

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

**Erfassung und Bewertung von Genexpressionsmustern
von Zebrafärbliingen (*Danio rerio*) nach Belastung
mit östrogenen Substanzen**

Martin C. Alberti

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. D. Langosch
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. B. Hock, em.
2. Univ.-Prof. Dr. A. Melzer

Die Dissertation wurde am 12.10.2006 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für
Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 15.12.2006 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	II
Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung.....	1
1.1 Das hormonelle System von Fischen	2
1.2 Östrogen wirksame Substanzen.....	5
1.3 Zebraäbrbling als Modellorganismus	6
1.4 Genexpressionsanalyse mittels DNA-Array-Technik	8
1.5 Zielsetzung	10
2 Material und Methoden.....	12
2.1 Material.....	12
2.1.1 Reagenzien	12
2.1.2 Kits und Microarrays.....	14
2.1.3 Primer	14
2.1.4 Sonden.....	15
2.1.5 Enzyme.....	20
2.1.6 Lösungen und Puffer	20
2.1.7 Verbrauchsmaterialien	23
2.1.8 Geräte	25
2.2 Methoden.....	26
2.2.1 Haltung und Nachzucht der Fische	26
2.2.2 Exposition der Fische	27
2.2.3 Probennahme und –aufarbeitung.....	31
2.2.3.1 RNA-Extraktion.....	33
2.2.3.2 Gelelektrophorese.....	33
2.2.3.3 Reinigung und Konzentration der RNA	34
2.2.3.4 cDNA-Synthese (Reverse Transkription).....	34
2.2.3.4.1 Reverse Transkription für qPCR.....	35
2.2.3.4.2 Reverse Transkription für Microarray-Experimente	35
2.2.3.5 Polymerase-Kettenreaktion	36
2.2.3.5.1 PCR als Kontrollsystem.....	37
2.2.3.5.2 Quantitative PCR.....	38
2.2.3.6 Einschritt-Reverse Transkription/PCR.....	41

2.2.4	Fertigung von Microarrays.....	41
2.2.5	Hybridisierung.....	43
2.2.5.1	Hybridisierung bei Gesamtgenom-Arrays.....	43
2.2.5.2	Hybridisierung bei Subset-Arrays.....	44
2.2.6	Scannen.....	45
2.2.7	Auswertung.....	46
2.2.7.1	Auswertung bei Gesamtgenom-Arrays.....	47
2.2.7.2	Auswertung bei Subset-Arrays.....	50
3	Ergebnisse.....	53
3.1	Exposition der Fische.....	53
3.2	Probennahme und –aufarbeitung.....	55
3.2.1	RNA-Extraktion.....	56
3.2.2	Reverse Transkription.....	57
3.2.3	Polymerase-Kettenreaktion.....	58
3.2.4	Einschritt Reverse Transkription/PCR.....	59
3.3	Quantitative PCR.....	63
3.4	Gesamtgenom-Arrays.....	69
3.5	Subset-Arrays.....	86
4	Diskussion.....	97
4.1	Probennahme und -aufarbeitung.....	97
4.2	Quantitative PCR.....	100
4.3	Gesamtgenom-Arrays.....	104
4.4	Subset-Arrays.....	111
5	Zusammenfassung.....	116
	Literatur.....	118
	Anhang A: Bestellnummern und Geninformationen der Sonden.....	133
	Anhang B: Gene IDs.....	136
B.1	Gene ID der Microarrays für E2-Proben.....	136
B.2	Gene ID der Microarrays für BPA-Proben.....	137
B.3	Gene ID der Microarrays für Genistein-Proben.....	139
	Anhang C: Listen mit signifikant regulierten Sonden für $p < 0,05$ und $f.c. > 2$....	142
C.1	Regulierte Sonden nach Exposition mit 500 ng/L E2 für elf Tage.....	142
C.2	Regulierte Sonden nach Exposition mit 1000 µg/L BPA für elf Tage.....	150
C.3	Regulierte Sonden nach Exposition mit 5000 µg/L Genistein für elf Tage.....	152
	Danksagung.....	161

Lebenslauf..... 162

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Östradiol-abhängige Bildung von Vitellogenin und <i>Zona radiata</i> -Protein in Hepatozyten	4
Abbildung 2: Funktionsprinzip der Microarray-Technologie	9
Abbildung 3: Brutkasten mit herausnehmbarer, netzartiger Vorrichtung	27
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Durchflusssystem	28
Abbildung 5: Zebrabärblingmännchen und -weibchen	29
Abbildung 6: Funktionsprinzip des ELRA	30
Abbildung 7: Arbeitsschritte der Probenaufarbeitung	32
Abbildung 8: Strukturformeln von Cy3-dCTP und Cy5-dCTP	36
Abbildung 9: Arrayer zum Spotten von Microarrays mit <i>Ring-/Pin-Head</i> aus vier Ringen und Nadeln	42
Abbildung 10: Exposition der Fische im Durchflusssystem	53
Abbildung 11: Gemessene E2-Konzentrationen im 500 ng/L-Expositionsbecken während der ersten sieben Tage der Exposition	54
Abbildung 12: Berechnete und gemessene E2-Konzentrationen in Expositionsbecken am sechsten Tag der Exposition	55
Abbildung 13: Präparation eines Zebrabärbling-Weibchens	56
Abbildung 14: RNA-Agarose-Gel	57
Abbildung 15: DNA-Agarose-Gel von Amplifikaten aus Kontroll-PCR	58
Abbildung 16: DNA-Agarose-Gel von Amplifikaten aus RT/PCR zur Kontrolle von RNA-Proben	59
Abbildung 17: DNA-Agarose-Gel von Amplifikaten aus RT/PCR nach elftägiger Exposition mit BPA	60
Abbildung 18: DNA-Agarose-Gel von Amplifikaten aus RT/PCR nach elftägiger Exposition mit Genistein	61
Abbildung 19: DNA-Agarose-Gel von Amplifikaten aus RT/PCR nach elftägiger Exposition mit E2	62
Abbildung 20: Fluoreszenzkurven eines typischen qPCR-Laufes mit Proben aus Genistein-Exposition	64
Abbildung 21: Fluoreszenzkurven des qPCR-Laufes der β - <i>actin1</i> -Kalibrationsreihe	65
Abbildung 22: Standardkurve der <i>vtg1</i> -Kalibrationsreihe für qPCR mit Primerkombination <i>vtg1/eflα</i>	66
Abbildung 23: Standardkurve der <i>eflα</i> -Kalibrationsreihe für qPCR mit Primerkombination <i>vtg1/eflα</i>	66
Abbildung 24: Standardkurve der <i>vtg1</i> -Kalibrationsreihe für qPCR mit Primerkombination <i>vtg1/β-actin1</i>	67
Abbildung 25: Standardkurve der β - <i>actin1</i> -Kalibrationsreihe für qPCR mit Primerkombination <i>vtg1/β-actin1</i>	67
Abbildung 26: Relative Expressionswerte (Ratios) für <i>vtg1</i> nach elftägiger Exposition mit E2, BPA, Genistein und EE2	68

Abbildung 27: „Zebrafish 14k OciChip™“-Gesamtgenom-Array nach Hybridisierung.....	70
Abbildung 28: Erfassung und Zuordnung der Spots des „Zebrafish 14k OciChip™“-Gesamtgenom-Arrays mit Hilfe des <i>Grids</i>	71
Abbildung 29: Verteilung der Daten eines Gesamtgenom-Arrays vor und nach der Normalisierung	72
Abbildung 30: MA-Diagramm über alle zehn Experimente mit 500 ng/L E2 für das Selektionsverfahren mit der Kombination [$p < 0,05$; $f.c. > 2$].....	74
Abbildung 31: Abhängigkeit der Anzahl signifikant regulierter Sonden sowie der Spezifität des Selektionsverfahrens von der Anzahl durchgeführter Experimente	75
Abbildung 32: Venn-Diagramm zur Darstellung der Anzahl regulierter <i>ORFs</i> , die bei jeweils einer, zwei oder drei Substanzen eine Änderung der Genexpression zeigten	77
Abbildung 33: Venn-Diagramm zur Darstellung der Anzahl regulierter <i>ORFs</i> , die bei jeweils einer, zwei oder drei Substanzen in GOs eingruppiert werden konnten	82
Abbildung 34: <i>Subset-Arrays</i> nach Hybridisierung mit verschiedenen Proben	86
Abbildung 35: Vergrößerter Bereich eines <i>Subset-Arrays</i> nach Hybridisierung zur Darstellung von einzelnen Spots	87
Abbildung 36: Erfassung und Zuordnung der Spots eines <i>Subset-Arrays</i> mit 96 Sonden (Genistein-Experiment) durch Verwendung des <i>Grids</i>	88
Abbildung 37: <i>Scatterplots</i> (Punktwolken) der Expressionswerte vor Durchführung der <i>On-chip</i> -Normalisierung (Cy3 gegen Cy5).....	89
Abbildung 38: <i>Scatterplots</i> (Punktwolken) der Expressionswerte nach Durchführung der <i>On-chip</i> -Normalisierung (Cy3 gegen Cy5).....	90
Abbildung 39: <i>Scatterplots</i> (Punktwolken) der Expressionswerte vor Durchführung der <i>Inter-chip</i> -Normalisierung (Cy3 und Cy5).....	91
Abbildung 40: <i>Scatterplots</i> (Punktwolken) der Expressionswerte nach Durchführung der <i>Inter-chip</i> -Normalisierung (Cy3 und Cy5).....	91

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien mit östrogener Aktivität: Chemische Gruppen und Beispiele.....	6
Tabelle 2: Anzahl der regulierten Sonden und FDR [in %] für verschiedene Kombinationen von p-value und mean fold change	73
Tabelle 3: Mean fold change der durch E2, BPA und Genistein regulierten Vitellogenin-Gene.....	77
Tabelle 4: Durch E2 und Genistein gemeinsam regulierte ORFs mit mean fold change	79
Tabelle 5: Angereicherte Funktionen in Zebrafisch-Männchen nach Exposition mit 500 ng/L E2 für elf Tage	83
Tabelle 6: Angereicherte Funktionen in Zebrafisch-Männchen nach Exposition mit 1000 µg/L BPA für elf Tage	84
Tabelle 7: Angereicherte Funktionen in Zebrafisch-Männchen nach Exposition mit 5000 µg/L Genistein für elf Tage.....	85
Tabelle 8: Umfang der Arbeiten mit Subset-Arrays.....	88
Tabelle 9: Konzentrationen der Substanzen bei Experimenten mit Subset-Arrays.....	89
Tabelle 10: Regulation der ORFs nach elftägiger Exposition mit 5, 50, 100, 200 und 500 ng/L E2 bei $p < 0,05$	92
Tabelle 11: Regulation der ORFs nach elftägiger Exposition mit 0,1, 2, 20, 200, 400, 1000 und 2000 µg/L BPA bei $p < 0,05$	94
Tabelle 12: Regulation der ORFs nach elftägiger Exposition mit 1, 10, 100, 500, 1000 und 5000 µg/L Genistein bei $p < 0,05$	96
Tabelle 13: Konzentrationen der Substanzen bei Experimenten mit Subset-Arrays....	112

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Ab	Absorption
Ak	Antikörper
ANOVA	analysis of variance
ASCII	American Standard Code for Information Interchange
bp	Basenpaare
BPA	Bisphenol A
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
CAS	Chemical Abstract Service
CEFAS	Centre for Environment, Fisheries & Aquaculture Science
cDNA	complementary DNA
CP	Crossing Point
Cy3-dCTP	Cy3-Desoxy-Cytosintriphosphat
Cy5-dCTP	Cy5-Desoxy-Cytosintriphosphat
dCTP	2'-Desoxy-Cytidin-5'-Triphosphat
DDE	Dichlordiphenyldichlorethylen
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH	deutscher Härtegrad
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol

E	Effizienz
E2	17 β -Östradiol
EE2	17 α -Ethinylöstradiol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ELRA	Enzyme-Linked Receptor Assay
ER	Östrogenrezeptor
ERE	Estrogen Responsive Element
ET(s)	Expressed Transcript(s)
f.c.	mean fold change
FDR	False Discovery Rate
FWER	Family-Wise Error Rate
g	Gramm
G	Guanin
GC	Gaschromatographiegerät
GC/MS	Kopplung von GC mit MS
GOs	Gene Ontologies
GtH	Gonadotropin
h	Stunde(n)
HSD	Honestly Significant Difference
Hsp	Hitzeschockprotein
ID	Identifikation
L	Liter
LOEC	Lowest Observed Effect Concentration
M	molar
min	Minute(n)
mL	Milliliter

mm	Millimeter
mM	millimolar
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger RNA (Boten-Ribonukleinsäure)
MS	Massenspektrometer
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	mikromolar
n	Anzahl
ng	Nanogramm
N	Nukleus
NAs	not applicable(s)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nanometer
ORF	Open Reading Frame (Offenes Leseraster)
P	Probability
PAKs	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PC	Personal Computer
PCBs	Polychlorierte Biphenyle
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PCT	Polychloriertes Terphenyl
pH	pondus Hydrogenii
pmol	Pikomol
POD	Peroxidase
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure

RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real Time quantitative PCR
RT/PCR	Einschritt-Reverse Transkription/PCR
s	Sekunde(n)
SbG	Steroid-bindende Globuline
SDS	Natriumlaurylsulfat
T	Thymin
TBT	Tributylzinn
TC(s)	Tentative Consensus Sequence(s)
TIFF	Tagged Image File Format
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	transfer RNA
u	units
USA	United States of America (Vereinigte Staaten von Amerika)
UV	ultraviolett
V	Volt
Vtg	Vitellogenin
W	Watt
ZFIN	Zebrafish Information Network
Zr	Zona radiata

1 Einleitung

Die Verunreinigung der aquatischen Umwelt durch endokrin aktive Substanzen steht in den letzten Jahren vermehrt im öffentlichen und wissenschaftlichen Interesse. Bei einem Chemieunfall am Everglades Lake Apopka in Florida, USA, im Jahre 1980 waren große Mengen des DDT-haltigen Pestizids Dicofol in den See gelangt. Als Folge konnte ein Zusammenbruch der Alligatorenpopulation beobachtet werden. Ursache hierfür war, dass viele Alligatoreneier unbefruchtet blieben, da junge Alligatorenmännchen eine Verkümmern und Missbildung des Penis aufwiesen, die zu Sterilität und Zeugungsunfähigkeit führten (Guillette *et al.* 1994; Guillette *et al.* 1995, Guillette *et al.* 1996a, Guillette *et al.* 1996b). Diese war eindeutig auf die Wirkung des persistierenden Metaboliten p,p'-DDE zurückzuführen, für den antiandrogene Wirkungen nachgewiesen wurden (Kelce *et al.* 1995).

Störungen der Reproduktionsfähigkeit konnten auch bei Vögeln beobachtet werden, die Fische aus verschmutzten Gewässern als Beutetiere fraßen. Bei Möwen in Kalifornien und um die großen Seen sowie beim Weißkopfseeadler an der Ostküste der USA traten vermehrt Änderungen in Verhalten und Wachstum, Verdünnung der Eischalen, sogar Missbildungen und Feminisierung männlicher Vögel auf. Diese Effekte wurden auf die Verschmutzung der Gewässer mit DDT, PCBs und Dioxinen zurückgeführt (Fry 1995).

Eine Vermännlichung aquatischer Organismen, die auf den Einsatz von Anti-Fouling-Farben (Schiffsanstriche gegen Algenbewuchs) beruhte, konnte am Besten bei Meeresschnecken belegt werden. Der Wirkstoff Tributylzinn (TBT) verursachte entlang von stark benutzten Schiffsrouten und in Häfen einen Zusammenbruch der Schneckenpopulation (Tyler *et al.* 1998).

Untersuchungen in englischen Flüssen an frei lebenden und in Käfigen gehaltenen Fischen zeigten eine Störung der Gonadenorganogenese auf. Männliche Individuen ließen Anzeichen von Intersex, einer Verweiblichung der Geschlechtsorgane, erkennen. So konnte in den männlichen Hoden Ovargewebe festgestellt und die Bildung eines Eidotter-Vorläuferproteins, dem Vitellogenin (Vtg), nachgewiesen werden. Die Vtg-Produktion findet normalerweise nur bei weiblichen Fischen statt. Dieser Effekt ist auf eine Belastung der Gewässer mit östrogen wirksamen Chemikalien aus der Landwirt-

schaft sowie aus Abwässern von industriellen und kommunalen Kläranlagen zurückzuführen (Purdom *et al.* 1994; Harries *et al.* 1996; Harries *et al.* 1997).

1.1 Das hormonelle System von Fischen

Die Verweiblichung der Geschlechtsorgane in männlichen Fischen ist auf das Einwirken von exogenen Chemikalien oder Hormonen zurückzuführen. Ihre Wirkung beruht auf einer Beeinträchtigung des Geschlechtshormonsystems im Organismus. Daher wird im Folgenden näher auf die molekularen Mechanismen bei der Oogenese (Eireifung) in Teleostei (Echte Knochenfische) eingegangen, zu denen etwa 95% aller heute lebenden Fischarten gehören.

Bei der Oogenese in Fischen finden entscheidende molekulare Mechanismen in den als Vitellogenese und Zonagenese bezeichneten Stadien statt.

Die Vitellogenese umfasst den Vorgang der Synthese des Eidotter-Vorläuferproteins Vtg sowie dessen Transport und Aufnahme in die Oozyte (Eizelle). Vtg wird normalerweise ausschließlich in der Leber weiblicher Fische unter Kontrolle des weiblichen Sexualhormons 17 β -Östradiol (E2) gebildet. Es wird über das Blut zu den heranreifenden Eiern transportiert, um diese mit den nötigen Nährstoffen für den zukünftigen Embryo zu versorgen. Unter Einwirkung östrogen aktiver Substanzen wird die Vtg-Bildung auch in männlichen Individuen induziert. Als Folge sind erhöhte Mengen Vtg in Leber und Blut nachweisbar (Wahli 1988; Lim *et al.* 1991; Purdom *et al.* 1994; Sumpter und Jobling 1995; Bowman *et al.* 2000; Funkenstein *et al.* 2000; Lattier *et al.* 2001).

Die Zonagenese beschreibt den Vorgang der Synthese des als Zonagenin, Zona radiata oder Chorion bezeichneten extrazellulären Eischalenbausteins sowie dessen Transport und Ablagerung bei der reifenden Oozyte (Murata *et al.* 1997). Da der Syntheseort der beim Aufbau der Eihülle beteiligten Proteine innerhalb unterschiedlicher Arten verschieden ist, findet sich in der Literatur eine uneinheitliche Nomenklatur. Bei Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*), Dorsch (*Gadus morhua*), Flunder (*Pseudopleuronectes americanus*), Japanischen Reiskarpfing (*Oryzias latipes*) und Taimen (*Hucho peryi*) werden die Eihüllenproteine in der Leber synthetisiert und Choriogenine oder Zona radiata-Proteine genannt (Oppen-Berntsen *et al.* 1992a; Oppen-Berntsen *et al.* 1992b; Lyons *et al.* 1993; Murata *et al.* 1997; Shimizu *et al.* 2000). Bei Seenadel (*Syngnathus acus*), Karpfen (*Cyprinus carpio*), Goldfisch (*Carassius auratus*) und Zebra-

bärbling (*Danio rerio*) erfolgt die Bildung der als Zona pellucida-Proteine bezeichneten Eihüllenproteine hingegen unmittelbar in den Ovarien (Begovac und Wallace 1989; Chang *et al.* 1996; Chang *et al.* 1997; Wang und Gong 1999; Mold *et al.* 2001). Die Bildung des Zona radiata-Proteins steht unter Kontrolle von E2 und findet üblicherweise nur in weiblichen Fischen statt (Oppen-Berntsen *et al.* 1992a; Celius und Walther 1998a; Shimizu *et al.* 2000). Eine Induktion bei männlichen Fischen nach Belastung mit östrogen aktiven Substanzen konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Arukwe *et al.* 1997; Arukwe *et al.* 1998; Celius und Walther 1998b; Celius *et al.* 1999; Oppen-Berntsen *et al.* 1999; Celius *et al.* 2000; Arukwe *et al.* 2001). Ein Einfluss östrogen Substanzen auf die Zona pellucida-Proteine konnte hingegen bisher nicht belegt werden (Liu *et al.* 2006).

Abbildung 1 zeigt den Ablauf der molekularen Mechanismen in den Hepatozyten (Leberzellen) der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*), der zur Bildung von Zona radiata-Protein und Vtg führt (Tyler *et al.* 1996). E2 wird in den Follikelzellen einer reifenden Oozyte gebildet. Dieser Follikel besteht aus äußeren Thekazellen, die durch Gonadotropin zur Testosteron-Bildung angeregt werden, sowie inneren Granulosazellen, in denen die Aromatisierung des Testosterons zum E2 erfolgt (Kime 1998). Das E2 wird an Steroid-bindende Globuline (SbG) gebunden (Miguel-Queralt *et al.* 2004), gelangt über das Blutplasma zur Leber, wird durch Diffusion in die Hepatozyten aufgenommen und bindet an den zytoplasmatischen Östrogenrezeptor (ER) (Flouriot *et al.* 1996; MacKay *et al.* 1996; Flouriot *et al.* 1997). Der Östrogenrezeptor weist eine hohe Spezifität für E2 auf, lässt jedoch eine Strukturtoleranz bei seinen Liganden zu (Anstead *et al.* 1997). Hierbei scheinen insbesondere *para*-substituierte phenolische sowie andere Wasserstoffbrücken-bildende Gruppen entscheidend zu sein (Oostenbrink *et al.* 2000). Der Östrogenrezeptor wird durch Hitzeschockproteine in einer hochaffinen Form gehalten. Durch Bindung des E2 fallen diese ab (Landel *et al.* 1995) und der Rezeptor wird nach Phosphorylierung dimerisiert und somit aktiv (Weigel 1996). Dieses aktivierte Rezeptor/Hormon-Dimer bindet an eine spezifische DNA-Sequenz, dem so genannten Estrogen Responsive Element (ERE) (Katzenellenbogen *et al.* 1993). Dieses fungiert als Enhancer-Element des Promoters und leitet die Transkription des Gens ein. Die gebildete mRNA wird dann ins Zytosol transportiert und dort in der Translation ins entsprechende Protein übersetzt, das eine östrogene Wirkung herbeiführt (Parker 1993).

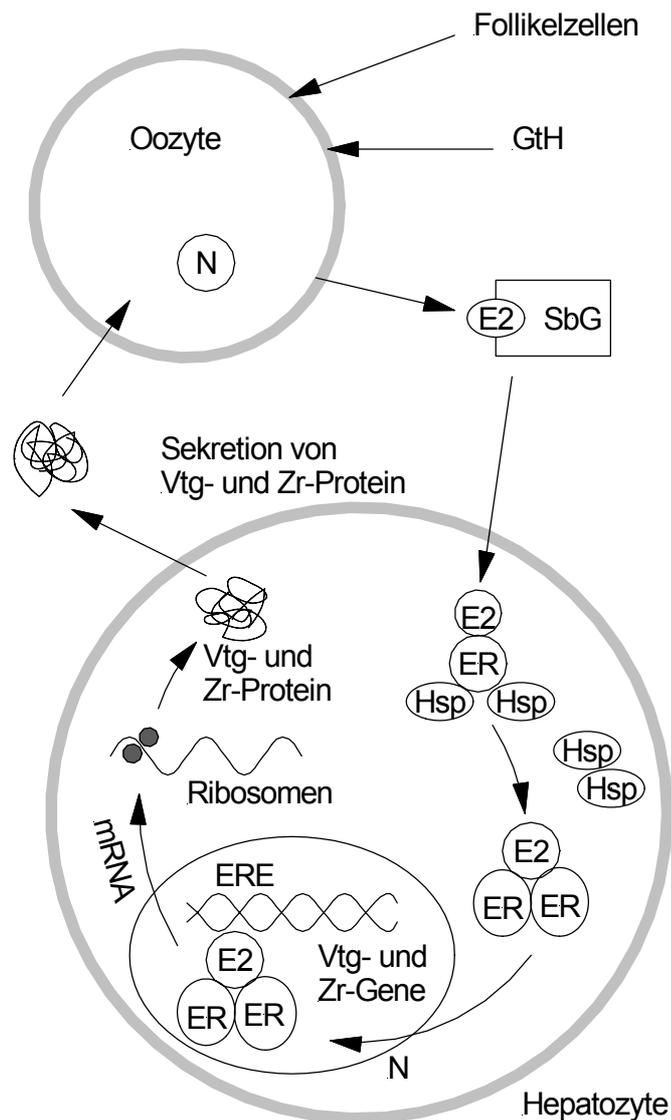


Abbildung 1: Östradiol-abhängige Bildung von Vitellogenin und *Zona radiata*-Protein in Hepatozyten der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*)
 GtH: Gonadotropin, E2: 17 β -Östradiol, SbG: Steroid-bindende Globuline, ER: Östrogenrezeptor, Hsp: Hitzeschockprotein, ERE: Estrogen Responsive Element, Vtg: Vitellogenin, Zr: Zona radiata, N: Nucleus

Die östrogene Wirkung ist stark vom Entwicklungsstand eines Organismus abhängig. Kommt es bereits im Stadium der Ausbildung von primären Geschlechtsmerkmalen zu Störungen der Gonadenorganogenese durch Fremdstoffe, kann dies irreversible Defekte des Organismus zur Folge haben. Derartige Störungen des Hormonsystems bei Adulttieren sind hingegen häufig reversibel und können nach dem Verschwinden des Fremdstoffs wieder abklingen. Nur bei dauerhafter Exposition sind auch bleibende Schädigungen denkbar. Organismen im Entwicklungsstadium reagieren also empfindlicher auf endokrin aktive Substanzen als Adulttiere (Bigsby *et al.* 1999; Drastichova *et al.* 2005).

1.2 Östrogen wirksame Substanzen

Neben den körpereigenen Sexualhormonen mit östrogenen Wirkung bei Menschen und Tieren (Endogene Östrogene) sind in der Umwelt noch weitere östrogen wirksame Rückstände von natürlichen Inhaltsstoffen aus Pflanzen und Pilzen (Phyto- und Myko-östrogene) sowie von Medikamenten (Synthetische Östrogene) und Industriechemikalien vorzufinden. Substanzen mit östrogenen oder anti-östrogenen Wirkung, die von außen zugeführt werden, werden auch als Xenoöstrogene bezeichnet.

Endogene Östrogene wie das E₂, das im gesamten Tierreich als dominierendes weibliches Sexualhormon produziert wird, und auch seine Metaboliten Östradiol, Östron oder Östriol weisen eine hohe biologische Aktivität auf. Die drei als inaktive Konjugate vorliegenden Metabolite werden mit dem Urin ausgeschieden und durch intensive Viehwirtschaft in großen Mengen in die Umwelt freigesetzt (Shore *et al.* 1993). In Kläranlagen findet durch mikrobielle Aktivität eine Dekonjugation statt, wodurch die Östrogene in eine aktive Form überführt werden und dann ins Abwasser und die Flüsse gelangen (Merz *et al.* 1998; Ternes *et al.* 1999a; Ternes *et al.* 1999b). Hier können sie z.B. von Fischen über die Kiemen oder die Nahrung aufgenommen werden und ihre endokrine Wirkung entfalten.

Synthetische Östrogene wie z.B. 17 α -Ethinylöstradiol (EE₂) oder Mestranol, die als Kontrazeptiva (Anti-Baby-Pille) sowie in der Hormonsubstitutionstherapie eingesetzt werden, weisen eine ähnliche biologische Wirkung wie endogene Östrogene auf und gelangen auf gleichem Wege in aquatische Systeme (Merz *et al.* 1998; Lee *et al.* 2004).

Weitere endokrin aktive Substanzen natürlichen Ursprungs sind Phytoöstrogene, die z.B. Bestandteil von Hülsenfrüchten wie Soja, diversen Kleearten, Hopfen, Mais und Holz sind (nicht zu verwechseln mit den Phytohormonen in der Pflanzenphysiologie, die als Botenstoffe Wachstum und Entwicklung der höheren Pflanzen steuern und koordinieren). Diese werden vorwiegend durch die Nahrung aufgenommen und gelangen durch Ausscheidungen in die aquatische Umwelt. Daneben spielt die Freisetzung durch die Papier- und Zellstoffherstellung eine Rolle (Stumpf *et al.* 1996; Santti *et al.* 1998). Die natürlich vorkommenden Mykohormone werden von Schimmelpilzen gebildet.

Xenoöstrogene können auf aquatische Systeme erheblichen Einfluss haben. Bis zu 200 Substanzen werden als endokrin wirksam eingestuft (Gülden *et al.* 1997). Die Auswir-

kungen und Wirkmechanismen sind sehr vielfältig. In Tabelle 1 sind die wichtigsten Chemikalien mit östrogenen Aktivität zusammengefasst.

Tabelle 1: Chemikalien mit östrogenen Aktivität: Chemische Gruppen und Beispiele

Chemische Gruppen	Beispiele
Diphenylmethan-Derivate (chloriert)	<i>o,p'</i> -DDT
Diphenylmethan-Derivate (nicht-chloriert)	Bisphenol A
Triphenylmethan-Derivate	Phenolphthalein
Biphenyle (chloriert)	Aroclor 1221
Biphenyle (nicht-chloriert)	2,2'-Dihydroxybiphenyl
Chlorierte Triphenyle	PCT, Aroclor 5442
PAKs	3,9-Dihydroxybenz(a)-anthracen
Naphthole	1-Naphthol
Alkylphenole	4- <i>tert.</i> Oktylphenol
Phenoxyloxane	Diphenylhexamethylcyclotetrasiloxan
Chlorierte Cyclodiene	Kepon
Phthalsäureester	Benzylbutylphthalat

1.3 Zebrabärbling als Modellorganismus

Der Zebrabärbling (*Danio rerio* Hamilton-Buchanan 1822) gehört zur Familie der Karpfenfische (Cyprinidae), die mit über 2000 Arten eine der artenreichsten Fischfamilien darstellt. Er ist in den Zuflüssen des Ganges in Bengalen (Indien und Bangladesch) sowie Pakistan beheimatet und lebt als schnellwüchsiger Schwarmfisch in langsam fließenden oder stehenden Gewässern, wie zum Beispiel in Reisfeldern.

Als Modellorganismus verfügt der Zebrabärbling über viele Eigenschaften, die für die Entwicklungsbiologie und Genetik von großem Nutzen sind. Zu diesen gehören seine geringe Größe von vier bis sechs Zentimetern und seine genügsamen Ansprüche an Wasser, Futter und Beckengröße, die eine vergleichsweise platzsparende und preis-

günstige Haltung ermöglichen. Der Zebrabärbling besitzt keine saisonale Laichzeit, sondern ist ganzjährig während eines zwei bis fünf Tage dauernden Laichzyklus fertil (Creaser 1934; Hisaoka *et al.* 1962; Eaton und Farley 1974a; Eaton und Farley 1974b; Laale 1977; Goolish *et al.* 1998). Das Zebrabärbling-Weibchen kann pro Laichakt 300 bis 500 Eier ablaichen (Hisaoka *et al.* 1958). Im frühen Stadium der Geschlechtsentwicklung ist der Zebrabärbling ein protogynen Hermaphrodit. Bei zehn bis zwölf Tage alten Tieren differenzieren sich zunächst alle Gonaden unabhängig vom genetischen Geschlecht zu Ovarien. 23 bis 25 Tage nach dem Schlüpfen erfolgt schließlich bei der einen Hälfte der Ovarien eine Reifung zu weiblichen Gonaden, bei der anderen Hälfte findet eine Umformung zu Testes statt. Nach ungefähr 40 Tagen ist der Prozess der Sexualdifferenzierung abgeschlossen (Takahashi 1977). Der kurze Generationszyklus von der Befruchtung bis zur Laichreife beträgt zwölf bis 16 Wochen. Die Embryonen sind durchsichtig und alle Zellen bleiben bis in das frühe Larvenstadium sichtbar. Zudem sind die Embryonen ausreichend groß, um klassische Transplantationsexperimente von einzelnen Zellen oder Zellverbänden durchführen zu können.

