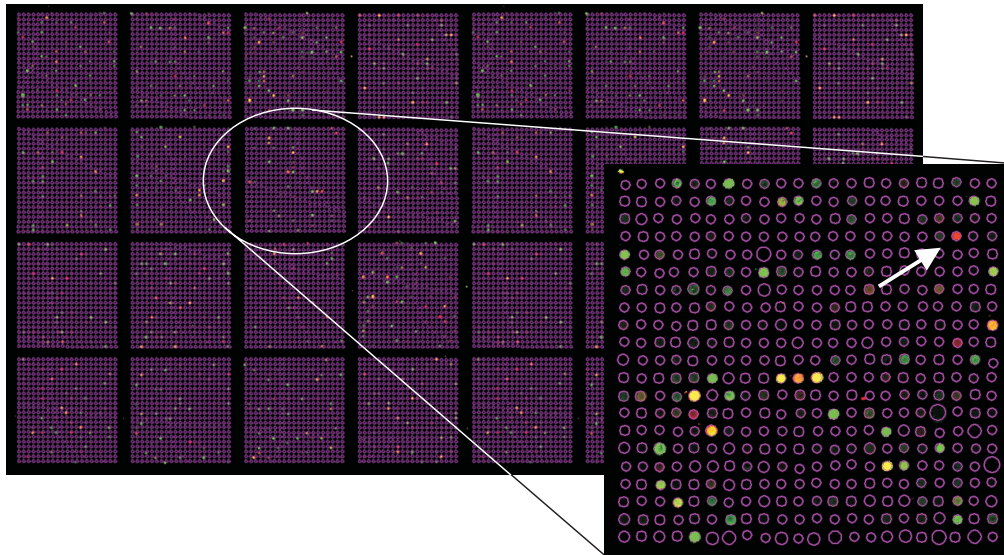


Abb. 21: 14k Microarray mit Raster nach Hybridisierung (E2-Probe und nicht exponierte Probe) und Scannen, zur Erfassung der einzelnen Spots mit der Software.

In diesem Fall, symbolisieren grüne Spots in ihrer Exposition herabregulierte Gene und rote hochregulierte Gene. Der rote Spot in der vierten Zeile des vergrößerten Ausschnitts wurde *vtg1* zugeordnet. Durch die Software ist jedem Spot eine Gen Accession Number, eine Genbezeichnung und somit – falls bekannt - eine Funktion des Gens zuzuordnen.

Tabelle 10 zeigt einen Vergleich verschiedener Ansätze zur Erfassung der durch die verschiedenen Chemikalien regulierten Gene.

Tabelle 10: Anzahl der regulierten Gene und FDR bei verschiedenen p-Werten und fold-change cut-offs. p: p-Wert, f.c.: fold change, FDR: false discovery rate.

p < 0,05; f.c. ≥ 2			p < 0,01		
Chemikalie	Anzahl regulierter Gene	FDR	Chemikalie	Anzahl regulierter Gene	FDR
E2	211	11%	E2	274	19%
BPA	47	52%	BPA	87	71%
Genistein	231	14%	Genistein	168	25%

p < 0,005			p < 0,001		
Chemikalie	Anzahl regulierter Gene	FDR	Chemikalie	Anzahl regulierter Gene	FDR
E2	186	13%	E2	86	5%
BPA	44	71%	BPA	7	79%
Genistein	70	25%	Genistein	12	11%

Ein gleichzeitiges Absenken des p-Wertes reduziert die FDR bei den E2- und Genistein-Arrays zwar, aber auch die Anzahl der regulierten Gene. Wird als minimaler fold change 2 festgesetzt und der p-Wert kleiner als 0,05 gehalten (zu 95% wurde das gefundene Gen durch die jeweilige Chemikalie reguliert), erhält man eine ausreichende Anzahl regulierter Gene bei einer akzeptablen FDR.

Nach der Auswertung der Daten der Microarray-Experimente konnten für alle drei Chemikalien Listen mit in ihrer Expression hoch- und herabregulierten Genen erstellt werden. Diese Listen sind in den Anhängen A, B und C zu finden.

Durch E2 wurden 211 Sequenzen reguliert, davon 111 TCs und 100 ETs. 47 Sequenzen wurden durch BPA reguliert, davon 18 TCs und 29 ETs. Genistein regulierte 231 Sequenzen: 123 TCs und 108 ETs. Von den drei getesteten Substanzen veränderte BPA das Genexpressionsmuster am geringsten. Am stärksten durch alle drei getesteten Chemikalien reguliert wurde die Expression von Genen, die für Eidottervorläuferproteine kodieren. Im Falle von E2 sind dies vtg2 (Faktor 445,3), vtg7 (Faktor 442,4) und vtg5 (Faktor 410,5). Tabelle 11 zeigt die am stärksten regulierten

Gene der Chemikalien und ihre jeweilig zugeordnete Gene Ontology (GO) im Rahmen der biologischen Prozesse, in die sie involviert sind. Die GO-Einteilung der Gene erfolgte nach der für das GO-Konsortium erarbeiteten Einteilung des Zebrafish Information Network¹.

Tabelle 11: Die am stärksten regulierten Gene und der biologische Prozess, an dem das jeweilige Genprodukt beteiligt ist. * markiert die zum aktuellen Stand vorhergesagten Genprodukte.

Name	Kodiert für	Faktor E2	Faktor BPA	Faktor Genstein	GO (Biologischer Prozess)
<i>vtg2</i>	vitellogenin 2*	445,3	10,8	13,6	Lipidtransport
<i>vtg6</i>	vitellogenin 6*	248,5	12,7	13,4	Lipidtransport
<i>vtg7</i>	vitellogenin 7*	442,4	6,6	85,5	Lipidtransport
<i>vtg5</i>	vitellogenin 5	410,5	9,7	91,4	Lipidtransport
<i>vtg1</i>	vitellogenin 1	283,5	-	33,8	Lipidtransport
<i>nnt</i>	nicotinamide nucleotide transhydrogenase	94,1	-	3,4	Elektronentransport
<i>ripk5</i>	receptor interacting protein kinase 5	63,6	-	-	Protein Aminosäuren Phosphorylierung
<i>hoxa3a</i>	homeo box A3a	31,0	-	-	Entwicklung
<i>aldob</i>	aldolase b, fructose-bisphosphate	-4,6	-	-3,7	Glykolyse
<i>gpx4a</i>	glutathione peroxidase 4a	-3,9	-	-	Antwort auf oxidativen Stress
<i>zp3b</i>	zona pellucida glycoprotein 3b	-	-	8,15	Oozyten Wachstum
<i>fgg</i>	fibrinogen, gamma polypeptide	-	-	-5,8	Blutgerinnung
<i>oct1</i>	octamer-binding transcription factor 1	-	3,4	-	Regulation der Transkription
<i>vtg3</i>	vitellogenin 3	9,8	3,3	2,25	Lipidtransport
<i>gapdh</i>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	-3,3	2,6	-	Glukose Metabolismus

¹ http://zfin.org/cgi-bin/webdriver?Mival=aa-ZDB_home.apg

Name	Kodiert für	Faktor E2	Faktor BPA	Faktor Genistein	GO (Biologischer Prozess)
<i>rpl4</i>	ribosomal protein L4	-	2,5	-	Metabolismus
<i>smarcel1</i>	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily e, member 1	-	-3,2	-	DNA abhängige Regulation der Transkription
<i>ngb</i>	neuroglobin	-	-2,8	-	Sauerstofftransport
<i>hoxa5a</i>	homeo box A5a	-	-2,6	-	Entwicklung
<i>myl7</i>	myosin, light polypeptide 7, regulatory	-	-2,3	-	Binden von Ca ⁺⁺ Ionen

Die Expression von keinen anderen Genen als die der *vtg*-Gene wurde durch irgendeine Exposition stärker reguliert. Dies belegt die oestrogene Wirksamkeit der drei Chemikalien und die Eignung von *vtg* als Markergene für das Vorhandensein von oestrogen wirksamen Substanzen oder Mischungen in Gewässern.

Der Großteil der regulierten Gene ist in den Metabolismus involviert. Auffällig ist die Häufung von Genen in der Genistein-Liste, die für Eischalen-Proteine kodieren (Gene accession Nummern NM_131696, NM_131829, BC095596, NM_131827 und BC097083). Nach *vtg* erfährt die Expression dieser fünf ETs mit die stärkste Hochregulierung durch Genistein.

Eine weitere Auffälligkeit ist das Vorkommen von Genen auf allen drei Listen, die für sogenannte homeo box Proteine kodieren. Bei E2 ist dies homeo box A3a; *hoxa3a* (NM_131534), Faktor 31 und *hoxa2b* (NM_131106), Faktor 2,7, bei BPA homeo box a5a; *hoxa5a* (NM_131540), Faktor -2,6. Bei Genistein ist das *dmbx1* (AF398526), das um den Faktor 2,2 herabreguliert wurde. Homeo box Proteine spielen eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung. Alle drei Chemikalien können die Expression von Genen, die in der Entwicklungsphase wichtig sind, beeinflussen.

Abb. 22 zeigt die Verteilung der regulierten Genexpressionen.

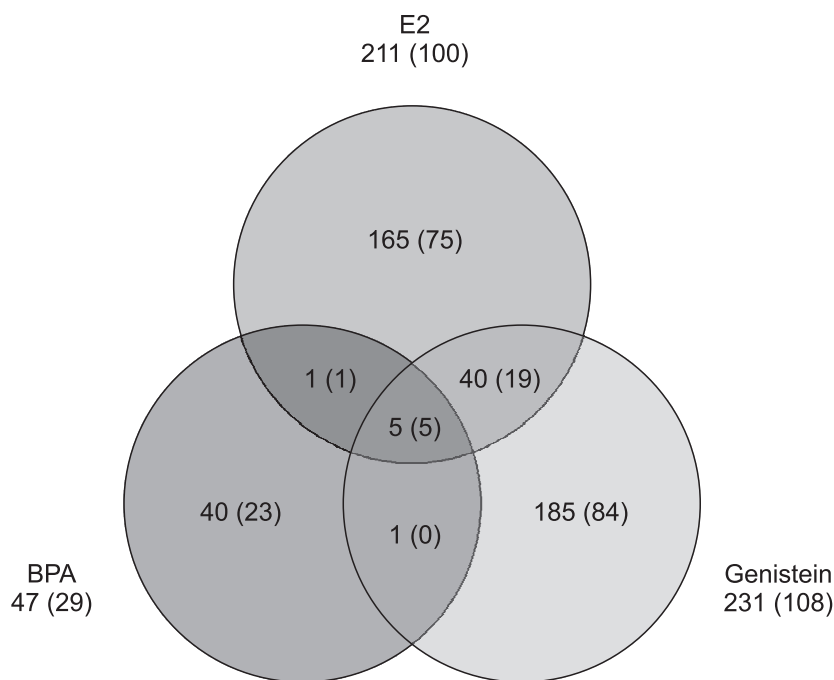


Abb. 22: Venn-Diagramm der von jeder Chemikalie in ihrer Expression regulierten Gene. Die erste Zahl gibt die Gesamtzahl der Sequenzen (ETs und TCs) an, die Zahl in Klammern die Anzahl an ETs. Die in den Schnittmengen angegebenen Zahlen zeigen die Gene, deren Expression von zwei bzw. allen drei Chemikalien reguliert werden.

Die Expression von sechs Genen (6 ETs) wurde von E2 und BPA reguliert, die von 46 (davon 25 ETs) von E2 und Genistein und die von sechs (davon 5 ETs) von BPA und Genistein. Bei den fünf Genen, deren Expressionen von allen drei Chemikalien reguliert wurden, handelt es sich um *vtg2*, *vtg3*, *vtg5*, *vtg6* und *vtg7*. Das einzige Gen, dessen Expression nur von E2 und BPA reguliert wurde, kodiert für die Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase.

Tabelle 12 zeigt die Gene, die von E2 und BPA gemeinsam in ihrer Expression reguliert wurden, die Faktoren und den zugehörigen biologischen Prozess.

Tabelle 12: Gene, deren Expression von E2 und BPA in ihrer Expression reguliert wurden. * markiert die zum aktuellen Stand vorhergesagten Genprodukte.

Name	Kodiert für	Accession Number	Faktor E2	Faktor BPA	GO (Biologischer Prozess)
<i>vtg2</i>	vitellogenin 2*	AY729644.1	445,3	10,8	Lipidtransport
<i>vtg7</i>	vitellogenin 7*	AY729649.1	442,4	6,6	Lipidtransport
<i>vtg5</i>	vitellogenin 5	NM_001025189.1	410,5	9,7	Lipidtransport

Name	Kodiert für	Accession Number	Faktor E2	Faktor BPA	GO (Biologischer Prozess)
<i>vtg6</i>	vitellogenin 6*	XM_682549.1	248,5	12,7	Lipidtransport
<i>vtg3</i>	vitellogenin 3	AF254628.1	9,8	3,3	Lipidtransport
<i>gapdh</i>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	BC095386.1	-3,3	2,6	Glukose Metabolismus

Die Expression von fünf Eidottervorläuferproteinen wird von beiden Substanzen hoch reguliert. Die Änderung durch BPA (Faktor 3,3 bis 12,7) ist im Vergleich zu E2 (Faktor 9,8 bis 445,3) eher schwach. Neben dem Vitellogenin wird die Expression des Gens *gapdh* reguliert, welches das Enzym Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase kodiert. Allerdings wird die Expression dieses Enzyms durch E2 herabreguliert und durch BPA hochreguliert. Die einzige Gemeinsamkeit in der Wirkung der Chemikalien auf das Expressionsmusters des Zebraäbrblings ist die verstärkte Expression des Vitellogenins.

Die gemeinsam von E2 und Genistein regulierten ETs wurden in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13: ETs, deren Expression von E2 und Genistein in ihrer Expression reguliert wurden. * markiert die zum aktuellen Stand vorhergesagten Genprodukte.

Name	Kodiert für	Accession Number	Faktor E2	Faktor Genistein	GO (Biologischer Prozess)
<i>vtg2</i>	vitellogenin 2*	AY729644.1	445,3	13,6	Lipidtransport
<i>vtg7</i>	vitellogenin 7*	AY729649.1	442,4	85,4	Lipidtransport
<i>vtg5</i>	vitellogenin 5	NM_001025189.1	410,5	91,4	Lipidtransport
<i>vtg1</i>	vitellogenin 1	AY034146.1	283,5	33,8	Lipidtransport
<i>vtg6</i>	vitellogenin 6*	XM_682549.1	248,5	13,4	Lipidtransport
<i>nnt</i>	nicotinamide nucleotide transhydrogenase	NM_214756.1	94,1	3,4	Elektronen-transport
<i>ripk5</i>	receptor interacting proteinkinase 5	NM_205627.2	63,6	3,6	Protein Aminosäuren Phosphorylierung
<i>vtg3</i>	vitellogenin 3	AF254638.1	9,8	2,3	Lipidtransport

Name	Kodiert für	Accession Number	Faktor E2	Faktor Genistein	GO (Biologischer Prozess)
<i>ccnb2</i>	cycline B2	NM_199430.1	8,7	3,6	Zellzyklus
<i>dvr1</i>	decapentaplegic and Vg-related 1	NM_130948.1	5,7	2,4	Zellproliferation
<i>hpx</i>	hemopexin	XM_686594.1	-4,8	-4,7	Unbekannt
<i>aldob</i>	aldolase b, fructose-bisphosphate	NM_194367.3	-4,6	-3,7	Glykolyse
<i>adh8a</i>	alcohol dehydrogenase 8a	NM_001001946.1	-3,1	-3,1	Alkohol Metabolismus
<i>serpina1</i>	serine protease inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1	NM_001013259.1	-3,1	-4	Unbekannt
<i>wdr45l</i>	wdr45 like	NM_200240.1	-2,8	-2,9	Unbekannt
<i>fabp10</i>	fatty acid binding protein 10, liverbasic	NM_152960.1	-2,7	-2,3	Transport
<i>mdka</i>	midkine-related growth factor	NM_131070.2	-2,7	-2,6	Neuralrohrbildung
<i>polr3e</i>	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide E	NM_212754.1	-2,6	-2,3	Transkription
<i>arhe</i>	ras homologe gene family member E	NM_199522.1	-2,5	-2,6	Proteintransport
<i>magi1</i>	membran associated guanylate kinase	NM_001007063.1	-2,4	-2,7	Proteinbindung
<i>serpincl1</i>	serine protease inhibitor, clade C (antithrombin), member 1	NM_182863.1	-2,3	-3,8	Endopeptidase Inhibitor
<i>adipor1b</i>	adiponectin receptor 1b	NM_213500.1	-2,3	-2	Unbekannt
<i>dmbx1</i>	diencephalon/mesencephalon homeobox 1	AF398526.1	-2,2	-2,2	Entwicklung
<i>chn1</i>	chimerin (chimaerin) 1	NM_213000.1	-2,2	-2,3	Positive Regulation der GTPase Aktivität

Insgesamt wurde die Expression von 24 ETs sowohl von E2 als auch von Genistein reguliert, am stärksten *vtg1*, *vtg2*, *vtg5*, *vtg6* und *vtg7* (Faktor 248,5 bis 445,3 bei E2, Faktor 13,4 bis 91,4 bei Genistein). Beide Chemikalien verstärkten auch die Expression

von *ccnb2* (E2: Faktor 8,7; Genistein: 3,6), dessen Genprodukt an der Zellzyklusregulation beteiligt und am Zellkern lokalisiert ist. Die Expression von zwei Genen, deren Produkte eine Rolle bei der Entwicklung spielen, wurde herabreguliert: *mdka* (E2: -2,7; Genistein: -2,6) und *dmbx1* (E2 und Genistein: -2,2). Beide Substanzen konnten also die Expressionsrate von Entwicklungsgenen beeinflussen. Im Vergleich zu BPA regulierte Genistein die Expression einer größeren Anzahl von Genen, deren Expression auch von E2 reguliert wurde. Wie schon bei den von BPA und E2 regulierten Genen ist auch in Tabelle 13 ersichtlich, dass E2 einen wesentlich größeren Effekt auf die Transkription der Gene als Genistein hat. E2 und Genistein sind sich zwar in ihrer regulatorischen Wirkung ähnlicher als E2 und BPA, jedoch ist diese Wirkung bei E2 wesentlich stärker.