Daneben eignet sich der Zebrabärbling hervorragend für genetische Analysen und Selektionsverfahren. Inzwischen wurden vielfältige und effiziente Methoden zur Mutagenese sowie zu deren Nachweis etabliert. Dabei kommen chemische Mutagene (Dooley und Zon 2000; Böhm *et al.* 2003; Dosch *et al.* 2004; Wagner *et al.* 2004) sowie provirale Insertionen (Gaiano *et al.* 1996; Amsterdam *et al.* 1999; Golling *et al.* 2002) zum Einsatz. Ferner wurden Techniken zum Gentransfer (Transgenese) (Long *et al.* 1997) sowie zur Genausschaltung (Morpholino knock-down) (Nasevicius und Ekker 2000) etabliert.

Da der Zebrabärbling ein Wirbeltier (Vertebrat) ist, können entwicklungsbiologische und genetische Erkenntnisse teilweise sogar auf den Menschen übertragen und zur Erforschung erbbedingter Erkrankungen genutzt werden (Metscher und Ahlberg 1999; Zon 1999; Dooley und Zon 2000).

Die zügig voranschreitende Entschlüsselung des Genoms durch das Sanger Institute¹ in Cambridge, Großbritannien sowie die Bereitstellung von Sequenz-Informationen im

¹ http://www.sanger.ac.uk/Projects/D_erio/

Internet² erlauben den Einsatz von umfangreichen Genexpressionsanalysen wie der DNA-Array-Technik.

1.4 Genexpressionsanalyse mittels DNA-Array-Technik

Eine Möglichkeit, die hormonellen Wirkungen endokrin aktiver Substanzen an aquatischen Organismen zu untersuchen, bietet die Genexpressionsanalyse mittels DNA-Array-Technik. Das Funktionsprinzip der DNA-Array-Technik basiert auf der Hybridisierung von Nukleinsäuren (nach James Watson und Francis Crick). Dabei kommt es zu einer Aneinanderlagerung von zwei komplementären Nukleinsäure-Einzelsträngen über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen ihren hydrophoben Purin- und Pyrimidin-Basen. Edwin Southern nutzte dieses Prinzip erstmalig 1975, um auf einer Membran fixierte DNA-Fragmente mit markierten DNA-Sonden nachzuweisen (vgl. Southern Blot) (Southern 1975).

Bei der DNA-Array-Technik werden einzelsträngige Nukleinsäuren strukturiert auf einem Träger-Substrat immobilisiert. An diese erfolgt eine Hybridisierung von unterschiedlich Fluoreszenz-markierten Targetnukleinsäuren aus verschiedenen zu vergleichenden Geweben. Als *Target* (Ziel) wird die aus dem Gewebe extrahierte Nukleinsäure bezeichnet, die es zu untersuchen gilt. Nach Abwaschen unspezifisch gebundener Target-DNA wird die Lokalisierung und Intensität der Hybridisierungen über Fluoreszenzscanning bestimmt.

Verwendet man dabei als Immobilisierungsmatrix beschichtete Glas- oder Kunststoff-Slides, auf die man mit Hilfe eines Roboters (Arrayer) tausende DNA-Spots aufbringt, die kleiner als 250 µm sind, spricht man auch von Microarrays.

Bei der Genexpressionsanalyse mittels dieser hochauflösenden Microarray-Technologie immobilisiert man DNA-Sonden (DNA-Klone oder synthetische Oligonukleotidsequenzen aus dem interessierenden Chromosom oder Gen) auf der Matrix und hybridisiert mit markierten DNA-Targets aus Geweben verschiedener Experimente/Konditionen und der Kontrolle (Schena *et al.* 1998; Duggan *et al.* 1999; Gabig und Wegrzyn 2001). Die Funktionsweise ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

² <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/zebrafish/index.html>

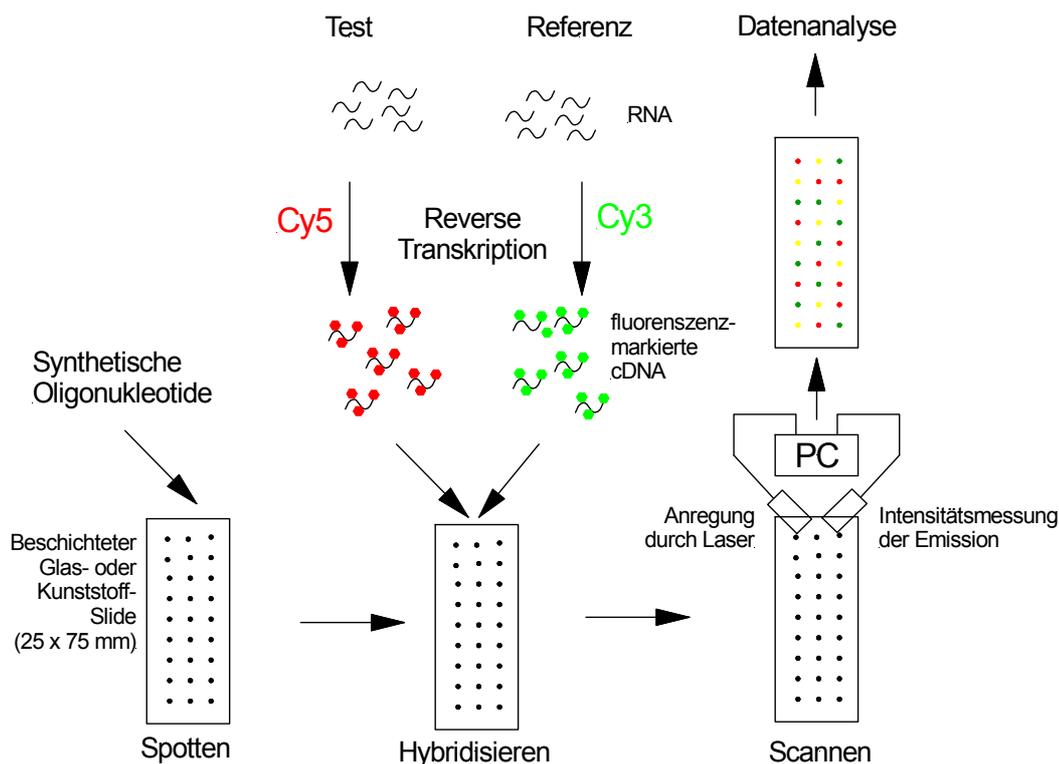


Abbildung 2: Funktionsprinzip der Microarray-Technologie
 Cy3: Cy3-dCTP, Cy5: Cy5-dCTP, PC: Personal Computer

Die DNA-Microarray-Technologie ist heute eine der effektivsten Methoden, die eine gleichzeitige Erfassung der Genexpression von tausenden von Genen sowie eine Bewertung großer Mengen an biologischen Informationen ermöglicht (Schena *et al.* 1995; Chee *et al.* 1996; Schena *et al.* 1996; DeRisi *et al.* 1997; Duggan *et al.* 1999; White *et al.* 1999; Kim *et al.* 2001; Arbeitman *et al.* 2002; Hamatani *et al.* 2004; Wang *et al.* 2004b).

Bei der Anwendung von Microarrays am Modellorganismus Zebrafisch standen dabei bisher entwicklungsbiologische Untersuchungen im Vordergrund, die sich vorwiegend auf ausgewählte Gene beschränkten (Ton *et al.* 2002; Lo *et al.* 2003; Linney *et al.* 2004; Mathavan *et al.* 2005).

In der Umweltanalytik ist die Verwendung der DNA-Array-Technik bisher auf wenige Einsatzgebiete beschränkt. Dabei wurden die Auswirkungen von Umweltchemikalien auf humane Zellen (Mankame *et al.* 2004; Wang *et al.* 2004a), Ratten (Sprague-Dawley[®]) (Kato *et al.* 2004), Mäuse (*Mus musculus*) (Bartosiewicz *et al.* 2001a; Bartosiewicz *et al.* 2001b; Watanabe *et al.* 2004), Nematoden (*Caenorhabditis elegans*) (Custodia *et al.* 2001), Forellenbarsche (*Micropterus salmoides*) (Larkin *et al.* 2002; Larkin

et al. 2003a) und Edelsteinkärpflinge (*Cyprinodon variegatus*) (Larkin *et al.* 2003b) untersucht.

1.5 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung der Microarray-Technologie für die Erfassung der Genexpression von Zebraabräblingen (*Danio rerio*) sowie die Bewertung der Expressionsmuster nach der Belastung mit östrogen wirksamen Substanzen. Die Arbeiten umfassten die Aufzucht und Haltung der Fische, die Durchführung von Expositionsexperimenten, die Aufarbeitung der Proben, die Fertigung der Microarrays, die Hybridisierung der Proben sowie die Auswertung der Ergebnisse. Für die Expositionen mit östrogen wirksamen Substanzen wurde E2 als Vertreter eines endogenen Östrogens, BPA als Vertreter einer Umweltchemikalie, Genistein als Vertreter eines Phytoöstrogens und EE2 als Positivkontrolle gewählt. Der Konzentrationsbereich der Substanzen erstreckte sich von niedrigen bis zu hohen Dosen, für die bereits eine östrogene Wirkung nachgewiesen wurde. Die Untersuchung der Genexpression erfolgte mit Hilfe der Microarray-Technologie. Als Voraussetzung für den Einsatz dieser Technik in einem relevanten Konzentrationsbereich wurde die quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) genutzt. Als Markergen fand hierbei das Gen *vtg1* Anwendung, das für das Eidotter-Vorläuferprotein Vitellogenin kodiert. Mit der Microarray-Technologie konnte die Expression einer Vielzahl von Genen parallel untersucht werden. Dabei wurden zunächst Gesamtgenom-Arrays mit 14067 unterschiedlichen Sonden für Proben verwendet, die einer relativ hohen Konzentration ausgesetzt wurden und bei denen eine östrogene Wirkung durch qPCR nachgewiesen wurde. So konnte für jede der drei untersuchten Substanzen eine Liste mit regulierten Genen des Zebraabräblings erstellt werden. Durch den Vergleich der regulierten Gene zwischen den Substanzen wurden schließlich Markergene identifiziert, die zum Nachweis östrogenen Wirkungen verwendet werden können. Die Bewertung der Genexpressionsmuster erfolgte durch funktionelle Analyse unter Verwendung von *Gene Ontologies*, die biologische Prozesse im Zebraabräbling beschreiben. Schließlich wurden mit *Subset-Arrays*, die eine Auswahl von Sonden trugen, weitere Konzentrationen von E2, BPA und Genistein untersucht. Dabei konnten weitreichende Erfahrungen zur Methodik gesammelt und die Nachweisgrenzen der Microarray-Technologie aufgezeigt werden.

Die Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden im Rahmen des von der Europäischen Union geförderten Projektes EDEN (endocrine disruptors: exploring novel endpoints, exposure, low-dose- and mixture-effects in humans, aquatic wildlife and laboratory animals) durchgeführt. Insgesamt waren an diesem Projekt 22 verschiedene europäische Partner beteiligt. Die Projektziele der Technischen Universität München wurden wegen des großen Umfangs in Zusammenarbeit mit Ulf Kausch, einem Kollegen am Lehrstuhl für Zellbiologie, erarbeitet. Insbesondere die qPCR-Experimente wurden gemeinsam durchgeführt und sind hier aus Gründen der Kohärenz vollständig wiedergegeben. Sie dienen nicht nur zur Bestimmung der Effektkonzentrationen, sondern vor allem auch zur Überprüfung der Microarray-Experimente. Meine Aufgaben umfassten vorwiegend die Etablierung der Microarray-Technologie sowie die Durchführung der Microarray-Experimente.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien

17 β -Östradiol [CAS # 50-28-2]	Sigma, E-8875
17 β -Östradiol-BSA	Sigma, E-0756
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin	Fluka, 87748
3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS)	Fluka, 69947
Agarose NEE0	Roth, 2267.2
Biotin-POD-Konjugat	Sigma, P-9568
Bisphenol A [CAS # 80-05-7]	Sigma, I-0635
Blocking Reagenz	Boehringer Mannheim, 1112589
Borsäure	Sigma, B-7901
Bromphenolblau	Merck, 159102
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma, A-2153
Chloroform	Sigma, C-7559
Desoxynukleotidtriphosphate (dNTP Set), je 100 mM	GeneCraft, GC-013001
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, D-5758
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, 102952
DNA-Längenmarker, 100bp GeneRuler™	Fermentas, SM0243
DNA-Längenmarker, 100/500bp GenSura Superladder	Roth, L496.1
Ethanol absolut	Riedel-de Haën, 32205
Ethidiumbromid-Lösung 1%	AppliChem, A 1152,0025

Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz-Dihydrat (Na ₂ EDTA)	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
Kaliumdihydrogencitrat	Fluka, 60215
Kalziumchlorid, entwässert	Roth, A119.1
Maus-anti-human-Östrogenrezeptor-Ak, biotinyliert	Dako, E7107
Natriumacetat-Trihydrat	Merck, 6268
Natriumcarbonat	Merck, 106393
Natriumchlorid	J. T. Baker, 0278
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Fluka, 71402
Natriumhydroxid	Roth, 6771.1
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck, 106346
Natriumhydrogencarbonat	Merck, 106329
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, 106580
Natriumhydroxid	Roth, 6771.1
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Fluka, 71728
Östrogenrezeptor α , human	MoBiTec, P2188
Salzsäure	J. T. Baker, 6081
Schwefelsäure	Merck, 100732
Sorbinsäure	Fluka, 85510
Streptavidin	Vektor, SA-5000
TRI Reagent TM	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

2.1.2 Kits und Microarrays

1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)	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

2.1.3 Primer

Konzentration aller Primer: 100 pmol/μL

β-actin (NCBI Zugriffsnummer: 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')

eflα (NCBI Zugriffsnummer: L23807; Produktgröße: 208 bp)

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

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

vig1 (NCBI Zugriffsnummer: 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 Hilfe des Internetprogramms „Primer3“³ erstellt. Die Synthese der Primer erfolgte durch MWG Biotech in Ebersberg, Deutschland.

2.1.4 Sonden

Für die *Subset-Arrays* wurden die Sondensequenzen von Ocimum Biosolutions in Hyderabad, Indien zur Verfügung gestellt. Die Sonden sind 50 bp lang und am 5'-Ende mit einer NH₂-C₆-Modifikation versehen.

Die Bestellnummern und Sequenzen der Sonden sind nachfolgend aufgeführt. Die Synthese der Sonden erfolgte durch MWG Biotech in Ebersberg, Deutschland.

Konzentration aller Sonden: 100 pmol/μL

Folgende 50 Sonden werden bei allen *Subset-Arrays* gespottet:

#00043: 5'-CCC TCC TCT TGG TCG CTT TGC TGT GCG TGA CAT GAG GCA GAC CGT TGC TG-3'
#00562: 5'-ATC GTC TCT GAA GTT GGT GAA GAA GCA AAC TGG AAA ATG TGT GCC AAT GC-3'
#01171: 5'-ATG CGG GCG CGG GCA TTT CCC TCA ATG ACA ATT TTG TCA AGC TCT TTT CC-3'
#03268: 5'-CCT CAG CCC TGT TGC GTT CCC ATC AAA CTG TCC CCC ATC TCC ATG CTC TA-3'
#03519: 5'-AGC TGT ATG GAA AAG TTC TTG GCA TTG TGG GAC TTG GAA GGA TCG GCA AA-3'
#04050: 5'-TTG ACC TGA AAG TGA AAA TTC CAG AGC GAA CTA TCT ACA AAA AGA AAA TT-3'
#04614: 5'-CAG TTC AAA AGG ATT GAT ACA GCA ATG TGC GGA CCC AAG GGT GTG ACG GT-3'
#04672: 5'-GGC AAG CCA CAT GCC ACA CAT GGG CCA CCT GCC ACC GTT CAG CCA TTC CG-3'
#05176: 5'-TCA CAT CAC GCC TGG CAC ACA TGC TTC TGA GGA TGC AGT CAA CAA GCA GC-3'
#05346: 5'-GAG GCA GTG AAT CAG ATG CGC TAG CCG CCC CAT ACA ACT GAG AAG TTA CG-3'
#06233: 5'-ACA CCG TAC CAG GTT TAG GGA AAA AAC TTT GGC TAT CAT CTC GTT CCT CA-3'
#06261: 5'-GCT GAA CGA CGA GGA CCA GGT GGT GGT GAA TAA AGC CGC AGT GAT GGT GC-3'
#06947: 5'-AGA CAG ACG CAT TCG AAA GAG ATT GAG AGC AAA GAA GAT GAG GTG GAG GA-3'
#06962: 5'-GTT CAA GTT GGT CCT AGA GCT GCT GAG AGG CTT GTT AAG CAA ATC AAC AT-3'
#07030: 5'-ACG CCC AAC TTC TGC ACC CTA CTT TGC TAT GAC AGA GTC TTC TCT GAT AT-3'
#07095: 5'-TGC AGC AGC AGC AAC GGG CGG CGT TTA ATA AAC AAA ACT CTG ACA AAT TA-3'
#07343: 5'-TGT CCA GCG GCA GCA GCA ACG GCT CAC TGA TCT CGC AAA CAC ACA TCC TG-3'
#07666: 5'-TTC AGC CGA CAG CAT CCG CAG CAA GCA GCA GCG ATG GCT CTC CTC AAA AC-3'

³ Adresse: http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi

#07758: 5'-GTC TGT CAT GCC TCT ATC ATC AAT GGG ACC ACA GCA AAA TCT AAT AAA CA-3'

#07832: 5'-ATG GAC GAT CCA CAG GCT TAG TGT TAG ATA GCG GAG CAA CAC ATA CTA CT-3'

#07971: 5'-GGC ACA GAG GAA GAT CCG AGA CAT TTT GAC ACA AGT CAA GCA GCA GCA GA-3'

#08000: 5'-AAG ATG AAA AAG GAA GTG GCA GCA GCA GTA CCA GCT CTA CTC GCA ATC TG-3'

#08049: 5'-AAT AAT ACA TCT GAT GGG GAT AAG TTC AAA CAG ATC TTC CAG GCA TAT GA-3'

#08087: 5'-CTC AGA AGT CCT TTG ATT TCA TTG CTA GGA TTC CAG TCC CAA TGT CA-3'

#08103: 5'-GTC TTC CTC TCG CAG GTC TAG AGC ATC TAT GAC AGG GGT GAG AAC CGT GT-3'

#08109: 5'-CAC ACT ATT CTC AGG GAA GAA TTC AGG AAG CAC CCA AAC TGA CGC ATT TA-3'

#08162: 5'-CGC TAA AGT GAA ACC CCC CCG ACA GCA GAC GCC CAG CAC ACT GCC ACA GC-3'

#08169: 5'-CAT CTT CAC AAA ACT GCT TCT CAA ACT CCC AGA CCT GCG CTC TCT TAA TA-3'

#08233: 5'-AGG CTC TCA AAT CAG GAG ATG CAG CCA TTG TCG AGA TGG TCC CTG GCA AG-3'

#08534: 5'-TTT GCA GCA ACA GCA CCC AGG CAA ACA AGC AAA AGA GCA ACA GCA GCA GC-3'

#09054: 5'-ATT TAA GAA GGA GAA AAG CCC ATT CAA GAA GGA CAA AAG CCC ATT TAA GA-3'

#09301: 5'-ACT CCT CCT CCG GGA GTG TCT GAA GAT GAG CTG GAT CTC ACA CCA GTT GT-3'

#09580: 5'-CTA TAC AGC AAC AGT TAC TCT CCG TTC AGC AGC AGC ACC TGC TCA ACC TG-3'

#09754: 5'-CTC AAC ACG CCA CCA CGT TGT CAC TCA GCA CAT TAG CCA CGC CCA AGA GG-3'

#09758: 5'-CCA ACC ACA CCA GCG ACT ACA CCT CCA CAT CAC CGC ACG CTT TTC ACT GC-3'

#10198: 5'-GTC TCA AGC TCA AGC TCA AGT TCC ACT ACA CGC AAG GTG GTA ACC ATT GT-3'

#10285: 5'-CAG CAG CGG CAG CAG CAG CAG CTA AAG GAC TGC ATA CAT TGT CTC TCA AA-3'

#10451: 5'-GGT CTC AGA GCG AGA AAA ACC CTC CAT CTA CAC CCA CAA CCA GCA GCA GC-3'

#10706: 5'-GGG TGA TGC CAA GAA GAC TTG TGA TGC TCT GTC TGC CAA GGT CCG CGA GG-3'

#10815: 5'-ACG ACA ACA TCA TCT GCG GTA TAA CCT CGG TGG CCT TCT CCA AGA GCG GT-3'

#11552: 5'-CCA TTG GCA ATG AGA GGT GAG GTG CCA GAG GCC CTG TTT CCA GCC ATC CT-3'

#11857: 5'-GTT CTT CTT CAC TTA CGC CAC CAG GAA CGA CAG CAG CGT TAT GGT CCA CG-3'

#12026: 5'-GGC AGA CGG ACA CAT GCC GAG CGA CCA CAC CAC CTC CGG CGG AGA CCA GT-3'

#12110: 5'-CCA CCC GTG ACG AAC AGC AGC AGC TCT TGC AGA AGG TTC TGG CAG CTT CA-3'

#12152: 5'-TTC ACC AAC CTG CCT CAC ACG CCG CGC TAC TAC GAG ATC CTC AAG AAG AG-3'

#12161: 5'-TCG GGG AGT ATC TCT TGC TCA CTC ATC CAG CTA CAC GAG TCA AGA TGC CT-3'

#13164: 5'-ATC GAT GAG AGA CAT TCT GCT GCA CGG GAA GCC AAA GCT GGG TAG AGA GC-3'

#13260: 5'-TCT GTC CAC GCT AAC AGG AAA GAA CGT CTT GAT TGT GGG AGG ACA TCA TT-3'

#13370: 5'-AGG AAA GCT GCA CAC ACC TCA TCG AGG CAC ACA AGG AAT GCA TGA GAG CG-3'

#13940: 5'-CTC TGC ACA AAC CCC TTC AAC TTC AGG CCC AGC AGC AGC AGC AAG AGC TA-3'

Folgende 37 Sonden sind zusätzlich bei den *Subset-Arrays* gespottet, die für die Bisphenol A-Proben verwendet werden:

#00651: 5'-GAA GGC TCA GCC TGA GGA GCC CCA CAT CAC TGC TGC TAA GGA AAT CGA GG-3'
#01364: 5'-GCG GAG CAA ACT CCA CCC CCA GCC TGG TGA CCA CGC CCT TTT TCC TTA AT-3'
#02595: 5'-TGG ATG ATG CCA CTG AAG CCA GCG AGG GCC TGA GCC GAG AGG TCA ACA CA-3'
#02612: 5'-CCA TTA ACC CCT GCC ACC CCA TCT CGG TAC TCT CCT GTA TCA AAA GGC AT-3'
#03126: 5'-CAA GAG ATG ATA GAC ATT GTT GAG ACC GTT TAC AGG GGG GCG AGG AAA GG-3'
#03495: 5'-TTG CTT CAA GGG GAA CTG AGT GAC TTT TTA GCC GCA AGT AAA GAC CCC AT-3'
#04050: 5'-TTG ACC TGA AAG TGA AAA TTC CAG AGC GAA CTA TCT ACA AAA AGA AAA TT-3'
#04068: 5'-TGG ACA GAC AGC TTC ACA GAA TGT GTC GGA GGC ACC GCA GAT TTA TCC AT-3'
#04431: 5'-GCC AAA ATC CAA GAC AAA GAA GGC ATT CCC CCT GAC CAG CAG AGG TTG AT-3'
#04531: 5'-TTC CCA GAG TTC AGC GAC CCT GCG GCT CCA GGA AAG CTG AGG CAG TAT GT-3'
#05368: 5'-GTT CCC CTC AGA GAA AAA CCC CGC ACC TCT TTT GTC CCG CAG GAG GAT TT-3'
#05463: 5'-TGG CCT TCC GTG TCC CCA CCC CCA ATG TCT CTG TTG TGG ATC TGA CAG TC-3'
#05637: 5'-CCA AAG GTA ACC GCA TTG AGG AGA TTC CTG AGG TCG CAC TTG TTG TTG AT-3'
#05667: 5'-CCG TGC TCG ATA CCT GGC ATC TAC GGT GTG TTG AAC AGA AAA CGA GGA CA-3'
#05830: 5'-TCT TAC ACA GCC TAC ATC AAA GAC TAC ATG AAG GCA GTT AAG GCC AAG TT-3'
#05851: 5'-GCC TCA AAT CAA GGA GGG AAA GCG GGT GTT GAT TGC CGC TCA TGG AAA CC-3'
#05981: 5'-CGA ACT TTT TTT CAT ACA GAT CTC CCG CTT CCT CTC GAA CTG CGT CAC AC-3'
#06147: 5'-ATG TCA AAA AGG GAT ATT TAC CTC CCC GTC ACT GTT CCC ATC AAT CCA GA-3'
#07050: 5'-TAT ATG CTA CAG TCC AGT TTG GGA CCA GCC TAC ACA ACA TCT CTG CGC CA-3'
#07990: 5'-GTT CTG AAC TTG GTC ATT GTC AGG AAG GGT GAG AAG GAG TAA AGC CCC TA-3'
#08728: 5'-AGA CAA CGG AGT GAC ACG AGC TTT CAG AAA TAT CCC TGG CAT CAC ACT GC-3'
#08765: 5'-AAC TAG GAG TGG ACG ACG AAT GGG CAG AGG AGG TTT TGG TGG GGG TGG TG-3'
#08874: 5'-GCT CGT TTC CAG CGG AAT CAC CGG CTA ATC AGT GAC ATT CTG AGT GAG GT-3'
#08886: 5'-TGC GGA GAG TGC TAG CGG ACA ACC CGT GGA GGC CGA GAG TGA AGC TGC TG-3'
#09943: 5'-ACA TGT GAG TCT GCG TTT CTG TCC AAG AGG AAC CCC AGG CAG ATC TAG TG-3'
#10283: 5'-GAA AGA GTC TCA CAG GAA GAC GTG CTT CAG TTG CAC CAA AAA TAG CAG AG-3'
#10792: 5'-AGC AGA AGG TGC TGG AAA GGG AGA TAG ACC CAC TAA AAG ACC ACC AGT CC-3'
#10879: 5'-CAA TAG AGT CAA GAT GAA CAA ACG GCC AGG AAA AGA AGC AAG AAG GAA AA-3'
#11036: 5'-CCT CTG AAA AGG GAG ACC CTC ATC TGA GTG ATT TCC TGG AGA CTG ACT AC-3'
#11056: 5'-CAA CCT CCT ACT GTT TCG CTG GAC ACA ACG ATG GGA ACT ATT GTG CTT GA-3'
#11494: 5'-AGG GCT TCA ACG TGT CCG TGC AGG GTA TCA TCA TTT ACA GAG CTG CCT AC-3'

#11761: 5'-GAT TAA AGT GGA AAA CGA AGA CCC CCT GGT TCC TGA CAT TGT GTA TGG GC-3'
#11927: 5'-TCC ACC ATT GAC CCC TAC GAG CCC ACC TAC TGC CTC TGT GAA CAA GAG CC-3'
#12685: 5'-TAC GCC CCA AAG TCT GTT TAC CCT CTT CGG TGT CTA CGG TGA CGT GCA AC-3'
#12988: 5'-GAG GCT TTT GGC TGC ATA GAT CAG AAC CGG GAT GGA GTT ATC AAC AAA TC-3'
#13048: 5'-CAC TAA CTA CAT CTA CAG CAT CGC CGT CTT CCC TAA CGG AAA AGA CTT TA-3'
#13870: 5'-TTT TAC CAA GAG GGG TCA GGC TGC CCT GGA CAG GCT TAT TGT GTT TGA TG-3'

Folgende 46 Sonden werden zusätzlich bei den *Subset-Arrays* gespottet, die für die Ge-
nistein-Proben verwendet werden:

#00032: 5'-ACA GCA GTG TGC TAG CCT TCA GCT ACT CAA TCC TGT GAG GAG AGT TGT GC-3'
#00054: 5'-TTG QAA AGG ATG TAA GGA GAG AAG ACC TGA ATG GCT TAG TGT GAG AGA AG-3'
#00167: 5'-TCG CCC GGA CTG CAC CCT GCT GTT TGC CCC AGA TTC CAG GAG TGA CCA TT-3'
#00181: 5'-ATT GTG GAA GAG GTG GTG GAT GGA AAA GTG GTC AGC TCA TCC TCC AAG GC-3'
#00186: 5'-AAA GCA CAA GAG TAG TTT TGG AAG ACG ACT GAT CAT GAG ATG CTA CTT CA-3'
#00226: 5'-CAT TGT CAA GAT GTT CAC CTT TGT AGA CCC ACA GTC TCT GTC TCC TGT GC-3'
#00374: 5'-CGG AGC TAA TTA CCT CCA ACT ACC AGT CAA CTG CCC GTA CCG CAC CCG TG-3'
#00430: 5'-GAA CTA CTT CAT TCC AAA GGG GAC TTC TAT TAG AAC AAA CCT GTC TTC GG-3'
#00937: 5'-GGG GTG AAT GTG ACG CAG CCA CGA GCA CAA AGA GCC GCA CTG GCA CTG TG-3'
#01821: 5'-CTG TGC ACA AAT CAT GCT CCT TTG CCA ATG GAT GGA AAG TCA AGG ACG GT-3'
#02130: 5'-TCT GCC GTG TGT TCA GGA TCT CCA TCA GAC ATA TCT CGC TGC TTC TCA AC-3'
#02156: 5'-AGC AGT CAG CAT CTG AAT GAC CTG CTG CTG CCT CTG GCC CTT CGG CTG CA-3'
#02178: 5'-CCT ACC CTG CAC CAA CGC CTG CAC AGG CTC CGC CCT CCT GCA CCC CTC GC-3'
#02197: 5'-ACG CAG AGA GCG CAC GCA GCG GTG TCT ACC ACC TGA AGG CTA CAT ACA CA-3'
#02353: 5'-AGA AAT CCG TCA CCA TGA GAA TTG AGC TGC TGG GTT GTG ATT TCG AAT AA-3'
#02721: 5'-AAG GAG ACA AGC GTT GGC CCA GGA ACT CGG CCT GAA CGA GTC TCA AAT CA-3'
#02741: 5'-AGT ACT GAT TTT GCT AAC ACT AGG ACT AGC CTA CGA ATG AGC CCA AGG CG-3'
#02980: 5'-CAA CAA GTC GTC CCA CTG GAG CAG TCC ATG AGC ACA CTT AAT CAG AGC AT-3'
#03055: 5'-AAG TGG GGT TTG GAG ACC TGT CAG CGT CTG GAT AAA AAC TAG TAT AAA TG-3'
#03336: 5'-GAA GAA CCT CTG CTG AAA AAA GCG AAA CTT GAT GCA GTT TTC GGT TTC AG-3'
#03427: 5'-AAA TAG CCA TAA AAA ATC AGG CGA TTC AGA TGT GAC CGG GAA ACC AAA GG-3'
#03807: 5'-AAC ATC GTC AGG AGC ACG CCT CGC ACT TAG ACC GTA GCC AAT CAG CTC CG-3'
#03985: 5'-CAA TCA AGT CTT ACC TAG CCG TCT TCC TTA CCT CTA TTA TTC TTA AAA TA-3'
#04173: 5'-CAA CAT GGC GTT AAG GTT GTG TCT GAG CCT TCC TCT CCT GTT CCT ATG GA-3'
#04492: 5'-GAA GAG AGT CAG GCC CTC ACT CAC CCA GAC CAG CTC AAA CTG AAG AAG AT-3'

#05003: 5'-TCT ACG CAA GGC TGA ACA AGC GCC GGG CCA TAA AGG CAC CTC CGT CAT CA-3'
#05946: 5'-CCG AAG AAC GAG GGT CGC GCT TAT TCT GTT AAG TAG TCT GCT CCC AGG TC-3'
#07195: 5'-ACA GAC TAG GAT AAC TAC GCA ATC CAC TAG TCG TGC AGA GAG CTG GAT GA-3'
#07441: 5'-ACT CCA ACA CAG TCG CTG GAC AGT TTG ATG ACG CAG ACG TGG ATC ACT GA-3'
#07850: 5'-CTC CCA GTG ATG AGG TTG TTT CTA GTA GAG AAG TTA TCC TGA CTT TGT GA-3'
#08036: 5'-GGA TTT ACA GGA GCA ATT ATT TTA ATA ATC GCC CAC GGA CTA ACC TCA TC-3'
#08214: 5'-CTG TAC GCT GTT GTG GGG TAT AAC CTG CGC CCT TTG ACC AGC AGG AAT GT-3'
#08756: 5'-GGA TGG ACT AAT GTG CAA GAC TTT TCT GCA AAG CCA ATT CAG CTC ATA TA-3'
#08758: 5'-GTC CGT TAC AGA AGA GCA TAT TTA ATG TTT CTG ACC TTT TCA ACT CTG AG-3'
#08858: 5'-ACC CCA CGC ACA GCT CGC CCT TAC TGG CCC AAA CGG ACC TGC CCA CAG AG-3'
#09080: 5'-CTT CAG CAC TAC AGT TAC CAA TCC TGA GCC AAT GGG AAA GCA GGG ACG TG-3'
#09391: 5'-TGC TGA TGC TGA AGG TCC CAA CTT GTT CAT CTC CGA TGC TTA CCA TAA GG-3'
#09458: 5'-AAC CAA CTA CAA CAT TGA AGA CTT TGC TGA CCT CGG CAT GTT CCC ACC AT-3'
#09662: 5'-AAT GGA GAC CAC ATA CAC TGT GCT GGA GAA AGA CGG GCG AAA GAG GGG CT-3'
#09694: 5'-ACC GTC ACC AAC TCC TTC ACC ATC GGC AAA GAG GCT GAA ATC ACC ACC AT-3'
#09776: 5'-ATG TCA GTG AGG TTT CTG ATT TCG ACA AGA ACA AGC TGA AGA AGA CCG TA-3'
#09965: 5'-GAG GCT GTT CGC ACT AAG CTG ACC GAG CGT CTT GAG GAC CTG AGG ACC AT-3'
#10274: 5'-TGT TGG AGG GCT TTG GCA CAA AGG GCT ACA TCG CTA ATC TGG GTC ACG GC-3'
#10542: 5'-AAC ATC AAG CGC AAC AAT TCG GCA CGC TCC ACC AAG CGC ATC TCG CAT AT-3'
#11421: 5'-GTC ATC ACC GAG GAG TTT TAG ATG AGT TTT CCA TGT GTG CTG ACC AGC AG-3'
#12936: 5'-GGT GCA GCC TTG CCA TTT CAG AAG TCC TTG ATT TTC ATT GCT AGG GTT CC-3'

Bei den *Subset-Arrays* werden folglich 50 Sonden für E2-Proben, 87 Sonden für Bisphenol A-Proben und 96 Sonden für Genistein-Proben immobilisiert.