Tabelle 14 zeigt die in ihrer Expression von BPA und Genistein regulierten Gene.

Tabelle 14: Gene, deren Expression von BPA und Genistein in ihrer Expression reguliert wurden. * markiert die zum aktuellen Stand vorhergesagten Genprodukte.

Name	Kodiert für	Accession Number	Faktor BPA	Faktor Genistein	GO (Biologischer Prozess)
<i>vtg5</i>	vitellogenin 5	NM_001025189.1	9,7	91,3	Lipidtransport
<i>vtg7</i>	vitellogenin 7*	AY729649	6,6	85,4	Lipidtransport
<i>vtg2</i>	vitellogenin 2*	AY729644	10,8	13,6	Lipidtransport
<i>vtg6</i>	vitellogenin 6*	XM_682549	12,7	13,4	Lipidtransport
<i>vtg3</i>	vitellogenin 3	AF254638	3,3	2,3	Lipidtransport
<i>ch211-146113</i>	Unbekannt	AL954384	2,3	5,2	Unbekannt

Lediglich die Expression von sechs Genen wurde von BPA und Genistein reguliert. Fünf davon kodieren für verschiedene Eidottervorläuferproteine, und das Produkt des sechsten ist bis dato unbekannt. Bis auf die Ausnahme *vtg3* war dabei die regulatorische Wirkung von Genistein wesentlich stärker.

Tabelle 15 zeigt die Gene, deren Expression von allen drei Chemikalien reguliert wurde.

Tabelle 15: Gene, deren Expression von E2 (500 ng/l), BPA (1.000 µg/l) und Genistein (5.000 µg/l) in ihrer Expression reguliert wurden. * markiert die zum aktuellen Stand vorhergesagten Genprodukte.

Name	Kodiert für	Accession Number	Faktor E2	Faktor BPA	Faktor Genistein	GO (Biologischer Prozess)
<i>vtg2</i>	vitellogenin 2*	AY729644	445,3	10,8	13,6	Lipidtransport
<i>vtg7</i>	vitellogenin 7*	AY729649	442,4	6,6	85,4	Lipidtransport
<i>vtg5</i>	vitellogenin 5	NM_001025189.1	410,5	9,7	91,3	Lipidtransport
<i>vtg6</i>	vitellogenin 6*	XM_682549	248,5	12,7	13,4	Lipidtransport
<i>vtg3</i>	vitellogenin 3	AF254638	9,8	3,3	2,3	Lipidtransport

Die Expression von fünf Eidottervorläuferproteinen wurde durch E2, Genistein und BPA reguliert. Deutlich wird die wesentlich stärkere Wirkung von E2 im Vergleich zu den anderen beiden Substanzen. Das am stärksten regulierte Gen ist bei E2 *vtg2* (Faktor 445,3), bei BPA *vtg6* (Faktor 12,7) und bei Genistein *vtg5* (Faktor 91,3), das am schwächsten regulierte ist bei den drei Chemikalien *vtg3*.

Diese Tabelle belegt die oestrogene Wirksamkeit der getesteten Substanzen, aber auch das jeweilig unterschiedliche Potential.

3.10 Einteilung der Gene in „Gene Ontology Classes (GO)“

Durch die Microarray-Experimente wurden Listen mit Genen erstellt, deren Expression durch die Chemikalien E2, BPA und Genistein reguliert wurde. Um einen genaueren Einblick zu erhalten, wurden diese Gene in Gene Ontology (GO) Klassen eingeordnet. Die GOs sind zunächst unterteilt in molekulare Funktion (GO:0003674: molecular_function), Zellkomponente (GO:0005575: cellular_component) und biologischer Prozess (GO:0008150: biological_process). Um die Wirkweise der Chemikalien genauer zu charakterisieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit das Augenmerk auf die biologischen Prozesse gelegt, an denen die Genprodukte beteiligt sind. Bislang sind 11.300 biologische Prozesse in Klassen eingeordnet¹. Um eine

¹ Quelle: <http://www.geneontology.org/>

Vergleichsmöglichkeit mit den auf den Microarray-Slides immobilisierten Sonden zu haben, wurden zunächst die 14.067 Sonden den GOs zugeteilt und dann die regulierten Sonden der drei Chemikalien. Dabei kann ein und dieselbe Sonde bzw. Gen mehreren GOs zugeordnet sein. So ist das Gen *aldob* sowohl der übergeordneten GO „Metabolismus“ als auch der untergeordneten „Glykolyse“ zugeordnet. Die Listen mit den GOs finden sich in den Anhängen D, E und F.

Die von E2 hochregulierten 109 Gene wurden in 31 GOs eingeteilt, 42 spielen eine Rolle im Metabolismus, das entspricht 40,78 % aller durch E2 regulierten Gene. 18 Genprodukte sind an der Transkription beteiligt, also 17,48 % der durch E2 regulierten Gene, gleichzeitig sind aber lediglich 7,85% aller gespotteten Sonden an der Transkription beteiligt. Dies zeigt die starke Wirkung von E2 auf Transkriptionsvorgänge. Elf an der Entwicklung beteiligten Gene (10,68 % der regulierten Gene) wurden hochreguliert, davon vier an der Entwicklung des Nervensystems. Zu diesen vier gehören *ephrin a2* und *forkhead box a2*. 6,94 % der auf dem Microarray vorhandenen Sonden wurden Entwicklungsvorgängen zugeordnet, was den Einfluss von E2 auf die Entwicklung des Zebrafischblümlings belegt. Weitere 3 Gene spielen eine Rolle bei der Apoptose. Bei den von E2 herabregulierten 102 Genen sind 28 am Metabolismus beteiligt, davon fünf am Alkoholmetabolismus.

141 durch Genistein in ihrer Expression hoch regulierte Gene wurden 30 GOs zugewiesen. 31,78 % dieser Gene wurden dem Metabolismus zugeordnet, was in Etwa dem Anteil der Sonden auf dem Array von 30,42 % entspricht. Fünf Gene wurden der Regulation des Zellzykluses zugeordnet, dies entspricht 3,88 % der regulierten Gene, wobei lediglich 1,81 % der gespotteten Sonden dieser GO zugewiesen wurde. Auch drei der durch E2 hoch regulierten Gene wurden der Regulation des Zellzykluses zugewiesen, was dort einem Anteil von 2,91 % entspricht.

Wie bei den durch E2 herabregulierten Genen lassen sich auch bei den durch Genistein herabregulierten einige dem Alkoholmetabolismus zuweisen. Insgesamt konnten bei Genistein 36 der 90 runter regulierten Gene dem Metabolismus zugeordnet werden. Auffällig ist jedoch die Zuweisung von drei Genen zur GO Blutgerinnung, die bei beiden anderen Chemikalien nicht erscheint. Drei der regulierten Gene entsprechen einem Anteil von 2,75 % aber nur 0,14 % der gespotteten Sonden wurden zu dieser GO zugewiesen. Dies entspricht fast dem Zwanzigfachen, wenn man die prozentualen Anteile vergleicht.

Auch die von BPA in ihrer Regulation hochregulierten Gene wurden zum Großteil dem Metabolismus zugewiesen. 18 der 39 Gene sind in dieser GO zu finden, das entspricht einem Anteil von 58,06 % der regulierten Gene gegenüber 30,42 % der gespoteteten Gene in dieser GO. BPA hat also stärksten Einfluss auf den zellulären Metabolismus. Auffällig ist außerdem die Auswirkung der Chemikalie auf Gene, deren Produkte am Spleißen beteiligt sind.

4 Diskussion

Als Modellorganismus für das Einschätzen und das Charakterisieren des Gefährdungspotentials von Wirbeltieren durch endokrine Disruptoren mit oestrogener Wirkung wurde der Zebraärbling gewählt. Auch Rückschlüsse auf die Gefährdung des Menschen sollten so ermöglicht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Tiere vier Chemikalien ausgesetzt: 17 β -Oestradiol (E2), Bisphenol A (BPA), Genistein und Ethinyloestradiol (EE2), wobei die mit EE2 exponierten Proben als Positiv-Kontrollen verwendet wurden. Rose et al. (2002) haben die starke Wirkung von EE2 auf die Vitellogenin-Synthese im Zebraärbling bereits beschrieben. Deswegen wurde EE2 für die Positiv-Kontrollen verwendet.

Nach der Exposition von männlichen Zebraärblingen wurden die Veränderungen in der Genexpression der Fische, hervorgerufen durch die Chemikalien, erfasst. Weibliche Tiere synthetisieren Oestrogene – im Gegensatz zu den männlichen Tieren – in großem Maße selbst. Bei den männlichen Tieren wurden stärkere Antworten in der Gen-Expression auf niedrige Konzentrationen der oestrogen wirksamen Chemikalien im Wasser erwartet, deswegen wurden männliche Zebraärblinge für die Expositions-Experimente verwendet. Insbesondere gilt dies für die Auswirkungen auf die Expression der *vtg*-Gene, die normalerweise nicht von männlichen Tieren exprimiert werden.

Die in ihrer Expression regulierten Gene wurden verschiedenen Klassen (GOs) innerhalb der Klasse der biologischen Prozesse zugewiesen. Diese Einteilung erlaubt die Zusammenfassung mehrerer Gene in biologischen Prozessen und somit eine Vorhersage der Auswirkung der Änderungen im Expressionsmuster.

4.1 Exposition von Zebraärblingen

Die Hälterung der Zebraärblinge erwies sich als problemlos. Auch das Umsetzen der Fische von den Hälterungsbecken in die kleineren Expositionsbecken verlief ohne übermäßigen Stress für die Tiere, da sie nach wenigen Minuten bereits wieder das gewohnte Schwarmverhalten zeigten. Auch die einfache Nachzucht der Fische und die Tatsache, dass die Chemikalien – wie etwa bei Untersuchungen an Ratten – nicht dem Futter beigemischt werden mussten, sondern einfach dem Medium Wasser hinzugefügt

werden konnten, um die Auswirkungen auf die Genexpression bei einem Wirbeltier zu untersuchen, unterstreichen die Eignung des Zebraärbblings.

Das Exponieren der Fische in Durchflußbecken erwies sich als sehr zweckmäßig, da so die Konzentrationen in den einzelnen Becken konstant gehalten wurden. Im Vergleich mit den Arbeiten anderer Gruppen (vgl. Tabelle 16: Vergleich verschiedener E2-Expositionen mit unterschiedlichen Fischen und Systemen. LOEC: lowest observed effective concentration. Tabelle 16) mit Zebraärbblingen und anderen Fischen, liegen die festgestellten Schwellenkonzentrationen (E2: 200 ng/l, BPA: 1.000 µg/l) in einem vergleichbaren Bereich. Für Genistein liegen bislang keinerlei vergleichbare Arbeiten vor, doch für E2 fanden van den Belt et al. (2003) nach semistatischer Exposition von männlichen Zebraärbblingen eine Schwellenkonzentration von 20 ng/l.

Tabelle 16: Vergleich verschiedener E2-Expositionen mit unterschiedlichen Fischen und Systemen. LOEC: lowest observed effective concentration.

Organismus	Zeitdauer	System	Protein / mRNA	LOEC <i>vtg</i>
Zebraärbbling (<i>Danio rerio</i>)	11 Tage	Durchfluss	mRNA (LightCycler)	200 ng/l (diese Arbeit)
Moskitofisch (<i>Gambusia affinis</i>)	4 Tage	statisch	mRNA (LightCycler)	250 ng/l (Leusch et al., 2005)
Zebraärbbling (<i>Danio rerio</i>)	3 Wochen	semi- statisch	Protein	20 ng/l (van den Belt et al., 2003)
Rotaugen (<i>Rutilus rutilus</i>)	3 Wochen	Durchfluss	Protein	100 ng/l (Routledge et al., 1998)
Regenbogenforelle (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	3 Wochen	Durchfluss	Protein	100 ng/l (Routledge et al., 1998)
Fettkopfbarsch (<i>Pimephales promelas</i>)	3 Wochen	Durchfluss	Protein	100 ng/l (Panter et al., 1998)
Zebraärbbling (<i>Danio rerio</i>)	8 Tage	Durchfluss	Protein	21 ng/l (Rose et al., 2002)
Regenbogenforelle (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	14 Tage	semi- statisch	Protein und mRNA (Hybridisation Protection Assay, HPA)	14 ng/l (Thomas-Jones et al., 2003)
Regenbogenforelle (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	48 Stunden	semi- statisch	Protein und mRNA (Hybridisation Protection Assay, HPA)	30 ng/l (Thomas-Jones et al., 2003)

Die vergleichsweise niedrigen Konzentrationen einiger Arbeiten liegen wohl in der semistatischen Exposition und der Messung des Vitellogenin-Proteins, nicht der mRNA begründet, da das Protein im Tier akkumulieren kann. Eine weitere Ursache kann in der vergleichsweise langen Expositionsdauer von drei Wochen liegen. Für männliche Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) und männliche Rotaugen (*Rutilus rutilus*) fanden Routledge et al. (1998) ebenfalls auf Protein-Ebene einen Wert von 100 ng/l nach dreiwöchiger Durchflußexposition. Scholz et al. (2004) zeigten durch den Vergleich beider Nachweisverfahren, dass die Analyse auf Transkriptom-Ebene nach Kurzzeit-Expositionen und die Untersuchung auf Proteomebene für die Detektion von Auswirkungen geringer Konzentrationen oestrogen wirksamer Substanzen geeignet ist.

Noch besser vergleichbar sind die Ergebnisse anderer Arbeiten nach BPA Exposition: für den Schwertträgerplaty (*Xiphophorus helleri*) wurde durch Quantifizieren der mRNA eine Schwellenkonzentration von 2.000 µg/l festgestellt (Kwak et al., 2001), für die Regenbogenforelle und den Zebraäbrbling durch Messen der Proteinmenge 1.000 µg/l (van den Belt et al., 2003).

Die Expositionsdauer von elf Tagen war vergleichsweise kurz. Eine Zusammenfassung der Arbeiten anderer Gruppen, die die Vitellogenin-Synthese nach Exposition mit verschiedenen oestrogen wirksamen Substanzen an verschiedenen Süßwasserfischen untersucht haben (van den Belt et al., 2003), zeigt, dass ein Großteil der Expositionen zwischen drei Wochen und 30 Tagen andauerten. Doch auch eine elftägige Exposition resultierte im Durchflusssystem in starken Veränderungen im Genexpressionsmuster. Weiterhin wurden die möglichen toxischen Effekte der hohen Expositionskonzentrationen durch eine kürzere Dauer minimiert. Toxische Effekte hätten auch starke Einflüsse auf die Veränderungen des Genexpressionsmusters gehabt, die durch die Microarray Experimente erfasst wurden, was eine eindeutige Zuordnung zu einem oestrogenen Effekt erschwert hätte. Welshons und Jordan (1987) konnten die Fähigkeit von MCF7-Zellen zeigen, sich an E2-Expositionen anzupassen. Das heißt, dass eine kürzere Expositionsdauer zumindest auf Transkriptomebene eine stärkere Reaktion hervorrufen kann als längere Expositionen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte vor Allem durch die qPCR-Experimente gezeigt werden, dass eine Expositionsdauer von elf Tagen ausreicht, um eindeutige Effekte der oestrogen-wirksamen Chemikalien im Zebraäbrbling zu detektieren.

4.2 Chemikalien und Konzentrationen

Die getesteten Chemikalien E2, BPA und Genistein sind Vertreter der Eingangs vorgestellten Klassen von endokrinen Disruptoren mit oestrogener Wirkung (vgl. 1.1, S. 10). Als Positivkontrolle dienten Zebrafische, die mit 30 ng/l EE2 exponiert wurden. Die starke oestrogene Wirkung dieser Chemikalie wurde bereits an Regenbogenforellen mit einer LOEC von 0,1 – 10 ng/l (Purdom et al., 2004; Jobling et al., 1996) und am Zebrafisch mit einer LOEC von 10 ng/l (Petersen et al., 2000) festgestellt.