Im Anhang A ist eine Tabelle der Sonden mit den Bestellnummern von Ocimum Biosolutions und den entsprechenden Geninformationen aufgeführt. Als Geninformationen sind die Zugangsnummern für Datenbanken sowie die Bezeichnungen und Abkürzungen der spezifisch an die Sonden bindenden Sequenz-Abschnitte des Zebrabärblings (*Danio rerio*) angegeben. Bei den spezifisch bindenden Sequenz-Abschnitten handelt es sich um so genannte Offene Leseraster (*Open Reading Frames, ORFs*). *ORFs* sind kodierende Bereiche der DNA, die zwischen einem Start- und Stoppcodon liegen. Die bindenden *ORFs* sind entweder Abschnitte von Zebrabärbling-Genen, deren Funktion bekannt ist (so genannte *Expressed Transcripts, ETs*), oder Abschnitte von Bereichen, die beim Zebrabärbling noch nicht entschlüsselt sind (so genannte *Tentative Consensus*

Sequences, TCs). Die *TCs* weisen hohe Übereinstimmungen zu *ORFs* aus anderen Organismen oder DNA-Klonen auf, für die zum Teil Funktionen bekannt sind.

2.1.5 Enzyme

DNA-Polymerase BioTherm™ (5 u/μL)	GeneCraft, GC-002-1000
RNase Inhibitor Protector (40u/μL)	Roche, 3335399

2.1.6 Lösungen und Puffer

a) Blockierungs-Lösung (4x)

von Nexterion, 39-1066071

b) DEPC-H₂O_{dd} (0,1%)

1 mL DEPC (0,1%)

H₂O_{dd} ad 1000 mL

über Nacht rühren, dann autoklavieren

c) Carbonat Puffer, pH 9,6

1,59 g Na₂CO₃ (15 mM)

2,93 g NaHCO₃ (25 mM)

H₂O_{dd} ad 1000 mL

d) Na₂EDTA (0,5 M), pH 8,0

186,1 g Na₂EDTA • 2 H₂O (0,5 M)

pH 8,0 mit NaOH

H₂O_{dd} ad 1000 mL

e) Hybridisierungs-Lösung

von Nexterion, 39-1066075

f) Ladepuffer für RNA/DNA–Agarosegel (10x)

5 mL 100 mM Tris (pH 7,6) (50 mM)

5 mL Glycerol (50%)

20 μL 0,5 M Na_2EDTA (pH 8,0) (1 mM)

30 mg Bromphenolblau (0,3%)

30 mg Xylencyanol (0,3%)

g) MgCl_2 -Lösung (50 mM)

von GeneCraft

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

41,9 g MOPS, freie Säure (0,2 M)

6,8 g $\text{NaOAc} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ (50 mM)

20 mL 0,5 M Na_2EDTA (pH 8,0; 10 mM)

pH 7,0 mit 10 M NaOH einstellen

$\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ (DEPC behandelt) ad 1000 mL

i) PBS Puffer, pH 7,6

1,38 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (10 mM)

12,46 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (70 mM)

8,5 g NaCl (145 mM)

$\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ ad 1000 mL

j) PBSE Puffer, pH 7,6

1,38 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (10 mM)

12,46 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (70 mM)

8,5 g NaCl (145 mM)

10 mL 0,5 M Na_2EDTA (pH 8,0; 5 mM)

$\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ ad 1000 mL

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

1,38 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (10 mM)

12,46 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (70 mM)

8,5 g NaCl (145 mM)

5 mL Tween[®] 20 (0,5%)

H₂O_{dd} ad 1000 mL

l) PCR-Puffer (10x)

von BioThermTM ohne MgCl₂ von GeneCraft, GC-002-007

m) RNA Probenpuffer

10 mL Formamid

3,5 mL 37% Formaldehyd

2 mL 5x MOPS

n) SDS Lösung (10%)

100 g SDS

H₂O_{dd} ad 1000 mL

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

175,3 g NaCl (3 M)

88,2 g tri-Natriumcitrat • 2 H₂O (0,3 M)

pH 7,0 mit HCl einstellen.

H₂O_{dd} ad 1000 mL

p) Spotting-Puffer (2x)

von Nexterion, 39-1066029

q) Substrat für POD

30 mL Substrat Puffer

500 µL TMB Stammlösung

100 µL Wasserstoffperoxid-Lösung

r) 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

s) TBE Puffer (5x)

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

t) TMB Stammlösung

0,3 g 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
5 mL DMSO
Methanol ad 20 mL

u) Waschpuffer 1 für Ocimum Biosolutions Zebrafish OciChip™

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

v) Waschpuffer 2 für Ocimum Biosolutions Zebrafish OciChip™

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

w) Waschpuffer 3 für Ocimum Biosolutions Zebrafish OciChip™

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

x) Wasserstoffperoxid-Lösung (30%)

3,3 mL H₂O₂ (30%)
H₂O_{dd} ad 100 mL

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

Aquaristikbedarf:

Sera Premium, Plankton-Futtertabletten

Sera Vipran, Flockenfutter für Zierfische

Tetra Aqua Safe, Dosierung 5 mL in 10l Leitungswasser

Tetra Fresh Delica, Rote Mückenlarven

Tetra TetraMin, Flockenfutter für Zierfische

Tetra TetraMin Baby, Flockenfutter für Jungfische

Laborbedarf:

Biopur Safe-Lock Reaktionsgefäße, 2,0 mL Eppendorf, 0030 121.597

Filterpipettenspitzen:

DF30ST, 30 µl Gilson, F161933

Safe-Seal-Tips® Premium, 10 µl Biozym, 693010

Safe-Seal-Tips® PreCision®, 100 µl Biozym, 692086

Safe-Seal-Tips® Plus200, 200 µl Biozym, 796201

Safe-Seal-Tips® Plus1000, 1000 µl Biozym, 796501

Gene Frame 1,7 x 2,8 cm (125 µL) Peqlab, 82-0578

Glasperlen, 4 mm Diagonal, 9012404

Handschuhe, puderfrei Meditrade, 1221R

Küvetten (UVette®), 50 bis 2000 µL Eppendorf, 0030 106.300

LightCycler® Kapillaren, 20 µL 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

Safe-Lock Reaktionsgefäße, 0,5 mL Eppendorf, 0030 121.023

Safe-Lock Reaktionsgefäße, 1,5 mL Eppendorf, 0030 120.086

Safe-Lock Reaktionsgefäße, 2,0 mL Eppendorf, 0030 120.094

Safe-Lock Reaktionsgefäße, 1,5 mL, amber Eppendorf, 0030 120.191

Slides E barcoded	Nexterion, 39-1064016
Sterilisationsklebeband	Heiland, 326 202
Zentrifugen-Röhrchen, 50 mL	TPP, 38008

2.1.8 Geräte

Aquarieninnenfilter 2012, 2052	Eheim
Autoklav, 3870 ELV	Tuttenauer
Arrayer GMS 417	MWG Biotech
Array-Scanner GMS 418	Affymetrix
Brutschrank 2771	Köttermann
Dreieckfilter mit Ausströmer	Lapis
Eismaschine AF-10	Scotsman
Elektrophoresekammern GNA 100	Pharmacia
Elektrophoresestation EPS 600 für DNA-Gele	Pharmacia
Elektrophoresestation PowerPac 200 für RNA-Gele	Bio Rad
Feinwaage R 160 P	Sartorius
Gel-Dokumentationssystem	LTF-Labortechnik
Heizstab 25W TSRH 25	Jäger
Heizstab 50W TSRH 50	Jäger
Hybridisierungsöfen Hybaid Shake 'n' stack	MWG Biotech
Hybridisierungskammer	Peqlab
LightCycler [®] 2.0 System	Roche
Magnetrührer RET	Janke und Kunkel
Membran-Luftpumpe 7500	Lapis
Mikrotiterplattenwaschgerät 96PW	SLT-Laborinstrumente
Mikrowellengerät 8019	Privileg
Peristaltikpumpen, analog & digital	Ismatec

pH-Meter Microprocessor	WTW
Photometer GeneQuant 80-2115-05	Amersham Biosciences
Plattenphotometer SpectraFluor Plus	Tecan
Schüttler, Vortex VF 2	Janke und Kunkel
Schwingmühle	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
Zentrifugen Adapter für LightCycler [®]	Roche

2.2 Methoden

2.2.1 Haltung und Nachzucht der Fische

Die Haltung der Zebrabärblinge (*Danio rerio*) erfolgt in Vollglasaquarien mit 160 L Wasservolumen, die mit Leitungswasser von den Stadtwerken Freising befüllt sind. Die Wassertemperatur wird mit je drei Heizstäben (50 W) konstant auf 24°C gehalten. Der pH-Wert beträgt 7,8, die Wasserhärte 18° dH und die Beleuchtungsdauer 12 h am Tag. Innenfilter reinigen das Wasser und mit Membran-Luftpumpen werden die Becken mit ausreichend Sauerstoff versorgt. Zusätzlich erfolgen einmal pro Monat Wasserwechsel, bei denen die Hälfte des Wasservolumens erneuert wird. An den Böden der Aquarien befinden sich dunkler Kies und wenige Schiefersteine. Aufgrund eines möglichen Einflusses durch Phytoöstrogene wird auf Wasserpflanzen verzichtet. Die Fütterung der Fische mit Flockenfutter findet morgens und abends statt. Neben den Zebrabärblingen

befinden sich in jedem Becken acht Panzerwelse (*Corydoras paleatus*) zur Verwertung der Futterreste am Boden.

Die Zebrabärblinge stammen aus örtlichen Zoofachgeschäften, da sich diese den lokalen Wasserverhältnissen angepasst haben. Daneben erfolgt eine eigene Nachzucht. Für diese werden ein Männchen und zwei Weibchen in Brutkästen mit 3 L Wasservolumen umgesetzt. In diesen Kästen wird die Temperatur mit einem Heizstab (25 W) auf konstant 25°C gehalten. Ein Dreieckfilter reinigt das Wasser und eine Membran-Luftpumpe stellt die Sauerstoffversorgung sicher. An den Böden der Brutkästen befindet sich eine netzartige Vorrichtung, durch die die Eier fallen, um sie vor Fraß durch die Elterntiere zu schützen (siehe Abbildung 3). Nach dem Laichen werden die Elterntiere aus den Brutkästen entfernt und die Wassertemperatur zur Förderung der Entwicklung auf 26°C erhöht. Die Jungfische schlüpfen nach 48 h und sind vorerst schwimmunfähig. Diese entwickeln sich innerhalb von vier Tagen soweit fort, dass mit der Fütterung von fein gemahlenem Flokkenfutter begonnen wird. Alle zehn Tage wird ein Wasserwechsel durchgeführt. Hierzu wird die Hälfte des Wassers entnommen und durch frisches Leitungswasser ersetzt.



Abbildung 3: Brutkasten mit herausnehmbarer, netzartiger Vorrichtung

2.2.2 Exposition der Fische

Die Exposition der Zebrabärblinge mit östrogenen Substanzen erfolgt in Aquarien mit 20 L Volumen, die Bestandteile eines Durchflusssystems sind. In Abbildung 4 ist der Aufbau des Durchflusssystems schematisch dargestellt.

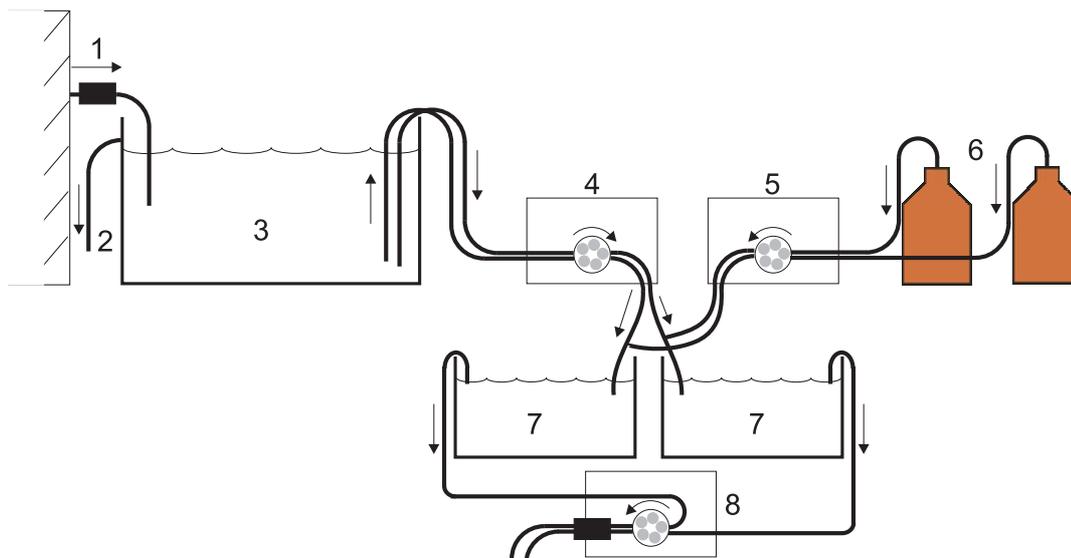


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Durchflusssystems

1: Frischwasserzulauf mit Aktivkohlefilter, 2: Überlauf, 3: Vorlaufbecken (500 L), 4: Peristaltikpumpe für Wasserversorgung, 5: Peristaltikpumpe für Chemikaliendosierung, 6: Flaschen mit Vorratslösungen, 7: Expositionsbekken (20 L), 8: Beckenablauf über Peristaltikpumpe und Aktivkohlefilter

Leitungswasser der Stadtwerke Freising wird durch Aktivkohle gefiltert, in einem 500 L fassenden Vorlaufbecken gesammelt und auf 24°C erwärmt. Die 20 L-Expositionsbekken werden über Peristaltikpumpen mit dem Wasser aus dem Vorlaufbecken versorgt. Die Zufuhr der östrogenen Substanzen sowie das Abpumpen des überschüssigen Wassers erfolgen mit weiteren Peristaltikpumpen. Bevor das abgepumpte Wasser aus den Expositionsbekken in die kommunale Kanalisation gelangt, wird es durch Aktivkohle gefiltert. In jedem Expositionsbekken befindet sich ein Heizstab, der die Temperatur auf konstant 24°C hält. Zudem versorgt je ein Sprudelstein, der an einer Membran-Luftpumpe angeschlossen ist, das Wasser mit ausreichend Sauerstoff. Die Durchflussrate beträgt 21 mL/min, so dass ein 1,5-facher Austausch des Beckeninhalts in 24 h gewährleistet ist. Die Vorratslösungen der östrogenen Substanzen werden in einem Kühlschrank bei 4°C gelagert und jeden zweiten Tag erneuert. In jedem Expositionsbekken befinden sich bis zu zwölf männliche Zebrabärblinge. Die Selektion der männlichen Tiere erfolgt dabei aufgrund von äußeren Merkmalen. Abbildung 5 verdeutlicht den morphologischen Unterschied zwischen schlankem Männchen und dickbäuchigem Weibchen.



Abbildung 5: Zebrabärblingmännchen (oben) und -weibchen (unten)

Die Beleuchtungsdauer der Fische im tageslichtfreien Raum beträgt 12 h am Tag. Ein Expositionsexperiment mit einer Chemikalie dauert elf Tage und umfasst folgende Konzentrationen in den Becken:

EE2: 0,5, 1, 10, 50, 100, 200, 300, 400 und 500 ng/L

BPA: 0,1, 2, 20, 200, 400, 1000 und 2000 µg/L

Genistein: 1, 10, 100, 500, 1000 und 5000 µg/L

Bei jedem Expositionsexperiment werden zudem ein Becken mit EE2 (30 ng/L) für Positivkontrollen und vier zusätzliche Becken ohne Chemikalie für Negativkontrollen installiert. Ferner wird ein weiteres Becken ohne Chemikalie eingerichtet, in dem vier weibliche Zebrabärblinge gehalten werden. Diese dienen als Kalibrator bei den qPCR-Experimenten.

Bei Genistein erfolgt bei den beiden höchsten Konzentrationen (1000 µg/L und 5000 µg/L) aufgrund der geringen Löslichkeit der Substanz eine semistatische Exposition. Das bedeutet, dass die Becken nicht an das Durchflusssystem angeschlossen sind und das Wasser in den Becken regelmäßig ausgetauscht wird. Hierfür wird jeden zweiten Tag die Hälfte des Wassers (10 L) entnommen und durch frisches Wasser ersetzt, das entsprechend nachdosiert wird.

Für die Vorratslösungen der östrogenen Substanzen werden folgende Lösungsmittel verwendet:

EE2, EE2 und BPA: EtOH < 0,01%

Genistein: DMSO < 0,01% (außer bei 5000 µg/L, DMSO = 0,016%)

Kontrolle von Konzentrationen in Expositionsbecken

Die Konzentrationen der östrogenen Substanzen in den Becken werden jeden Tag kontrolliert. Die Überprüfung von E2 erfolgt dabei mit Hilfe des so genannten *Enzyme-Linked Receptor Assay* (ELRA) (Seifert *et al.* 1998). Der ELRA funktioniert ähnlich wie ein kompetitiver *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) und ist ein nicht-radioaktiver Rezeptor-Test, der auf dem humanen Östrogenrezeptor α basiert. Das Funktionsprinzip des ELRA ist in Abbildung 6 dargestellt und die Durchführung im darauf folgenden Abschnitt beschrieben.

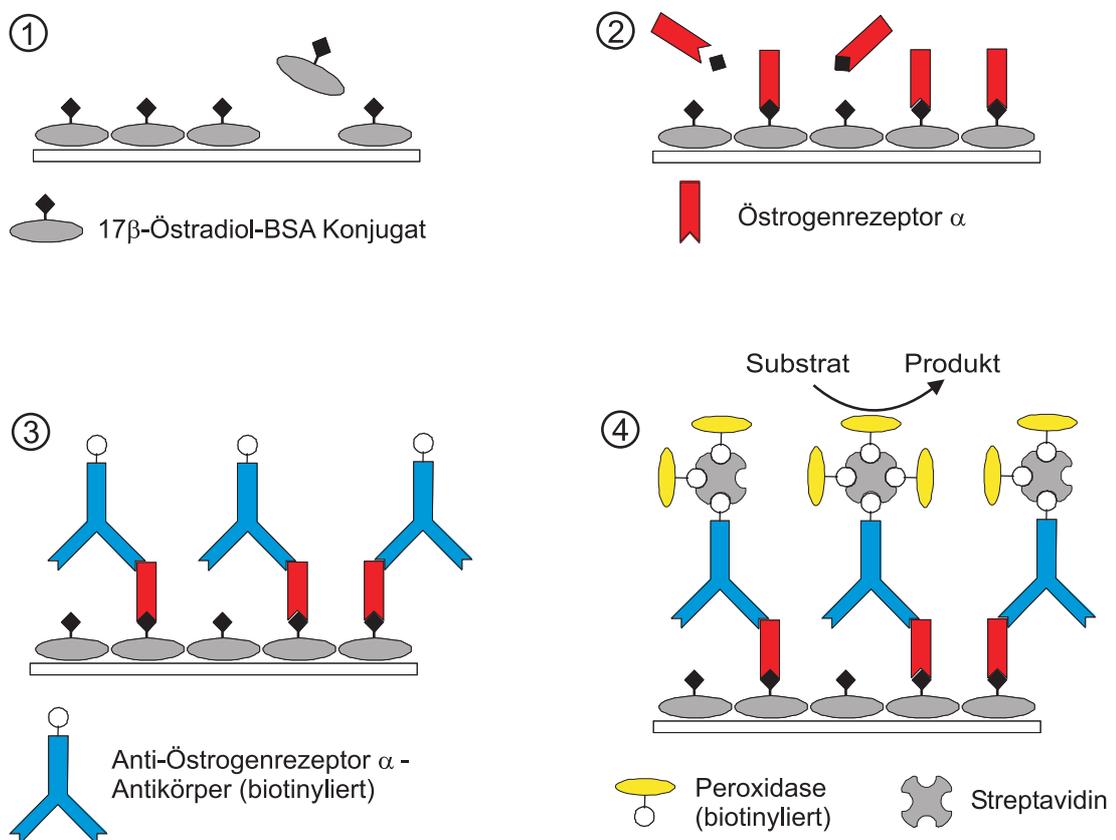


Abbildung 6: Funktionsprinzip des ELRA (nach Seifert *et al.* 1998)

Der ELRA wird mit einem chromogenen Substrat (TMB) durchgeführt und es erfolgen alle Reaktionen in Polystyrol-Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten. Dabei sind folgende Arbeitsschritte erforderlich:

① **Beschichtung** durch Zugabe von 150 μ L 17 β -Östradiol-BSA (Verdünnung 1:1500) in Carbonatpuffer und Inkubation über Nacht bei 4°C. Am nächsten Morgen erfolgt eine

Blockierungsreaktion durch Zugabe von 300 μL 5% BSA, 2,7% (Boehringer Mannheim) Blocking Reagent für 1 h bei RT.

② **Kompetitive Rezeptorreaktion** durch Zugabe von je 100 μL der 17β -Östradiol-Lösung (0,01-1000 $\mu\text{g/L}$) und der Östrogenrezeptor α -Lösung.

③ **Antikörperreaktion** durch Zugabe von 200 μL des biotinylierten anti-human-ER-Antikörpers (DAKO) (Verdünnung 1:500 in PBS) und Inkubation für 30 min bei RT.

④ **Streptavidin-POD-Biotin Verstärker-System** durch Zugabe von 200 μL des Streptavidin-POD-Biotin-Komplexes (Verdünnung Streptavidin 1:100000 und POD-Biotin 1:400000 in PBS), Vorinkubation für 30 min und anschließende Inkubation für 1 h bei RT.

Die Substratreaktion setzt durch Zugabe von 200 μL Substrat (30 mL Substratpuffer + 500 μL TMB-Stammlösung + 100 μL H_2O_2) ein und wird nach 20 min durch Zugabe von 50 μL 2N H_2SO_4 gestoppt. Im Anschluss wird im Mikrotiterplattenphotometer die Absorption bei 450nm (Referenzfilter 620nm) gemessen.

Zwischen den einzelnen Schritten wird je dreimal mit 350 μL Waschpuffer mit Hilfe eines Mikrotiterplattenwaschgerätes gewaschen.

Die Nachweisgrenze des ELRA liegt bei 70 bis 500 ng/L E2. Infolgedessen werden die Becken mit den Konzentrationen 100, 200, 300, 400 und 500 ng/L E2 im ELRA überprüft. Die Konzentrationen der anderen Substanzen werden mittels GC/MS (Kopplung eines Gas-Chromatographiegerätes (GC) mit einem Massenspektrometer (MS)) von der Firma CEFAS in Weymouth, Großbritannien gemessen.

2.2.3 Probennahme und –aufarbeitung

Die Zebra-bärblinge werden morgens vor der Fütterung mit einem Netz aus den Aquarien entnommen. Im Anschluss werden sie gemäß der Richtlinien des Tierschutzgesetzes betäubt und der Kopf wird abgetrennt. Unmittelbar danach werden die Zebra-bärblinge mit einer Schere vom After ausgehend am Bauch nach vorne aufgeschnitten und die dunklen Lebergewebe vorsichtig aus den Bauchhöhlen seziiert. Jedes Lebergewebe wird in ein Biopur Safe-Lock Reaktionsgefäß überführt und durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff schockgefroren, da eine Extraktion der RNA aus allen Geweben nicht am selben Tag möglich ist. Somit wird einem Abbau von RNA in den Leberzellen

durch RNasen vorgebeugt und eine gleiche Behandlung aller Proben gewährleistet. Schließlich werden die Lebergewebe bei -70°C gelagert.

Bei der Entnahme der Lebergewebe können männliche und weibliche Zebraabärblinge deutlich differenziert werden. Dabei werden die Gonadengewebe der Fische untersucht. Bei Männchen ist das weiße Gonadengewebe schwach entwickelt und paarig, dorsal seitlich der Schwimmblase angeordnet. Bei Weibchen hingegen ist das Gonadengewebe wesentlich größer ausgebildet und nimmt einen großen Teil der Bauchhöhle im hinteren Bereich ein.

Nach der Probennahme wird die Aufarbeitung der Proben fortgesetzt. Diese erfolgt mit den Verfahren, die in den folgenden Abschnitten beschrieben sind. Abbildung 7 zeigt die Arbeitsschritte der Probenaufarbeitung im Überblick.

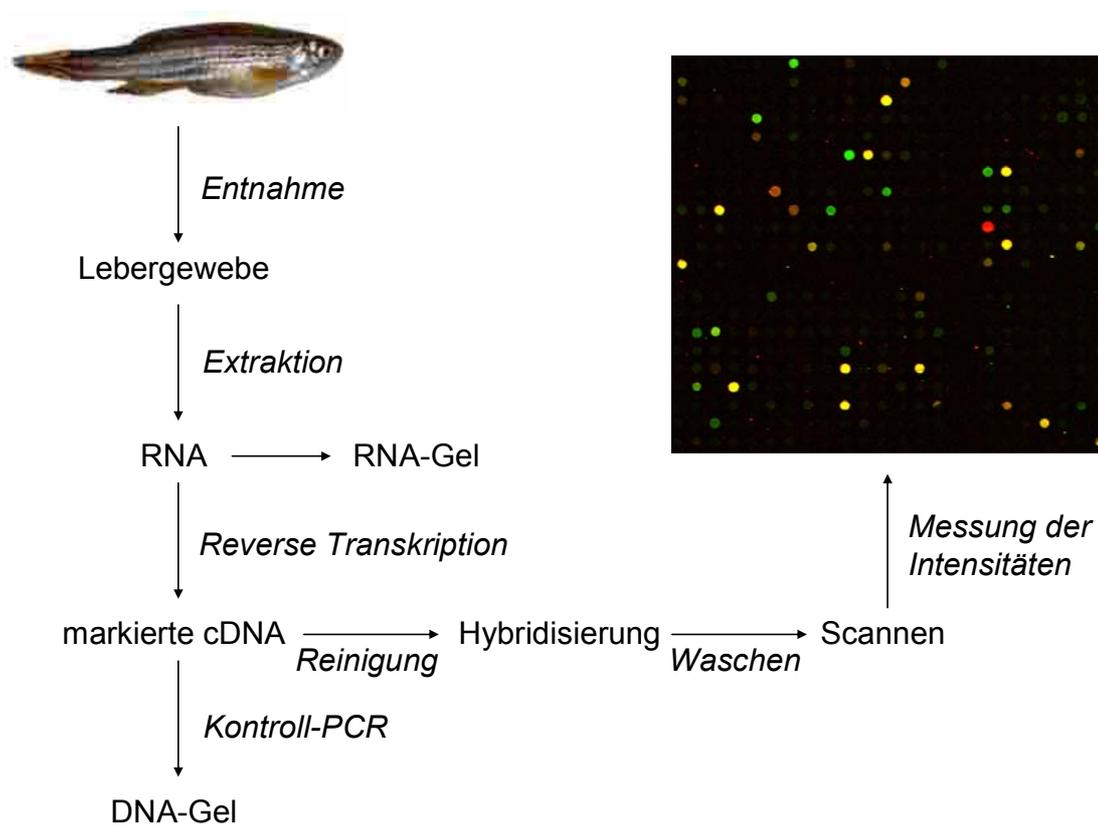


Abbildung 7: Arbeitsschritte der Probenaufarbeitung

2.2.3.1 RNA-Extraktion

Die RNA aus dem Lebergewebe wird mit dem TRI REAGENT™ RNA-Isolationssystem nach Anleitung extrahiert. Die Homogenisierung des Gewebes erfolgt dabei mit Hilfe von Glasperlen in der Schwingmühle. Das Extraktionsverfahren beruht auf einer Phenolisierung, bei der es zu einer Phasentrennung kommt. Es bildet sich eine untere organische Phase (enthält Proteine), eine Interphase (enthält DNA) sowie eine obere wässrige Phase (enthält RNA). Als Optimierung zum Protokoll wird dieser Trennungsschritt wiederholt, um eine möglichst reine RNA zu erhalten. Die wässrige Phase wird dabei mit Hilfe des Phase Lock Gels von Eppendorf separiert. Dieses bildet mit der Interphase eine feste, undurchlässige Schicht und die obere, wässrige Phase wird durch Abgießen getrennt. Die gelöste RNA wird anschließend unter Vakuum in der SpeedVac zentrifugiert, um sicherzustellen, dass alle Lösungsmittel beseitigt sind. Der Rückstand wird im Anschluss in 65°C warmen DEPC-H₂O_{dd} gelöst. Die Konzentration und Reinheit der Lösung wird photometrisch bestimmt. Die Konzentration wird durch Messung der Absorption (Ab) bei 260 nm und die Reinheit durch Messung der Ratio Ab₂₆₀/Ab₂₈₀ ermittelt. Liegt das Ab₂₆₀/Ab₂₈₀-Verhältnis der RNA-Lösung in einem Bereich zwischen 1,9 und 2,1, wird jeder Probe 0,5 µL RNase-Inhibitor zugegeben. Im Anschluss werden die Proben elektrophoretisch aufgetrennt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -70°C gelagert.