Kashiwada et al. (2002) ermittelten für den Japanischen Reiskärfisch (*Oryzias latipes*) die „Lethal Concentration 50“ (LC50), also die Konzentration, bei der 50 % der getesteten Tiere innerhalb von 72 Stunden starben, für E2 bei 3,5 mg/l, für NP bei 0,85 mg/l und für BPA bei 6,8 mg/l. In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Expositionen starb keiner der exponierten Zebrafische während der Versuchsdauer von elf Tagen. Für Genistein liegen bislang keinerlei Daten über die Toxizität vor. Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Expositionen starb kein Zebrafisch, somit ist davon auszugehen, dass alle Konzentrationen unterhalb der LC50 für diese Art lagen.

Die Ergebnisse des Enzyme Linked Receptor Assays (ELRA) zeigen, dass die gewünschte Konzentration nicht sofort zu Beginn der Exposition erreicht wurde. Dies könnte darin begründet liegen, dass die Chemikalien zu Beginn nicht in ganzer Menge in das Wasser der Expositionsbecken gelangen. Ein Teil könnte an die Innenfläche der Schläuche, die von den Vorratsflaschen zu den Aquarien führen, oder die Silikonabdichtung der Glasaquarien binden, was die stetig ansteigende Konzentration bis zur Soll-Konzentration in Abb. 9 erklären würde. Die in Abb. 8 ersichtlichen leichten Schwankungen der Konzentrationen um die jeweiligen Sollwerte ist durch den Versuchsaufbau zu erklären. So liegt die Löslichkeit der Chemikalien, die bei 4°C in einem Kühlschrank gelagert werden, um eine Degradation zu verhindern, unter dem für die Berechnung der Konzentration verwendeten Wert bei Raumtemperatur. Die große Wasserhärte des verwendeten Leitungswasser von 18°dH ließ die zuführenden Schläuche innerhalb weniger Tage verkalken, so dass diese in regelmäßigen Abständen erneuert werden Prozess, was zu Schwankungen in der Zudosierung der Chemikalien führen konnte. Schließlich zeigte sich, dass die verwendeten Präzisions-Peristaltikpumpen keine gleichbleibende Pumprate hatten. Auch dies führte eventuell zu leichten Schwankungen der gemessenen Istwerte.

Die verwendeten Konzentrationen liegen in einem relativ hohen Bereich. Tabelle 17 zeigt einen Vergleich der Konzentrationen in den Expositionsbecken und Konzentrationen, die bereits in der Umwelt gemessen worden sind.

Tabelle 17: Vergleich zwischen den Konzentrationen in den Expositionsbecken und bereits gemessenen Konzentrationen.

Chemikalie	Konzentrationen Expositionsbecken	ermittelter Schwellenwert	Konzentration Freiland	Ort
E2	1 – 500 ng/l	200 ng/l	13 ng/l (Johnson et al., 2005)	Kläranlagenabwasser
BPA	0,1 – 2.000 µg/l	1.000 µg/l	4 – 92 ng/l (Stachel et al., 2003)	Elbe
			0,5 – 410 ng/l (Fromme et al., 2002)	Oberflächenwasser
Genistein	1 – 5.000 µg/l	5.000 µg/l	10 µg/l (Kiparissis et al., 2001)	Zellstoffabrikabwasser, Ontario, Kanada
			3 – 38 ng/l (Spengler et al., 2001)	Kläranlagenabwasser
NP	1 – 500 µg/l	-	27 – 430 ng/l (Stachel et al., 2003)	Elbe
			28 ng/l (Fries und Puttmann, 2003)	Elbe
			1220 ng/l (Fries und Puttmann, 2003)	Oder
EE2	30 ng/l	-	1,8 ng/l (Hinteman et al., 2006)	Kläranlagenabwasser
			0,7 ng/l (Hinteman et al., 2006)	Oberflächenwasser

Außer den in Elbe und Oder gemessenen NP Konzentrationen liegen die im Freiland gemessenen Konzentration im unteren Bereich der verwendeten Expositions-konzentrationen. Gleichzeitig ist aber auch zu erkennen, dass mehrere oestrogen wirksame endokrine Disruptoren zugleich vorkommen. Das heißt, dass die Gewässer mit einer Mischung aus endogenen, synthetischen, Xeno- und Phytoestrogenen belastet sind. Diese Mischung könnte die geringen

Einzelkonzentrationen, die tatsächlich in Gewässern zu finden sind, aufsummieren. Die Additivität der Wirkung verschiedener oestrogen wirksamer Chemikalien wurde durch Payne et al. (2000) gezeigt. Genauere Untersuchungen über die Wirkung dieser Mischungen werden zur Zeit im Rahmen des EDEN¹ Forschungsprojektes durchgeführt. Zusätzlich sind Wildtiere - nicht nur im aquatischen Lebensraum – diesem belasteten Wasser nicht nur elf Tage ausgesetzt sondern meistens über einen viel längeren Zeitraum.

4.3 Quantitative PCR

Quantitative PCR (qPCR) Experimente wurden in dieser Arbeit durchgeführt, um die oestrogene Wirksamkeit der getesteten Chemikalien zu belegen, eine Schwellenkonzentration für die Exposition der Zebrafische für elf Tage festzulegen und um die Konzentration zu finden, aus der exponierte Fische für die Microarray-Experimente Verwendung finden konnten. Dazu wurde die Expression eines Zielgens mit der Expression verschiedener Housekeeping- oder Referenzgene verglichen. Als Zielgen diente *vtg1*, das für ein Eidottervorläuferprotein kodiert. Zusätzlich wurden die Expressionsraten dreier verschiedener Housekeeping-Gene auf die Induzierbarkeit durch BPA untersucht.

Die qPCR bietet eine schnelle Möglichkeit, die Expressionsrate eines Zielgens zu überprüfen. Noch schneller ist die Methode, die Expressionsrate auf einem DNA-Agarosegel abzuschätzen. Der Vergleich der Bandengröße und Leuchtintensität der visualisierten cDNA - die nötige Software ist in vielen modernen Geldokumentationsanlagen enthalten - erlaubt jedoch keine exakte Quantifizierung. Die mittels qPCR ermittelten *Crossing Points* (CPs) ermöglichen einen genauen quantitativen Vergleich. Durch das Normalisieren über einen Kalibrator werden verschiedene Versuche und durch die Effizienzkorrektur die Expression verschiedener Gene miteinander vergleichbar.

Für den Zweck, die Expression eines Zielgens bzw. eines stark regulierten Markergens in unterschiedlich exponierten Organismen zu vergleichen, ist der Vergleich mit der Expression eines einzelnen Referenzgens ausreichend. Sollen jedoch schwache Regulierungen detektiert werden, sind mehrere Referenzgene nötig, um die

¹ <http://www.edenresearch.info/>

möglichen individuellen Schwankungen in der Expression eines der Referenzgene ausgleichen zu können. In dieser Arbeit wurde die Expressionsrate von *vtg1* bei den signifikant unterschiedlichen Gruppen von E2 um den Faktor 1.000 bis 10.000, von BPA um den Faktor 10.000 – 80.000, von Genistein um den Faktor 1.000 und von EE2 um den Faktor von 80.000 – 110.000 erhöht. Im Vergleich zu diesen sehr großen Faktoren fällt die gezeigte Schwankung in der Expression der Referenzgene nicht ins Gewicht. Die größte Schwankung zeigte *β-aktin* (bis zu Faktor 33), die geringste *gapdh* (bis zu Faktor 7). Als Referenzgen eignet sich von den drei getesteten somit im Zebrafisch *gapdh* am Besten, jedoch sind die gezeigten Schwankungen zu gering, um die Werte bei so stark regulierten Markergenen wie *vtg1* zu verfälschen.

Bei den NP-Proben war keine eindeutige Aussage möglich. Die Zebrafische reagierten sehr unterschiedlich auf die verschiedenen Konzentrationen von NP. Selbst bei der höchsten Konzentration von 500 µg/l ist kein eindeutiges Ergebnis zu erkennen. Die Vermutung liegt nahe, dass NP erst in sehr hohen Konzentrationen eine starke oestrogene Wirkung hat. Allerdings ist das Risiko groß, dass man auf Transkriptomebene dann keine oestrogenen Effekte sondern Auswirkungen der Toxizität misst. Aus diesem Grunde sind die NP Proben nicht in die Microarray-Experimente aufgenommen worden. Vetillard und Bailhache (2006) zeigten, dass NP erst in einer Konzentration von 2,2 mg/l bei juvenilen Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) eine verstärkte Vitellogenin-Expression in der Leber bewirkt.

Der starke Anstieg in der Expressionsrate von *vtg1* zeigt die Eignung dieses Markers als Zielgen für die Detektion von oestrogenen Effekten. Allerdings erlaubt dieser Ansatz nur das Feststellen einer oestrogenen Wirkung, nicht aber wodurch diese hervorgerufen wurde: ob eine einzelne Substanz, ein Gemisch oder andere Ursachen vorliegen. Der Ansatz ermöglicht eine schnelle „Ja / Nein“ Antwort auf die Frage, ob der untersuchte Organismus mit oestrogen wirksamen Substanzen in Kontakt gekommen ist.

4.4 Microarray-Experimente

Die Veränderungen im Genexpressionsmuster von männlichen adulten Zebrafischen, die mit 500 ng/l E2, 1.000 µg/l BPA und 5.000 µg/l Genistein exponiert wurden, wurden mit Microarray-Experimenten erfasst. Anschließend wurde eine Liste der

regulierten Gene für jede Chemikalie erstellt. Insgesamt wurden 211 Gene durch E2, 231 durch Genistein und 47 durch BPA in ihrer Expression reguliert.

Von allen drei Chemikalien am stärksten reguliert wurde die Expression der Gene, die für verschiedene Vitellogenin-Proteine kodieren. Dies zeigt, wie sensitiv das endokrine System ist. Bislang sind sieben verschiedene Vitellogenin-Gene bekannt (Wang et al., 2000), fünf davon werden in ihrer Expression von allen drei getesteten Chemikalien hochreguliert. Es fällt auf, dass E2 den stärksten Einfluss auf deren Expression hat, BPA den schwächsten. Die oestrogene Wirkung von BPA ist deutlich zu erkennen, jedoch wesentlich schwächer als die von Genistein oder E2. Grundsätzlich wurde gezeigt, dass sich Vitellogenin sehr gut als Marker auf Transkriptomebene eignet.

Die Expression von *vtg1* wurde lediglich von E2 und Genistein hochreguliert, nicht aber von BPA. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der qPCR-Experimente, durch die eine signifikante Erhöhung der Expression von *vtg1* durch BPA bei 2.000 µg/l festgestellt wurde. Wang et al. (2005) veröffentlichten die Sequenzen mehrerer Vitellogenin Gene, und es zeigte sich beim Abgleich der verwendeten Primer Sequenzen, dass die verwendete forward-Sequenz für *vtg1* zu 100 % zu der Basenfolge von *vtg7* komplementär ist, die reverse-Sequenz zu 94 %. Durch die verwendeten Primer wurde also nicht nur ein Abschnitt des *vtg1* Gens amplifiziert, sondern auch die mehrerer anderer Vitellogenin Gene. Dies könnte auch den starken Anstieg in der Expression erklären, der bei den Microarray-Experimenten geringer war. Nachdem dies aber sowohl bei den Kontrollen als auch bei den exponierten Tieren geschah, verfälscht dies nicht das Ergebnis der qPCR-Experimente, zumal es Zweck dieser Experimente war, oestrogene Effekte zu messen, was durch Messen der Expression mehrerer Vitellogenin-Gene erfolgen kann, wie Tabelle 11 zeigt.

Alle drei Chemikalien sind beim Zebraabärbling in der Lage, die Expression von Genen zu regulieren, die an der Entwicklung des Embryos beteiligt sind. Brion et al. (2004) zeigten die Auswirkungen von E2 auf die Entwicklung der Embryonen, die mit 100 ng/l E2 exponiert wurden. Die auffälligste Auswirkung war dabei ein Verschieben des Geschlechterverhältnisses zu Gunsten der weiblichen Tiere. Auch das Phytoestrogen Genistein regulierte die Expression von Entwicklungsgenen. Dies ist eine mögliche Erklärung für die Hochregulierung der *zona pellucida*-Gene, die für Bausteine der Eihülle kodieren. Nachdem die Tiere in ihrem natürlichen Lebensraum immer wieder Phytoestrogenen ausgesetzt sind, könnte im Laufe der Zeit ein

Schutzmechanismus gegen eine entsprechende Exposition entwickelt worden sein: die Eihülle wurde verstärkt. So könnte die Entwicklung der Embryonen vor Veränderungen durch Phytoöstrogene geschützt werden.

Arukwe et al. (2001) zeigten mittels ELISA-Messungen, dass auch NP in Regenbogenforellen die Synthese von Eihüllen-Proteinen verstärkt. Nachdem die Regulierung der *zona pellucida*-Gene nicht durch E2 oder BPA erfolgte, können diese als Marker zur Detektion bestimmter oestrogen wirksamer endokriner Disruptoren dienen. Der Marker Vitellogenin differenziert nicht zwischen unterschiedlichen Oestrogenen, mit den Eihüllen-Proteinen könnte so ein spezifischerer Marker vorliegen.

45 Gene wurden in ihrer Expression durch E2 und Genistein reguliert, davon 24 ETs. Im Gegensatz dazu sind die gemeinsam von E2 und BPA oder Genistein und BPA regulierten Gene lediglich Vitellogenin-Gene oder *gapdh* bei E2 und BPA und ein bislang unbekanntes Gen bei Genistein und BPA. Dies deutet darauf hin, dass E2 und Genistein eine ähnliche Wirkweise haben, das Xenooestrogen BPA jedoch eine unterschiedliche. Das et al. (1997) zeigten, dass es einen nicht-Rezeptor-Weg für Oestrogene geben muss, in der Zelle zu wirken. Unterschiede in den Effekten auf das Expressionsmuster der drei Chemikalien sind möglicherweise auf unterschiedliche „Signalwege“ zurückzuführen.

Die von dem „Gene Ontology (GO) Consortium“ bereitgestellte Datenbank ist ein sehr nützliches Werkzeug, um die Produkte bestimmter Gene einer Zellkomponente, einer molekularen Funktion oder einem biologischen Prozess zuzuordnen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die von den untersuchten Chemikalien regulierten Gene, soweit möglich, biologischen Prozessen zugeordnet. Auch hier traten wieder einige Gemeinsamkeiten von E2 und Genistein auf, jedoch nur wenige von E2 und BPA oder Genistein und BPA. Dies untermauert die Annahme, dass BPA seine oestrogene Wirkung anders hervorruft als E2 oder Genistein.

Auffällig ist, dass drei durch Genistein in ihrer Expression herabregulierte Gene der Blutgerinnung zugeordnet wurden. Vielleicht ist dies einer der gesundheitsfördernden Aspekte des Phytoöstrogens, der Genistein den Einzug in Apotheken als Nahrungsergänzungsmittel ermöglichte.

Die Gesamt-Genom-Microarrays bieten einen komfortablen Weg, um sich über die Veränderungen im Expressionsmuster einen Überblick zu verschaffen. Im Gegensatz zu den qPCR-Experimenten wird mittels Microarrays also nicht die Expression eines einzelnen Gens untersucht, sondern die von vielen, in diesem Falle

von 14.067. Bei dieser großen Anzahl von immobilisierten Sonden auf dem Array-Chip bietet sich die Normalisierung über die Gesamtzahl der Gene an, da man davon ausgeht, dass der größte Teil der Gene nicht reguliert wird. Anders sieht das bei Arrays aus, bei denen man eine geringere Anzahl von Sonden selbst immobilisiert. Hier muss eine bestimmte Anzahl von Housekeeping-Genen immobilisiert werden, über die dann normalisiert werden kann. Die vorliegenden qPCR Ergebnisse zeigen aber, dass Schwankungen der Expression durchaus vorliegen und die Gene nicht ständig auf einem gleichbleibenden Niveau exprimiert werden. Diese Schwankungen sind zwar so gering, dass sie das Ergebnis nicht verfälschen, wenn man die Expression eines Markergens untersucht, jedoch erschweren sie das Auffinden von Genen, die nur schwach reguliert werden. Als Lösung dieses Problems bei Microarrays mit geringer Sondenzahl bietet sich das Normalisieren über spezielle Normalisierungssonden an, die von einem anderen Organismus stammen.

4.5 Gefährdung durch oestrogen wirksame endokrine Disruptoren

Eine Gefährdung für Mensch (Andersson und Skakkebaek, 1999) und Tier (vgl. 1., S. 9ff.) durch oestrogen wirksame endokrine Disruptoren liegt vor. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass oestrogen wirksame Chemikalien wie E2, BPA oder Genistein nicht nur in den Metabolismus regulatorisch eingreifen, sondern auch Entwicklungsvorgänge steuern können. Das Regulieren der Expression von Genen, deren Produkte an der Entwicklung beteiligt sind, zeigt, dass oestrogen wirksame Substanzen nicht nur in juvenilen Organismen die Entwicklung verändern, sondern auch in Adulten diese erneut aktivieren können.

Für die eingangs erwähnten Beispiele für die Bedrohung ganzer Populationen konnten im Rahmen dieser Arbeit Belege gesammelt werden, wie oestrogen wirksame Substanzen diese Effekte erzielen. Das Regulieren von Entwicklungsgenen wie den *homeo box*-Genen, die von allen drei Chemikalien reguliert wurden, könnte für das Verschieben des Geschlechterverhältnisses verantwortlich sein.