2.2.3.2 Gelelektrophorese

„Die (Gel-)Elektrophorese ist ein biochemisches Trennverfahren, bei dem die Wanderung von geladenen Molekülen in einem elektrischen Feld zu deren Trennung ausgenutzt wird“ (Ibelgaufts 1993). Die aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückrats negativ geladenen DNA- oder RNA-Moleküle wandern daher zur Anode, und zwar umso langsamer, je größer sie sind. Je nach Art der Nukleinsäure wurde folgendes Gel verwendet:

a) DNA-Agarose-Gel (1%):

In 40 mL H₂O_{dd} werden 0,5 g Agarose gelöst und 10 mL TBE-Puffer (5x) zugegeben. Der Ansatz wird in der Mikrowelle aufgeköcht und man lässt ihn abkühlen. Dann gibt man 3 µL Ethidiumbromid-Lösung zu und gießt das Gel im Kühlschrank.

b) RNA-Agarose-Gel (1%):

In 43,5 mL DEPC-H₂O_{dd} werden 0,5 g Agarose gelöst und 5 mL MOPS-Puffer (10x) zugegeben. Der Ansatz wird in der Mikrowelle aufgekocht, und man lässt ihn abkühlen. Dann gibt man 3 µL Ethidiumbromid-Lösung sowie 1,5 mL Formalin zu und gießt das Gel im Kühlschrank.

Das Ethidiumbromid dient zur Detektion der Nukleinsäuren. Es interkaliert zwischen zwei benachbarten Basenpaaren (Knippers 2001) und fluoresziert unter Anregung mit UV-Licht (366 nm). Das Gel wird in die Elektrophoresekammer gesetzt und ein Laufpuffer (TBE-Puffer (1x) für DNA- und MOPS-Puffer (1x) für RNA-Gele) zugegeben. Dann werden die zu trennenden Proben mit Probenpuffer (Endkonzentration 1x) in die Taschen des Gels pipettiert. Neben den Proben wird bei der DNA-Gelelektrophorese ein DNA-Längenmarker zur Größenbestimmung der Fragmente aufgetragen. Im Anschluss wird eine Spannung von 120 V bis zur Auftrennung der Proben angelegt und dann das Gel unter UV-Licht fotografiert.

2.2.3.3 Reinigung und Konzentration der RNA

Die in DEPC-H₂O_{dd} gelöste RNA liegt bei den Proben aufgrund verschiedener Mengen extrahierten Gewebes in unterschiedlichen Konzentrationen vor. Bei der Reversen Transkription für die Microarray-Experimente ist der Einsatz von 45 µg RNA, die in einem Volumen von 12 µL gelöst sind, erforderlich. Daher erfolgt eine Reinigung und Konzentration der RNA nach Protokoll mit dem „RNeasy MinElute Cleanup“-Kit von Qiagen. Der Kit basiert auf einem Säulchen-System, bei dem die RNA selektiv an einer Membran bindet und von dieser nach Reinigung in einem definierten Volumen eluiert wird.

2.2.3.4 cDNA-Synthese (Reverse Transkription)

Mit Hilfe der Reversen Transkription wird die mRNA (Boten-RNA, vom englischen *messenger-RNA*) in die stabilere komplementäre cDNA (*complementary DNA*) umgeschrieben. Die mRNA ist eine direkte RNA-Kopie eines zu einem Gen gehörigen Teilabschnitts der DNA, die während des Vorgangs der Transkription durch das Enzym RNA-Polymerase im Nukleus hergestellt und anschließend in das Zytoplasma transportiert wird. Bei der Bildung der mRNA erfolgt eine Polyadenylierung, eine Anknüpfung einer Kette von 100 bis 250 Adenin-Nukleotiden an das 3'-Ende der mRNA. Diese Ket-

te wird auch als Poly-A⁺-Schwanz der mRNA bezeichnet. Der Anteil von mRNA an der extrahierten Gesamt-RNA beträgt ca. 2%.

Bei der Reversen Transkription wird zunächst die Gesamt-RNA mit den Oligo-dT-Primern auf ca. 70°C erhitzt, um die Sekundärstrukturen der RNA aufzuschmelzen. Nach Abkühlen des Ansatzes auf Raumtemperatur hybridisieren die Oligo-dT-Primer selektiv an die Poly-A⁺-Schwänze der mRNA. Dann gibt man Puffer, Nukleotide, RNase-Inhibitoren und Reverse Transkriptase zu, inkubiert, und die cDNA wird synthetisiert. Nachfolgend sind zwei Methoden für die cDNA-Synthese aufgeführt: die Reverse Transkription zur Synthese von cDNA für die Verwendung in quantitativer PCR sowie die Reverse Transkription zur Synthese Fluoreszenz-markierter cDNA für die Verwendung in Microarray-Experimenten.

2.2.3.4.1 Reverse Transkription für qPCR

Die Reverse Transkription zur Synthese von cDNA für die Verwendung in qPCR-Experimenten erfolgt nach Protokoll mit dem „1st Strand cDNA Synthesis (AMV)“-Kit von Roche. Dabei wird von jeder Probe 2 µg Gesamt-RNA umgeschrieben. Die Inkubation der AMV Reversen Transkriptase erfolgt bei 42°C für 1 h. Die synthetisierte cDNA wird bis zur Verwendung in der qPCR bei -20°C gelagert.

2.2.3.4.2 Reverse Transkription für Microarray-Experimente

Die Reverse Transkription zur Synthese Fluoreszenz-markierter cDNA für die Verwendung in Microarray-Experimenten erfolgt nach Protokoll mit dem „CyScribe First-Strand cDNA Labelling“-Kit von Amersham Biosciences. Dabei werden von jeder Probe 45 µg Gesamt-RNA umgeschrieben. Diese wurden zuvor wie in Abschnitt 2.2.3.3 beschrieben konzentriert und liegen gelöst in einem Volumen von 12 µL vor. Die Markierung der cDNA erfolgt mit Fluoreszenz-markierten Cy3-dCTPs oder Cy5-dCTPs. In Abbildung 8 sind die Strukturformeln von Cy3-dCTP und Cy5-dCTP angegeben.

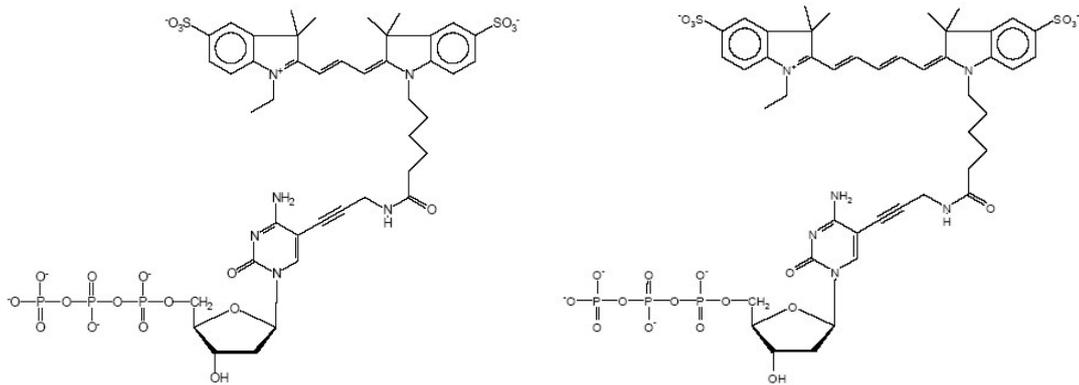


Abbildung 8: Strukturformeln von Cy3-dCTP (links) und Cy5-dCTP (rechts)

Jeweils die Hälfte der Proben von exponierten Tieren und Kontrolltieren werden verschieden farbig markiert (*color-flip*), da durch die verschiedene Struktur von Cy3- und Cy5-dCTP ein unterschiedlich guter Einbau in die cDNA erfolgt.

Der Reversen Transkription schließt sich eine Reinigung der cDNA mit einem dem Kit beiliegenden Säulchen-System an. Dabei bindet die cDNA selektiv an einer Membran, und nicht eingebaute Komponenten werden entfernt. Nach zwei Elutionsschritten mit je 60 μL Puffer liegt die cDNA gelöst in einem Volumen von ca. 120 μL vor. Nach dem ersten Elutionsschritt wird jeder Probe 1 μL für die Verwendung in einer PCR entnommen, die zur Kontrolle der Reversen Transkription dient. Die Fluoreszenz-markierte cDNA ist vor Licht zu schützen und wird bis zum Einsatz bei den Hybridisierungsexperimenten bei -20°C gelagert.

2.2.3.5 Polymerase-Kettenreaktion

Die in der Reversen Transkription gebildete cDNA weist zu geringe Mengen auf, um sie mittels eines Gels überprüfen zu können. Aus diesem Grund wird ein geringer Teil der cDNA-Probe in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingesetzt. Bei der PCR wird eine definierte Sequenz der cDNA enzymatisch amplifiziert.

Zur Durchführung einer PCR werden eine thermostabile DNA-Polymerase, geringe Mengen von Ausgangs-DNA (*template*), zwei spezifisch bindende Oligonukleotidprimer, Puffer und Nukleotide benötigt. Das PCR-Programm besteht aus mehreren Zyklen. Ein Zyklus umfasst einen Denaturierungs-, Annealing- und Elongationsschritt. Die Denaturierung der DNA erfolgt bei ca. 94°C . Dabei trennt sich der Doppelstrang der Ausgangs-DNA auf. Anschließend wird die Temperatur gesenkt, wodurch es zur Hybridi-

sierung der im Überschuss vorhandenen Primer an die nun einzelsträngige Ausgangs-DNA kommt. Danach wird die Temperatur auf das Temperaturoptimum der DNA-Polymerase erhöht, wobei jeder Primer verlängert wird, bis wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt. Da die Komplementierung an beiden Strängen der Ausgangs-DNA abläuft, wird in einem Zyklus die Zahl der Ausgangs-DNAs verdoppelt. Nach mehreren Zyklen wird das Programm mit einer finalen Elongation beendet (Saiki *et al.* 1988).

2.2.3.5.1 PCR als Kontrollsystem

Die PCR wird zur Überprüfung der Reversen Transkription angewendet. Jede Fluoreszenz-markierte cDNA-Probe wird mit einem Primerpaar für *β -actin*, *efla* oder *vtgl* amplifiziert. Im Anschluss werden die PCR-Produkte auf ein DNA-Gel aufgetragen und die Banden einer Probe bzw. einem Gewebe zugeordnet. Ist eine scharfe, einzelne Bande sichtbar, wird die Probe für Hybridisierungsexperimente verwendet. Nachfolgend ist die Durchführung der PCR beschrieben:

Für jede Probe wird folgender Master-Mix hergestellt und dann in ein PCR-Reaktionsgefäß überführt:

35,0 μ L	H ₂ O _{dd}
5,0 μ L	PCR-Puffer
2,5 μ L	dNTP-Mix
2,5 μ L	MgCl ₂
0,5 μ L	Primer forward
0,5 μ L	Primer revers
2,0 μ L	DMSO
1,0 μ L	Ausgangs-DNA (cDNA)

Die PCR-Reaktionsgefäße werden in den Thermocycler gestellt und das Programm gestartet. Erst bei Erreichen der Temperatur von 92°C werden die Deckel geöffnet und je 1 μ L DNA-Polymerase in die Reaktionsgefäße pipettiert (sog. Hot-Start-PCR). Das Programm besteht aus 30 Zyklen, ein Zyklus wie folgt:

- a) 92°C 60 s
- b) 55°C 60 s

c) 72°C 90 s

Das Programm endet mit einer finalen Elongation bei 72°C für 10 min.

Die Lagerung der PCR-Produkte erfolgt bei -20°C.

2.2.3.5.2 Quantitative PCR

Als quantitative PCR (qPCR) wird die so genannte „*Real Time quantitative PCR*“ (RT-PCR) verwendet. Diese beruht auf dem Prinzip der konventionellen PCR und bietet zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung. Die Quantifizierung erfolgt mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen während der PCR-Zyklen (daher der Name „*Real Time*“). Bei der RT-PCR nimmt die Fluoreszenz proportional mit der Menge der gebildeten PCR-Produkte zu, was eine Quantifizierung ermöglicht. Eine gelelektrophoretische Auftrennung der Fragmente ist daher nicht nötig, die Daten sind sofort verfügbar und das Kontaminationsrisiko ist minimiert.

Als Fluoreszenz-Farbstoff wird SYBR[®] Green I von Roche verwendet, welches sich in die so genannte „*minor groove*“ (kleine Furche) der doppelsträngige DNA einlagert. SYBR[®] Green I verfügt in gelöster Form über eine schwache Fluoreszenz, die jedoch in gebundener Form stark erhöht ist. Der DNA-Farbstoff-Komplex absorbiert blaues Licht bei $\lambda_{\max} = 498$ nm und emittiert grünes Licht bei $\lambda_{\max} = 522$ nm.

Als Reaktionsgefäße dienen Glaskapillaren mit einem Volumen von 20 μ L. Die PCR-Reaktion und Messung der Fluoreszenz erfolgt mit dem LightCycler[®] von Roche. Nachfolgend ist die Durchführung der qPCR beschrieben. Die Probenvorbereitung findet dabei unter der Sterilbank statt.

Die aus der Reversen Transkription für qPCR erhaltene cDNA wird in DEPC-H₂O_{dd} 1:20 verdünnt. Dann wird ein Master-Mix nach Protokoll mit dem „LightCycler[®] Fast-Start DNA Master^{PLUS} SYBR Green I“-Kit von Roche hergestellt, der die Primer in einer Konzentration von 0,5 μ M enthält. Im Anschluss werden 16 μ L vom Master-Mix und 4 μ L von der verdünnten cDNA-Probe in eine Glaskapillare pipettiert. Die Glaskapillaren werden dann in den LightCycler[®] gesetzt und es wird mit der Messung der Proben begonnen. Von jeder Expositionskonzentration werden vier bis neun verschiedene Proben zwei Mal gemessen. Zudem werden bei jedem qPCR-Lauf eine Kalibratorprobe und eine Negativkontrolle mitgeführt. Verschiedene PCR-Läufe werden durch Verwendung des Kalibrators miteinander vergleichbar. Das LightCycler[®]-Programm beginnt

mit einer Inkubation bei 95°C für 10 min, der 40 Zyklen folgen. Bei der Messung von *vtg1* und *efl α* besteht ein Zyklus aus folgenden Inkubationsschritten:

- a) 95°C 0 s
- b) 56°C 5 s
- c) 72°C 9 s

Bei der Messung von *vtg1* und *β -actin1* umfasst ein Zyklus folgende Schritte:

- a) 95°C 0 s
- b) 56°C 5 s
- c) 72°C 10 s

Durch Messung der Emission des integrierten SYBR[®] Green I nach jedem Zyklus wird für jede Probe eine zyklusabhängige Kurve erstellt. Aus dieser werden die so genannten *Crossing Points* (CPs) mit Hilfe der LightCycler[®]-Software 3.5 (Roche) nach der „Second Derivative Maximum Methode“ ermittelt. Ein CP beschreibt die Zyklenzahl, bei der das Fluoreszenzsignal eines PCR-Produktes das Hintergrundsignal übersteigt und exponentiell zunimmt. Das bedeutet, je mehr cDNA des Zielgens in der Probe ist, desto kleiner ist der CP.

Nach Durchführung der qPCR wird eine Schmelzkurve der Amplifikate zur Bestimmung der Schmelztemperatur und Identifikation der PCR-Produkte erstellt. Hierfür werden die PCR-Produkte bei 95°C denaturiert und für 2 min auf 60°C abgekühlt. Die komplementären DNA-Stränge hybridisieren wieder und die cDNA liegt doppelsträngig vor. Während einer schrittweisen Erhöhung der Temperatur um 0,1°C/s bis auf 95°C schmilzt die doppelsträngige DNA auf und die Abnahme der Fluoreszenz wird mit Hilfe der LightCycler[®]-Software 3.5 gemessen.

Für die Quantifizierung der Genexpressionsstärken wird eine Kalibrator-normalisierte relative Quantifizierung mit Effizienzkorrektur durchgeführt. Als Kalibrator dient eine cDNA-Mischprobe von vier nicht exponierten weiblichen Zebrabärblingen. Diese wird für die Normalisierung der verschiedenen qPCR-Läufe verwendet. Die relative Quantifizierung der Genexpressionsstärke einer Probe erfolgt über die Berechnung des Verhältnisses vom CP des Zielgens *vtg1* zum CP eines Referenzgens (*Housekeeping*-Gens). Als Referenzgen wird dabei *efl α* oder *β -actin1* verwendet. Die Effizienzen der qPCRs werden für die Primerkombinationen *vtg1/efl α* und *vtg1/ β -actin1* mit Hilfe von Kalibra-

tionsreihen ermittelt. Für die Kalibrationsreihen werden verschiedene Verdünnungen (unverdünnt, 1:10, 1:100, 1:1.000 und 1:10.000) des cDNA-Kalibrators verwendet. Aus den Abständen der CPs bei den gemessenen Verdünnungen wird eine Standardkurve erstellt und über deren Steigung die Effizienz der qPCR berechnet:

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

Die Datenauswertung der CPs erfolgt nach der Methode von Pfaffl *et al.* (2002), die auf der „delta-delta CP“ ($\Delta\Delta\text{CP}$)-Methode basiert. Die $\Delta\Delta\text{CP}$ -Methode unterstellt der Amplifikation von Ziel- und Referenzgen eine einheitliche Effizienz:

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

Der $\Delta\Delta\text{CP}$ -Wert betrachtet den Einfluss auf die unterschiedliche Expression, der durch die Exposition mit einer Substanz bedingt ist:

$$\Delta\Delta\text{CP-Wert} = \Delta\text{CP-Wert (exponierte Probe)} - \Delta\text{CP-Wert (Kontroll-Probe)}$$

Der Vergleich der unterschiedlichen Expressionswerte von exponierter und Kontroll-Gruppe erfolgt durch Berechnung der Ratio:

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

Dabei wird bei der $\Delta\Delta\text{CP}$ -Methode für die Amplifikation von Ziel- und Referenzgen eine identische Effizienz von 2 angenommen. Die von Pfaffl *et al.* (2002) optimierte Gleichung berücksichtigt bei der Berechnung der Ratio die tatsächliche Effizienz der Reaktion:

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

wobei E = Effizienz, Referenzgen = *Housekeeping* Gen und Zielgen = *vgl.*

Zur statistischen Auswertung wird eine einfaktorische Varianzanalyse (*one-way ANOVA*) zwischen den verschiedenen Expositionsbedingungen/-gruppen durchgeführt. Dieser folgt eine Signifikanzauswertung mit dem Tukey HSD (*Honestly Significant Difference*) Test. Dieser *post hoc test* (Mehrfachvergleichstest) berechnet die Mittelwertsdifferenzen, die erreicht werden müssen, damit sich die Mittelwerte statistisch signifikant unterscheiden. Der Vergleich der berechneten HSD-Werte mit den Mittelwertsdifferenzen zwischen den Expositionsbedingungen/-gruppen erlaubt eine Aussage über signifikante Unterschiede in der Genexpression.

Als Zielgen wird bei allen drei zu untersuchenden Substanzen das Markergen *vtg1* verwendet. Bei Bisphenol A (BPA) und Genistein wird *β -actin* als Referenzgen benutzt. Bei E2 dient *ef1a* als Referenzgen, da die Expression von *β -actin* durch E2 beeinflusst wird.

2.2.3.6 Einschritt-Reverse Transkription/PCR

Bei der Einschritt-Reverse Transkription/PCR (*One-step RT/PCR*) findet die cDNA-Synthese und unmittelbar anschließende PCR-Reaktion in einem Reaktionsgefäß statt. Sie dient vorwiegend zur Überprüfung der Qualität von RNA-Proben und Primern. Alle RNA-Proben, die bei qPCR- und Microarray-Experimenten eingesetzt werden, werden mit dieser Methode umgeschrieben und amplifiziert. Daneben wird die RT/PCR angewendet, um bei einzelnen Proben die Vitellogenin-Synthese semiquantitativ nachzuweisen. Die Durchführung erfolgt nach Protokoll des „cMaster™ RTplusPCR“-Kits von Eppendorf. Dabei werden von jeder Probe 2 μ g Gesamt-RNA und alle für die Reverse Transkription und PCR benötigten Komponenten in ein Reaktionsgefäß pipettiert, dieses in den Thermocycler gestellt und das Programm gestartet. Das Programm beginnt mit einer Inkubation bei 50°C für 50 min. Dieser schließt sich eine Inkubation bei 94°C für 2 min an, der 30 Zyklen folgen. Ein Zyklus umfasst dabei folgende Inkubationsschritte:

- a) 94°C 15 s
- b) 54°C 20 s
- c) 68°C 45 s

Im Anschluss werden die PCR-Produkte auf ein DNA-Gel aufgetragen und die Banden einer Probe bzw. einem Gewebe zugeordnet. Ist eine scharfe, einzelne Bande sichtbar, wird die Probe für qPCR- und Microarray-Experimente verwendet. Die Lagerung der PCR-Produkte erfolgt bei -20°C.

2.2.4 Fertigung von Microarrays

Zur Untersuchung der Genexpression bei verschiedenen Konzentrationen werden Microarrays mit einer Auswahl von Sonden hergestellt. Die Auswahl der Sonden erfolgt über die Experimente mit Gesamtgenomarrays (siehe Abschnitt 2.2.7.1).

Die Sonden sind 50 bp lang und am 5'-Ende mit einer $\text{NH}_2\text{-C}_6$ -Modifikation versehen. Als Träger-Substrat werden Glas-Slides mit Epoxy-Beschichtung verwendet. Bei der Immobilisierung der Sonden erfolgt eine irreversible, kovalente Bindung der NH_2 -Gruppen der Sonden mit den Epoxy-Gruppen des Träger-Substrates.

Die Sonden werden mit Hilfe eines Roboters, dem so genannten Arrayer, strukturiert auf die Slides aufgetragen (gespottet). Hierfür werden die Sonden in dem Spotting-Puffer mit einer Endkonzentration von $12,5 \mu\text{M}$ gelöst und in eine Mikrotiterplatte überführt. Die Mikrotiterplatte wird dann in der Vorrichtung des Arrayers fixiert und das Programm gestartet. Der Arrayer spottet die Sonden nach einem zuvor definierten Muster mit gleicher Intensität auf die Slides. Mittels des Spotting-Musters werden die *Gene IDs* erstellt, die Informationen über die Lokalisierung der Spots enthalten. Der Spotting-Vorgang erfolgt mit Hilfe des so genannten *Ring-/Pin-Head* (Ring-/Nadel-Kopf). Dieser besteht aus vier Ringen und Nadeln mit einem Durchmesser von $250 \mu\text{m}$ und ist in Abbildung 9 gezeigt.

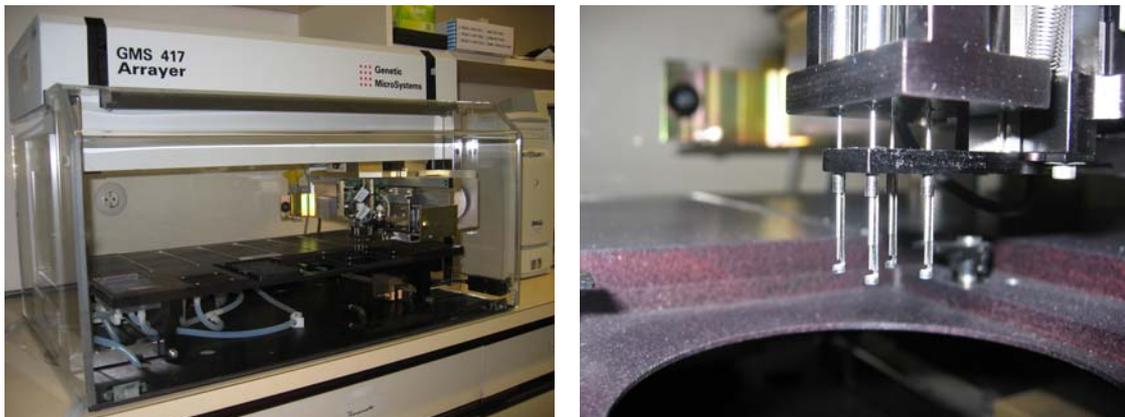


Abbildung 9: Arrayer zum Spotten von Microarrays (links) mit *Ring-/Pin-Head* aus vier Ringen und Nadeln (rechts)

Beim Spotting-Vorgang werden die Ringe zunächst durch Eintauchen in die Kavitäten der Mikrotiterplatte mit der Sondenlösung benetzt. Im Anschluss positioniert der Arrayer den *Ring-/Pin-Head* über einem Slide und die Sondenlösung wird auf diesen aufgetragen. Das Auftragen erfolgt durch die Nadeln, die durch den benetzten Ring nach unten gesteuert werden, dabei Sondenlösung aufnehmen und diese auf die Slideoberfläche durch Auftupfen abgeben. Nach jedem Spotting-Vorgang schließen sich je zwei Waschschriffe des *Ring-/Pin-Head* mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ sowie eine Trocknung durch Druck-

luft an. Nach Beendigung des Spottens werden die Slides aus dem Arrayer genommen und es erfolgt die Immobilisierung der Sonden nach Protokoll in einer Feuchtekammer.

Nach der Immobilisierung werden die Microarrays bis unmittelbar vor Durchführung der Hybridisierungsexperimente lichtgeschützt, trocken und bei Raumtemperatur gelagert.

Die *Subset-Arrays* weisen je nach zu untersuchenden Substanz eine unterschiedliche Anzahl an Sonden auf. Für E2-Proben sind 50 Sonden, für BPA-Proben 87 Sonden und für Genistein-Proben 96 Sonden immobilisiert.

Für die Auswertung der Microarrays ist die so genannten *Gene ID* erforderlich. Diese enthält Informationen über die Lokalisierung der Sonden auf dem Microarray und muss im Format einer ASCII-Datei vorliegen. Für jeden der drei Microarray-Typen wird die zugehörige *Gene ID* erstellt. Sie sind im Anhang B angefügt.

2.2.5 Hybridisierung

Bei der Hybridisierung kommt es aufgrund von Basenpaarung zur Zusammenlagerung der komplementären Einzelstrang-DNAs von Probe und Microarray. Nachfolgend sind die Hybridisierung für Gesamtgenom-Arrays und *Subset-Arrays* beschrieben.

2.2.5.1 Hybridisierung bei Gesamtgenom-Arrays

Die Hybridisierung der Fluoreszenz-markierten cDNA-Proben erfolgt bei den „Zebrafish 14k OciChipTM-Gesamtgenom-Arrays“ nach Protokoll des Herstellers. Zur Vermeidung von Verdunstung werden die Microarrays in Hybridisierungskammern platziert. Die Hybridisierungskammern werden lichtgeschützt in den Hybridisierungsöfen gestellt und es wird mit der Inkubation begonnen. Die Hybridisierungsdauer beträgt 18 h und die Hybridisierungstemperatur 42°C. In einem Hybridisierungsexperiment werden zwei unterschiedlich Fluoreszenz-markierte Proben aus einem exponierten Fisch sowie einem Kontrollfisch eingesetzt.

Insgesamt werden bei den Microarrayexperimenten für jede zu untersuchende Substanz jeweils zehn Proben von männlichen Zebrafärblingen verwendet, die folgenden Konzentrationen ausgesetzt wurden: 500 ng/L bei E2, 1000 µg/L bei BPA und 5000 µg/L bei Genistein. Zudem werden 30 Proben von männlichen Zebrafärblingen benutzt, die aus Kontrollbecken stammen.

2.2.5.2 Hybridisierung bei Subset-Arrays

Bevor die *Subset-Arrays* für Hybridisierungsexperimente eingesetzt werden können, müssen diese vorbereitet werden. Hierfür erfolgen fünf Waschschriffe sowie eine Blockierungsreaktion für 15 min bei 50°C nach Protokoll des Herstellers. Im Anschluss werden die Microarrays durch Zentrifugation im Zentrifugenröhrchen für 4 min bei 1500 rpm getrocknet.

Die Hybridisierung der Fluoreszenz-markierten cDNA-Proben erfolgt bei den *Subset-Arrays* nach Protokoll des Slide-Herstellers. Zudem werden so genannte *Gene Frames* verwendet, die den Einsatz eines relativ großen Volumens an Hybridisierungslösung ermöglichen. *Gene Frames* sind Kunststoffrähmchen, die um den bespotteten Bereich auf den Microarray aufgeklebt werden. Im Anschluss wird die Hybridisierungslösung innerhalb des begrenzten Bereichs auf den Microarray pipettiert und dieser unter Ausschluss von Luftbläschen mit einer Kunststofffolie abgedeckt. Vor dem Auftragen der Hybridisierungslösung auf den Microarray wird diese für 2 min auf 95°C erhitzt und dann sofort für 1 min auf Eis gestellt, um DNA-Doppelstränge zu denaturieren. Die fertigen Microarrays werden dann zur Vermeidung von Verdunstung in Hybridisierungskammern platziert. Die Hybridisierungskammern werden lichtgeschützt in den Hybridisierungsöfen gestellt und es wird mit der Inkubation begonnen. Die Hybridisierungsdauer beträgt 18 h und die Hybridisierungstemperatur 42°C. In einem Hybridisierungsexperiment werden zwei unterschiedlich Fluoreszenz-markierte Proben aus einem exponierten Fisch sowie einem Kontrollfisch eingesetzt.