Es ist bekannt, dass pränatale Exposition mit natürlichen und synthetischen Oestrogenen zu verschiedenen Krebserkrankungen bei Mensch und Tier führen kann (Birnbauer und Fenton, 2003). In diesem Zusammenhang ist es auffällig, dass einige der durch E2 und Genistein regulierten Gene GOs zugewiesen wurden, die mit der

Zellzyklusregulation oder DNA-Replikation in Verbindung stehen. Der Verdacht liegt nahe, dass diese Veränderungen später zu irreparablen Schäden an der Zelle führen.

Es lassen sich auch direkte Hinweise auf eine Kanzerogenität finden: das Gen *ctnnb2*, kodierend für beta-catenin 2, wurde in seiner Expression um den Faktor 17,8 durch E2 hochreguliert. Fritsch et al. (2006) zeigten kürzlich, dass beta-catenine in Tumorzellen von Keimbahntumoren stark exprimiert werden und im Zellkern akkumulieren. Dort agieren beta-catenine vermutlich als Transkriptionsfaktoren (Huber et al., 1996).

Auch bei den Chemikalien Genistein und BPA lassen sich Hinweise auf eine Kanzerogenität finden. Durch BPA wird die Expression von *oct1* hochreguliert. *oct1* wird in MCF7-Zelllinien übermäßig stark exprimiert (Jin et al., 1999). Bei den durch Genistein regulierten Genen lassen sich mehrere prominente Marker für Krebs finden. Beispiele hierfür sind XM_688865.1, das für ein Protein kodiert, das dem NKX2-Protein ähnelt oder Cyclin A, das um den Faktor 3 hochreguliert wurde. NKX2 dient als Marker für humane Lungenkarzinome (Kang et al., 2004) und Cyclin A für humane Brustkarzinome (Husdal et al., 2006).

Die Gefährdung geht also nicht nur von den negativen Effekten auf die Reproduktion aus, sondern auch von zellulären Effekten, von denen viele auf Kanzerogenität der endokrinen Disruptoren mit oestrogener Wirkung deuten.

Die in der Umwelt tatsächlich gemessenen Konzentrationen sind niedriger als die in den durchgeführten Experimenten verwendeten Konzentrationen (vgl. Tabelle 17, S. 74). Jedoch handelt es sich in der Natur um Expositionen mit Mischungen von mehreren oestrogen wirksamen Chemikalien und um eine zumeist lebenslange Expositionsdauer. Somit ist anzunehmen, dass die beschriebenen Auswirkungen in unterschiedlichem Ausmaß auch in der Umwelt zu finden sind.

Wirbeltiere sind ständig oestrogen wirksamen endokrinen Disruptoren ausgesetzt. Tabelle 17 (S. 74) zeigt, dass diese in verschiedenen Mischungen bereits Teil des Oberflächenwassers sind. Der Mensch ist nicht nur über das Trinkwasser exponiert. So findet EE2 Verwendung in Kontrazeptiva und BPA in der Plastikmanufaktur. BPA findet sich in Lebensmittelverpackungen wie in Mikrowellengeschirr, das bedeutet, dass der Mensch täglich mit oestrogen wirksamen Chemikalien in Kontakt kommt.

Die Tatsache, dass die Expression mehrerer Vitellogenin-Gene durch E2, BPA und Genistein hochreguliert wurde, zeigt, dass das endokrine System sehr fein justiert ist und auf relative geringe Konzentrationen oestrogen wirksamer Substanzen reagiert.

Es bleibt die Frage, was man tun könnte, um diese Gefährdung zu verringern. Alum et al. (2004) versuchten, E2, EE2 und BPA mit Chlor und Ozon zu oxidieren. Dabei zeigten sie, dass bereits nach 10 minütiger Ozonbehandlung des Wassers weniger als 25 % der ursprünglichen endokrinen Disruptoren messbar waren. Eine Behandlung von Kläranlagenabwasser mit Ozon wird bereits in Einzelfällen angewendet (Falconer, 2006) und ist für Ballungszentren auch angebracht. Denkbar ist auch eine Filterung des Abwassers über Aktivkohle, um organische Substanzen zu binden. Es ist also möglich, das Vorkommen von endokrinen Disruptoren in der Umwelt zu reduzieren und somit auch die Gefährdung von Wirbeltieren.

5 Zusammenfassung

Endokrine Disruptoren mit oestrogener Wirkung sind in vielen Gewässern in Mischungen nachweisbar. Dazu gehören verschiedene Vertreter der vier Klassen endogene Oestrogene, Phyto- und Mykooestrogene, synthetische und Xenooestrogene. Es ist zwar bekannt, dass diese Substanzen in höheren Konzentrationen die Fähigkeit zur Reproduktion beeinträchtigen und den Bestand von diversen Wirbeltierpopulationen gefährden, über die genauen Effekte auf das Expressionsmuster von Individuen ist hingegen wenig bekannt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden männliche, adulte Zebrabärblinge (*Danio rerio*) mit 17 β -Oestradiol, Bisphenol A, Genistein, Nonylphenol und Ethinyloestradiol für elf Tage exponiert. Nach der Exposition wurde aus den Lebern der Fische die RNA extrahiert und in cDNA revers transkribiert.

Zum Erfassen der Expressionsveränderung einzelner Markergene im Zebrabärbling diente die quantitative PCR, die es ermöglichte, die Expressionsänderung dieses Gens mit der Expression von nicht-regulierten Referenzgenen zu vergleichen. Mit diesem Ansatz konnte gezeigt werden, dass die Expression des Markergens *vtg1*, kodierend für das Eidottervorläuferprotein Vitellogenin, in männlichen Tieren durch folgende Chemikalien signifikant verstärkt wurde: 17 β -Oestradiol (200 ng/l), Bisphenol A (2.000 μ g/l), Genistein (5.000 μ g/l) und Ethinyloestradiol (30 ng/l).

Zur Erfassung von Genexpressionsmusteränderungen im Bereich des gesamten Genoms wurden Microarray-Experimente mit 14.067 auf Objektträgern immobilisierten Sonden durchgeführt. Dabei wurde die fluoreszenzmarkierte cDNA von Kontrolltieren und exponierten Tieren (17 β -Oestradiol, 500 ng/l; Bisphenol A, 1.000 μ g/l; Genistein, 5.000 μ g/l) mit diesen Sonden hybridisiert. Nach der statistischen Auswertung der gewonnenen Daten wurden die in ihrer Expression regulierten Gene analysiert und verschiedenen biologischen Prozessen zugeordnet. Dabei fand die Datenbank der „Gene Ontologies“ (GO) Verwendung. Es stellte sich heraus, dass sich die Effekte von 17 β -Oestradiol und Genistein ähneln, Bisphenol A hingegen nur schwache und dazu unterschiedliche Effekte bewirkte. Die Mehrzahl der regulierten Gene kodieren für Proteine, die im Metabolismus eine Rolle spielen. Neben einigen Genen, die in der Entwicklung eine Rolle spielen, wurden mehrere Gene in ihrer Expression reguliert, die in der Human- und Veterinärmedizin als Marker für die Diagnose und Therapie von Krebs genutzt werden.

Literaturverzeichnis

- Alum A, Yoon Y, Westerhoff P, Abbaszadegan M. 2004. Oxidation of bisphenol A, 17beta-estradiol, and 17alpha-ethynyl estradiol and byproduct estrogenicity. *Environ Toxicol.* 19(3): 257-64.
- Andersson AM, Skakkebaek NE. 1999. Exposure to exogenous estrogens in food: possible impact on human development and health. *Eur J Endocrinol.* 140(6):477-85. Review.
- Arukwe A, Kullman SW, Hinton DE. 2001. Differential biomarker gene and protein expressions in nonylphenol and estradiol-17beta treated juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 129(1):1-10.
- Beck V, Pfitscher A, Jungbauer A. 2005. GFP-reporter for a high throughput assay to monitor estrogenic compounds. *Biochem Biophys Methods.* 64(1): 19-37.
- Birnbaum LS, Fenton SE. 2003. Cancer and developmental exposure to endocrine disruptors. *Environ Health Perspect.* 111(4): 389-94. Review.
- Brion F, Tyler CR, Palazzi X, Laillet B, Porcher JM, Garric J, Flammarion P. 2004. Impacts of 17beta-estradiol, including environmentally relevant concentrations, on reproduction after exposure during embryo-larval-, juvenile- and adult-life stages in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat Toxicol.* 68(3): 193-217.
- Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. 1992. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ.* 305(6854): 609-13.
- Cleveland WS. 1979. Robust locally weighted regression and smoothing scatterplots. *J. Amer. Statist. Assoc.* 74: 829-836.
- Colborn T. 1995. Environmental estrogens: Health implications for humans and wildlife. *Environ Health Perspect.* 103 Suppl 7: 135-136.

- Custodia N, Won SJ, Novillo A, Wieland M, Li C, Callard IP. 2001. *Caenorhabditis elegans* as an environmental monitor using DNA microarray analysis. *Ann N Y Acad Sci.* 948: 32-42.
- Czihak G., Langer H., Ziegler H. 1992. *Biologie.* 5. Auflage. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Das SK, Taylor JA, Korach KS, Paria BC, Dey SK, Lubahn DB. 1997. Estrogenic responses in estrogen receptor-alpha deficient mice reveal a distinct estrogen signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94 (24): 12786-91.
- Falconer IR. 2006. Are endocrine disrupting compounds a health risk in drinking water? *Int J Environ Res Public Health.* 3(2): 180-4.
- Fent. 1998. *Ökotoxikologie.* Georg Thieme Verlag, New York, Stuttgart.
- Fries E, Puttmann W. 2003. Occurrence and behaviour of 4-nonylphenol in river water of Germany. *J Environ Monit.* 5(4): 598-603.
- Fritsch MK, Schneider DT, Schuster AE, Murdoch FE, Perlman EJ. 2006. Activation of Wnt/beta-catenin signaling in distinct histologic subtypes of human germ cell tumors. *Pediatr Dev Pathol.* 9(2): 115-31. Epub 2006 Jun 16.
- Fromme H, Kuchler T, Otto T, Pilz K, Muller J, Wenzel A. 2002. Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. *Water Res.* 36(6): 1429-38.
- Gentleman R.C., Carey V.J., Bates D.M., Bolstad B., Dettling M., Dudoit S., Ellis B., Gautier L., Ge Y., Gentry J., Hornik K., Hothorn T., Huber W., Iacus S., Irizarry R., Leisch F., Li C., Maechler M., Rossini A.J., Sawitzki G., Smith C., Smyth G., Tierney L., Yang J.Y., Zhang J., 2004. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* 5 (10): R80.

- Gruvberger S, Ringner M, Chen Y, Panavally S, Saal LH, Borg A, Ferno M, Peterson C, Meltzer PS. 2001. Estrogen receptor status in breast cancer is associated with remarkably distinct gene expression patterns. *Cancer Res.* 61(16): 5979-84.
- 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. *Environ Health Perspect.* 102(8): 680-8.
- Hinteman T, Schneider C, Scholer HF, Schneider RJ. 2006. Field study using two immunoassays for the determination of estradiol and ethinylestradiol in the aquatic environment. *Water Res.* 40(12): 2287-94.
- Huber O, Korn R, McLaughlin J, Ohsugi M, Herrmann BG, Kemler R. 1996. Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech Dev.* 59(1): 3-10.
- Husdal A, Bukholm G, Bukholm IR. 2006. The prognostic value and overexpression of cyclin A is correlated with gene amplification of both cyclin A and cyclin E in breast cancer patient. *Cell Oncol.* 28(3): 107-16.
- Ihaka R, Gentleman RC. 1996. A language for data analysis and graphics. *J. Comput. Graph. Statist.* 5 (3): 299-314.
- Jin T, Branch DR, Zhang X, Qi S, Youngson B, Goss PE. 1999. Examination of POU homeobox gene expression in human breast cancer cells. *Int J Cancer.* 81(1): 104-12.
- Jobling S, Casey D, Rodgers-Gray T, Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Pawlowski S, Baunbeck T, Turner AP, Tyler CR. 2004. Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. *Aquat Toxicol.* 66(2): 207-22.

- Jobling S, Sheanan D, Osborne JA, Matthiesen P, Sumpter JP. 1996. Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to alkylphenolic chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 194–202.
- Johnson AC, Aerni HR, Gerritsen A, Gibert M, Giger W, Hylland K, Jurgens M, Nakari T, Pickering A, Suter MJ, Svenson A, Wettstein FE. 2005. Comparing steroid estrogen, and nonylphenol content across a range of European sewage plants with different treatment and management practices. *Water Res.* 39(1): 47-58.
- Kang Y, Hebron H, Ozbun L, Mariano J, Minoo P, Jakowlew SB. 2004. Nkx2.1 transcription factor in lung cells and a transforming growth factor-beta1 heterozygous mouse model of lung carcinogenesis. *Mol Carcinog.* 40(4): 212-31.
- Kashiwada S, Ishikawa H, Miyamoto N, Ohnishi Y, Magara Y. 2002. Fish test for endocrine-disruption and estimation of water quality of Japanese rivers. *Water Res.* 36(8): 2161-6.
- Kavlock RJ, Daston GP, DeRosa C, Fenner-Crisp P, Gray LE, Kaattari S, Lucier G, Luster M, Mac MJ, Maczka C, Miller R, Moore J, Rolland R, Scott G, Sheehan DM, Sinks T, Tilson HA. 1996. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ Health Perspect.* 104 Suppl 4: 715-40.
- Kiparissis Y, Hughes R, Metcalfe C, Ternes T. 2001. Identification of the isoflavonoid genistein in bleached kraft mill effluent. *Environ Sci Technol.* 35(12): 2423-7.
- Kwak HI, Bae MO, Lee MH, Lee YS, Lee BJ, Kang KS, Chae CL, Sung HJ, Shin JS, Kim JH, Mar WC. 2001. Effects of nonylphenol, bisphenol A, and their mixture on the viviparous swordtail fish (*Xiphophorus helleri*). *Environ. Health Perspect.* 20: 787–795.

- Leusch FD, Van den Heuvel MR, Laurie AD, Chapman HF, Gooneratne SR, Tremblay LA. 2005. Quantification of vitellogenin mRNA induction in mosquitofish (*Gambusia affinis*) by reverse transcription real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). *Biomarkers*. 10(6): 429-38.
- Linney E, Dobbs-McAuliffe B, Sajadi H, Malek RL. 2004. Microarray gene expression profiling during the segmentation phase of zebrafish development. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 138(3): 351-62.
- Little R.J.A. and Rubin C.B., 1987. *Statistical Analysis with Missing Data*. New York: Wiley.
- Lo J, Lee S, Xu M, Liu F, Ruan H, Eun A, He Y, Ma W, Wang W, Wen Z, Peng J. 2003. 15000 unique zebrafish EST clusters and their future use in microarray for profiling gene expression patterns during embryogenesis. *Genome Res*. 13(3): 455-66.
- Mason CF, Ford TC, Last NI. 1986. Organochlorine residues in British otters. *Bull Environ Contam Toxicol*. 36(5): 656-61.
- Mathavan S, Lee SG, Mak A, Miller LD, Murthy KR, Govindarajan KR, Tong Y, Wu YL, Lam SH, Yang H, Ruan Y, Korzh V, Gong Z, Liu ET, Lufkin T. 2005. Transcriptome analysis of zebrafish embryogenesis using microarrays. *PLoS Genet*. 1(2): 260-76.
- Omoto Y, Hayashi S. 2002. A study of estrogen signaling using DNA microarray in human breast cancer. *Breast Cancer*. 9(4): 308-11.
- Panter GH, Thompson RS, Sumpter JP. 1998. Adverse reproductive effects in male fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to environmentally relevant concentrations of the natural oestrogens, oestradiol and oestrone. *Aquat. Toxicol*. 42: 243-253.

- Payne J, Rajapakse N, Wilkins M, Kortenkamp A. 2000. Prediction and assessment of the effects of mixtures of four xenoestrogens. *Environ Health Perspect.* 108(10): 983-987.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29(9): e45
- Pfaffl MW. 2004. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOSpektrum* 1/04: 92-95
- Purdom CE, Hardiman PA, Bye VJ, Eno NC, Tyler CR, Sumpter JP. 1994. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem Ecol* 8: 275-285.
- Rasmussen R. 2001. Quantification on the LightCycler. In: Meuer, S, Wittwer, C and Nakagawara, K, eds. *Rapid Cycle Realtime PCR, Methods and Applications*; Springer Press, Heidelberg; ISBN 3-540-66736-9, 21-34
- Rose J, Holbech H, Lindholst C, Norum U, Povlsen A, Korsgaard B, Bjerregaard P. 2002. Vitellogenin induction by 17beta-estradiol and 17alpha-ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 131(4): 531-9.
- Routledge EJ, Sheahan D, Desbrow C, Brighty GC, Waldock M, Sumpter JP. 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent 2: in vivo responses in trout and roach. *Environ. Sci. Technol.* 32: 1559–1565.
- Scholz S, Kordes C, Hamann J, Gutzeit HO. 2004. Induction of vitellogenin in vivo and in vitro in the model teleost medaka (*Oryzias latipes*): comparison of gene expression and protein levels. *Mar Environ Res.* 57(3): 235-44.
- Seifert, M, Haindl, S, Hock, B. 1999. Development of an enzyme linked receptor assay (ELRA) for estrogens and xenoestrogens. *Analytica Chimica Acta* 386: 191-199.