Bei den Hybridisierungsexperimenten mit Subset-Arrays wurden cDNA-Proben von männlichen Zebraäbrblingen verwendet, die mit folgenden Konzentrationen von E2, BPA und Genistein exponiert wurden:

E2: Anzahl Proben, gesamt: 100

Anzahl Hybridisierungsexperimente: 50

Konzentration E2 [ng/L]	Anzahl Proben
0	50
5	10
50	10
100	10
200	10
500	10

BPA: Anzahl Proben, gesamt: 112

Anzahl Hybridisierungsexperimente: 56

Konzentration BPA [$\mu\text{g/L}$]	Anzahl Proben
0	56
0,1	8
2	8
20	8
200	8
400	8
1000	8
2000	8

Genistein: Anzahl Proben, gesamt: 96

Anzahl Hybridisierungsexperimente: 48

Konzentration Genistein [$\mu\text{g/L}$]	Anzahl Proben
0	48
1	8
10	8
100	8
500	8
1000	8
5000	8

2.2.6 Scannen

Als Vorbereitung zum Scannen wird der *Gene Frame* einschließlich Kunststoffolie vorsichtig entfernt und der Microarray gewaschen. Es erfolgen drei Waschschrte nach Protokoll des „Zebrafish 14k OciChipTM-Gesamtgenom-Arrays“ oder nach Anleitung des „Nexterion Slides E“. Dabei wird der Microarray bei jedem Waschschrte in ein neues Greinerröhrchen mit 50 mL Waschpuffer überführt, um den Übertrag von SDS zu vermeiden. Im Anschluss wird der Microarray durch Zentrifugation im Zentrifugenröhrchen für 4 min bei 1500 rpm getrocknet und dann bis zum Scannen lichtgeschützt aufbewahrt. Das Scannen des Microarrays erfolgt mit dem Arrayscanner in zwei Mes-

sungen bei den Wellenlängen 532 nm und 635 nm. Bei 532 nm (grüner Laser) wird die Fluoreszenz der hybridisierten Cy3-dCTPs und bei 635 nm (roter Laser) die der hybridisierten Cy5-dCTPs angeregt. Die Intensitäten des emittierten Lichts werden gemessen und als unterschiedliche Farbsignale in Bildern dargestellt. Die beiden Bilder werden als *Tagged Image File Format* (TIFF-Datei) gespeichert und schließlich für die Auswertung verwendet. Das Scannen der Microarrays sollte so bald wie möglich nach der Hybridisierung stattfinden, da die Fluoreszenz mit der Zeit nachlässt.

2.2.7 Auswertung

Die Bilddaten der gescannten Microarrays werden zunächst mit Hilfe der *Microarray Analysis Software ImaGene 5.0* ausgelesen. Hierbei werden von jedem gemessenen Microarray die zwei TIFF-Dateien, das so genannte *Grid* sowie die *Gene ID* in das Programm geladen. Das *Grid* (Raster) wird so ausgerichtet, dass jeder Spot exakt erfasst wird. Mittels der *Gene ID* erfolgt eine Zuordnung der erfassten Spots zu den entsprechenden Sonden. Die Software liest schließlich die Intensitäten und Hintergrundsignale der einzelnen Spots beider Bilddateien aus und speichert die Werte im Format von ASCII-Dateien. Für jeden Microarray werden folglich zwei Dateien generiert. Die eine Datei enthält für jeden Spot die Messergebnisse der Fluoreszenzsignale der Cy3-dCTPs, die andere Datei die der Cy5-dCTPs.

Bei der optischen Darstellung wird dem Fluoreszenzsignal der Cy3-dCTPs eine grüne Farbe und dem Fluoreszenzsignal der Cy5-dCTPs eine rote Farbe zugeordnet. Je höher die Intensität eines Signals ist, desto intensiver ist die Farbe des Spots. Hybridisieren von der Probe mehr Cy3-dCTPs an einer Sonde als Cy5-dCTPs, erscheint der Spot grün. Binden hingegen mehr Cy5-dCTPs an die Sonde, weist der Spot eine rote Farbe auf. Bei gleichen Mengen von Cy3- und Cy5-dCTPs in der Probe kommt es zu einer Überlagerung der Farben und der Spot ist gelb.

Die Methode der Datenauswertung hängt vor allem von der Anzahl der Sonden auf dem Microarray ab, da eine Normalisierung der Daten erforderlich ist. Bei den 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 und somit bei diesen keine Änderung der Signalintensität detektierbar ist. Bei den *Subset-Arrays*, bei denen vorwiegend Sonden gespottet

wurden, für die eine Regulation erwartet wird, ist daher eine Normalisierung über Signale von einzelnen Sonden erforderlich, die spezifisch an *Housekeeping* Gene binden.

2.2.7.1 Auswertung bei Gesamtgenom-Arrays

Die Gesamtgenom-Arrays tragen 14067 Oligonukleotid-Sonden, die spezifisch an Abschnitte der *ORFs* des Zebrafisches binden. Die *ORFs* sind entweder Abschnitte von Zebrafisch-Genen (*ETs*) oder Abschnitte von nicht entschlüsselten Bereichen (*TCs*). Der Anteil von *ETs* beträgt dabei 54 Prozent. Nur bei diesen liegen Informationen über Funktionen im Zebrafisch vor. Die *TCs* weisen hingegen hohe Übereinstimmungen zu *ORFs* aus anderen Organismen oder DNA-Klonen auf, für die zum Teil Funktionen bekannt sind.

Für jede der drei zu untersuchenden Substanzen wird ein Datensatz generiert. Ein Datensatz umfasst zehn kompetitive Hybridisierungen bei 14067 Sonden. Kompetitiv bedeutet, dass die unterschiedlich Fluoreszenz-markierten cDNA-Proben aus exponiertem Fisch und Kontrollfisch um die Bindungsstellen auf dem Array - die Sonden - konkurrieren. Folglich liegen in einem Datensatz für jede Sonde 20 Messergebnisse vor. Die Datenverarbeitung erfolgt dabei mit der Statistik-Programmiersprache *R* (Ihaka und Gentleman 1996; Gentleman *et al.* 2004). Zu jeder Sonde wird der Expressionswert als Differenz zwischen dem Hintergrundsignal und dem Intensitätssignal bestimmt:

$$\text{Expressionswert} = \text{Intensitätssignal} - \text{Hintergrundsignal}$$

Bei Sonden, 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 so genannte *NAs* (*not applicable*, nicht verwendbare) generiert. Für jeden Datensatz, der 20 Expressionswerte zu jeder Sonde umfasst, wird eine Statistik über die Anzahl der *NAs* pro Sonde erstellt. Bei mehr als vier *NAs* zu einer Sonde wird diese aus dem Datensatz entfernt. Bei weniger als vier oder gleich vier *NAs* werden die fehlenden Werte mit Hilfe des *transcan algorithm* (Little und Rubin 1987) kalkuliert.

Im Anschluss erfolgt die Normalisierung der Daten. Diese umfasst die so genannte *On-chip*- und *Inter-chip*-Normalisierung. Bei der *On-chip*-Normalisierung (Normalisierung auf dem Microarray) werden die Expressionswerte von Cy3 gegen die zugehörigen Expressionswerte von Cy5 nach einer nicht-linearen, grafisch gestützten Methode normalisiert (*scatterplot smoother loess* nach Cleveland 1979). Bei der *Inter-chip*-

Normalisierung (Normalisierung zwischen den Microarrays) erfolgt eine Skalierung aller Expressionswerte auf gleichen Mittelwert und gleiche Varianz nach linearer Methode.

Die Erfassung von Unterschieden in der Genexpression zwischen exponierten Tieren und Kontrolltieren erfolgt durch statistische Auswertung der normalisierten Daten. Dabei werden für jede Sonde zwei Werte berechnet: *mean fold change* sowie *p-value*. Der *mean fold change* beschreibt den tatsächlich gemessenen Unterschied zwischen den exponierten Tieren und Kontrolltieren als „n-fache Änderung des Mittelwertes“ der normalisierten Expressionswerte. Der *p-value* (p-Wert) wird durch einen statistischen Test (*Student's 1-sample t-test*) berechnet und gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der die gewonnenen Daten rein zufällig entstanden sein können. Durch die Kombination von *p-value* und *mean fold change* werden die Sonden selektiert, die durch die östrogenen Substanzen reguliert werden. Durch die gleichzeitige Beobachtung von mehr als 14000 Sonden ergibt sich eine deutlich erhöhte Wahrscheinlichkeit, dass infolge der großen Menge von statistischen Tests rein zufällig viele Tests die gewählte Signifikanzschwelle (*p-value*) überschreiten. Zur Bewältigung dieser Situation des multiplen Testens wird eine Permutationsberechnung durchgeführt. Diese erlaubt eine Abschätzung der Anzahl von falsch positiv berechneten Werten in der Kandidatenliste. Dabei werden für jeden Datensatz alle $\frac{1}{2} \times \binom{10}{5} = 126$ informativen Permutationen der Sonden einbezogen und die Anzahl der regulierten Sonden für verschiedene Grenzwerte berechnet. Im Anschluss wird die *False Discovery Rate (FDR)* abgeschätzt. Diese ist der Quotient aus der Anzahl von Sonden, die über die permutierten Daten selektiert wurden (n_{exp} ; *number of expected*) und der Anzahl von Sonden, die unter den beiden gesetzten Bedingungen eine Antwort zeigten (n_{obs} ; *number of observed*):

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

Von der *FDR* lässt sich schließlich die Spezifität eines Selektionsverfahrens ableiten:

$$\text{Spezifität} \approx (n_{obs} - n_{exp}) / n_{obs}$$

Für jede der drei zu untersuchenden Substanzen werden so Listen mit regulierten Sonden erstellt und die *FDRs* berechnet. Für die Selektion der regulierten Sonden wird schließlich diejenige Kombination von *p-value* und *mean fold change* gewählt, die bei allen drei Substanzen eine möglichst große Anzahl an regulierten Sonden bei hoher Sig-

nifikanz und niedriger *FDR* aufweist. Die grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgt mit Hilfe eines MA-Diagramms, das zugleich die Stärke der Regulation (Ratio) sowie die Signalintensitäten der Sonden veranschaulicht. Dabei wird M über A aufgetragen und es gilt:

$$A = \frac{1}{2} \log_2 (x_{\text{exponiert}} \times x_{\text{Kontrolle}})$$

$$M = \log_2 (x_{\text{exponiert}} / x_{\text{Kontrolle}})$$

wobei x = Mittelwert der normalisierten Expressionswerte über alle zehn Experimente.

Durch den Vergleich der regulierten *ETs* und *TCs* zwischen den Substanzen werden dann Markergene identifiziert, die durch alle drei Substanzen reguliert werden und somit zum Nachweis östrogenen Wirkungen verwendet werden können.

Im Anschluss erfolgt die Bewertung der Genexpressionsmuster durch funktionelle Analyse. Hierfür werden zunächst alle *ORFs*, die auf dem Gesamtgenom-Array repräsentiert sind, so genannten *Gene Ontologies (GOs)* zugeordnet. Unter *GOs* versteht man Vokabularien, die die Eigenschaften von Genen beschreiben. Zusätzlich werden Relationen zwischen den Begriffen der *GOs* hergestellt und Vernetzungen zwischen Genen und Genprodukten sowie zu kooperierenden Datenbanken geschaffen.

Das *Gene Ontology Consortium*⁴ entwickelt hierzu kontinuierlich drei sich untergliedernde Standard *GOs*, die die Gene hinsichtlich ihrer biologischen Prozesse (*Biological Processes*), zellulären Komponenten (*Cellular Components*) und molekularen Funktionen (*Molecular Functions*) charakterisieren.

Bei der Zuordnung der *ORFs* werden die *GOs* berücksichtigt, die biologische Prozesse beschreiben. Dabei werden die Annotationen für Genprodukte und Proteine des Zebrafisch (*Danio rerio*) verwendet, die vom *Zebrafish Information Network (ZFIN)*⁵ bereit gestellt werden.

Zudem wird bei der Zuordnung die Struktur der *GOs* einbezogen. Das bedeutet, dass für *ORFs*, die in einer Unterklasse eingruppiert sind, die übergeordneten Klassen mit in den Datensatz aufgenommen werden. Ein *ORF* kann folglich in mehreren *GOs* vertreten sein. Ebenso können den *GOs* verschiedene *ORFs* zugeordnet sein. Nach der Einteilung aller auf dem Gesamtgenom-Array repräsentierten *ORFs* in *GOs* erfolgt eine entspre-

⁴ Homepage des *Gene Ontology Project*: <http://www.geneontology.org/>

⁵ Homepage des *ZFIN*: <http://zfin.org/>

chende Zuordnung der durch die drei Substanzen regulierten *ORFs*. Dann werden für jede Substanz die *GOs* ermittelt, die im Vergleich zum Gesamtgenom-Array ein erhöhtes Vorkommen aufweisen. Dabei wird mit Hilfe der hypergeometrischen Verteilung, die als Nullmodell dient, für jede Funktion (*GO*) die Fehlerwahrscheinlichkeit der Anreicherung (*p-value*) statistisch abgeschätzt. *GOs* mit einem *p-value* kleiner als 0,05 werden als angereichert eingestuft. Das bedeutet, dass die einzelne Funktion mit 95%iger Wahrscheinlichkeit angereichert ist. Dann werden die Ergebnisse mit Hilfe der Bonferroni-Methode (multiples Testen) korrigiert. Die Bonferroni-Methode beruht auf dem Prinzip, bei jeder einzelnen Funktion die Signifikanz so hoch zu wählen, dass man insgesamt wieder 95% erreicht. Hierfür werden die einzelnen *p-values* unter Berücksichtigung der Gesamtzahl der angereicherten Funktionen korrigiert:

$$p\text{-value}_{\text{Bonferroni}} = p\text{-value} \times k$$

wobei $p\text{-value}_{\text{Bonferroni}}$ = nach Bonferroni-Methode korrigierter *p-value*, k = Anzahl von angereicherten *GOs*.

Da bei einzelnen *ORFs* die Zuordnung zu *GOs* wegen der Berücksichtigung der Struktur der *GOs* mit einer relativ hohen Fehlerwahrscheinlichkeit behaftet ist, werden bei der Bonferroni-Korrektur nur die angereicherten *GOs* berücksichtigt, die mindestens fünf regulierte Gene enthalten. Nach Durchführung der Bonferroni-Methode gilt eine Funktion als signifikant angereichert, wenn sie einen $p\text{-value}_{\text{Bonferroni}}$ von kleiner als 0,1 aufweist.

2.2.7.2 Auswertung bei Subset-Arrays

Die *Subset-Arrays* tragen je nach zu untersuchender Substanz 50 (E2), 87 (BPA) oder 96 (Genistein) Sonden. Bei jedem dieser Microarray-Typen dienen zehn Sonden zur Normalisierung der Daten. Diese binden spezifisch an *Housekeeping* Gene des Zebrafischs, für die keine Änderung der Signalintensität zwischen exponiertem Tier und Kontrolltier zu erwarten ist.

Für jede Konzentrationsstufe jeder Chemikalie wird ein Datensatz generiert (fünf bei E2, sieben bei BPA und sechs bei Genistein). Bei BPA und Genistein umfasst jeder Datensatz acht kompetitive Hybridisierungen, bei E2 zehn kompetitive Hybridisierungen. Die Datenverarbeitung erfolgt dabei mit der Statistik-Programmiersprache *R* (Ihaka und Gentleman 1996; Gentleman *et al.* 2004). Wie bei den Gesamtgenom-Arrays wird zu

jeder Sonde der Expressionswert als Differenz zwischen Hintergrundsignal und Intensitätssignal bestimmt. Im Anschluss werden die Expressionswerte logarithmiert.

Die logarithmierten Expressionswerte werden zur Normalisierung der Daten verwendet. Diese umfasst die so genannte *On-chip*- und *Inter-chip*-Normalisierung. Die *On-chip*-Normalisierung basiert auf einer grafisch gestützten Methode, bei der zunächst die Expressionswerte als *Scatterplot* (Punktwolke) dargestellt werden (Cy3 gegen Cy5). Dann wird eine Ursprungsgerade an den *Housekeeping* Genen angelegt und die Expressionswerte werden an dieser linear normalisiert (ein-Parameter). Im Anschluss werden bei der *Inter-chip*-Normalisierung für jeden Microarray die Expressionswerte (Cy3 und Cy5) sowie die entsprechenden Mittelwerte über die anderen Microarrays (Cy3 und Cy5) als *Scatterplot* dargestellt. Dann wird eine Gerade an die aufgetragenen Werte der *Housekeeping* Gene angelegt und die Expressionswerte werden gegen diese linear normalisiert (zwei-Parameter).

Die normalisierten Daten werden schließlich für die statistische Auswertung verwendet. Dabei werden für jede Sonde zwei Werte berechnet: *mean fold change* sowie *p-value*. Der *mean fold change* beschreibt den tatsächlich gemessenen Unterschied zwischen den exponierten Tieren und Kontrolltieren als „n-fache Änderung des Mittelwertes“ der normalisierten Expressionswerte. Der *p-value* (p-Wert) wird durch einen statistischen Test, den so genannten *Welch-t-test* berechnet. Der *Welch-t-test* ist eine Anpassung des *t-tests* und ermöglicht Mittelwertvergleiche zwischen Messreihen bei verschiedener Varianz der Genexpression. Die Selektion der regulierten Sonden erfolgt zunächst unter Ignorieren des multiplen Testens. Dabei wird der *p-value* auf kleiner 0,05 gesetzt. Das bedeutet, dass die einzelne Sonde mit 95%iger Wahrscheinlichkeit signifikant reguliert wird. Dann werden die Ergebnisse mit Hilfe der Bonferroni-Methode korrigiert. Die Bonferroni-Methode beruht auf dem Prinzip, bei jedem Einzeltest die Signifikanz so hoch zu wählen, dass man insgesamt wieder 95% erreicht. Hierfür werden paarweise Vergleiche zwischen Gruppenmittelwerten mit *t-tests* ausgeführt und die Fehlerraten der einzelnen Tests unter Berücksichtigung der Anzahl der durchzuführenden Tests adjustiert:

$$\alpha_{\text{adj.}} = \alpha_{\text{gesamt}} / k$$

wobei $\alpha_{\text{adj.}}$ = adjustierte Fehlerrate des Einzeltests, α_{gesamt} = Gesamt-Fehlerrate, k = Anzahl der Paarvergleiche.

Die Abschätzung der Fehlerwahrscheinlichkeit erfolgte beim multiplen Testen (Bonferroni-Korrektur) über die *Family-Wise Error Rate (FWER)*. Sie ist definiert als die Wahrscheinlichkeit von mindestens einem falsch positiv berechneten Wert unter der Kandidatenliste:

$$FWER = P(V > 0)$$

wobei P = Wahrscheinlichkeit (*Probability*), V = Typ I Fehler (falsch positiver Wert).

Für jede zu untersuchende Substanz werden so Listen erstellt, die Auskunft über die Regulation der gespotteten Sonden bei den verschiedenen Konzentrationen geben. Zudem werden die Expressionswerte zwischen den verschiedenen östrogenen Substanzen verglichen. Schließlich erfolgt ein Vergleich der Ergebnisse von den *Subset-Arrays* mit denen der qPCR, der eine umfassende Bewertung der Microarray-Technologie erlaubt.

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden umfangreiche Ergebnisse zur Erfassung und Bewertung der Genexpression von Zebraabräblingen (*Danio rerio*) nach Belastung mit östrogenen Substanzen erzielt. Da die Ergebnisse auf einer Gesamtzahl von 534 Proben basieren, sind zu den Methoden der Exposition, Probennahme, Probenaufarbeitung und Hybridisierung die Ergebnisse einiger Proben exemplarisch dargestellt. Die Ergebnisse der quantitativen PCR sind im Abschnitt 3.3 beschrieben. Die Ergebnisse der Microarray-Experimente mit Gesamtgenom-Arrays sind detailliert im Abschnitt 3.4 und die *Subset-Arrays* im Abschnitt 3.5 zusammengefasst.

3.1 Exposition der Fische

Die Exposition der Fische mit den östrogenen Substanzen erfolgte im Durchflusssystem. Abbildung 10 zeigt ein Expositionsexperiment mit E2 für elf Tage. In jedem 20L-Expositionsbecken befanden sich zwölf männliche Zebraabräblinge.



Abbildung 10: Exposition der Fische im Durchflusssystem

Während der Expositionsexperimente wurden jeden Tag Wasserproben aus den Expositionsbecken entnommen und die Konzentrationen kontrolliert. Die Überprüfung von E2 erfolgte dabei mit Hilfe des ELRA (Seifert *et al.* 1998). Abbildung 11 zeigt die Messergebnisse des ELRA zu dem Becken mit der berechneten Konzentration von 500 ng/L E2 während der ersten sieben Tage der Exposition. Es ist deutlich zu erkennen, dass die gemessene Konzentration zu Beginn geringfügig niedriger ist als die berechnete Konzentration. Im weiteren Verlauf stellt sich jedoch die erforderliche Konzentration nahezu konstant ein.

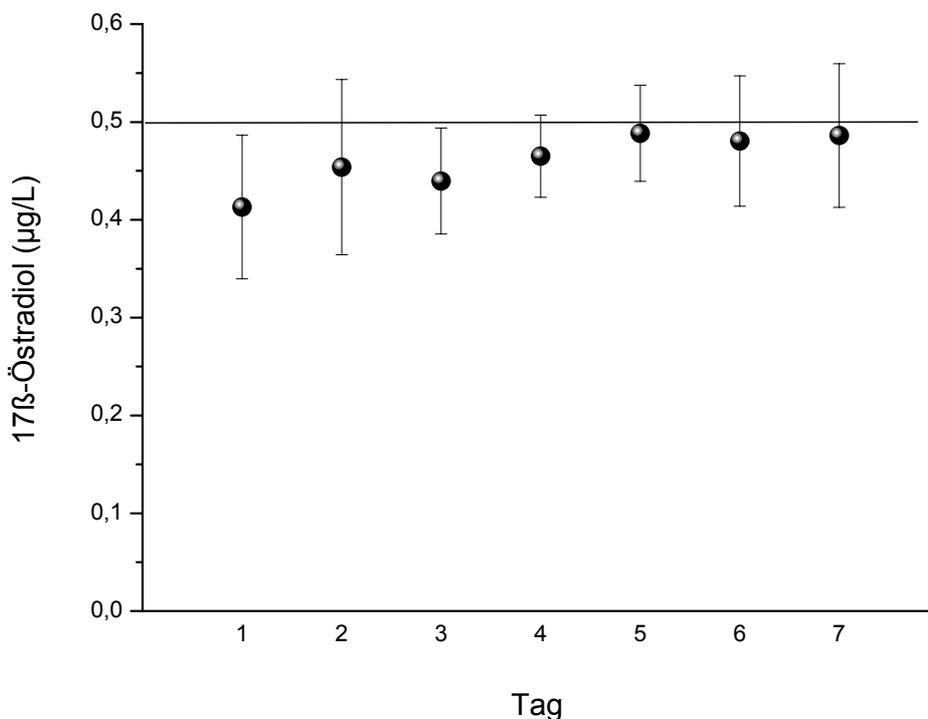


Abbildung 11: Gemessene E2-Konzentrationen im 500 ng/L-Expositionsbecken während der ersten sieben Tage der Exposition

Für den sechsten Tag der Exposition sind in Abbildung 12 zu den berechneten E2-Konzentrationen in den Expositionsbecken (100, 200, 300, 400 und 500 ng/L) die mit dem ELRA gemessenen Werte gezeigt. Die gemessenen Konzentrationen in den Becken weichen nur vernachlässigbar von den berechneten Konzentrationen ab.

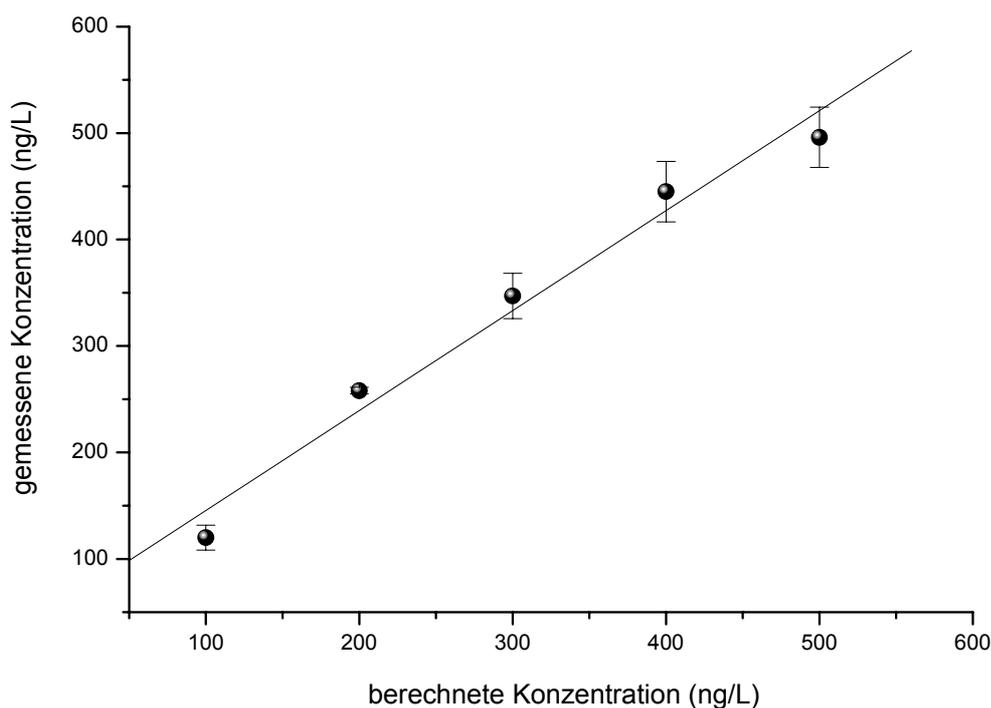


Abbildung 12: Berechnete und gemessene E2-Konzentrationen in Expositionsbecken am sechsten Tag der Exposition

Die exemplarischen Ergebnisse zeigen, dass die Exposition im Durchflusssystem sehr gut funktionierte. Durch die exakte Dosierung von Wasser und Chemikalien über Peristaltikpumpen waren die Expositionsbedingungen konstant und eine kontinuierliche Belastung der Fische mit östrogenen Substanzen war gewährleistet.

3.2 Probennahme und –aufarbeitung

Die Probennahme erwies sich im Wesentlichen als unproblematisch. Lediglich die Unterscheidung zwischen männlichen und weiblichen Zebraabärblingen aufgrund morphologischer Merkmale im bewegten Zustand sowie das Fangen der gewünschten Fische bereitete anfangs Schwierigkeiten und bedurfte etwas Übung. Abbildung 13 zeigt ein Zebraabärbling-Weibchen bei der Präparation. Das weiße Gonadengewebe im hinteren Bereich ist gut vom dunklen Lebergewebe unterscheidbar.

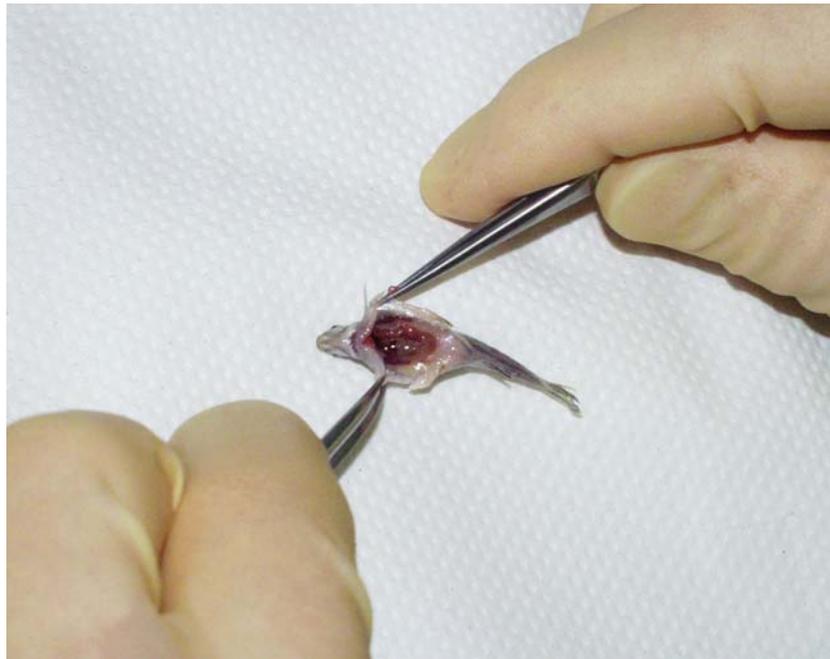


Abbildung 13: Präparation eines Zebraäbrbling-Weibchens

Bei Männchen ist das weiße Gonadengewebe nur schlecht sichtbar. Es ist schwach entwickelt und liegt paarig, dorsal seitlich der Schwimmblase. Die seziierten Lebergewebe der Männchen und Weibchen wogen je nach Größe des Tieres zwischen 40 und 100 mg.

3.2.1 RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion wurde mittels eines RNA-Gels überprüft. Abbildung 14 zeigt ein RNA-Gel, bei dem zwei verschiedene Proben in drei unterschiedlichen Konzentrationen aufgetragen wurden. Die Banden der 18S rRNA und 28S rRNA sind deutlich sichtbar und unterscheidbar.

Die Intensität der Banden gibt Aufschluss über die vorhandene RNA-Konzentration in der aufgetragenen Probe. Die Banden der Proben 1 und 4 sind relativ schwach erkennbar. Bei diesen wurden Proben mit einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/L}$ aufgetragen. Bei Proben 2 und 5 sind die Banden intensiver und die RNA-Konzentration der aufgetragenen Proben betrug 2 $\mu\text{g/L}$. Die Banden der Proben 3 und 6 sind am deutlichsten sichtbar. Bei diesen Proben war die RNA-Konzentration mit 3 $\mu\text{g/L}$ am größten.

Neben dem RNA-Gel wurde zur Überprüfung jeder Probe die Konzentration und Reinheit der gelösten RNA photometrisch bestimmt. Die Konzentrationsbestimmungen ergaben für die Proben der Lebergewebe der Männchen Werte von 0,3 bis 1,5 mg/mL.

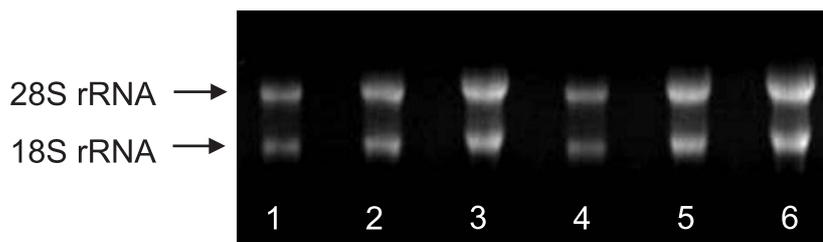


Abbildung 14: RNA-Agarose-Gel

- 1: RNA-Probe von Lebergewebe, Männchen, Kontrolltier, 1 µg/L
- 2: RNA-Probe von Lebergewebe, Männchen, Kontrolltier, 2 µg/L
- 3: RNA-Probe von Lebergewebe, Männchen, Kontrolltier, 3 µg/L
- 4: RNA-Probe von Lebergewebe, Männchen, exponiert mit 500 ng/L E2, 1 µg/L
- 5: RNA-Probe von Lebergewebe, Männchen, exponiert mit 500 ng/L E2, 2 µg/L
- 6: RNA-Probe von Lebergewebe, Männchen, exponiert mit 500 ng/L E2, 3 µg/L

Bei Weibchen lagen die Konzentrationen der RNA-Lösungen zwischen 1,3 und 2,5 mg/mL. Die höheren Konzentrationen bei den Weibchen waren durch die meist größeren Körper und Organe bedingt. Das Ab_{260}/Ab_{280} -Verhältnis der RNA-Lösungen lag zwischen 1,8 und 2,1. Die Lösungen wiesen somit eine ausreichend hohe Reinheit auf, dass mit der Reversen Transkription oder Einschnitt-Reversen Transkription/PCR fortgeföhren werden konnte.