- Shore LS, Gurevitz M, Shemesh M. 1993. Estrogen as an environmental pollutant. *Bull Environ Contam Toxicol*. 51 (3): 361-366.
- Spengler P, Korner W, Metzger JW. 2001. Substances with estrogenic activity in effluents of sewage treatment plants in southwestern Germany. 1. Chemical analysis. *Environ Toxicol Chem*. 20(10): 2133-41.
- Stachel B, Ehrhorn U, Heemken OP, Lepom P, Reincke H, Sawal G, Theobald N. 2003. Xenoestrogens in the River Elbe and its tributaries. *Environ Pollut*. 124(3): 497-507.
- Sumpter JP, Jobling S. 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ Health Perspect*. 103 Suppl 7: 173-8.
- Ternes TA, Stumpf M, Mueller J, Haberer K, Wilken RD, Servos M. 1999. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants--I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Sci Total Environ*. 225(1-2): 81-90.
- Thomas-Jones E, Thorpe K, Harrison N, Thomas G, Morris C, Hutchinson T, Woodhead S, Tyler C. 2003. Dynamics of estrogen biomarker responses in rainbow trout exposed to 17beta-estradiol and 17alpha-ethinylestradiol. *Environ Toxicol Chem*. 22(12): 3001-8.
- Todorov JR, Elskus AA, Schlenk D, Ferguson PL, Brownawell BJ, McElroy AE. 2002. Estrogenic responses of larval sunshine bass (*Morone saxatilis* x *M. chrysops*) exposed to New York City sewage effluent. *Mar Environ Res*. 54(3-5): 691-5.
- Tsutsumi O. 2005. Assessment of human contamination of estrogenic endocrine-disrupting chemicals and their risk for human reproduction. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 93(2-5): 325-330.
- Van den Belt K, Verheyen R, Witters H. 2003. Comparison of vitellogenin responses in zebrafish and rainbow trout following exposure to environmental estrogens. *Ecotoxicol Environ Saf*. 56(2): 271-81.

- Vetillard A, Bailhache T. 2006. Effects of 4-n-nonylphenol and tamoxifen on salmon gonadotropin-releasing hormone, estrogen receptor, and vitellogenin gene expression in juvenile rainbow trout. *Toxicol Sci.* 92(2): 537-44. Epub 2006 May 16.
- Wang H, Yan T, Tan JT, Gong Z. 2000. A zebrafish vitellogenin gene (vg3) encodes a novel vitellogenin without a phosphitin domain and may represent a primitive vertebrate vitellogenin gene. *Gene* 256: 303–310.
- Wang H, Tan JT, Emelyanov A, Korzh V, Gong Z. 2005. Hepatic and extrahepatic expression of vitellogenin genes in the zebrafish, *Danio rerio*. *Gene* 356: 91-100.
- Welshons WV, Jordan VC. 1987. Adaptation of estrogen-dependent MCF-7 cells to low estrogen (phenol-red free) culture. *Eur J Clin Oncol* 12: 1935-1939
- Woodward A, Percival H, Jennings N, Moore C. 1993. Low clutch viability of American Alligators on Lake Apopka. *Florida Science* 56: 52-63.
- Zhang D, Salto-Tellez M, Putti TC, Do E, Koay ES. 2003. Reliability of tissue microarrays in detecting protein expression and gene amplification in breast cancer. *Mod Pathol* 16(1): 79-84.

Anhang A

Liste mit allen hoch- und herabregulierten Sequenzen nach der Exposition mit E2.

Kodiert für	Kürzel	Accession Nummer	fc	p - Wert
ETs hochreguliert				
vitellogenin 2	<i>vtg2</i>	AY729644.1	445,33	1,51E-08
vitellogenin 7 mRNA, partial cds	<i>vtg7</i>	AY729649.1	442,37	9,23E-09
vitellogenin 5	<i>vtg5</i>	NM_001025189.1	410,51	4,21E-09
vitellogenin 1	<i>vtg1</i>	AY034146.1	283,53	2,25E-08
vitellogenin 6	<i>vtg6</i>	XM_682549.1	248,46	1,45E-08
nicotinamide nucleotide transhydrogenase	<i>nnt</i>	NM_214756.1	94,13	7,72E-07
receptor interacting protein kinase 5	<i>ripk5</i>	NM_205627.2	63,55	8,95E-05
homeo box A3a	<i>hoxa3a</i>	NM_131534.1	31,01	1,51E-06
pdgfa associated protein 1	<i>pdap1</i>	NM_200210.1	24,93	1,89E-05
carbohydrate (chondroitin) synthase 1	<i>chys1</i>	NM_212678.1	20,66	9,86E-05
nuclear receptor subfamily 1, group d, member 1	<i>nr1d1</i>	NM_205729.1	18,61	4,42E-04
catenin beta 2	<i>ctnnb2</i>	BC056276.1	17,82	3,60E-06
forkhead box P2	<i>foxp2</i>	NM_001030082.1	17,65	4,88E-05
THO complex 2	<i>thoc2</i>	NM_001003847.1	16,15	5,15E-04
l(3)mbt-like 2 (Drosophila)	<i>l3mbtl2</i>	NM_200032.1	14,90	4,79E-06
excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 3	<i>ercc3</i>	NM_201582.1	12,95	5,59E-04
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 1, like	<i>dnaja11</i>	NM_199662.1	9,94	9,08E-05
vitellogenin 3, phosvitinless	<i>vtg3</i>	AF254638.1	9,76	3,43E-04
nuclear factor of activated T-cells 5, tonicity -responsive	<i>nfat5</i>	NM_199895.1	9,39	3,13E-04
cyclin B2	<i>ccnb2</i>	NM_199430.1	8,73	2,19E-05
nothepsin	<i>nots</i>	NM_131804.1	6,82	2,97E-05
estrogen receptor 1	<i>esr1</i>	NM_152959.1	6,66	3,59E-04
TBC1 domain family, member 7	<i>tbc1d7</i>	NM_200777.1	5,97	3,16E-03

Kodiert für	Kürzel	Accession Nummer	fc	p - Wert
activin A receptor, type IB	<i>acvr1b</i>	NM_130990.1	5,88	3,12E-03
decapentaplegic and Vg-related 1	<i>dvr1</i>	NM_130948.1	5,74	3,30E-04
integrin beta1 subunit-like protein 2	<i>itgb1</i>	NM_001034987.1	5,05	1,83E-05
forkhead box A2	<i>foxa2</i>	NM_130949.1	4,59	1,33E-02
S-adenosylhomocysteine hydrolase-like 2	<i>ahcy12</i>	NM_201340.1	4,31	2,50E-02
tumor protein p73-like	<i>tp73l</i>	BC076530.1	4,27	8,44E-03
eukaryotic translation termination factor 1	<i>etf1</i>	NM_201460.2	4,26	9,53E-06
cleavage and polyadenylation specific factor 1	<i>cpsf1</i>	AY648799.1	4,13	1,65E-05
heat shock 60kD protein 1 (chaperonin)	<i>hspd1</i>	NM_181330.3	4,03	1,53E-02
guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 1, like	<i>gnb1l</i>	NM_213481.1	3,86	8,89E-05
3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	<i>hibadh</i>	NM_201160.1	3,49	1,39E-02
mesoderm posterior b	<i>mespb</i>	NM_131552.1	3,36	8,05E-04
reticulon 1	<i>rtn1</i>	BC071446.1	3,33	1,07E-03
jagged 2	<i>jag2</i>	AF229450.1	3,18	2,16E-02
dermatan sulfate proteoglycan 3	<i>dspg3</i>	NM_001017903.1	3,18	6,42E-04
Rac GTPase-activating protein 1	<i>racgap1</i>	NM_199631.1	3,09	2,68E-03
valosin containing protein	<i>vcp</i>	NM_201481.1	3,03	3,18E-04
homeo box A2b	<i>hoxa2b</i>	NM_131106.1	2,68	3,36E-02
ephrin A2	<i>efna2</i>	BC080234.1	2,57	4,68E-02
vitellogenin 2	<i>vtg2</i>	XM_682944.1	2,41	4,92E-03
engrailed 1b	<i>eng1b</i>	AF071237.1	2,33	2,40E-02
pleckstrin homology domain containing, family A (phosphoinositide binding specific) member 1	<i>plekha1</i>	NM_213436.1	2,28	1,11E-03
talin 1	<i>tlh1</i>	NM_001009560.1	2,23	6,36E-03
protein inhibitor of activated STAT, 4	<i>pias4</i>	NM_213403.2	2,11	2,90E-02
FK506 binding protein 11	<i>fkbp11</i>	NM_001012249.1	2,11	5,87E-03
CDK5 regulatory subunit associated protein 1-like 1	<i>cdkall</i>	NM_200627.1	2,06	8,59E-03

Kodiert für	Kürzel	Accession Nummer	fc	p - Wert
TCs hochreguliert				
similar to vitellogenin	LOC557092	XM_680074.1	159,18	1,11E-06
zgc:92055	zgc:92055	NM_001007768.1	43,46	3,58E-06
similar to myosin containing PDZ domain	LOC559005	XM_682299.1	33,40	1,30E-04
Zebrafish DNA sequence from clone CH211-162M14, complete sequence		AL935053.6	28,78	9,68E-06
Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-26L17 in linkage group 3, complete sequence		BX901973.12	28,39	2,76E-04
Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-183C16 in linkage group 4, complete sequence		BX640593.8	24,06	2,96E-06
zgc:56425	zgc:56425	NM_199989.1	18,52	8,98E-05
Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-8O19 in linkage group 20 Contains the gene for a novel protein (zgc:63746), the gene for a novel protein (zgc:55614), the gene for the 5' end of a novel protein similar to mouse and human cyclin-dependent kinase (CDC2-like) 11 (CDK11), the gene for a novel protein similar to vertebrate mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5 (MAP3K5), a novel gene and eleven CpG islands, complete sequence		BX545848.23	17,12	4,35E-05
zgc:109973	zgc:109973	NM_001020540.1	16,08	6,82E-04
similar to vitellogenin 3 precursor	LOC565509	XM_688789.1	15,93	4,43E-06
Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-225F5 in linkage group 3, complete sequence		BX682558.6	14,65	4,31E-04
similar to Forkhead box protein P1	LOC564127	XM_687486.1	13,15	1,75E-04
similar to vitellogenin 1	LOC559475	XM_686219.1	12,00	4,24E-04
zgc:123049	zgc:123049	BC086809.1	11,05	3,31E-04
zgc:63647	zgc:63647	NM_201077.1	10,65	8,78E-05
zgc:110689	zgc:110689	NM_001020477.1	10,50	4,06E-03
similar to tuberous sclerosis 2	LOC567524	XM_690820.1	10,41	2,74E-03
zgc:109868	zgc:109868	NM_001017824.1	10,20	1,59E-05
zgc:100913	zgc:100913	NM_001003751.1	9,86	4,44E-03

Kodiert für	Kürzel	Accession Nummer	fc	p - Wert
Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-97O1 in linkage group 14, complete sequence		BX640507.8	8,95	5,22E-03
similar to WNK lysine deficient protein kinase 4	LOC557091	XM_680072.1	8,93	4,60E-03
Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-4C23 in linkage group 22, complete sequence		AL929032.10	8,84	5,08E-04
Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-223L3 in linkage group 4, complete sequence		CR388075.14	6,67	1,69E-04
Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-126A1 in linkage group 22, complete sequence		BX927163.31	6,09	6,70E-05
Zebrafish DNA sequence from clone CH211-250B7 in linkage group 16, complete sequence		CR626888.9	5,89	1,44E-04
zgc:55456	zgc:55456	NM_197942.1	5,47	4,39E-03
zgc:77836	zgc:77836	NM_213196.1	4,77	2,28E-03
zgc:112538	zgc:112538	NM_001017741.2	4,53	1,16E-03
similar to tensin-like SH2 domain containing 1	CH211-191A24.2	XM_693973.1	4,47	8,57E-03
similar to RAN binding protein 5	LOC569455	XM_692846.1	4,09	1,18E-02
Danio rerio clone CH211-218M15, complete sequence		AC144711.2	4,07	1,51E-03
zgc:56142	zgc:56142	NM_213003.1	4,00	7,95E-03
Zebrafish DNA sequence from clone CH211-89M19, complete sequence		BX004832.9	3,81	3,69E-03
zgc:63663	zgc:63663	NM_200614.1	3,76	5,17E-03
Zebrafish DNA sequence from clone CH211-209J18 in linkage group 12, complete sequence		CR450820.5	3,73	1,88E-04
Zebrafish DNA sequence from clone CH211-123O7 in linkage group 21, complete sequence		CR354383.8	3,71	7,28E-07
similar to Tumor necrosis factor-inducible protein TSG-6 precursor (TNF-stimulated gene 6 protein) (Hyaluronate-binding protein)	LOC567311	XM_690606.1	3,71	1,56E-03

Kodiert für	Kürzel	Accession Nummer	fc	p - Wert
zgc:110312	zgc:110312	NM_001020583.1	3,70	8,26E-04
Zebrafish DNA sequence from clone CH211-11J2 in linkage group 7, complete sequence		CR381676.9	3,46	1,32E-03
similar to alpha-2-macroglobulin-1	LOC567732	XM_691032.1	3,41	7,06E-03
Zebrafish DNA sequence from clone CH211-257O19 in linkage group 15, complete sequence		BX640522.13	3,37	4,44E-04
similar to mKIAA1148 protein	LOC568810	XM_692165.1	3,29	1,83E-02
Zebrafish DNA sequence from clone DKEYP-3F10 in linkage group 11, complete sequence		BX649282.8	3,10	4,58E-02
zgc:55652	zgc:55652	NM_199775.1	3,09	1,05E-02
Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-210O7 in linkage group 6, complete sequence		BX571728.14	2,99	1,81E-02
similar to ubiquitin specific protease 10	LOC564632	XM_680529.1	2,96	3,40E-04
Zebrafish DNA sequence from clone CH211-251J8, complete sequence		AL935207.6	2,96	1,88E-02
Zebrafish DNA sequence from clone CH211-195I16 in linkage group 23, complete sequence		BX649300.4	2,80	4,39E-02
similar to Putative eukaryotic translation initiation factor 3 subunit (eIF-3)	LOC562666	XM_686041.1	2,75	3,48E-02
zgc:77407	zgc:77407	NM_213266.1	2,73	1,98E-02
similar to putative protein, with a coiled coil-4 domain, of bilateral origin (4H869)	LOC571179	XM_694744.1	2,67	3,76E-03
zgc:112431	zgc:112431	NM_001017782.1	2,56	1,24E-02
hypothetical protein LOC554662	LOC554662	XM_697410.1	2,50	1,62E-02
Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-171E12 in linkage group 7, complete sequence		BX470088.11	2,26	3,02E-02
similar to Family with sequence similarity 63, member A	LOC563470	XM_686831.1	2,25	1,21E-02
zgc:110658	zgc:110658	NM_001017879.1	2,21	3,40E-03

Kodiert für	Kürzel	Accession Nummer	fc	p - Wert
Zebrafish DNA sequence from clone BUSM1-12F11 in linkage group 19 Contains the 3' part of the rxrb gene for retinoid x receptor beta, a novel gene, the col11a2 gene for collagen type XI alpha-2, the fabg1 gene for FabG (beta-ketoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase, E. coli) like, and the 3' part of the brd2 gene for bromodomain-containing protein 2, complete sequence		AL672176.10	2,20	1,97E-02
similar to alpha-2-macroglobulin-1	LOC568842	XM_692198.1	2,07	3,67E-02
zgc:55283	zgc:55283	NM_200997.1	2,05	1,21E-06
similar to sodium-calcium exchanger	LOC557499	XM_680579.1	2,02	1,30E-02
ETs herabreguliert				
hemopexin	<i>hpx</i>	XM_686594.1	-4,84	5,04E-04
aldolase b, fructose-bisphosphate	<i>aldob</i>	NM_194367.3	-4,58	1,59E-02
glutathione peroxidase 4a	<i>gpx4a</i>	NM_001007282.1	-3,93	3,43E-02
fatty acid binding protein 10, liver basic	<i>fabp10</i>	NM_152960.1	-3,35	2,06E-02
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>gapdh</i>	BC095386.1	-3,32	2,05E-02
bactin2	<i>bactin2</i>	NM_181601.3	-3,31	8,63E-03
ferritin, heavy polypeptide 1	<i>fth1</i>	NM_131585.1	-3,24	4,81E-02
alcohol dehydrogenase 8a	<i>adh8a</i>	NM_001001946.1	-3,07	1,69E-02
actin, alpha 1, skeletal muscle	<i>acta1</i>	NM_131591.1	-3,06	1,17E-02
serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1	<i>serpina1</i>	NM_001013259.1	-3,05	3,27E-02
wdr45 like	<i>wdr45l</i>	NM_200240.1	-2,95	1,93E-03
signal peptid peptidase 3	<i>sppl3</i>	NM_001015068.1	-2,84	2,43E-02
trypsin	<i>try</i>	AJ297822.1	-2,77	3,08E-02
midkine-related growth factor	<i>mdka</i>	NM_131070.2	-2,71	9,63E-03
fatty acid binding protein 2, intestinal	<i>fabp2</i>	AY266452.1	-2,69	2,32E-02
glyceraldehyde-3-phosphatase dehydrogenase, spermatogenic	<i>gapdhs</i>	NM_213094.1	-2,64	3,55E-02
polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide E	<i>polr3e</i>	NM_212754.1	-2,61	1,67E-02

Kodiert für	Kürzel	Accession Nummer	fc	p - Wert
ras homolog gene family, member E	<i>arhe</i>	NM_199522.1	-2,54	9,96E-03
neurocan	<i>ncan</i>	AB127940.1	-2,48	2,32E-02
casein kinase 1, delta like	<i>csnk1dl</i>	NM_199583.1	-2,46	7,92E-03
keratin 18	<i>krt18</i>	NM_178437.2	-2,42	4,40E-02
membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain containing 1	<i>magi1</i>	NM_001007063.1	-2,40	2,51E-02
SRB7 suppressor of RNA polymerase B homolog (yeast)	<i>surb7</i>	NM_213423.1	-2,38	2,76E-03
carboxypeptidase A	<i>cpa</i>	NM_199271.1	-2,36	4,87E-03
ba2 globin, like	<i>ba2l</i>	BC076356.1	-2,35	4,75E-02
MYC binding protein 2	<i>mycbp2</i>	NM_001012247.1	-2,34	1,10E-02
SEC6-like 1 (S. cerevisiae)	<i>sec6l1</i>	NM_212715.1	-2,33	1,02E-02
retinol binding protein 2a, cellular	<i>rbp2a</i>	NM_153004.1	-2,32	4,54E-02
polymerase (DNA directed), epsilon 2	<i>pole2</i>	NM_173246.1	-2,32	2,70E-02
elastase 2 like	<i>ela2l</i>	NM_212835.1	-2,31	4,05E-02
MYST histone acetyltransferase 2	<i>myst2</i>	NM_212635.1	-2,30	1,56E-02
adiponectin receptor 1b	<i>adipor1b</i>	NM_213500.1	-2,28	6,81E-03
bactin1	<i>bactin1</i>	NM_131031.1	-2,28	3,37E-02
tubulin, alpha 7 like	<i>tuba7l</i>	NM_001002230.1	-2,27	6,01E-04
serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade C (antithrombin), member 1	<i>serpincl1</i>	NM_182863.1	-2,25	4,36E-02
fatty acid binding protein 1b	<i>fabp1b</i>	NM_001024651.1	-2,24	4,40E-02
chimerin (chimaerin) 1	<i>chn1</i>	NM_213000.1	-2,24	1,59E-02
chromodomain helicase DNA binding protein 1-like	<i>chd1l</i>	NM_200313.1	-2,22	1,77E-02
SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4	<i>smarca4</i>	NM_181603.1	-2,21	3,84E-03
diencephalon/mesencephalon homeobox 1	<i>dmbx1</i>	AF398526.1	-2,19	1,08E-02
glycogen synthase kinase 3 alpha	<i>gsk3a</i>	NM_131390.2	-2,13	2,05E-02
sine oculis homeobox homolog 4.2	<i>six4.2</i>	NM_131718.1	-2,09	1,35E-02

Kodiert für	Kürzel	Accession Nummer	fc	p - Wert
GATA-binding protein 2	<i>gata2</i>	NM_131233.1	-2,09	1,57E-04
aryl hydrocarbon receptor 1a	<i>ahr1a</i>	NM_131028.1	-2,07	2,01E-02
glutamate receptor, ionotropic, AMPA 3.1	<i>gria3.1</i>	NM_198339.1	-2,06	2,62E-03
DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 15	<i>dhx15</i>	XM_693517.1	-2,04	6,37E-04
amylase, alpha 2A	<i>amy2a</i>	NM_213011.1	-2,03	2,03E-03
zic family member 2 (odd-paired homolog, Drosophila) b	<i>zic2b</i>	NM_001001820.1	-2,02	1,37E-02
glutathione S-transferase pi	<i>gstp1</i>	NM_131734.2	-2,02	3,25E-02
ictacalcin	<i>icn</i>	NM_212761.1	-2,02	3,11E-02
myosin VIa	<i>myo6a</i>	NM_001004111.1	-2,00	2,19E-03
TCs herabreguliert				
Zebrafish DNA sequence from clone CH211-234P6 in linkage group 24, complete sequence		BX001030.7	-4,16	1,46E-02
enolase 1	<i>enol</i>	NM_212722.1	-3,98	1,94E-03
zgc:103710	zgc:103710	NM_001008582.1	-3,21	2,19E-02
zgc:63517	zgc:63517	NM_200876.1	-3,13	2,02E-02
Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-16P21 in linkage group 3, complete sequence		BX511021.9	-3,08	2,99E-02
Zebrafish DNA sequence from clone CH211-208B16 in linkage group 8, complete sequence		BX004819.11	-3,01	6,38E-03
zgc:92479	zgc:92479	NM_001003489.1	-2,93	2,11E-02
similar to Zinc finger homeobox protein 1b (Smad interacting protein 1) (SMADIP1)	LOC563104	XM_686470.1	-2,90	1,37E-02
zgc:123027	zgc:123027	NM_001012480.1	-2,85	4,26E-02
Zebrafish DNA sequence from clone CH211-79L20 in linkage group 16, complete sequence		BX511010.5	-2,74	3,63E-03
similar to Attractin precursor (Mahogany homolog) (DPPT-L)	LOC571748	XM_695369.1	-2,72	2,44E-02
Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-267F18 in linkage group 5, complete sequence		CR753899.5	-2,71	6,77E-03

Kodiert für	Kürzel	Accession Nummer	fc	p - Wert
similar to kinesin family member 1B isoform alpha	LOC562945	XM_686311.1	-2,63	1,49E-02
zgc:55856	zgc:55856	NM_200235.1	-2,60	3,00E-04
similar to 7-transmembrane receptor frizzled-1	LOC557384	XM_680438.1	-2,59	2,65E-02
Zebrafish DNA sequence from clone CH211-87A15 in linkage group 23, complete sequence		CR376756.10	-2,57	7,85E-03
similar to glutathione S-transferase	LOC564619	XM_687953.1	-2,54	4,20E-03
similar to ATP synthase beta-subunit	LOC571176	XM_694742.1	-2,51	4,50E-02
Zebrafish DNA sequence from clone CH211-250G22, complete sequence		BX890565.9	-2,43	4,26E-02
Zebrafish DNA sequence from clone CH211-262I1 in linkage group 11, complete sequence		CR847939.13	-2,41	6,31E-03
similar to chymotrypsinogen B1	LOC562139	XM_685539.1	-2,37	2,06E-02
Zebrafish DNA sequence from clone CH211-168G7 in linkage group 4, complete sequence		BX470114.6	-2,33	1,89E-02
Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-30H2 in linkage group 2, complete sequence		CR383666.7	-2,33	8,41E-03
Zebrafish DNA sequence from clone CH211-113A14 in linkage group 25, complete sequence		CR354435.20	-2,32	4,71E-03
Zebrafish DNA sequence from clone CH211-274G13 in linkage group 14, complete sequence		BX323881.7	-2,31	8,40E-03
similar to Receptor-type tyrosine-protein phosphatase kappa precursor (Protein-tyrosine phosphatase kappa) (R-PTP-kappa)	LOC555348	XM_677839.1	-2,29	2,12E-02
zgc:92061	zgc:92061	NM_001002383.1	-2,27	3,95E-02
similar to Collagen alpha 1(XIX) chain precursor (Collagen alpha 1(Y) chain)	LOC570837	XM_694359.1	-2,25	3,06E-03
zgc:110585	zgc:110585	NM_001017906.1	-2,24	7,58E-03
similar to Notch 2	LOC559948	XM_683343.1	-2,24	2,32E-02
Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-118G10 in linkage group 8, complete sequence		CR547121.11	-2,22	1,43E-03

Kodiert für	Kürzel	Accession Nummer	fc	p - Wert
zgc:91973	zgc:91973	NM_001002658.1	-2,22	2,73E-03
Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-161F5 in linkage group 15, complete sequence		CR388121.11	-2,22	2,24E-03
zgc:92631	zgc:92631	NM_001002695.1	-2,20	4,06E-02
zgc:66198	zgc:66198	NM_199554.1	-2,16	3,15E-02
zgc:64115	zgc:64115	NM_213136.1	-2,15	1,67E-02
Zebrafish DNA sequence from clone DKEYP-84F3 in linkage group 16, complete sequence		BX539313.4	-2,13	4,00E-02
Zebrafish DNA sequence from clone CH211-275P14 in linkage group 8, complete sequence		BX927202.7	-2,11	2,13E-03
similar to Col9a3-prov protein	LOC567110	XM_690399.1	-2,10	8,65E-03
similar to basic transcription factor 3	LOC556625	XM_678080.1	-2,09	2,69E-02
similar to WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1	LOC570676	XM_694182.1	-2,08	1,73E-02
similar to WD and tetratricopeptide repeats 1	LOC570606	XM_694107.1	-2,07	1,09E-03
similar to integrin alpha 11 subunit	LOC570776	XM_694293.1	-2,06	1,27E-03
similar to Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 24 (Ubiquitin thiolesterase 24) (Ubiquitin-specific processing protease 24) (Deubiquitinating enzyme 24)	LOC569730	XM_693133.1	-2,06	4,62E-03
similar to SMC2 protein	LOC563640	XM_686996.1	-2,04	4,54E-03
zgc:64091	zgc:64091	NM_213146.1	-2,03	1,10E-02
zgc:63744	zgc:63744	BC054136.1	-2,02	2,29E-02
similar to ubiquitin specific protease 8	LOC565434	XM_688719.1	-2,02	8,25E-04
Zebrafish DNA sequence from clone CH211-217F24 in linkage group 21, complete sequence		BX324223.23	-2,02	1,29E-03
zgc:55705	zgc:55705	NM_213078.1	-2,02	1,52E-03
similar to Dimethylglycine dehydrogenase, mitochondrial precursor (ME2GLYDH)	LOC566241	XM_689510.1	-2,02	4,59E-02

Anhang B

Liste mit allen hoch- und herabregulierten Sequenzen nach der Exposition mit Genistein.

Kodiert für	Symbol	Accession Nummer	fc	p-Wert
ETs hochreguliert				
vitellogenin 5	<i>vtg5</i>	NM_001025189.1	91,35	7,58E-06
vitellogenin 7 mRNA, partial cds	<i>vtg7</i>	AY729649.1	85,45	1,28E-06
vitellogenin 1	<i>vtg1</i>	AY034146.1	33,81	2,42E-04
vitellogenin 2	<i>vtg2</i>	AY729644.1	13,56	1,18E-04
vitellogenin 6	<i>vtg6</i>	XM_682549.1	13,35	4,48E-05
zona pellucida glycoprotein 3 b	<i>zp3b</i>	NM_131696.1	8,15	3,86E-02
zona pellucida glycoprotein 2.4	<i>zp2.4</i>	NM_131829.1	7,54	3,69E-02
zona pellucida glycoprotein 2.4	<i>zp2.4</i>	BC095596.1	7,27	4,64E-02
zona pellucida glycoprotein 2.2	<i>zp2.2</i>	NM_131827.1	7,15	3,42E-02
zona pellucida glycoprotein 3.2	<i>zp3.2</i>	BC097085.1	5,72	4,82E-02
ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit s	<i>atp5s</i>	NM_200218.1	5,64	3,96E-02
linker histone H1M	<i>h1m</i>	NM_183071.2	5,60	2,93E-02
spastic paraplegia 21 (H. sapiens)	<i>spg21</i>	NM_213395.1	5,26	3,83E-02
diacylglycerol o-acyltransferase homolog 1	<i>dgat1</i>	NM_199730.1	5,20	4,10E-02
zona pellucida glycoprotein 2	<i>zp2</i>	BC097083.1	4,67	3,31E-02
claudin d	<i>clndd</i>	NM_180964.2	4,50	4,86E-02
RAB2, member RAS oncogene family	<i>rab2</i>	NM_201454.1	4,07	2,74E-02
adducin 3 (gamma)	<i>add3</i>	NM_199663.1	4,06	2,83E-02
sphingomyelin phosphodiesterase 4	<i>smpd4</i>	NM_213355.1	3,77	9,80E-03
clathrin, heavy polypeptide (Hc)	<i>cltc</i>	NM_001005391.1	3,63	4,04E-02
receptor interacting protein kinase 5	<i>ripk5</i>	NM_205627.2	3,62	1,12E-03
cyclin B2	<i>ccnb2</i>	NM_199430.1	3,60	3,70E-02
uroporphyrinogen decarboxylase	<i>urod</i>	NM_131347.1	3,56	4,89E-02

Kodiert für	Symbol	Accession Nummer	fc	p-Wert
acid phosphatase 5, tartrate resistant	<i>acp5</i>	NM_214773.1	3,43	3,20E-02
nicotinamide nucleotide transhydrogenase	<i>nnt</i>	NM_214756.1	3,41	2,38E-03
tubulin, beta 2c	<i>tubb2c</i>	NM_198809.1	3,17	8,75E-03
cyclin B1	<i>ccnb1</i>	NM_131513.1	3,02	4,04E-02
cyclin A2	<i>ccna2</i>	NM_152949.1	3,00	3,57E-02
MBD2 (methyl-CpG-binding protein)-interacting zinc finger protein	<i>mizf</i>	NM_213424.2	2,98	4,50E-02
integral membrane protein 1	<i>itm1</i>	NM_201458.1	2,96	4,87E-02
WD repeat domain 33	<i>wdr33</i>	NM_001024221.1	2,85	3,02E-02
TAF6 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor	<i>taf6</i>	NM_001004557.1	2,84	3,60E-02
zinc finger protein 259	<i>znf259</i>	NM_213108.1	2,81	3,23E-02
basic leucine zipper and W2 domains 1	<i>bzwl1</i>	NM_199708.1	2,80	2,82E-02
MCM4 minichromosome maintenance deficient 4, mitotin (S. cerevisiae)	<i>mcm4</i>	NM_198913.1	2,80	1,51E-02
creatine kinase, brain	<i>ckb</i>	NM_173222.1	2,80	3,95E-02
v-mos Moloney murine sarcoma viral oncogene homolog	<i>mos</i>	NM_205580.1	2,72	3,83E-02
exostoses (multiple) 1a	<i>ext1a</i>	NM_001012368.1	2,67	4,60E-02
tumor rejection antigen (gp96) 1	<i>tra1</i>	NM_198210.2	2,64	4,77E-02
MCM2 minichromosome maintenance deficient 2, mitotin (S. cerevisiae)	<i>mcm2</i>	NM_173257.1	2,55	1,70E-02
UTP11-like, U3 small nucleolar ribonucleoprotein (yeast)	<i>utp11l</i>	NM_199998.1	2,52	3,63E-02
Cap1 CAP, adenylate cyclase-associated protein 1	<i>cap1</i>	NM_199909.2	2,50	1,47E-02
tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta polypeptide	<i>ywhaq</i>	NM_201513.1	2,49	2,87E-02
cytochrome P450, subfamily XIA, polypeptide 1	<i>cyp11a1</i>	AF527755.1	2,43	4,99E-02
transmembrane 9 superfamily member 3	<i>tm9sf3</i>	NM_213389.1	2,42	5,63E-03
cyclin A1	<i>ccna1</i>	NM_212818.1	2,38	2,32E-02

Kodiert für	Symbol	Accession Nummer	fc	p-Wert
GDP dissociation inhibitor 2	<i>gdi2</i>	NM_199655.1	2,38	3,94E-02
H3 histone, family 3A	<i>h3f3a</i>	NM_212996.1	2,35	5,00E-02
decapentaplegic and Vg-related 1	<i>dvr1</i>	NM_130948.1	2,35	3,64E-02
TATA box binding protein like 2	<i>tbpl2</i>	NM_214796.1	2,31	8,68E-03
splicing factor, arginine/serine-rich 1 (splicing factor 2, alternate splicing factor)	<i>sfrs1</i>	NM_200593.2	2,30	4,00E-02
hypoxia up-regulated 1	<i>hyou1</i>	NM_212703.1	2,29	1,66E-02
translocation associated membrane protein 2	<i>tram2</i>	BC046900.1	2,27	1,44E-02
vitellogenin 3, phosphatase	<i>vtg3</i>	AF254638.1	2,25	2,85E-02
tubulin, gamma complex associated proteins	<i>tubgcp5</i>	NM_001018141.1	2,25	4,08E-02
swelling dependent chloride channel	<i>icl1</i>	BC066713.1	2,23	4,68E-02
RNA guanylyltransferase and 5'-phosphatase	<i>rngtt</i>	NM_212867.1	2,22	4,30E-02
<i>cth1</i>	<i>cth1</i>	NM_130939.1	2,22	1,94E-02
cell division cycle 2	<i>cdc2</i>	NM_212564.2	2,21	3,01E-02
proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 12	<i>psmd12</i>	NM_201578.1	2,20	3,03E-02
SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 2	<i>smarca2</i>	NM_212716.1	2,17	3,43E-02
DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1	<i>dnmt1</i>	NM_131189.1	2,17	2,27E-02
four and a half LIM domains	<i>fhl</i>	NM_199217.1	2,10	4,00E-02
glutamate-cysteine ligase, modifier subunit	<i>gclm</i>	NM_199845.1	2,09	1,31E-02
cell division cycle 20 homolog	<i>cdc20</i>	NM_213080.1	2,07	3,53E-02
inhibitor of growth family, member 5b	<i>ing5b</i>	NM_001007168.1	2,06	1,96E-02
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	<i>hnrl</i>	NM_213383.1	2,05	7,91E-03
translocase of outer mitochondrial membrane 40 homolog (yeast)	<i>tomm40</i>	NM_199614.1	2,04	1,92E-02
LIM-domain binding factor 3, like	<i>ldb3</i>	NM_201505.1	2,03	3,74E-02
runt-related transcription factor 1	<i>runx1</i>	NM_131603.2	2,01	4,48E-02