3.2.2 Reverse Transkription

Die Arbeiten umfassten zwei unterschiedliche Methoden der Reversen Transkription: zum einen die Reverse Transkription zur Synthese von cDNA für die Verwendung in qPCR-Experimenten und zum anderen die Reverse Transkription zur Synthese Fluoreszenz-markierter cDNA für die Verwendung in Microarray-Experimenten.

Da die synthetisierte cDNA aufgrund ihrer geringen Mengen nicht direkt mit Hilfe eines Gels überprüft werden konnte, konnte die einwandfreie Funktion der Reversen Transkription erst nach Durchführung weiterer Methoden festgestellt werden.

Die Reverse Transkription zur Synthese von cDNA für die Verwendung in qPCR-Experimenten erfolgte mit dem „1st Strand cDNA Synthesis (AMV)“-Kit von Roche. Die Ergebnisse der qPCR-Experimente im LightCycler sind in Abschnitt 3.3 detailliert aufgeführt und zeigen, dass die Reverse Transkription mit Hilfe des Kits fehlerfrei funktionierte.

Die Reverse Transkription zur Synthese Fluoreszenz-markierter cDNA für die Verwendung in Microarray-Experimenten erfolgte mit dem „CyScribe First-Strand cDNA

Labelling"-Kit von Amersham Biosciences. Dieser beinhaltete auch eine Reinigung der cDNA durch ein Säulchen-System. Dabei wurde die cDNA, die selektiv an einer Membran band, in zwei Elutionsschritten von dieser entfernt. Nach dem ersten Elutionsschritt wurde jeder Probe 1 μ L entnommen. Dieser wurde in einer PCR eingesetzt, die zur Kontrolle der Reversen Transkription diente. Die Ergebnisse der PCR sind in Abschnitt 3.2.3 beschrieben und zeigen, dass die Reverse Transkription mit Hilfe des Kits erfolgreich durchgeführt wurde.

3.2.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) diente zur Kontrolle der Reversen Transkription, die mit dem „CyScribe First-Strand cDNA Labelling“-Kit von Amersham Biosciences durchgeführt wurde. Dabei wurde von jeder Fluoreszenz-markierten cDNA-Probe 1 μ L amplifiziert und das PCR-Produkt auf ein DNA-Gel aufgetragen. Abbildung 15 zeigt ein typisches DNA-Gel von PCR-Produkten.

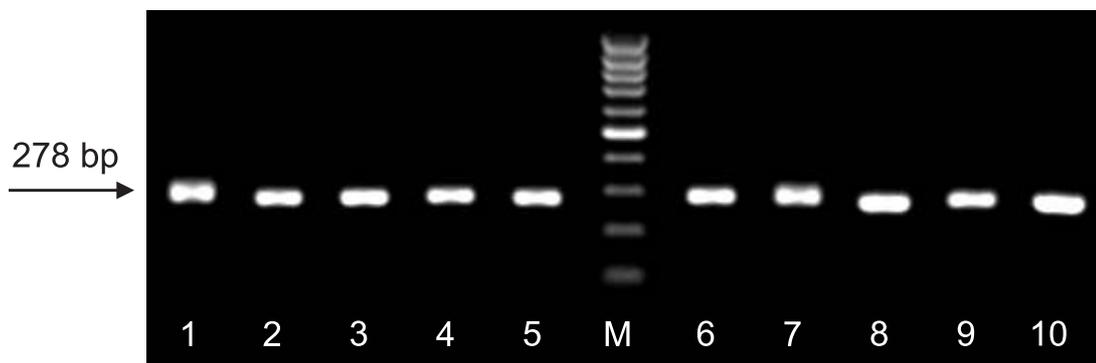


Abbildung 15: DNA-Agarose-Gel von Amplifikaten aus Kontroll-PCR verwendete Primer: β -actin, Produktgröße: 278 bp
1-5: DNA-Amplifikate von Cy3-markierten cDNA-Proben, Lebergewebe, Männchen, exponiert mit 500 ng/L E2
6-10: DNA-Amplifikate von Cy5-markierten cDNA-Proben, Lebergewebe, Männchen, Kontrolltiere
M: Marker

Das Amplifikat des β -actin ist 278 bp lang und bei allen aufgetragenen DNA-Proben als einzelne Bande deutlich sichtbar. Die Ergebnisse zeigen, dass die PCR gut funktionierte und bei jeder Probe die für die PCR verwendete cDNA einwandfrei war. Folglich konnten die Cy3- und Cy5-Fluoreszenz-markierten cDNA-Proben bei Hybridisierungsexperimenten eingesetzt werden.

Insgesamt wurden 368 verschiedene cDNA-Proben für Microarray-Experimente verwendet. Alle diese Proben wurden mit Hilfe der Kontroll-PCR überprüft und lieferten gute Ergebnisse.

3.2.4 Einschritt Reverse Transkription/PCR

Die Einschritt-Reverse Transkription/PCR (RT/PCR) diente vorwiegend zur Überprüfung der Qualität von RNA-Proben und Primern. Von jeder RNA-Probe wurden 2 µg Gesamt-RNA umgeschrieben, der Abschnitt eines *Housekeeping*-Gens amplifiziert und das Amplifikat auf ein DNA-Gel aufgetragen (siehe Abbildung 16).

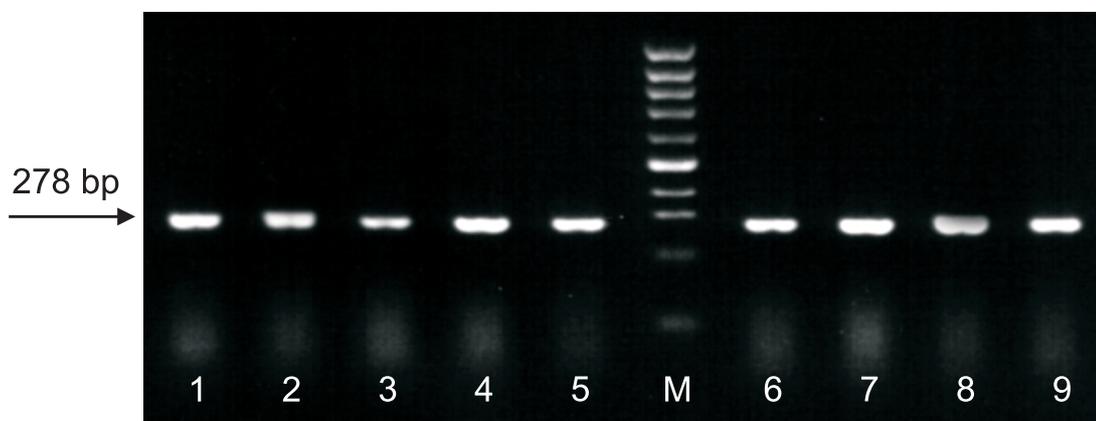


Abbildung 16: DNA-Agarose-Gel von Amplifikaten aus RT/PCR zur Kontrolle von RNA-Proben

verwendete Primer: *β-actin1*, Produktgröße: 278 bp

1: Positivkontrolle

2-3: DNA-Amplifikate aus verschiedenen Lebergeweben, Männchen, Kontrolltiere

4-5: DNA-Amplifikate aus verschiedenen Lebergeweben, Männchen, exponiert mit 1 µg/L Genistein

6-7: DNA-Amplifikate aus verschiedenen Lebergeweben, Männchen, exponiert mit 10 µg/L Genistein

8-9: DNA-Amplifikate aus verschiedenen Lebergeweben, Männchen, exponiert mit 100 µg/L Genistein

M: Marker

Das Amplifikat des *β-actin1* ist 278 bp lang und bei allen aufgetragenen Proben als einzelne Bande deutlich zu erkennen. Die Proben stammten aus den Lebergeweben verschiedener männlicher Fische, die für elf Tage in Kontrollbecken gehalten oder mit 1 bis 100 µg/L Genistein exponiert wurden. Die Positivkontrolle bestand aus einer Mischprobe von vier Lebergeweben weiblicher Zebraabärblinge.

Wurden wie im gezeigten Beispiel die Amplifikate eines *Housekeeping* Gens gebildet, war die Qualität der RNA-Proben einwandfrei, so dass die Proben für qPCR- und Microarray-Experimente verwendet werden konnten.

Daneben wurde die RT/PCR angewendet, um bei einzelnen Proben die Vitellogenin-Synthese semiquantitativ nachzuweisen. Hierfür wurden 2 µg Gesamt-RNA umgeschrieben, der Abschnitt des Markergens *vtg1* amplifiziert und das Amplifikat auf ein DNA-Gel aufgetragen. Nachfolgend sind drei exemplarische DNA-Gele gezeigt.

Abbildung 17 zeigt ein DNA-Gel von *vtg1*-Amplifikaten aus männlichen Fischen, die mit BPA exponiert wurden.

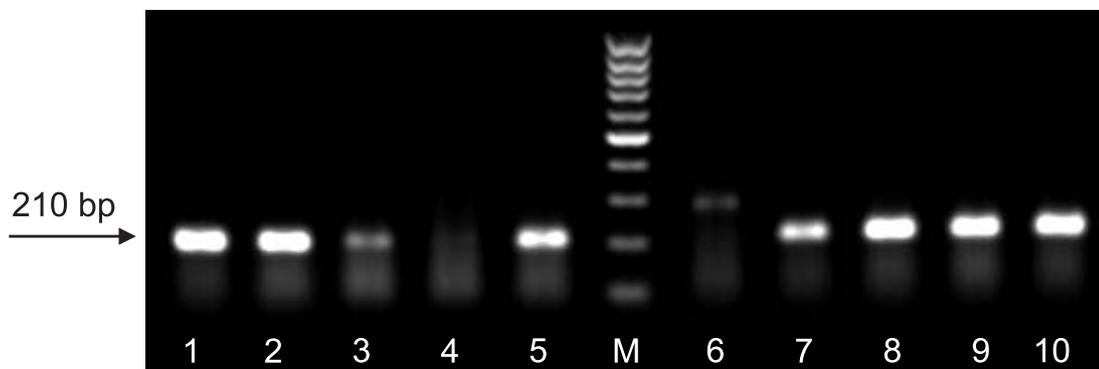


Abbildung 17: DNA-Agarose-Gel von Amplifikaten aus RT/PCR nach elftägiger Exposition mit BPA

verwendete Primer: *vtg1*, Produktgröße: 210 bp

1-10: DNA-Amplifikate aus verschiedenen Lebergeweben, Männchen, exponiert mit 1000 µg/L BPA

M: Marker

Das Amplifikat des *vtg1* ist 210 bp lang und bei den aufgetragenen Proben 1, 2, 8, 9 und 10 als einzelne, intensive Bande sichtbar. Bei den Proben 5 und 7 ist die Bande auch deutlich erkennbar, allerdings mit einer geringeren Intensität. Die Probe 3 weist nur eine schwache Bande bei 210 bp auf und die Proben 4 und 6 bilden keine Amplifikate. Bei Probe 6 ist jedoch ein schwaches Artefakt bei 100 bp zu erkennen.

Die Proben stammten aus den Lebergeweben verschiedener männlicher Fische, die für elf Tage mit einer Konzentration von 1000 µg/L BPA exponiert wurden. Normalerweise synthetisieren männliche Fische kein *vtg1*. Die Ergebnisse zeigen, dass die Exposition mit 1000 µg/L BPA bei sieben der zehn männlichen Individuen zu einer deutlichen *vtg1*-Induktion führte.

Abbildung 18 zeigt ein DNA-Gel von *vtgI*-Amplifikaten aus männlichen Fischen, die mit unterschiedlichen Konzentrationen Genistein exponiert wurden.

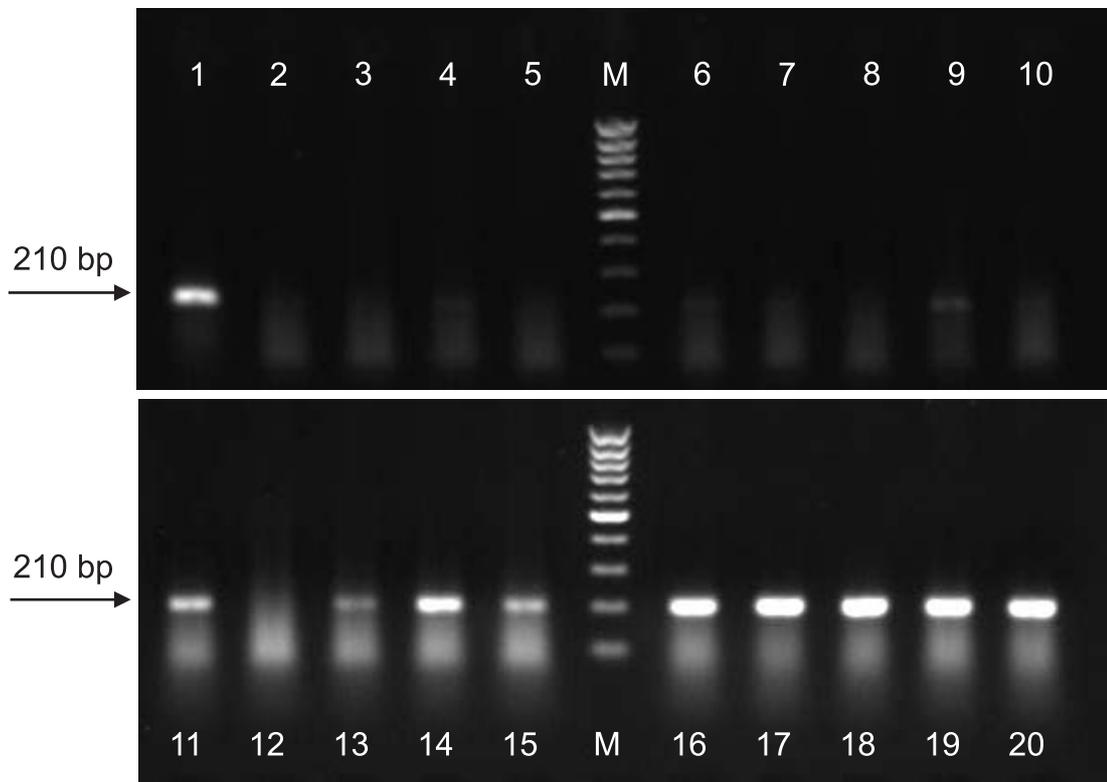


Abbildung 18: DNA-Agarose-Gel von Amplifikaten aus RT/PCR nach elftägiger Exposition mit Genistein

verwendete Primer: *vtg1*, Produktgröße: 210 bp

1: Positivkontrolle

2-5: DNA-Amplifikate aus verschiedenen Lebergeweben, Männchen, exponiert mit 100 µg/L Genistein

6-10: DNA-Amplifikate aus verschiedenen Lebergeweben, Männchen, exponiert mit 500 µg/L Genistein

11-15: DNA-Amplifikate aus verschiedenen Lebergeweben, Männchen, exponiert mit 1000 µg/L Genistein

16-20: DNA-Amplifikate aus verschiedenen Lebergeweben, Männchen, exponiert mit 5000 µg/L Genistein

M: Marker

Das *vtgI*-Amplifikat hat eine Größe von 210 bp und wurde von den Proben 2 bis 8 sowie 10 und 12 nicht gebildet. Die Probe 9 weist eine äußerst schwache *vtgI*-Bande auf. Nach zunehmender Intensität der Banden geordnet folgen die Proben 13, 15, 11 und 14. Bei den Proben 16 bis 20 ist jeweils eine intensive Bande deutlich zu erkennen. Bei der Probe 1 ist auch eine einzelne Bande bei 210 bp sichtbar. Diese stellt eine Mischprobe aus vier Lebergeweben weiblicher Zebraabrlinge dar und wurde als Positivkontrolle verwendet.

Die Ergebnisse zeigen, dass durch Genistein die *vtg*-Synthese in männlichen Zebra-
bärblingen induziert wurde. Männchen, die für elf Tage mit 100 oder 500 $\mu\text{g/L}$ Ge-
nistein exponiert wurden (Proben 1 bis 10), wiesen noch keine oder eine vernachlässig-
bare *vtg*-Synthese auf. Bei 1000 $\mu\text{g/L}$ Genistein zeigten hingegen vier von fünf Tieren
eine relativ schwache *vtg*-Synthese (Proben 11 bis 15). Bei 5000 $\mu\text{g/L}$ Genistein war
bei allen fünf untersuchten Männchen eine deutliche *vtg*-Synthese erkennbar (Proben
16 bis 20).

Abbildung 19 zeigt ein DNA-Gel von *vtg*-Amplifikaten aus männlichen Fischen, die
mit unterschiedlichen Konzentrationen E2 exponiert wurden.

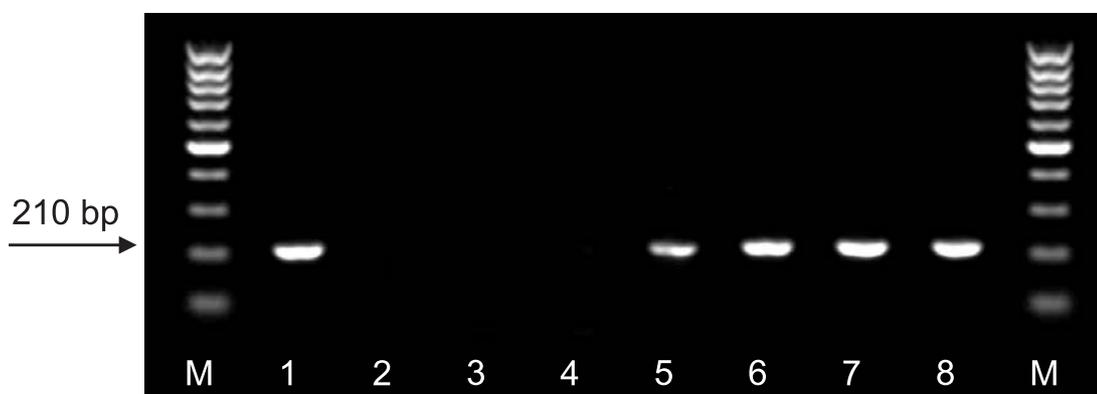


Abbildung 19: DNA-Agarose-Gel von Amplifikaten aus RT/PCR nach elftägiger Expo-
sition mit E2

verwendete Primer: *vtg1*, Produktgröße: 210 bp

1: Positivkontrolle

2: DNA-Amplifikat aus Lebergewebe, Männchen, exponiert mit 1 ng/L E2

3: DNA-Amplifikat aus Lebergewebe, Männchen, exponiert mit 10 ng/L E2

4: DNA-Amplifikat aus Lebergewebe, Männchen, exponiert mit 100 ng/L E2

5: DNA-Amplifikat aus Lebergewebe, Männchen, exponiert mit 200 ng/L E2

6: DNA-Amplifikat aus Lebergewebe, Männchen, exponiert mit 300 ng/L E2

7: DNA-Amplifikat aus Lebergewebe, Männchen, exponiert mit 400 ng/L E2

8: DNA-Amplifikat aus Lebergewebe, Männchen, exponiert mit 500 ng/L E2

M: Marker

Das Amplifikat des *vtg* ist 210 bp lang und bei den Proben 5 bis 8 als einzelne, scharfe
Bande erkennbar. Die Intensität der Bande ist bei der Probe 5 jedoch schwächer als bei
den Proben 6 bis 8. Die Proben 2 bis 4 bildeten keine Amplifikate. Bei der Probe 1 ist
eine deutliche Bande sichtbar. Diese stammte von einer Mischprobe aus vier weiblichen
Lebergeweben und diente somit als Positivkontrolle.

Folglich wurde bei den untersuchten männlichen Zebra-
bärblingen die Synthese von *vtg*
ab einer Konzentration von 200 ng/L E2 induziert (Proben 5 bis 8). Bei 200 ng/L E2

(Probe 5) war die *vtgI*-Synthese jedoch geringer als bei den höheren Konzentrationen (300 bis 500 ng/L E2, Proben 6 bis 8).

Die exemplarisch aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass die RT/PCR einwandfrei funktionierte und die Methode hervorragend geeignet war, um die Qualität von RNA-Proben und Primern zu überprüfen. Daneben eignete sich die RT/PCR zum semiquantitativen Nachweis der *vtgI*-Synthese bei einzelnen Proben. Es konnte der Einfluss der östrogenen Substanzen E2, BPA und Genistein auf die Expression von *vtgI* erfolgreich nachgewiesen werden. Zur Bestimmung von Effektkonzentrationen waren jedoch weitere Untersuchungen notwendig, die mit Hilfe der quantitativen PCR durchgeführt wurden.

3.3 Quantitative PCR

Die quantitative PCR (qPCR) wurde verwendet, um die Effektkonzentrationen der östrogenen Substanzen E2, BPA und Genistein zu ermitteln. Die Messungen wurden mit dem Markergen *vtgI* durchgeführt, da für dieses bereits semiquantitativ eine Regulation nachgewiesen wurde. Von jeder Konzentration wurden vier bis neun männliche Zebra-*bärblinge* untersucht. Dabei wurden von jeder Probe zwei Parallelmessungen durchgeführt. Abbildung 20 zeigt die Fluoreszenzkurven eines typischen qPCR-Laufes mit Proben aus einer Genistein-Exposition.

Die beschrifteten Fluoreszenzkurven zeigen, dass die Positivkontrollen (Kurven Nr. 3 und Nr. 5), die mit EE2 exponiert wurden, nach weniger Zyklen messbare Mengen an PCR-Produkten bildeten als die mit 5000 µg/L Genistein exponierten Proben (Kurven Nr. 4 und Nr. 6). Die beiden Negativkontrollen (Kurven Nr. 7 und Nr. 8) lieferten wie erwartet keine Fluoreszenzsignale. Die beiden Kalibratorkurven (Nr. 1 und Nr. 2) wurden für die Normalisierung der verschiedenen qPCR-Läufe verwendet. Als Kalibrator diente dabei eine cDNA-Mischprobe von vier nicht exponierten weiblichen Zebra-*bärblingen*. Die unbeschrifteten Kurven stammen von verschiedenen Proben, die mit unterschiedlichen Konzentrationen Genistein exponiert wurden.

Die Auswertung der Fluoreszenzkurven erfolgte mit Hilfe der LightCycler[®]-Software 3.5 (Roche). Dabei wurde von jeder Fluoreszenzkurve der *Crossing Point* (CP) ermittelt. Die relative Quantifizierung der Genexpressionsstärke einer Probe erfolgte über die Berechnung des Verhältnisses vom CP des Zielgens zum CP des Referenzgens.

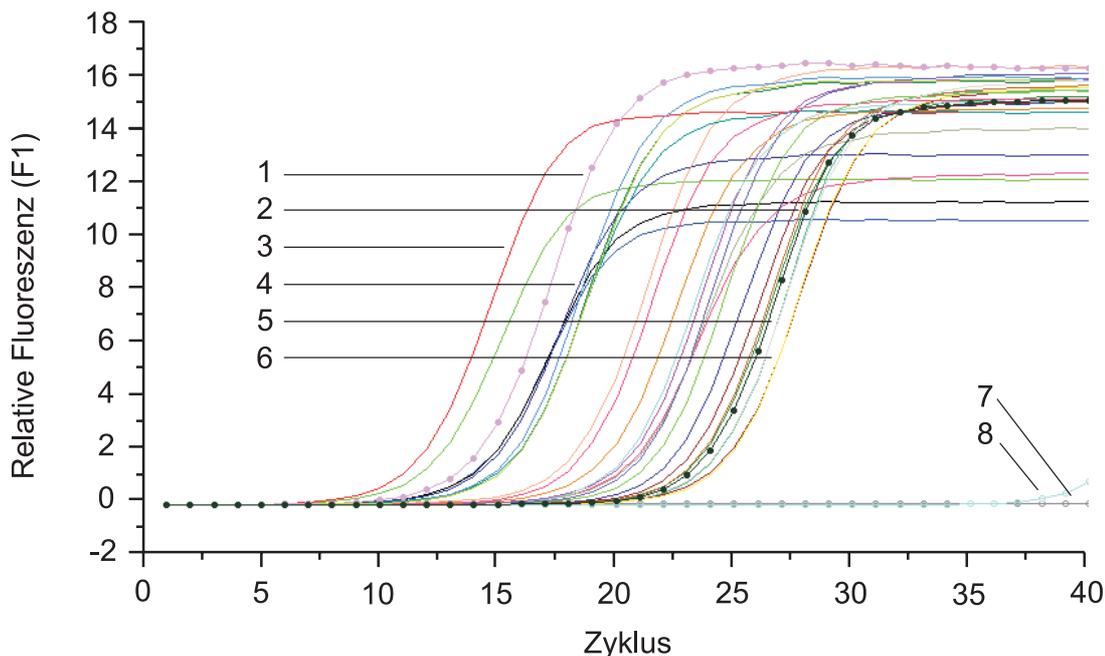


Abbildung 20: Fluoreszenzkurven eines typischen qPCR-Laufes mit Proben aus Genistein-Exposition

Das gezeigte Experiment umfasste 32 Proben, die mit Genistein oder EE2 (als Positivkontrollen) exponiert wurden. Nachfolgend sind acht Kurven exemplarisch erläutert:

- 1: *vtg1*-Kalibrator zum Vergleich verschiedener qPCR-Läufe
- 2: *β-actin1*-Kalibrator zum Vergleich verschiedener qPCR-Läufe
- 3: Positivkontrolle, exponiert mit 30 ng/L EE2, *vtg1*-Primer
- 4: Probe, exponiert mit 5000 µg/L Genistein, *vtg1*-Primer
- 5: Positivkontrolle, exponiert mit 30 ng/L EE2, *β-actin1*-Primer
- 6: Probe, exponiert mit 5000 µg/L Genistein, *β-actin1*-Primer
- 7: Negativkontrolle, keine Probe zugegeben, *vtg1*-Primer
- 8: Negativkontrolle, keine Probe zugegeben, *β-actin1*-Primer

Als Zielgen diente bei allen Proben *vtg1*. Als Referenzgen wurde *β-actin1* bei BPA und Genistein sowie *ef1a* bei E2 verwendet, da für *β-actin1* eine Regulation durch E2 festgestellt wurde. Zudem wurden für die Primerkombinationen *vtg1/ef1a* und *vtg1/β-actin1* die Effizienzen der qPCRs mit Hilfe von Kalibrationsreihen ermittelt. Für die Kalibrationsreihen wurden verschiedene Verdünnungen (unverdünnt, 1:10, 1:100, 1:1.000 und 1:10.000) des cDNA-Kalibrators verwendet. Abbildung 21 zeigt exemplarisch die Fluoreszenzkurven der *β-actin1*-Kalibrationsreihe.

Es ist deutlich zu erkennen, dass mit zunehmender Verdünnung des Kalibrators die messbaren Fluoreszenzsignale der gebildeten PCR-Produkte bei späteren Zyklen einsetzen. Das bedeutet, je mehr cDNA des Kalibrators in der Probe war, desto kleiner ist der CP.

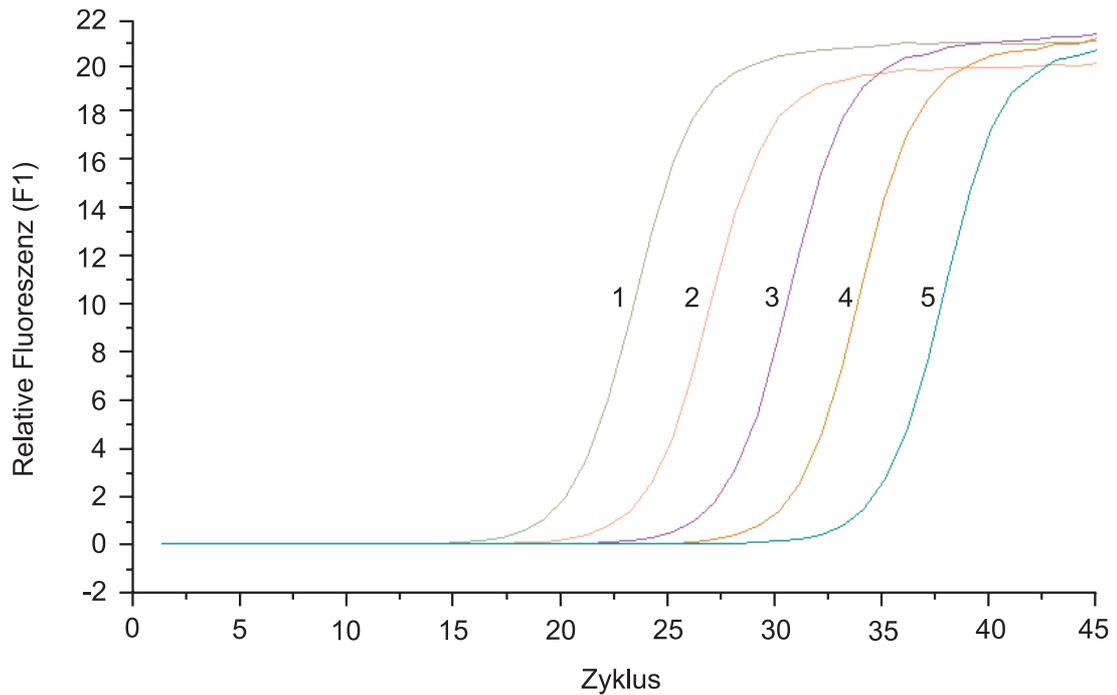


Abbildung 21: Fluoreszenzkurven des qPCR-Laufes der β -actin1-Kalibrationsreihe

- 1: unverdünnt
- 2: Verdünnung 1:10
- 3: Verdünnung 1:100
- 4: Verdünnung 1:1000
- 5: Verdünnung 1:10000

Aus den Abständen der CPs bei den gemessenen Verdünnungen wurde eine Standardkurve erstellt und über deren Steigung die Effizienz der qPCR berechnet. Nachfolgend sind die Standardkurven und Effizienzen für die qPCR mit der Primerkombination *vtg1/efla* gezeigt.

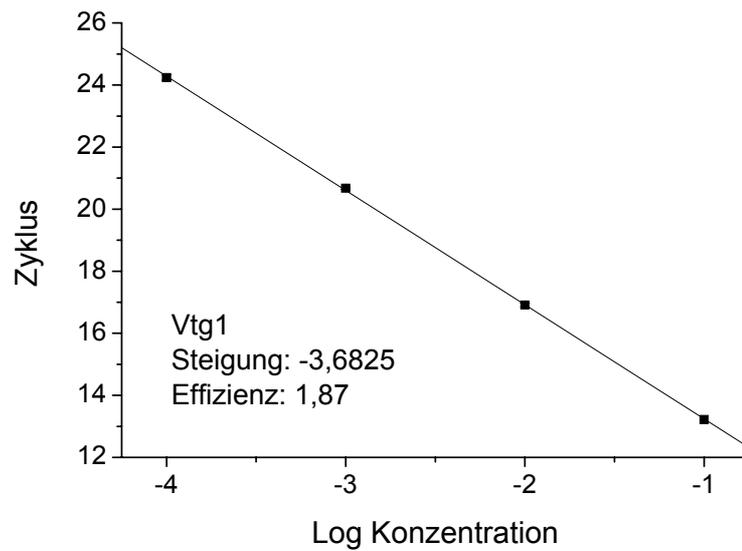


Abbildung 22: Standardkurve der *vtg1*-Kalibrationsreihe für qPCR mit Primerkombination *vtg1/ef1α*

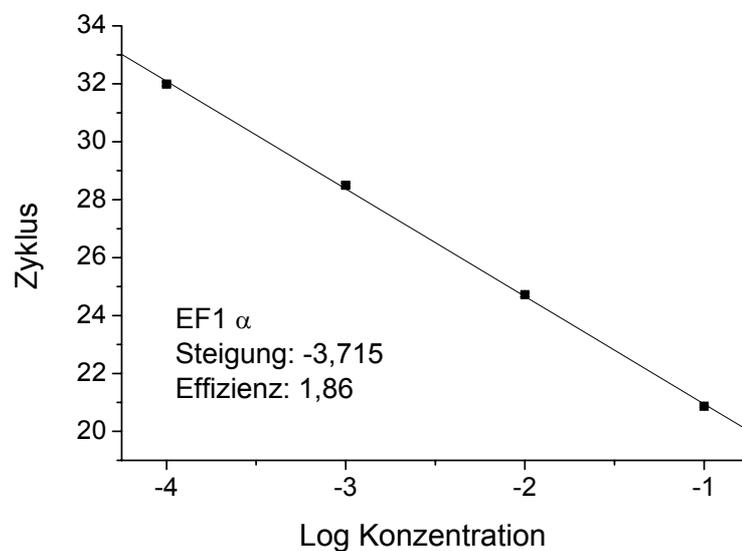


Abbildung 23: Standardkurve der *ef1α*-Kalibrationsreihe für qPCR mit Primerkombination *vtg1/ef1α*

Die berechneten Effizienzen lagen für die qPCR mit der Primerkombination *vtg1/ef1α* bei 1,87 (*vtg1*) und 1,86 (*ef1α*). Das bedeutet, dass sich bei jedem qPCR-Zyklus die Menge an Ausgangs-DNA um das 1,87- beziehungsweise 1,86-fache vervielfältigte.

Abbildung 24 und Abbildung 25 zeigen die Standardkurven und Effizienzen für die qPCR mit der Primerkombination *vtg1/β-actin1*.

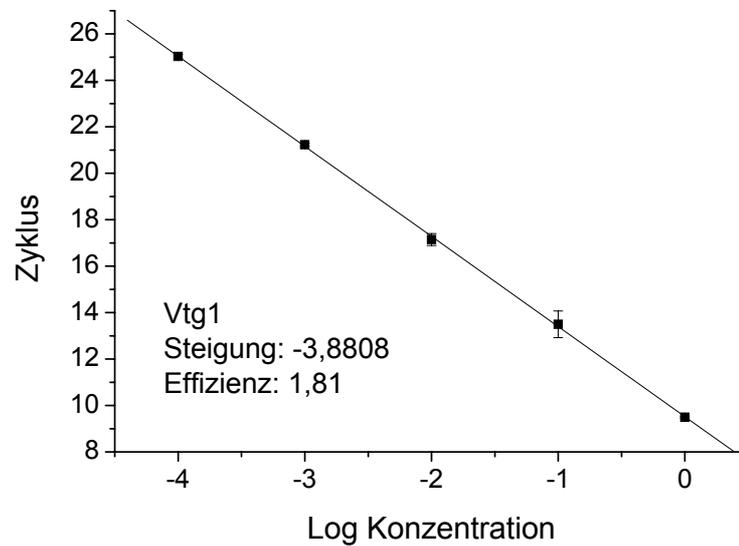


Abbildung 24: Standardkurve der *vtg1*-Kalibrationsreihe für qPCR mit Primerkombination *vtg1/β-actin1*

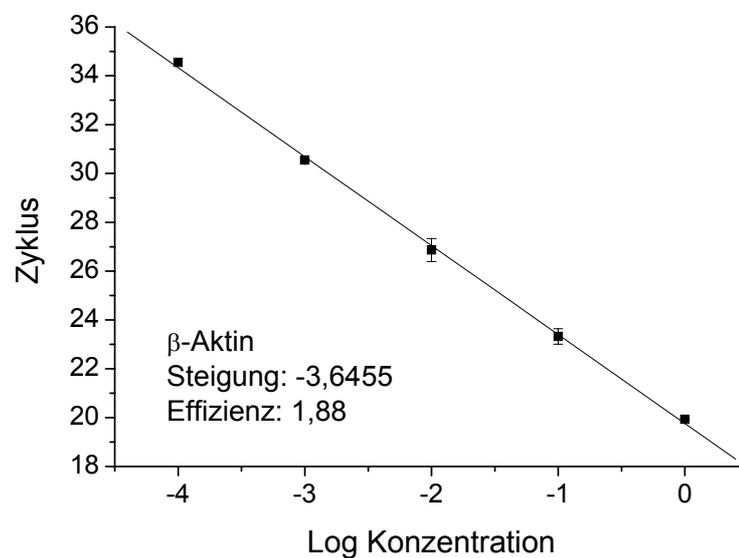


Abbildung 25: Standardkurve der *β-actin1*-Kalibrationsreihe für qPCR mit Primerkombination *vtg1/β-actin1*

Bei der Primerkombination *vtg1/β-actin1* lagen die Effizienzen von *vtg1* und *β-actin1* bei 1,81 und 1,88. Die Effizienz von *vtg1* war bei dieser Primerkombination

somit niedriger als bei der Primerkombination *vtg1/ef1a* (1,87). Dieser Unterschied war durch die verschiedenen qPCR-Programme der Primerpaare bedingt, hatte jedoch keinen Einfluss auf die Datenauswertung.

In der Praxis liegen die Effizienzen bei qPCRs in einem Bereich zwischen 1,7 und 1,9. Folglich waren die berechneten Effizienzen bei beiden Primerkombinationen ausreichend hoch genug.

Bei der Datenauswertung wurde eine Effizienz-korrigierte relative Quantifizierung der gemessenen CPs nach der Methode von Pfaffl *et al.* (2002) durchgeführt. Die erhaltenen Ratios wurden im Anschluss mittels einfaktorieller Varianzanalyse (*one-way ANOVA*) und Tukey HSD Test, der eine Aussage über signifikante Unterschiede in der Genexpression zwischen den Expositionsbedingungen/-gruppen erlaubt, statistisch ausgewertet.

In Abbildung 26 sind die Ergebnisse der qPCR-Experimente zusammenfassend dargestellt.

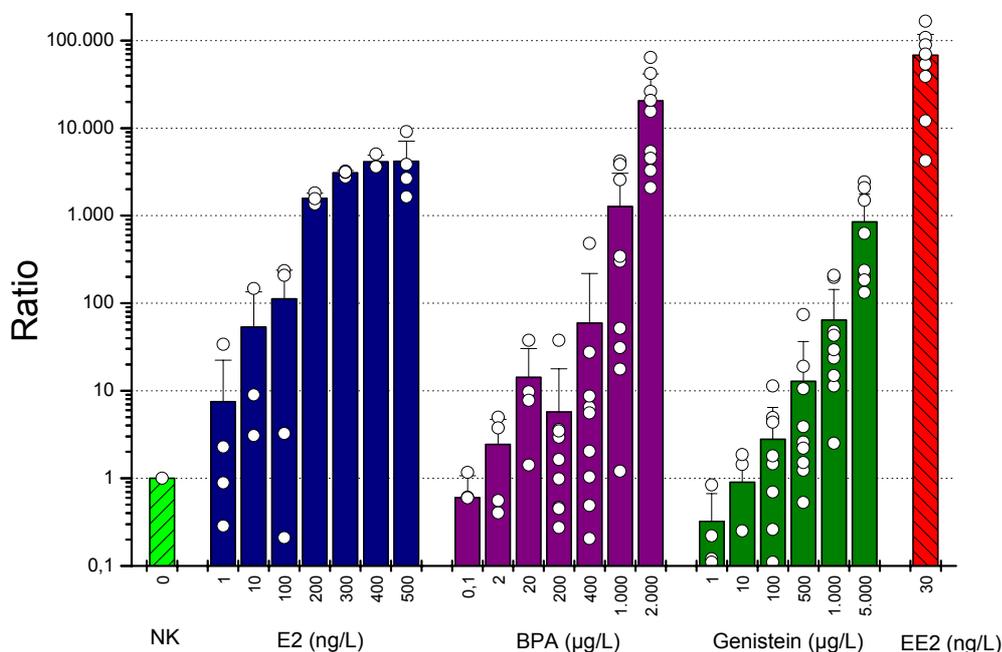


Abbildung 26: Relative Expressionswerte (Ratios) für *vtg1* nach elftägiger Exposition mit E2, BPA, Genistein und EE2. NK: Negativkontrolle

Das Diagramm zeigt zu jeder Konzentrationsstufe die Ratio als relativen Expressionswert von *vtg1*. Die Balken stellen dabei die Mittelwerte aus den Expressionswerten (Ra-

tios) der einzelnen Tiere dar. Daneben repräsentieren die Punkte im Diagramm die individuelle *vtgI*-Expression (Ratio) der Tiere. Das veranschaulicht die Verteilung innerhalb einer Expositionsgruppe. Als Negativkontrollen (NK) dienten männliche Zebra-bärblinge, die ohne Chemikalienzugabe im Durchflusssystem gehalten wurden. Zur Standardisierung der Expressionswerte aus den verschiedenen Expositionsexperimenten wurde die *vtgI*-Expression (Ratio) der Negativkontrollen auf den Wert 1 gesetzt.

Nach einer elftägigen Exposition wurde in den Lebergeweben der männlichen Zebra-bärblinge eine signifikante *vtgI*-Induktion bei 200 ng/L E2, 2000 µg/L BPA und 5000 µg/L Genistein nachgewiesen.

Die gemittelte Ratio der Expositionsgruppe mit 200 ng/L E2 war um das 1100-fache größer als bei der Gruppe mit den Kontrolltieren und erreichte ihren Höchstwert von 5000 bei der Gruppe mit 400 ng/L E2. Bei BPA war eine breite Verteilung der Expressionswerte (Ratios) innerhalb der Expositionsgruppen feststellbar, da die Fische eine hohe individuelle *vtgI*-Expression zeigten. Eine signifikante *vtgI*-Induktion war lediglich für die Gruppe mit 2000 µg/L BPA nachweisbar. Bei Genistein war eine konzentrationsabhängige Expression von *vtgI* erkennbar. Es wurde jedoch auch bei der höchsten Konzentration mit 5000 µg/L Genistein nicht das Expressionsniveau wie bei den mit E2 exponierten Proben erreicht. Das höchste Expressionsniveau wiesen die mit 30 ng/L EE2 exponierten Proben auf. EE2 verfügte bei gleichen Konzentrationen über einen größeren Einfluss auf die *vtgI*-Expression als das natürliche Hormon E2 und wurde daher als Positivkontrolle verwendet.

3.4 Gesamtgenom-Arrays

Für die Experimente mit den „Zebrafish 14k OciChipTM“-Gesamtgenom-Arrays wurden ausschließlich Fluoreszenz-markierte cDNA-Proben verwendet, die mit Hilfe der Kontroll-PCR überprüft wurden. Dabei wurden in jedem Hybridisierungsexperiment zwei unterschiedlich Fluoreszenz-markierte Proben aus einem exponierten Fisch sowie einem Kontrollfisch eingesetzt. Die Hybridisierung erfolgte als Optimierung zum Protokoll in Hybridisierungskammern, um die Verdunstung von Hybridisierungslösung zu vermeiden. Nach der Hybridisierung wurden die Gesamtgenom-Arrays intensiv gewaschen, getrocknet und gescannt. Das Scannen jedes Gesamtgenom-Arrays erfolgte mit dem Arrayscanner in zwei Messungen. Dabei wurden die Intensitäten des emittierten Lichts

der hybridisierten Cy3-dCTPs und Cy5-dCTPs gemessen und als Bilddaten gespeichert. Die Bilddaten wurden dann mit Hilfe der *Microarray Analysis Software ImaGene 5.0* überlagert und ausgelesen. Bei der Überlagerung der Bilddaten wurde das Fluoreszenzsignal der Cy3-dCTPs als grüne Farbe und das Fluoreszenzsignal der Cy5-dCTPs als rote Farbe optisch dargestellt. Je höher die Intensität eines Signals war, desto intensiver war die Farbe des Spots. Hybridisierten von der Probe mehr Cy3-dCTPs an einer Sonde als Cy5-dCTPs, erschien der Spot grün. Banden hingegen mehr Cy5-dCTPs an die Sonde, wies der Spot eine rote Farbe auf. Bei gleichen Mengen von Cy3- und Cy5-dCTPs in der Probe kam es zu einer Überlagerung der Farben und der Spot war gelb. Abbildung 27 zeigt die überlagerten Bilddaten eines Gesamtgenom-Arrays, bei dem eine Cy3-markierte Probe eines männlichen Kontrolltieres und eine Cy5-markierte Probe eines Zebrafärblich-Männchens, das mit 500 ng/L E2 exponiert wurde, hybridisiert wurden.

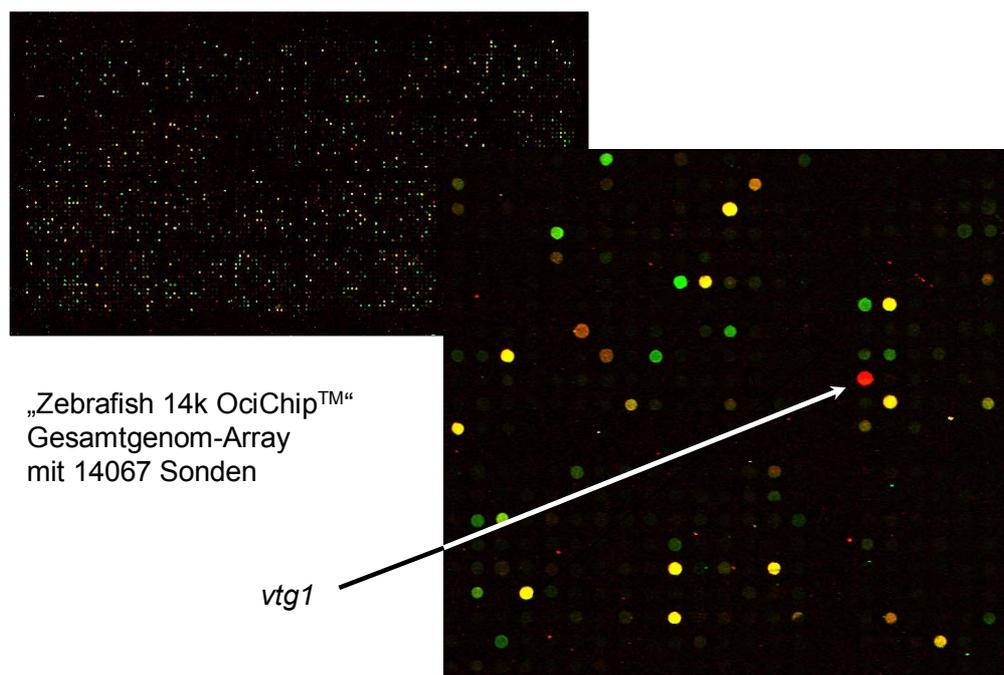


Abbildung 27: „Zebrafish 14k OciChip™“-Gesamtgenom-Array nach Hybridisierung mit einer Cy3-markierten Probe eines männlichen Kontrolltieres und einer Cy5-markierten Probe eines Zebrafärblich-Männchens, das mit 500 ng/L E2 exponiert wurde. Im vergrößerten Ausschnitt ist der Spot für *vtg1* mit einem intensiven, roten Signal erkennbar, was auf eine erhöhte Expression im exponierten Männchen schließen lässt.

Nach der Überlagerung der Bilddaten wurden das *Grid* (Raster) sowie die *Gene ID* in das Programm geladen. Das *Grid* wurde so ausgerichtet, dass jeder Spot exakt erfasst

wurde (siehe Abbildung 28). Mittels der *Gene ID* erfolgte eine Zuordnung der erfassten Spots zu den entsprechenden Sonden. Dann wurden die Intensitäten und Hintergrundsignale der einzelnen Spots mit Hilfe der Software ausgelesen und gespeichert.

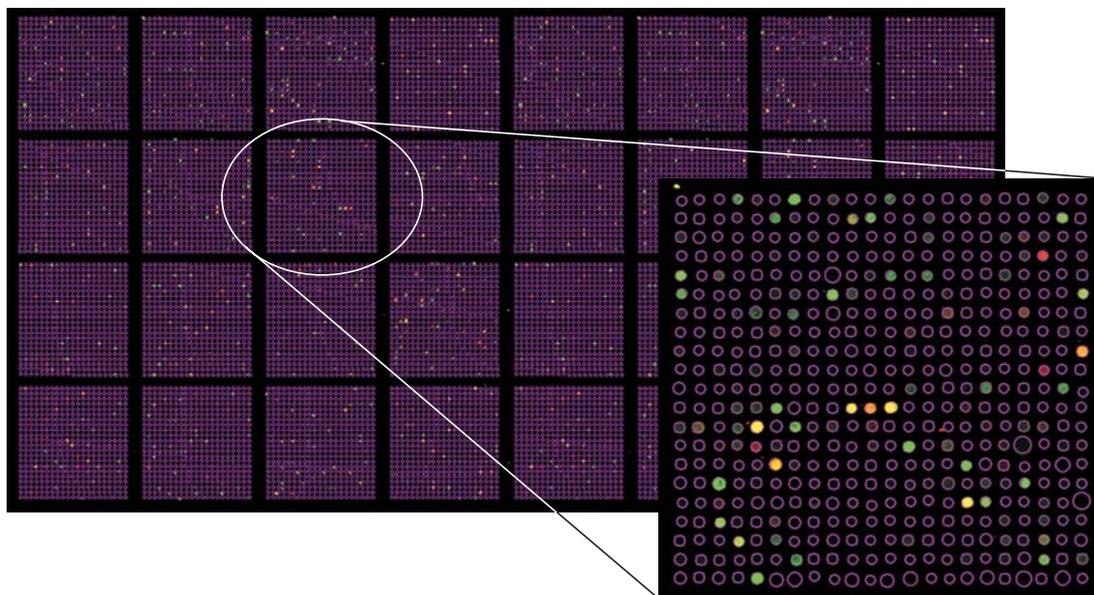


Abbildung 28: Erfassung und Zuordnung der Spots des „Zebrafish 14k OciChip™“-Gesamtom-Arrays mit Hilfe des *Grids* (Rasters)

Die Arbeiten mit den „Zebrafish 14k OciChip™“-Gesamtom-Arrays umfassten für jede der untersuchten Substanzen jeweils zehn Hybridisierungsexperimente. Als Proben wurden hierfür die Lebergewebe von jeweils zehn unterschiedlichen männlichen Zebrafischarten verwendet, die für elf Tage folgenden Konzentrationen ausgesetzt wurden: 500 ng/L E2, 1000 µg/L BPA und 5000 µg/L Genistein. Als Referenz-Proben dienten 30 Lebergewebe von verschiedenen männlichen Zebrafischarten, die in den Kontrollbecken des Durchflusssystems gehalten wurden.

Für jede der untersuchten Substanzen wurde ein Datensatz generiert, der zehn Hybridisierungen umfasste. Folglich lagen in einem Datensatz für jede der 14067 Sonden 20 Messergebnisse vor. Die Datenauswertung der Messergebnisse erfolgte nach den in Abschnitt 2.2.7.1 beschriebenen Verfahren. Dabei wurden die Daten über die gesamte Anzahl von Signalen auf dem Array normalisiert. Durch die Normalisierung wurden die auf jedem Gesamtom-Array verteilten Werte (*On-chip*-Normalisierung) sowie die Werte zwischen den zehn Gesamtom-Arrays (*Inter-chip*-Normalisierung) auf einen bestimmten Bereich skaliert und somit miteinander vergleichbar gemacht. Abbildung 29

zeigt exemplarisch für einen Gesamtgenom-Array die Verteilung der Daten vor und nach der Normalisierung.

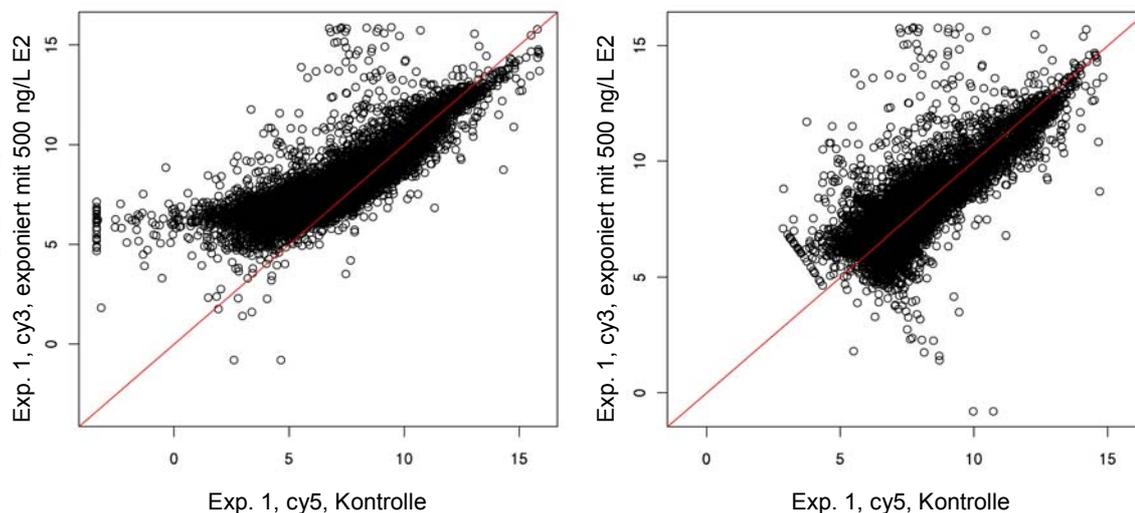


Abbildung 29: Verteilung der Daten eines Gesamtgenom-Arrays vor (links) und nach der Normalisierung (rechts).

Ein Kreis repräsentiert eine Sonde, wobei der Expressionswert (\log_2) des mit 500 ng/L E2 exponierten Tieres (mit Cy3-dCTPs markiert) über dem Expressionswert (\log_2) des Kontrolltieres (mit Cy5-dCTPs markiert) aufgetragen wurde. Exp.: Experiment

Abbildung 29 links zeigt, dass für die Mehrzahl der Sonden bei der mit Cy3-dCTPs markierten Probe größere Expressionswerte vorlagen als bei der mit Cy5-dCTPs markierten Probe. Diese Verteilung ist durch die unterschiedliche Struktur von Cy3- und Cy5-dCTP bedingt und kann auf einen vermehrten Einbau der Cy3-dCTPs in die cDNA zurückgeführt werden. Nach der Normalisierung der Daten war die Verteilung der Expressionswerte geglättet (siehe Abbildung 29 rechts). Da diese Verteilung bei allen Hybridisierungsexperimenten festgestellt wurde, erfolgte für jeweils die Hälfte der Proben von exponierten Tieren und Kontrolltieren eine verschieden farbige Markierung, ein so genannter *color-flip*.

Im Anschluss erfolgte die statistische Auswertung der normalisierten Daten. Dabei wurden zunächst für jede untersuchte Substanz für verschiedene Kombinationen von *p-value* und *mean fold change* Listen mit regulierten Sonden erstellt. Zudem wurden für jede Liste mit Hilfe von Permutationsberechnungen die Anzahl von falsch positiven Werten berechnet und hierüber die *False Discovery Rate (FDR)* abgeschätzt (siehe Ab-

schnitt 2.2.7.1). Tabelle 2 zeigt für verschiedene Kombinationen von *p-value* und *mean fold change* die Anzahl der regulierten Sonden sowie die zugehörige *FDR*.

Tabelle 2: Anzahl der regulierten Sonden und *FDR* [in %] für verschiedene Kombinationen von *p-value* und *mean fold change*.

Grau markiert: Kombination, die für die Erstellung der Listen verwendet wurde, *p*: *p-value*, *f.c.*: *mean fold change*

Substanz	p < 0,01 f.c. > 1,5	p < 0,05 f.c. > 2	p < 0,01 f.c. ≥ 0	p < 0,005 f.c. ≥ 0	p < 0,001 f.c. ≥ 0
	E2	210 11%	238 11%	274 19%	186 13%
BPA	62 63%	57 52%	87 71%	44 71%	7 79%
Genistein	121 13%	251 14%	168 25%	70 25%	12 11%

Die Ergebnisse aus Tabelle 2 zeigen, dass verhältnismäßig hohe *FDRs* vorliegen, wenn der *mean fold change* bei der Selektion nicht berücksichtigt wird (*f.c.* ≥ 0). Bei BPA liegen mit 52% bis 79% stets sehr hohe *FDRs* vor. Für E2 und Genistein wird eine ausreichend niedrige *FDR* für die Kombinationen [*p*<0,01; *f.c.*>1,5] und [*p*<0,05; *f.c.*>2] erreicht. Von diesen wurde die Kombination [*p*<0,05; *f.c.*>2] (grau markiert) wegen der erheblich größeren Anzahl an regulierten Sonden bei Genistein (251 gegenüber 121) und der besseren *FDR* bei BPA (52% gegenüber 63%) für die Erstellung der Listen bei allen drei Substanzen gewählt.

Das Ergebnis eines Selektionsverfahrens wird mit Hilfe eines MA-Diagramms, das zugleich die Stärke der Regulation (Ratio) sowie die Signalintensitäten der Sonden veranschaulicht, grafisch dargestellt. Dabei wird M über A aufgetragen und es gilt:

$$A = \frac{1}{2} \log_2 (x_{\text{exponiert}} \times x_{\text{Kontrolle}})$$

$$M = \log_2 (x_{\text{exponiert}} / x_{\text{Kontrolle}})$$

wobei *x* = Mittelwert der normalisierten Expressionswerte über alle zehn Experimente.

Abbildung 30 zeigt exemplarisch das MA-Diagramm über alle zehn Experimente mit 500 ng/L E2 für das ausgewählte Selektionsverfahren mit der Kombination $[p < 0,05; f.c. > 2]$.

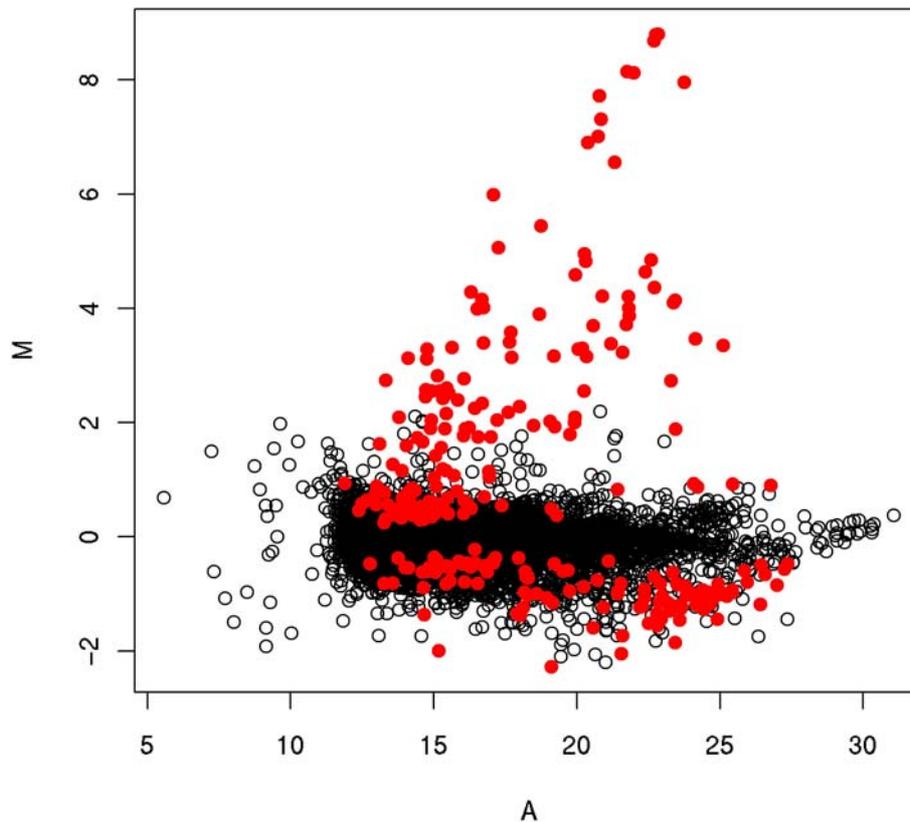


Abbildung 30: MA-Diagramm über alle zehn Experimente mit 500 ng/L E2 für das Selektionsverfahren mit der Kombination $[p < 0,05; f.c. > 2]$

Die 238 regulierten Sonden sind als rote Punkte und die übrigen, nicht regulierten Sonden als schwarze Kreise dargestellt. Dabei ist zu jeder Sonde M (beschreibt Ratio) über A (beschreibt Intensität) aufgetragen, wobei $A = \frac{1}{2} \log_2 (x_{\text{exponiert}} \times x_{\text{Kontrolle}})$; $M = \log_2 (x_{\text{exponiert}} / x_{\text{Kontrolle}})$ und $x =$ Mittelwert der normalisierten Expressionswerte über alle zehn Experimente

Das MA-Diagramm verdeutlicht, dass die regulierten Sonden stärker hoch- als herunterreguliert wurden. Zahlreiche Sonden wiesen eine Regulation von $M > 2$ auf, nur vereinzelte Sonden hingegen von $M > -2$. Die einzelnen Werte der regulierten Sonden von A, die die Signalintensitäten der Sonden beschreiben, waren wie bei den nicht regulierten Sonden gleichmäßig verteilt.

Die Anzahl der signifikant regulierten Sonden hängt von dem Selektionsverfahren, also der gewählten Kombination von *p-value* und *mean fold change*, ab. Daneben hat auch

die Anzahl der durchgeführten Experimente einen entscheidenden Einfluss auf die Anzahl der signifikant regulierten Sonden. Zur Untersuchung dieses Effektes wurden die Selektionsverfahren und Permutationsberechnungen für zehn, acht, sechs und vier Experimente durchgeführt. Dabei wurden für die Berechnungen mit acht, sechs und vier Experimenten Teilmengen des zehn Experimente umfassenden Datensatzes verwendet. Für die Berechnungen mit weniger als zehn Experimenten wurden alle mathematisch möglichen Kombinationen der Teilmengen berücksichtigt und als Ergebnisse die Mittelwerte aus diesen Kombinationen gebildet. Abbildung 31 zeigt die Ergebnisse, wobei die Anzahl der als signifikant regulierten Sonden über die entsprechende Spezifität des Selektionsverfahrens aufgetragen ist.