Kodiert für	Symbol	Accession Nummer	fc	p-Wert
TCs hochreguliert				
similar to dentin sialophosphoprotein preproprotein	LOC555353	XM_677844.1	7,97	2,53E-02
Danio rerio cDNA clone IMAGE:5602480, **** WARNING: chimeric clone ****		BC055167.1	6,60	1,97E-02
similar to brain-selective kinase 2 isoform gamma	LOC564185	XM_687533.1	6,43	4,83E-02
similar to dentin sialophosphoprotein preproprotein	LOC555353	XM_677844.1	6,02	3,61E-02
si:dkeyp-50f7.2	si:dkeyp-50f7.2	NM_212718.1	5,87	4,28E-02
Zebrafish DNA sequence from clone CH211-147G15 in linkage group 8, complete sequence		CR933103.10	5,38	2,48E-02
similar to vitellogenin	LOC557092	XM_680074.1	5,27	1,62E-03
Zebrafish DNA sequence from clone CH211-146L13 in linkage group 6, complete sequence		AL954384.11	5,15	4,73E-02
Danio rerio cDNA clone IMAGE:5602480, **** WARNING: chimeric clone ****		BC055167.1	5,13	3,93E-02
similar to putative galactose-binding protein	LOC561528	XM_703171.1	5,07	4,96E-02
Zebrafish DNA sequence from clone DKEYP-116B6 in linkage group 23, complete sequence		BX957303.8	4,91	4,36E-02
Zebrafish DNA sequence from clone CH211-129N15 in linkage group 19, complete sequence		BX957344.6	4,78	3,31E-02
Zv5_scaffold975		Zv5_scaffold975.16	4,77	4,83E-02
similar to Dihydropteridine reductase (HDHPR) (Quinoid dihydropteridine reductase)	LOC561928	XM_703197.1	4,69	2,66E-02
Zebrafish DNA sequence from clone CH211-261D18 in linkage group 7, complete sequence		BX001015.5	4,65	3,29E-02
Zebrafish DNA sequence from clone CH211-53P9 in linkage group 5, complete sequence		BX629349.6	4,54	4,61E-02
zgc:123174	zgc:123174	NM_001037110.1	4,42	2,62E-02
similar to RNA (guanine-7-) methyltransferase	LOC562801	XM_686175.1	4,39	4,28E-02

Kodiert für	Symbol	Accession Nummer	fc	p-Wert
Danio rerio cDNA clone IMAGE:5777525, **** WARNING: chimeric clone ****		BC090813.1	4,31	4,84E-02
similar to SWI/SNF-related, matrix associated, actin-dependent regulator of chromatin subfamily A containing DEAD/H box 1 (Enhancer trap locus homolog 1) (Etl-1)	LOC563175	XM_686544.1	4,28	3,63E-02
similar to zinc finger protein 289, ID1 regulated	LOC572425	XM_696138.1	4,25	2,48E-02
similar to Stathmin (Phosphoprotein p19) (pp19) (Oncoprotein 18) (Op18) (Leukemia-associated phosphoprotein p18) (pp17) (Prosolin) (Metablastin) (Pr22 protein)	LOC571906	XM_695550.1	4,24	4,19E-02
zgc:56330	zgc:56330	NM_199683.1	4,12	3,11E-02
Zebrafish DNA sequence from clone CH211-214J8 in linkage group 5, complete sequence		BX510923.8	3,87	4,49E-02
zgc:55343	zgc:55343	NM_200252.1	3,76	4,48E-02
zgc:100994	zgc:100994	NM_001003607.1	3,66	2,51E-02
Zebrafish DNA sequence from clone CH211-142E24 in linkage group 20, complete sequence		BX293547.6	3,63	4,82E-02
zgc:66165	zgc:66165	NM_212989.1	3,50	4,79E-02
Zebrafish DNA sequence from clone CH211-112G6 in linkage group 13, complete sequence		CR450827.5	3,47	4,91E-02
similar to Receptor-type tyrosine-protein phosphatase kappa precursor (Protein-tyrosine phosphatase kappa) (R-PTP-kappa)	LOC555348	XM_677839.1	3,38	2,64E-02
zgc:92194	zgc:92194	NM_001004588.1	3,25	1,55E-02
Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-271E14 in linkage group 12, complete sequence		BX640506.12	3,22	4,12E-02
Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-65F8, complete sequence		BX890597.13	3,04	2,09E-02
similar to Protein KIAA0934	LOC561234	XM_684640.1	2,83	4,87E-02
similar to GCN1 general control of amino-acid synthesis 1-like 1	LOC570396	XM_693873.1	2,77	4,37E-02
similar to Transcription factor IIIA (Factor A) (TFIIIA)	LOC570186	XM_693633.1	2,67	2,36E-02
hypothetical protein LOC570896	LOC570896	XM_694426.1	2,67	3,05E-02

Kodiert für	Symbol	Accession Nummer	fc	p-Wert
Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-274M14 in linkage group 23, complete sequence		BX511310.13	2,67	2,96E-02
similar to ZP2	LOC555180	XM_677704.1	2,64	1,04E-02
sphingolipid delta 4 desaturase/C-4 hydroxylase 2	LOC402799	XM_689103.1	2,58	1,78E-02
zgc:56034	zgc:56034	BC065323.1	2,52	3,54E-02
similar to Sulfotransferase 4A1 (Brain sulfotransferase-like protein) (hBR-STL) (hBR-STL-1) (Nervous system sulfotransferase) (NST)	LOC568494	XM_691824.1	2,51	3,84E-02
similar to NKX2-8 protein	LOC565596	XM_688865.1	2,51	4,72E-02
Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-169H1 in linkage group 14, complete sequence		CR753843.8	2,48	2,85E-02
zgc:55879	zgc:55879	NM_199875.1	2,47	1,72E-02
zgc:110395	zgc:110395	NM_001033107.1	2,40	2,80E-02
zgc:77429	zgc:77429	NM_213262.1	2,40	3,35E-02
Danio rerio, clone IMAGE:5601466, mRNA		BC046015.1	2,35	2,80E-02
similar to LOC407679 protein	LOC562885	XM_686254.1	2,34	8,94E-03
similar to ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 2	LOC560253	XM_683647.1	2,28	4,99E-02
zgc:92148	zgc:92148	NM_001002353.1	2,25	3,26E-02
zgc:66378	zgc:66378	NM_201010.1	2,24	1,80E-02
Zebrafish DNA sequence from clone CH211-203K12 in linkage group 22, complete sequence		BX004801.15	2,23	2,11E-02
zgc:110553	zgc:110553	NM_001013550.1	2,20	3,20E-02
similar to Ankyrin repeat domain protein 11 (Ankyrin repeat-containing cofactor-1)	LOC561805	XM_685205.1	2,16	7,50E-03
similar to Serine/threonine-protein kinase Pim-3	LOC561011	XM_684410.1	2,15	1,36E-02
hypothetical protein LOC562425	LOC562425	XM_685812.1	2,14	4,30E-02
similar to eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 1 isoform 4	LOC572435	XM_696148.1	2,14	1,56E-03

Kodiert für	Symbol	Accession Nummer	fc	p-Wert
similar to mitochondrial ribosomal protein L22	LOC560937	XM_684337.1	2,12	2,71E-02
zgc:109957	zgc:109957	NM_001024407.1	2,12	1,99E-02
zgc:101095	zgc:101095	NM_001004644.1	2,12	9,25E-03
zgc:66045	zgc:66045	NM_212647.1	2,10	8,05E-03
similar to R31546_1	LOC570545	XM_694040.1	2,09	4,92E-02
Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-183C16 in linkage group 4, complete sequence		BX640593.8	2,09	4,34E-02
zgc:65979	zgc:65979	NM_200066.1	2,09	3,94E-02
zgc:77126	zgc:77126	NM_206829.1	2,09	2,59E-02
similar to ATP-dependent metalloprotease YME1L1 (YME1-like protein 1) (ATP-dependent metalloprotease FtsH1)	LOC555390	XM_677883.1	2,07	1,44E-03
similar to pyrroline-5-carboxylate synthetase isoform 1	LOC557186	XM_701764.1	2,05	3,68E-02
Zebrafish DNA sequence from clone CH211-134G22 in linkage group 16, complete sequence		BX649265.5	2,01	3,55E-02
zgc:101879	zgc:101879	NM_001004673.1	2,01	3,01E-02
Zebrafish DNA sequence from clone CH211-140M22 in linkage group 1, complete sequence		CR361548.8	2,01	3,44E-02
ETs herabreguliert				
fibrinogen, gamma polypeptide	<i>fgg</i>	NM_213054.1	-5,75	6,39E-03
fibrinogen, B beta polypeptide	<i>fgb</i>	NM_212774.1	-5,48	9,71E-03
complement component c3b	<i>c3b</i>	XM_688299.1	-5,48	1,59E-03
complement component factor B	<i>bf</i>	NM_131338.1	-5,27	1,63E-03
hemopexin	<i>hpx</i>	XM_686594.1	-4,67	1,28E-02
serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1	<i>serpinal</i>	NM_001013259.1	-4,61	8,89E-03
retinol binding protein 4, plasma	<i>rbp4</i>	NM_130920.1	-4,02	2,01E-02
ceruloplasmin	<i>cp</i>	NM_131802.1	-3,81	7,55E-03

Kodiert für	Symbol	Accession Nummer	fc	p-Wert
serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade C (antithrombin), member 1	<i>serpincl</i>	NM_182863.1	-3,77	1,98E-03
aldolase b, fructose-bisphosphate	<i>aldob</i>	NM_194367.3	-3,65	1,22E-02
apolipoprotein A-I	<i>apoa</i>	NM_131128.1	-3,25	2,50E-02
chaperonin containing TCP1, subunit 8 (theta)	<i>cct8</i>	NM_201062.1	-3,10	4,84E-02
coagulation factor II (thrombin)	<i>f2</i>	NM_213390.1	-3,08	3,14E-02
alcohol dehydrogenase 8a	<i>adh8a</i>	NM_001001946.1	-3,07	9,75E-03
complement component bfb	<i>bfb</i>	NM_131241.1	-3,06	3,98E-03
cytochrome P450, subfamily III (arachidonic acid epoxygenase) polypeptide a	<i>cyp2ja</i>	NM_152954.1	-2,90	2,54E-03
wdr45 like	<i>wdr45l</i>	NM_200240.1	-2,79	7,16E-03
selenoprotein P, plasma, 1b	<i>sepp1b</i>	NM_178298.2	-2,71	2,80E-02
membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain containing 1	<i>magil</i>	NM_001007063.1	-2,67	5,31E-03
midkine-related growth factor	<i>mdka</i>	NM_131070.2	-2,60	1,38E-02
ras homolog gene family, member E	<i>arhe</i>	NM_199522.1	-2,56	3,07E-03
keratin 15	<i>krt15</i>	BC044144.1	-2,52	6,94E-03
HEAT repeat containing 1	<i>heatr1</i>	NM_199900.1	-2,50	1,63E-02
keratin 18	<i>krt18</i>	NM_178437.2	-2,49	1,29E-02
coagulation factor V	<i>f5</i>	NM_001007208.1	-2,43	7,56E-03
NADH dehydrogenase subunit 5	<i>ND5</i>	AC024175.3	-2,42	8,85E-03
type I cytokeratin, enveloping layer	<i>cyt1</i>	BC065653.1	-2,40	1,14E-02
complement component c3a	<i>c3a</i>	XM_695286.1	-2,38	3,68E-02
chimerin (chimaerin) 1	<i>chn1</i>	NM_213000.1	-2,30	6,89E-03
polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide E	<i>polr3e</i>	NM_212754.1	-2,28	2,24E-02
fatty acid binding protein 10, liver basic	<i>fabp10</i>	NM_152960.1	-2,27	3,57E-02
homogentisate 1,2-dioxygenase	<i>hgd</i>	NM_152966.1	-2,24	2,75E-02
diencephalon/mesencephalon homeobox 1	<i>dmbox1</i>	AF398526.1	-2,19	6,53E-03
plasminogen	<i>plg</i>	NM_201472.1	-2,18	4,43E-02

Kodiert für	Symbol	Accession Nummer	fc	p-Wert
splicing factor 3b, subunit 5	<i>sf3b5</i>	AY648771.1	-2,06	7,23E-03
alanine-glyoxylate aminotransferase, like	<i>agxtl</i>	NM_001002331.1	-2,03	3,76E-02
adiponectin receptor 1b	<i>adipor1b</i>	NM_213500.1	-2,03	1,07E-02
aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 2	<i>arnt2</i>	NM_131674.1	-2,02	8,62E-03
TCs herabreguliert				
similar to complement C3-H1	LOC571670	XM_695278.1	-6,74	1,11E-03
similar to complement C4-2	LOC562579	XM_685959.1	-5,97	1,30E-03
Zebrafish DNA sequence from clone CH211-234P6 in linkage group 24, complete sequence		BX001030.7	-5,48	7,02E-03
Zebrafish DNA sequence from clone CH211-215B16 in linkage group 2, complete sequence		BX927315.10	-3,52	8,40E-03
similar to kinesin family member 1B isoform alpha	LOC562945	XM_686311.1	-3,04	2,96E-03
similar to complement C3-Q1	LOC567902	XM_691211.1	-3,03	4,19E-02
Danio rerio cDNA clone IMAGE:3817681, partial cds		BC057487.1	-2,95	2,05E-03
Zebrafish DNA sequence from clone CH211-121D13 in linkage group 20, complete sequence		AL845550.13	-2,88	4,01E-02
similar to Zinc finger homeobox protein 1b (Smad interacting protein 1) (SMADI1)	LOC563104	XM_686470.1	-2,87	3,65E-03
similar to Heat shock protein HSP 90-alpha (HSP 86)	DKEY-241L7.8	CR381646.8	-2,74	6,25E-03
Zebrafish DNA sequence from clone CH211-81D10 in linkage group 14, complete sequence		BX005169.18	-2,72	2,98E-02
similar to alpha-2-macroglobulin-1	LOC568842	XM_692198.1	-2,70	2,35E-02
Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-16P21 in linkage group 3, complete sequence		BX511021.9	-2,68	3,05E-02
zgc:77825	zgc:77825	NM_205643.1	-2,66	3,53E-02
zgc:123136	zgc:123136	NM_205741.1	-2,58	3,13E-02
zgc:92631	zgc:92631	NM_001002695.1	-2,47	1,09E-02
zgc:92061	zgc:92061	NM_001002383.1	-2,44	2,50E-02

Kodiert für	Symbol	Accession Nummer	fc	p-Wert
Zebrafish DNA sequence from clone CH211-262I1 in linkage group 11, complete sequence		CR847939.13	-2,43	1,69E-02
hypothetical protein LOC553425	LOC553425	BC095066.1	-2,42	1,37E-03
zgc:103471	zgc:103471	NM_001008612.1	-2,40	6,68E-03
Danio rerio mitochondrial genome, complete sequence		AC024175.3	-2,39	3,16E-02
zgc:64091	zgc:64091	NM_213146.1	-2,39	1,63E-03
similar to Receptor-type tyrosine-protein phosphatase kappa precursor (Protein-tyrosine phosphatase kappa) (R-PTP-kappa)	LOC555348	XM_677839.1	-2,35	6,60E-03
zgc:92903	zgc:92903	NM_001002461.1	-2,31	1,19E-02
similar to complement C4-1	LOC566261	XM_689530.1	-2,31	1,50E-03
zgc:92055	zgc:92055	NM_001007768.1	-2,30	4,13E-03
Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-161F5 in linkage group 15, complete sequence		CR388121.11	-2,28	4,35E-03
zgc:92763	zgc:92763	NM_001002560.1	-2,28	9,97E-03
Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-67K20 in linkage group 8, complete sequence		BX005025.16	-2,27	2,67E-02
zgc:91973	zgc:91973	NM_001002658.1	-2,27	1,47E-02
Zebrafish DNA sequence from clone DKEYP-72G9 in linkage group 21, complete sequence		CR735104.7	-2,27	3,96E-03
zgc:92061	zgc:92061	NM_001002383.1	-2,26	2,36E-02
similar to WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1	LOC570676	XM_694182.1	-2,26	2,31E-02
zgc:64115	zgc:64115	NM_213136.1	-2,23	2,42E-02
similar to Notch 2	LOC559948	XM_683343.1	-2,23	2,04E-02
zgc:92479	zgc:92479	NM_001003489.1	-2,20	2,59E-02
zgc:101640	zgc:101640	NM_001007444.1	-2,19	8,98E-03
zgc:92010	zgc:92010	NM_001003994.1	-2,18	2,53E-02
zgc:85811	zgc:85811	NM_213284.1	-2,17	3,62E-02
zgc:92630	zgc:92630	NM_001002696.1	-2,15	4,99E-02
similar to Collagen alpha 1(XIX) chain precursor (Collagen alpha 1(Y) chain)	LOC570837	XM_694359.1	-2,14	1,14E-02

Kodiert für	Symbol	Accession Nummer	fc	p-Wert
zgc:112032	zgc:112032	BC095650.1	-2,14	2,29E-02
similar to tyrosine aminotransferase	LOC561410	XM_684816.1	-2,12	1,63E-02
similar to Suclg2 protein	LOC561735	XM_685141.1	-2,10	9,87E-04
Zebrafish DNA sequence from clone BUSM1-186F8 in linkage group 7 Contains the nitr1a_3 gene for novel immune-type receptor 1a, allele 3, the nitr1c_3 gene for novel immune-type receptor 1c, allele 3, the nitr2e_1 gene for novel immune-type receptor 2e, allele 1, the nitr1b_2 gene for novel immune-type receptor 1b, allele 2, the nitr2a_3 gene for novel immune-type receptor 2a, allele 3, the nitr2b_1 gene for novel immune-type receptor 2b, allele 1, the nitr1f_1 gene for novel immune-type receptor 1f, allele 1, a novel immune-type receptor 2c pseudogene, the nitr3d_3 gene for novel immune-type receptor 3d, allele 3, the nitr1h_1 gene for novel immune-type receptor 1h, allele 1, the nitr1d_5 gene for novel immune-type receptor 1d, allele 5 and two novel immune-type receptor 1 pseudogenes, complete sequence		AL591391.5	-2,09	4,35E-02
Zebrafish DNA sequence from clone CH211-245D9 in linkage group 1, complete sequence		AL929044.17	-2,09	1,28E-02
Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-276L17 in linkage group 14, complete sequence		BX537102.13	-2,07	1,58E-02
Zebrafish DNA sequence from clone CH211-208B16 in linkage group 8, complete sequence		BX004819.11	-2,06	4,81E-02
zgc:56326	zgc:56326	AY398361.1	-2,05	1,94E-02
similar to PHD finger protein 20 (Hepatocellular carcinoma-associated antigen 58 homolog)	LOC563332	XM_686696.1	-2,04	3,16E-02
Danio rerio zgc:123136, mRNA (cDNA clone MGC:123136 IMAGE:7263187), complete cds		BC107607.1	-2,02	4,26E-02
Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-29F22 in linkage group 14, complete sequence		AL935304.8	-2,01	4,45E-02

Anhang C

Liste mit allen hoch- und herabregulierten Sequenzen nach der Exposition mit Bisphenol A:

Kodiert für	Kürzel	Accession Nummer	fc	p - Wert
ETs hochreguliert				
vitellogenin 6	<i>vtg6</i>	XM_682549.1	12,70	1,45E-03
vitellogenin 2	<i>vtg2</i>	AY729644.1	10,79	5,32E-03
vitellogenin 5	<i>vtg5</i>	NM_001025189.1	9,70	2,26E-02
vitellogenin 7 mRNA, partial cds	<i>vtg7</i>	AY729649.1	6,63	1,36E-02
octamer-binding transcription factor 1	<i>oct1</i>	NM_131438.1	3,40	3,81E-02
vitellogenin 3, phosvitinless	<i>vtg3</i>	AF254638.1	3,33	3,59E-02
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>gapdh</i>	BC095386.1	2,64	3,94E-02
ribosomal protein L4	<i>rpl4</i>	NM_213107.1	2,48	1,90E-02
ribosomal protein L18a	<i>rpl18a</i>	NM_201060.1	2,43	2,74E-02
solute carrier family 25 alpha, member 5	<i>slc25a5</i>	NM_173247.1	2,40	2,85E-02
proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 5	<i>psmb5</i>	NM_131151.1	2,38	3,92E-02
EBNA1 binding protein 2-like	<i>ebna1bp2l</i>	NM_001003840.1	2,34	3,57E-02
phosphoglycerate mutase 1	<i>pgam1</i>	BC049404.1	2,27	2,35E-02
ribosomal protein L7a	<i>rpl7a</i>	NM_200047.1	2,17	4,91E-02
translationally controlled tumor protein	<i>tctp</i>	NM_198140.1	2,17	2,08E-02
ribosomal protein L24	<i>rpl24</i>	NM_173235.1	2,14	1,09E-02
ribosomal protein L4	<i>rpl4</i>	BC067580.1	2,10	1,84E-02
proliferation-associated 2G4 ,b	<i>pa2g4b</i>	NM_212641.2	2,08	5,77E-03
ribosomal protein L13a	<i>rpl13a</i>	NM_212784.1	2,07	1,16E-02
eukaryotic translation elongation factor 2, like	<i>ee2l</i>	NM_200458.2	2,06	4,87E-02
ribosomal protein S7	<i>rps7</i>	NM_200752.1	2,05	2,71E-02
splicing factor, arginine/serine-rich 1, like	<i>sfrs1l</i>	NM_213015.1	2,03	1,38E-03
discs, large (Drosophila) homolog 1	<i>dgl1</i>	NM_199526.1	2,03	3,01E-02

Kodiert für	Kürzel	Accession Nummer	fc	p - Wert
TCs hochreguliert				
im:6892314	im:6892314	NM_001013272.1	3,53	2,13E-02
zgc:123245	zgc:123245	NM_001034178.1	2,60	1,00E-02
zgc:103632	zgc:103632	NM_001005953.1	2,49	5,67E-04
im:6892314	im:6892314	BC069831.1	2,45	2,40E-02
zgc:92346	zgc:92346	NM_001002448.1	2,44	3,34E-02
similar to 10 kda Ca(2+)-binding S-100 protein	LOC558870	XM_682144.1	2,35	2,61E-02
zgc:92237	zgc:92237	NM_001003728.1	2,29	1,65E-02
Zebrafish DNA sequence from clone CH211-146L13 in linkage group 6, complete sequence		AL954384.11	2,27	3,79E-02
zgc:92066	zgc:92066	NM_001002378.1	2,15	3,29E-03
zgc:109934	zgc:109934	NM_001020531.1	2,12	2,31E-02
similar to Ferritin heavy chain (Ferritin H subunit) (Proliferation-inducing gene 15 protein)	LOC559768	XM_682988.1	2,04	1,12E-02
ETs herabreguliert				
SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily e, member 1	<i>smarce1</i>	NM_201298.1	-3,24	2,88E-02
neuroglobin	<i>ngb</i>	NM_131853.1	-2,82	4,54E-02
homeo box A5a	<i>hoxa5a</i>	NM_131540.1	-2,56	2,42E-02
myosin, light polypeptide 7, regulatory	<i>myl7</i>	NM_131329.2	-2,27	4,34E-02
thioredoxin domain containing (endoplasmic reticulum) 4	<i>txndc4</i>	NM_200892.1	-2,11	9,53E-03
phospholipase A2-activating protein	<i>plaa</i>	NM_212690.1	-2,02	4,43E-02
TCs herabreguliert				
Zebrafish DNA sequence from clone CH211-11319 in linkage group 11, complete sequence		BX569779.35	-2,74	1,50E-02
zgc:103512	zgc:103512	NM_001006016.1	-2,54	3,52E-02
similar to solute carrier family 5, member 7	LOC556699	XM_679550.1	-2,38	8,40E-03

Kodiert für	Kürzel	Accession Nummer	fc	p - Wert
Zebrafish DNA sequence from clone DKEYP-77G7 in linkage group 23, complete sequence		BX571765.6	-2,34	1,63E-03
similar to CG9351-PA, isoform A	LOC558578	XM_702585.1	-2,31	4,82E-02
Zebrafish DNA sequence from clone CH211-118E11 in linkage group 18, complete sequence		CR759865.13	-2,03	2,43E-02
similar to non-neuronal splice variant nPTB4	LOC562434	XM_703516.1	-2,02	4,84E-02

Anhang D

Liste mit allen hoch- und herabregulierten biologischen Prozessen für E2. %: Anteil an allen regulierten Genen.

Biologischer Prozess	Anzahl Gene	%
hochreguliert		
cellular process	53	51.46%
physiological process	51	49.51%
cellular physiological process	46	44.66%
metabolism	42	40.78%
cellular metabolism	37	35.92%
primary metabolism	36	34.95%
nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism	21	20.39%
regulation of cellular process	19	18.45%
regulation of cellular physiological process	19	18.45%
regulation of biological process	19	18.45%
regulation of physiological process	19	18.45%
transcription	18	17.48%
regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism	16	15.53%
regulation of cellular metabolism	16	15.53%
regulation of transcription	16	15.53%
regulation of metabolism	16	15.53%
transcription, DNA-dependent	14	13.59%
regulation of transcription, DNA-dependent	13	12.62%
development	11	10.68%
nervous system development	4	3.88%
nitrogen compound metabolism	4	3.88%
protein folding	4	3.88%
amino acid and derivative metabolism	4	3.88%
amine metabolism	4	3.88%

Biologischer Prozess	Anzahl Gene	%
regulation of progression through cell cycle	3	2.91%
apoptosis	3	2.91%
cell death	3	2.91%
programmed cell death	3	2.91%
regulation of cell cycle	3	2.91%
death	3	2.91%
lipid transport	3	2.91%
herabreguliert		
physiological process	38	44.19%
cellular process	36	41.86%
cellular physiological process	35	40.70%
metabolism	28	32.56%
cellular metabolism	26	30.23%
primary metabolism	23	26.74%
macromolecule metabolism	16	18.60%
localization	13	15.12%
establishment of localization	13	15.12%
transport	12	13.95%
generation of precursor metabolites and energy	7	8.14%
proteolysis	5	5.81%
carbohydrate metabolism	5	5.81%
alcohol metabolism	5	5.81%
hexose metabolism	4	4.65%
macromolecule catabolism	4	4.65%
glucose catabolism	4	4.65%
cellular catabolism	4	4.65%
hexose catabolism	4	4.65%
monosaccharide metabolism	4	4.65%
cellular carbohydrate metabolism	4	4.65%

Biologischer Prozess	Anzahl Gene	%
monosaccharide catabolism	4	4.65%
cellular carbohydrate catabolism	4	4.65%
glycolysis	4	4.65%
carbohydrate catabolism	4	4.65%
alcohol catabolism	4	4.65%
cellular macromolecule catabolism	4	4.65%
glucose metabolism	4	4.65%
catabolism	4	4.65%

Anhang E

Liste mit allen hoch- und herabregulierten biologischen Prozessen für Genistein.

%: Anteil an allen regulierten Genen.

Biologischer Prozess	Anzahl Gene	%
hochreguliert		
physiological process	62	48.06%
cellular process	59	45.74%
cellular physiological process	58	44.96%
metabolism	41	31.78%
cellular metabolism	37	28.68%
primary metabolism	36	27.91%
macromolecule metabolism	24	18.60%
nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism	19	14.73%
localization	17	13.18%
establishment of localization	17	13.18%
transport	16	12.40%
regulation of biological process	16	12.40%
biopolymer metabolism	16	12.40%
cell organization and biogenesis	9	6.98%
cellular biosynthesis	9	6.98%
cell division	7	5.43%
RNA processing	6	4.65%
RNA metabolism	6	4.65%
cell cycle	6	4.65%
regulation of progression through cell cycle	5	3.88%
organelle organization and biogenesis	5	3.88%
regulation of cell cycle	5	3.88%
DNA metabolism	5	3.88%
lipid metabolism	4	3.10%

Biologischer Prozess	Anzahl Gene	%
mRNA processing	3	2.33%
mRNA metabolism	3	2.33%
translational initiation	3	2.33%
lipid transport	3	2.33%
DNA replication initiation	2	1.55%
regulation of translational initiation	2	1.55%
herabreguliert		
cellular process	43	39.45%
physiological process	43	39.45%
cellular physiological process	40	36.70%
metabolism	36	33.03%
cellular metabolism	34	31.19%
transport	24	22.02%
localization	24	22.02%
establishment of localization	24	22.02%
generation of precursor metabolites and energy	18	16.51%
electron transport	16	14.68%
phosphate metabolism	8	7.34%
oxidative phosphorylation	8	7.34%
phosphorylation	8	7.34%
phosphorus metabolism	8	7.34%
response to stimulus	8	7.34%
ATP synthesis coupled electron transport	7	6.42%
ATP synthesis coupled electron transport (sensu Eukaryota)	6	5.50%
mitochondrial electron transport, NADH to ubiquinone	6	5.50%
response to stress	6	5.50%
organismal physiological process	5	4.59%
nitrogen compound metabolism	4	3.67%
blood coagulation	3	2.75%

Biologischer Prozess	Anzahl Gene	%
regulation of body fluids	3	2.75%
response to external stimulus	3	2.75%
response to wounding	3	2.75%
hemostasis	3	2.75%
wound healing	3	2.75%
coagulation	3	2.75%
alcohol metabolism	3	2.75%
tyrosine metabolism	2	1.83%
aromatic compound catabolism	2	1.83%
aromatic amino acid family metabolism	2	1.83%
aromatic amino acid family catabolism	2	1.83%
L-phenylalanine metabolism	2	1.83%
L-phenylalanine catabolism	2	1.83%

Anhang F

Liste mit allen hoch- und herabregulierten biologischen Prozessen für BPA.

=: Anteil an allen regulierten Genen.

Biologischer Prozess	Anzahl Gene	%
hochreguliert		
physiological process	25	80.65%
cellular process	25	80.65%
cellular physiological process	25	80.65%
cellular metabolism	18	58.06%
metabolism	18	58.06%
primary metabolism	18	58.06%
macromolecule metabolism	16	51.61%
cellular protein metabolism	12	38.71%
cellular macromolecule metabolism	12	38.71%
protein metabolism	12	38.71%
cellular biosynthesis	8	25.81%
biosynthesis	8	25.81%
macromolecule biosynthesis	8	25.81%
protein biosynthesis	8	25.81%
catabolism	3	9.68%
cellular macromolecule catabolism	3	9.68%
cellular catabolism	3	9.68%
macromolecule catabolism	3	9.68%
cell ion homeostasis	2	6.45%
iron ion transport	2	6.45%
iron ion homeostasis	2	6.45%
ion homeostasis	2	6.45%
cation homeostasis	2	6.45%
cytoplasm organization and biogenesis	2	6.45%

Biologischer Prozess	Anzahl Gene	%
RNA splicing, via transesterification reactions with bulged adenosine as nucleophile	2	6.45%
RNA splicing, via transesterification reactions	2	6.45%
RNA splicing	2	6.45%
ribosome biogenesis and assembly	2	6.45%
nuclear mRNA splicing, via spliceosome	2	6.45%
lipid transport	2	6.45%
metal ion homeostasis	2	6.45%
di-, tri-valent inorganic cation transport	2	6.45%
di-, tri-valent inorganic cation homeostasis	2	6.45%
glycolysis	2	6.45%
transition metal ion transport	2	6.45%
transition metal ion homeostasis	2	6.45%
herabreguliert		
physiological process	6	60.00%

Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Bertold Hock für die Überlassung des Themas, die fachliche Unterstützung sowie die stete Diskussionsbereitschaft. Sein tatkräftiges Engagement hat sehr zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Frau Stefanie Haindl, ohne deren überdurchschnittliche Einsatzbereitschaft die gestellten Fragen in dieser Zeit nicht hätte bearbeitet werden können.

Bei allen Kolleginnen und Kollegen bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit, ihre Hilfsbereitschaft und das freundschaftliche Arbeitsklima.

Ich danke Herrn Martin Alberti für die zahlreichen und hilfreichen wissenschaftlichen Diskussionen und die gute Zusammenarbeit.

Herrn Dr. Jan Budczies, oligene GmbH, Berlin danke ich für die gute Zusammenarbeit im Rahmen der statistischen Auswertung der Microarray-Experimente.

Dem Lehrstuhl für Tierhygiene der TU München danke ich für die Erlaubnis zur Benutzung des LightCyclers.

Bei den Partnergruppen des „EDEN“-Forschungsprojektes bedanke ich mich für die Hilfsbereitschaft bei der Versuchsplanung.

Ich danke der EU für die finanzielle Förderung des EDEN Projektes.

Lebenslauf

Name: Ulf Kausch
Ausbildung: Diplom-Biologe
Geburtsdatum: 15. Oktober 1974
in: Altenerding

Schulbildung

1980 – 1984 Grundschule in Walpertskirchen
1984 – 1993 Gymnasium in Erding
(Abschluß: Allgemeine Hochschulreife)

Studium

1994 – 2002 Studium der Biologie an der Ludwig Maximilians Universität München (Abschluß: Dipl.-Biol. Univ.)

Praktische Tätigkeiten

1993 – 1994 Wehrpflicht in Budel, Niederlande und Freising
2002 – 2005 Wissenschaftlicher Angestellter am Lehrstuhl für Zellbiologie, TU München in Freising-Weihenstephan. Während dieser Zeit wurde die Dissertation angefertigt.