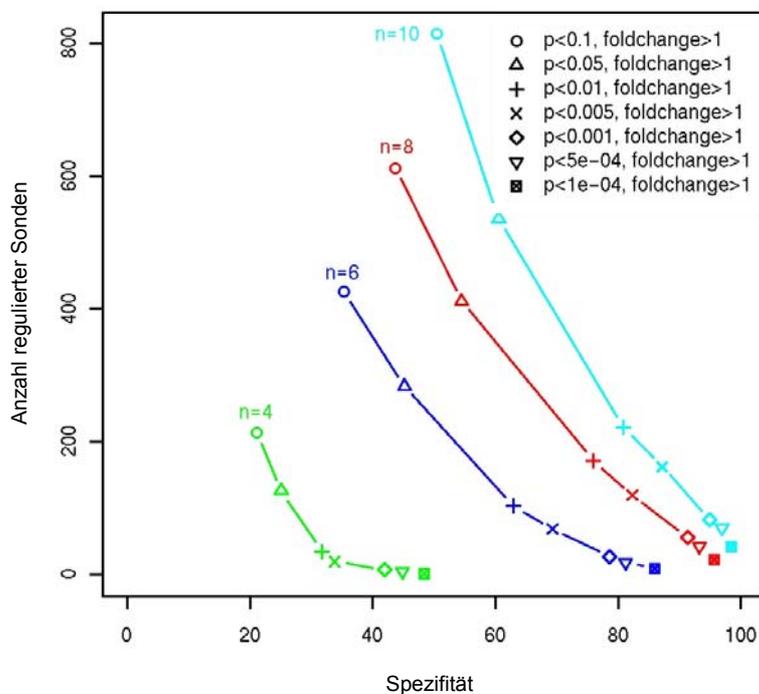


Abbildung 31: Abhängigkeit der Anzahl signifikant regulierter Sonden sowie der Spezifität des Selektionsverfahrens von der Anzahl durchgeführter Experimente. Aufgetragen ist die Anzahl regulierter Sonden über der Spezifität für verschiedene Selektionsverfahren bei unterschiedlicher Anzahl von Experimenten ($n = 4, 6, 8$ und 10). Die Daten stammen von männlichen Kontrolltieren sowie Zebraabärling-Männchen, die für elf Tage mit 500 ng/L E2 exponiert wurden.

Aus Abbildung 31 ist zu erkennen, dass die Anzahl der regulierten Sonden mit steigendem p -value zunimmt, allerdings auch die Spezifität des Auswahlverfahrens sinkt. Für alle gezeigten Kombinationen nehmen die Anzahl der regulierten Sonden und die Spezifität deutlich ab, wenn die Anzahl der durchgeführten Experimente reduziert wird. Eine

hohe Spezifität von ca. 90% wird bei einem niedrigen *p-value* nur mit acht ($p < 0,001$) oder zehn ($p < 0,005$) durchgeführten Experimenten erreicht. Eine noch gerade ausreichend hohe Spezifität von ca. 80% wird zwar bei Durchführung von sechs Experimenten erreicht, allerdings nur bei äußerst niedrigem *p-value* ($p < 0,001$) und geringer Anzahl von regulierten Sonden (< 50). Um eine hohe Anzahl an regulierten Sonden bei relativ hoher Spezifität ($> 80\%$) zu erhalten, sind daher mindestens acht Experimente notwendig.

Für die vorliegenden Ergebnisse zu E2, BPA und Genistein wurden jeweils zehn Experimente durchgeführt. Dabei wurde für alle drei Substanzen das Selektionsverfahren mit der Kombination [$p < 0,05$; f.c. > 2] ausgewählt. Die erstellten Listen mit den signifikant regulierten Sonden sind im Anhang C aufgeführt und nach dem *mean fold change* sortiert. Sie enthalten die Informationen über die *ORFs* des Zebrafisches, die spezifisch an die Sonden binden. Die *ORFs* sind dabei in zwei Gruppen eingeteilt: die *Expressed Transcripts, ETs* (Abschnitte von Zebrafisch-Genen) sowie die *Tentative Consensus Sequences, TCs* (Abschnitte von nicht entschlüsselten Bereichen). Die *TCs* weisen hohe Übereinstimmungen zu *ORFs* aus anderen Organismen oder DNA-Klonen auf, für die zum Teil Funktionen bekannt sind.

Da in manchen Fällen mehrere regulierte Sonden für das gleiche *ORF* kodieren, wurde dies bei der weiteren Auswertung berücksichtigt und die Anzahl der regulierten *ORFs* entsprechend korrigiert. Durch E2 wiesen dann insgesamt 211 *ORFs* (100 *ETs* und 111 *TCs*), durch BPA 47 *ORFs* (29 *ETs* und 18 *TCs*) und durch Genistein 231 *ORFs* (108 *ETs* und 123 *TCs*) eine Änderung ihrer Expression auf. Mit Hilfe eines Venn-Diagramms (siehe Abbildung 32) wird die Anzahl von *ETs* und *TCs* dargestellt, die bei jeweils einer, zwei oder drei Substanzen eine Änderung der Genexpression zeigten. Dabei sind jeweils die Gesamtzahl der regulierten *ORFs* sowie die Anzahl der regulierten *ETs* in Klammern aufgeführt.

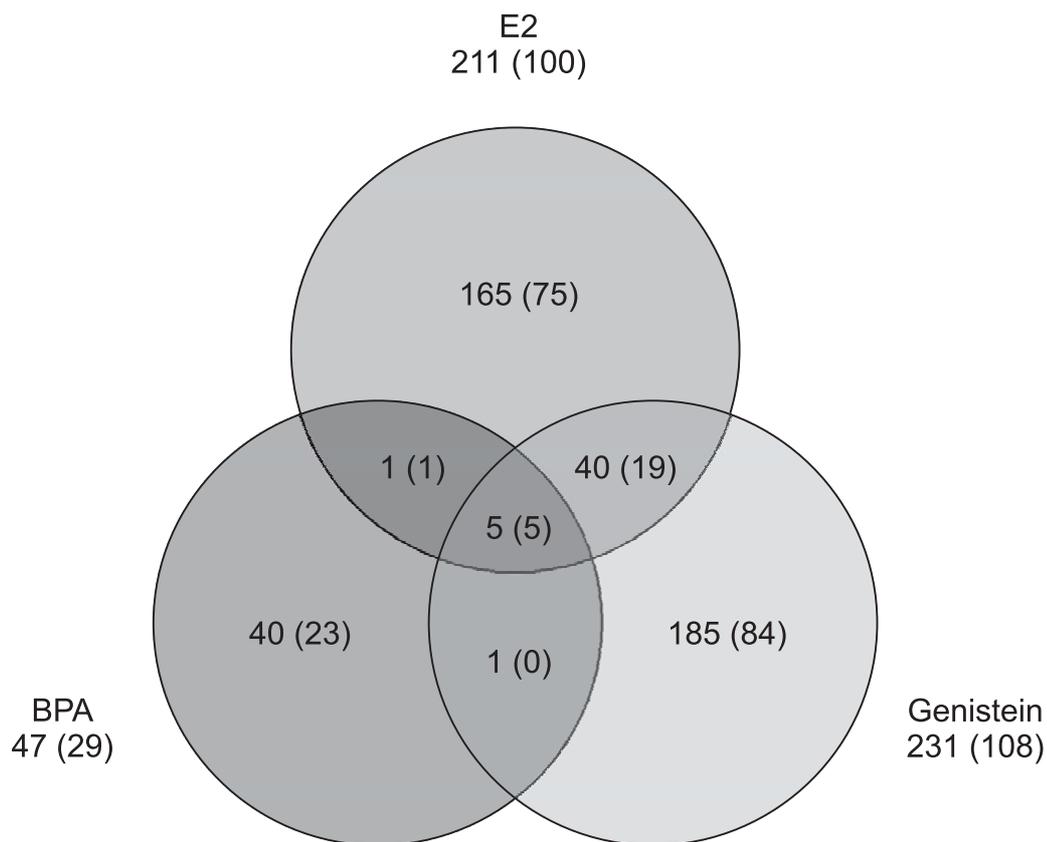


Abbildung 32: Venn-Diagramm zur Darstellung der Anzahl regulierter *ORFs*, die bei jeweils einer, zwei oder drei Substanzen eine Änderung der Genexpression zeigten. Aufgeführt sind jeweils die Gesamtzahl der regulierten *ORFs* sowie die Anzahl der regulierten *ETs* in Klammern.

Durch alle drei Substanzen regulierte *ORFs*

Die einzigen *ORFs*, die durch alle drei Substanzen reguliert wurden, sind verschiedene Vitellogenin-Gene. Tabelle 3 zeigt die *mean fold change* der regulierten Vitellogenin-Gene bei den drei Substanzen.

Tabelle 3: *Mean fold change* der durch E2, BPA und Genistein regulierten Vitellogenin-Gene

Substanz	<i>mean fold change</i>				
	<i>vtg2</i>	<i>vtg3</i>	<i>vtg5</i>	<i>vtg6</i>	<i>vtg7</i>
E2	445	10	411	248	442
BPA	11	3	10	13	7
Genistein	14	2	91	13	85

Die regulierten Vitellogenin-Gene *vtg2*, *vtg3*, *vtg5*, *vtg6* und *vtg7* zeigten stets die stärkste Antwort nach einer Exposition mit E2. Dabei wurden *vtg2*, *vtg7* und *vtg5* mit einem *mean fold change* von über 400 am höchsten reguliert, gefolgt von *vtg6* mit 248. Nach E2 verursachte Genistein mit einem *mean fold change* von 91 bei *vtg5* und 85 bei *vtg7* eine deutliche Gen-Antwort. BPA führte zu einer maximalen Hochregulation um das 13-fache bei *vtg6*. Nach einer Exposition mit BPA und Genistein zeigten *vtg2*, *vtg3* und *vtg6* vergleichbare Antworten in der Genexpression. *vtg3* wurde durch alle drei Substanzen mit einem *mean fold change* von 2 (Genistein), 3 (BPA) und 10 (E2) am wenigsten hochreguliert.

Durch BPA und E2 regulierte ORFs

Beim Vergleich der regulierten *ORFs* von BPA und E2 stellt man fest, dass neben den bereits aufgeführten Vitellogenin-Genen lediglich ein weiteres Gen durch beide Substanzen reguliert wurde. Dabei handelte es sich um die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*gadph*). Durch BPA wird die *gadph* um das 2,6- und 2,2-fache hochreguliert, durch E2 hingegen um das 3,3- und 2,9-fache herunterreguliert.

Durch BPA und Genistein regulierte ORFs

Durch BPA und Genistein wurde zusätzlich zu den Vitellogenin-Genen ein *ORF* reguliert, das für einen Sequenz-Abschnitt eines Zebrafisch-DNA-Klons kodiert (Zebrafish DNA sequence from clone CH211-146L13 in linkage group 6). Durch BPA zeigte dieses *TC* eine Hochregulation um das 2,3-fache und bei Genistein um das 5,2-fache.

Durch E2 und Genistein regulierte ORFs

Insgesamt wurden durch E2 und Genistein 45 *ORFs* gemeinsam reguliert (24 *ETs* und 21 *TCs*). In Tabelle 4 sind diese mit *mean fold change* aufgeführt und nach *ETs* und *TCs* sortiert.

Tabelle 4: Durch E2 und Genistein gemeinsam regulierte ORFs mit mean fold change

Bezeichnung des Open Reading Frame	mean fold change E2	mean fold change Genistein
ETs hochreguliert		
vitellogenin 2; <i>vtg2</i> [AY729644.1]	445,3	13,6
<i>Danio rerio</i> vitellogenin 7 (<i>vtg7</i>) mRNA, partial cds [AY729649.1]	442,4	85,4
vitellogenin 5; <i>vtg5</i> [NM_001025189.1]	410,5	91,3
vitellogenin 1; <i>vtg1</i> [AY034146.1]	283,5	33,8
vitellogenin 6; <i>vtg6</i> [XM_682549.1]	248,5	13,4
nicotinamide nucleotide transhydrogenase; <i>nnt</i>	94,1	3,4
receptor interacting protein kinase 5; <i>ripk5</i>	63,6	3,6
vitellogenin 3, phosphatidylcholine transfer protein; <i>vtg3</i>	9,8	2,2
cyclin B2; <i>ccnb2</i>	8,7	3,6
decapentaplegic and Vtg-related 1; <i>dvr1</i>	5,7	2,4
TCs hochreguliert		
similar to vitellogenin	159,2	5,3
Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-183C16 in linkage group 4, complete sequence	24,1	2,1
TC hoch- und herunterreguliert		
similar to alpha-2-macroglobulin-1	2,1	-2,7
ETs herunterreguliert		
hemopexin; <i>hpx</i>	-4,8	-4,7
aldolase b, fructose-bisphosphate; <i>aldob</i>	-4,1	-3,7
alcohol dehydrogenase 8a; <i>adh8a</i>	-3,1	-3,1
serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1; <i>serpinal</i>	-3,1	-4,0
wdr45 like; <i>wdr45l</i>	-2,9	-2,8
fatty acid binding protein 10, liver basic; <i>fabp10</i>	-2,7	-2,3
midkine-related growth factor; <i>mdka</i>	-2,7	-2,6
polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide E; <i>polr3e</i>	-2,6	-2,3
ras homolog gene family, member E; <i>arhe</i>	-2,5	-2,6
membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain containing 1; <i>magi1</i>	-2,4	-2,7
adiponectin receptor 1b; <i>adipor1b</i>	-2,3	-2,0
serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade C (antithrombin), member 1; <i>serpincl</i>	-2,3	-3,8
chimerin (chimaerin) 1; <i>chn1</i>	-2,2	-2,3
diencephalon/mesencephalon homeobox 1; <i>dmbx1</i>	-2,2	-2,2

Bezeichnung des <i>Open Reading Frame</i>	<i>mean fold change</i> E2	<i>mean fold change</i> Genistein
TCs herunterreguliert		
Zebrafish DNA sequence from clone CH211-234P6 in linkage group 24	-4,2	-5,5
Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-16P21 in linkage group 3	-3,1	-2,7
Zebrafish DNA sequence from clone CH211-208B16 in linkage group 8	-3,0	-2,1
zgc:92479	-2,9	-2,2
similar to Zinc finger homeobox protein 1b (Smad interacting protein 1) (SMADIP1)	-2,9	-2,9
similar to kinesin family member 1B isoform alpha	-2,6	-3,0
Zebrafish DNA sequence from clone CH211-262I1 in linkage group 11	-2,4	-2,4
zgc:103471	-2,4	-2,4
similar to Receptor-type tyrosine-protein phosphatase kappa precursor (Protein-tyrosine phosphatase kappa) (R-PTP-kappa)	-2,3	-2,4
zgc:92061	-2,3	-2,4
similar to Collagen alpha 1(XIX) chain precursor (Collagen alpha 1(Y) chain)	-2,3	-2,1
similar to Notch 2	-2,2	-2,2
zgc:91973	-2,2	-2,3
Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-161F5 in linkage group 15	-2,2	-2,3
zgc:92631	-2,2	-2,5
zgc:64115	-2,2	-2,2
similar to WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1	-2,1	-2,3
zgc:64091	-2,0	-2,4

Zusätzlich zu den bereits erläuterten Vitellogenin-Genen *vtg2*, *vtg3*, *vtg5*, *vtg6* und *vtg7* zeigte das Vitellogenin-Gen *vtg1* eine deutliche Hochregulation mit einem *mean fold change* von 284 für E2 und 34 für Genistein. Die Gene *nnt* und *ripk5* wurden durch E2 und Genistein unterschiedlich stark reguliert. Durch E2 wiesen diese eine wesentlich stärkere Regulation auf (94-fach gegenüber 3-fach für *nnt* und 64-fach gegenüber 4-fach für *ripk5*). Die Gene *ccnb2* und *dvr1* zeigten durch E2 eine etwa doppelt so starke Regulation auf als durch Genistein. Das TC mit der Bezeichnung „similar to alpha-2-macroglobulin-1“ wurde durch E2 um das 2-fache hoch- und durch Genistein um das 3-fache herunterreguliert. Die sonstigen, herunterregulierten *ETs* und *TCs* lagen bei E2

und Genistein jeweils im gleichen Bereich und erreichten einen maximalen *mean fold change* von -5.

Bewertung der Genexpressionsmuster

Die Bewertung der Genexpressionsmuster erfolgte durch funktionelle Analyse der biologischen Prozesse, die durch das *Gene Ontology Consortium*⁶ beschrieben sind. Dabei wurden die Annotationen für Genprodukte und Proteine des Zebrafährblings (*Danio rerio*) verwendet, die vom *Zebrafish Information Network* (ZFIN)⁷ bereitgestellt wurden und die Struktur der *Gene Ontologies* (GOs) berücksichtigt.

Von den insgesamt 14067 *ORFs*, die auf dem Gesamtgenom-Array repräsentiert waren, konnten lediglich 7623 in *GOs* eingruppiert werden. Nach Berücksichtigung der Struktur der *GOs*, waren diese 7623 *ORFs* in 1717 verschiedenen *GOs* vertreten.

Dann erfolgte die Einteilung der durch die drei Substanzen regulierten *ORFs* in *GOs*. In Abbildung 33 sind mit Hilfe eines Venn-Diagramms die Anzahl der *ORFs* dargestellt, die bei jeweils einer, zwei oder drei Substanzen in *GOs* eingeteilt werden konnten.

⁶ Homepage des *Gene Ontology Project*: <http://www.geneontology.org/>

⁷ Homepage des ZFIN: <http://zfin.org/>

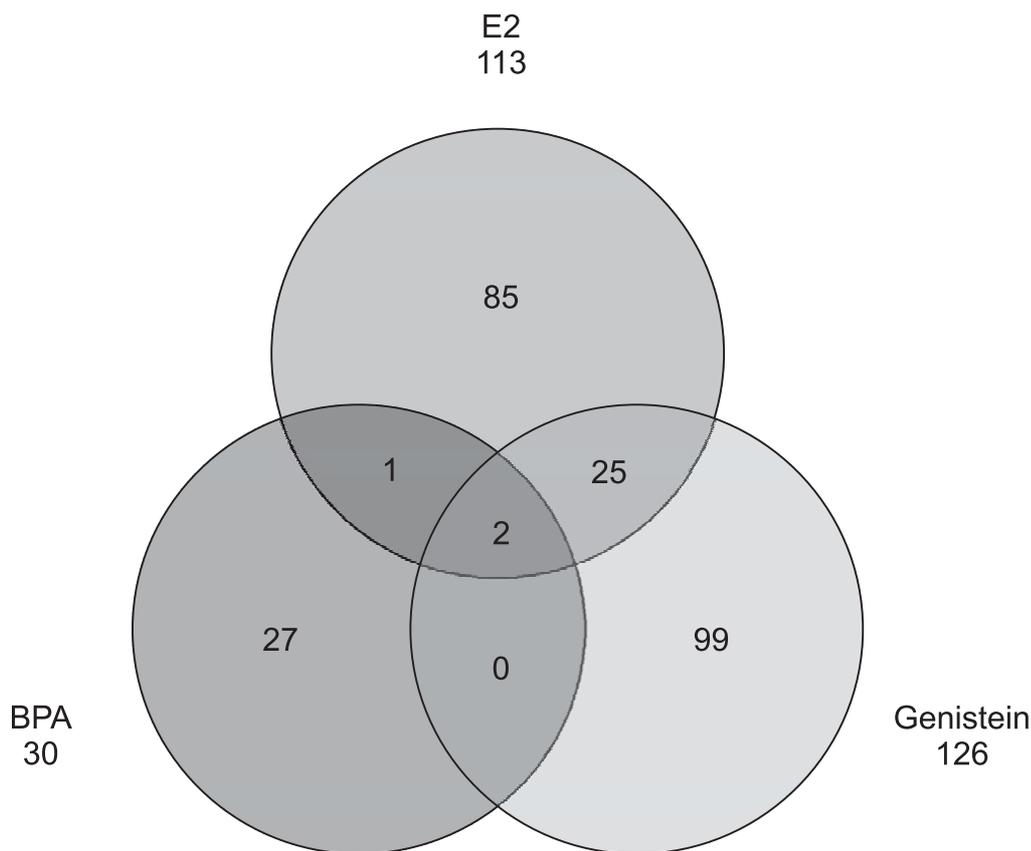


Abbildung 33: Venn-Diagramm zur Darstellung der Anzahl regulierter *ORFs*, die bei jeweils einer, zwei oder drei Substanzen in *GOs* eingruppiert werden konnten

Die einzigen zwei Gene, die von allen drei Substanzen reguliert wurden und *GOs* zugeordnet werden konnten, waren die Vitellogenin-Gene *vtg3* und *vtg5*. Für die drei Vitellogenin-Gene *vtg2*, *vtg6* und *vtg7*, die ebenfalls durch alle drei Substanzen eine Änderung ihrer Expression zeigten, erfolgte keine Eingruppierung in *GOs*, da sie noch nicht in der Datenbank enthalten waren. Aus diesem Grund wurden sie auch nicht bei der statistischen Auswertung berücksichtigt. Alle zugeordneten *ORFs* kodierten für Gene.

Im Anschluss wurden für jede Substanz die *GOs* ermittelt, die im Vergleich zum Gesamtgenom-Array ein erhöhtes Vorkommen aufwiesen. Dabei wurde für jede Funktion die Fehlerwahrscheinlichkeit der Anreicherung (*p-value*) statistisch abgeschätzt. *GOs* mit einem *p-value* kleiner als 0,05 wurden als angereichert eingestuft. Das bedeutet, dass die einzelne Funktion mit 95%iger Wahrscheinlichkeit angereichert war. Dann wurden die Ergebnisse mit Hilfe der Bonferroni-Methode (multiples Testen) korrigiert. Die Bonferroni-Methode beruht auf dem Prinzip, bei jeder einzelnen Funktion die Signifikanz so hoch zu wählen, dass man insgesamt wieder 95% erreicht. Hierbei wurden nur die 806 *GOs* berücksichtigt, die mindestens fünf regulierte Gene aufwiesen. Nach

Durchführung der Bonferroni-Methode galt eine Funktion als signifikant angereichert, wenn sie einen $p\text{-value}_{\text{Bonferroni}}$ von kleiner als 0,1 aufwies.

In Tabelle 5 bis Tabelle 7 sind die Ergebnisse der funktionellen Analysen für die Substanzen E2, BPA und Genistein dargestellt. Dabei sind zu den angereicherten *GOs* die durch die jeweilige Substanz regulierten Gene aufgeführt. Signifikant angereicherte *GOs* sind beim $p\text{-value}$ mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

Tabelle 5: Angereicherte Funktionen in Zebraärbling-Männchen nach Exposition mit 500 ng/L E2 für elf Tage

<i>Gene Ontology Nr.</i>	<i>Funktion</i>	<i>Regulierte Gene</i>	<i>p-value</i>
GO:0005319	lipid transporter activity	<i>vtg1, vtg3, vtg5</i>	0.002200
GO:0005200	structural constituent of cytoskeleton	<i>acta1, bactin1, bactin2</i>	0.004593
GO:0005884	actin filament	<i>acta1, bactin1, bactin2</i>	0.004593
GO:0006006	glucose metabolism	<i>aldob, eno1, gapdh, gapdhs, hibadh</i>	0.007899
GO:0004887	thyroid hormone receptor activity	<i>esr1, nr1d1</i>	0.008783
GO:0006869	lipid transport	<i>vtg1, vtg3, vtg5</i>	0.009571
GO:0006096	glycolysis	<i>aldob, eno1, gapdh, gapdhs</i>	0.017225
GO:0006066	alcohol metabolism	<i>adh8a, aldob, eno1, gapdh, gapdhs, hibadh</i>	0.017339
GO:0006092	main pathways of carbohydrate metabolism	<i>aldob, eno1, gapdh, gapdhs, hibadh</i>	0.021553
GO:0015629	actin cytoskeleton	<i>acta1, bactin1, bactin2, myo6a</i>	0.029418
GO:0051287	NAD binding	<i>gapdh, gapdhs, hibadh</i>	0.035113
GO:0004386	helicase activity	<i>chd11, ercc3, smarca4, zgc:63517</i>	0.043104

Nach einer elftägigen Exposition mit 500 ng/L E2 konnten in den Zebraärbling-Männchen keine signifikant angereicherten Funktionen (*GOs*) festgestellt werden. Unter Ignorieren des multiplen Testens wurden zwölf angereicherte *GOs* bestimmt (bei $p\text{-value} < 0,05$). Dabei zeigten die regulierten Gene *vtg1*, *vtg3* und *vtg5* eine Häufung bei den Funktionen „Lipidtransport“ und „Lipidtransportaktivität“. Die Gene *esr1* und *nr1d1* wurden der Funktion „Thyroidhormonrezeptoraktivität“ zugeordnet. Auffällig war auch eine Häufung von Genen bei Funktionen, die mit dem Zytoskelett (*acta1*, *bactin1*, *bactin2*, *myo6a*) oder dem Glukose-/ Alkoholmetabolismus (*adh8a*, *aldob*, *eno1*, *gapdh*, *gapdhs*, *hibadh*) in Zusammenhang stehen.

Tabelle 6: Angereicherte Funktionen in Zebrafisch-Männchen nach Exposition mit 1000 µg/L BPA für elf Tage, *: signifikant nach Durchführung der Bonferroni-Methode

Gene Ontology Nr.	Funktion	Regulierte Gene	p-value
GO:0003735	structural constituent of ribosome	<i>rpl13a, rpl18a, rpl24, rpl4, rpl7a, rps7, zgc:92237</i>	0.000003*
GO:0005840	ribosome	<i>rpl13a, rpl18a, rpl24, rpl4, rpl7a, rps7, zgc:92237</i>	0.000003*
GO:0030529	ribonucleoprotein complex	<i>rpl13a, rpl18a, rpl24, rpl4, rpl7a, rps7, zgc:103632, zgc:92237</i>	0.000007*
GO:0006412	protein biosynthesis	<i>eef2l, rpl13a, rpl18a, rpl24, rpl4, rpl7a, rps7, zgc:92237</i>	0.000173
GO:0005198	structural molecule activity	<i>rpl13a, rpl18a, rpl24, rpl4, rpl7a, rps7, zgc:92237</i>	0.000989
GO:0008199	ferric iron binding	<i>zgc:109934, zgc:92066</i>	0.001113
GO:0006826	iron ion transport	<i>zgc:109934, zgc:92066</i>	0.001426
GO:0005319	lipid transporter activity	<i>vtg3, vtg5</i>	0.002161
GO:0006879	iron ion homeostasis	<i>zgc:109934, zgc:92066</i>	0.002161
GO:0000398	nuclear mRNA splicing, via spliceosome	<i>sfrs11, zgc:103632</i>	0.005215
GO:0006869	lipid transport	<i>vtg3, vtg5</i>	0.005843
GO:0008380	RNA splicing	<i>sfrs11, zgc:103632</i>	0.006505
GO:0044249	cellular biosynthesis	<i>eef2l, rpl13a, rpl18a, rpl24, rpl4, rpl7a, rps7, zgc:92237</i>	0.007469
GO:0009058	biosynthesis	<i>eef2l, rpl13a, rpl18a, rpl24, rpl4, rpl7a, rps7, zgc:92237</i>	0.015098
GO:0005737	cytoplasm	<i>psmb5, rpl13a, rpl18a, rpl24, rpl4, rpl7a, rps7, slc25a5, tctp, zgc:92237</i>	0.018966
GO:0006096	glycolysis	<i>gapdh, pgam1</i>	0.027270
GO:0043234	protein complex	<i>psmb5, rpl13a, rpl18a, rpl24, rpl4, rpl7a, rps7, zgc:103632, zgc:92237</i>	0.034780
GO:0004239	methionyl aminopeptidase activity	<i>pa2g4b</i>	0.038322
GO:0015934	large ribosomal subunit	<i>rpl13a</i>	0.038322
GO:0006006	glucose metabolism	<i>gapdh, pgam1</i>	0.041151

Nach einer elftägigen Exposition mit 1000 µg/L BPA wurden in den Zebrafisch-Männchen drei signifikant angereicherte Funktionen (GOs) nachgewiesen. Diese beschreiben Funktionen an den Ribosomen. Die regulierten Gene *rpl13a, rpl18a, rpl24, rpl4, rpl7a, rps7* und *zgc:92237* waren dabei in allen drei dieser GOs eingruppiert. Zudem waren diese Gene bei weiteren GOs vertreten, die unter Ignorieren des multiplen Testens als angereichert eingestuft wurden (bei $p\text{-value} < 0,05$). Bei diesen werden Funktionen beschrieben, die mit der Protein-Biosynthese im Zusammenhang stehen (GO:0006412, GO:0044249, GO: 0009058).

Die regulierten Gene *vtg3* und *vtg5* waren bei den Funktionen „Lipidtransport“ und „Lipidtransportaktivität“ vertreten. Weiteren Genen konnten verschiedene Funktionen zum Glukose- (GO:0006096, GO:0006006) und Eisenmetabolismus (GO:0008199, GO:0006826, GO:0006879) zugeordnet werden.

Tabelle 7: Angereicherte Funktionen in Zebrafisch-Männchen nach Exposition mit 5000 µg/L Genistein für elf Tage, *: signifikant nach Durchführung der Bonferroni-Methode

Gene Ontology Nr.	Funktion	Regulierte Gene	p-value
GO:0051301	cell division	<i>ccna1, ccna2, ccnb1, ccnb2, cdc2, cdc20, smarca2</i>	0.000070*
GO:0019031	viral envelope	<i>zp2, zp2.2, zp2.4</i>	0.000189
GO:0005319	lipid transporter activity	<i>vtg1, vtg3, vtg5</i>	0.002767
GO:0019439	aromatic compound catabolism	<i>hgd, zgc:56326</i>	0.006961
GO:0007596	blood coagulation	<i>f2, fgg, plg</i>	0.008502
GO:0043085	positive regulation of enzyme activity	<i>chn1, chn1</i>	0.010257
GO:0006869	lipid transport	<i>vtg1, vtg3, vtg5</i>	0.011908
GO:0006270	DNA replication initiation	<i>mcm2, mcm4</i>	0.023334
GO:0000074	regulation of progression through cell cycle	<i>ccna1, ccna2, ccnb1, ccnb2, dvr1</i>	0.027547
GO:0005096	GTPase activator activity	<i>chn1, zgc:66165</i>	0.028654
GO:0006446	regulation of translational initiation	<i>bzwl, zgc:56330</i>	0.028654
GO:0051258	protein polymerization	<i>cyp11a1, fgg, tubb2c</i>	0.029243
GO:0000226	microtubule cytoskeleton organization and biogenesis	<i>cyp11a1, tubgcp5</i>	0.034406
GO:0005083	small GTPase regulator activity	<i>chn1, gdi2</i>	0.040564
GO:0009072	aromatic amino acid family metabolism	<i>hgd, zgc:56326</i>	0.047101
GO:0043087	regulation of GTPase activity	<i>chn1, gdi2</i>	0.047101

Nach einer elftägigen Exposition mit 5000 µg/L Genistein wurde in den Zebrafisch-Männchen eine signifikant angereicherte Funktion (GO) nachgewiesen. Diese beschreibt die Funktion „Zellteilung“. Als regulierte Gene wurden dieser Funktion *ccna1*, *ccna2*, *ccnb1*, *ccnb2*, *cdc2*, *cdc20* und *smarca2* zugeordnet. Unter Ignorieren des multiplen Testens wurden 15 weitere, angereicherte GOs festgestellt (bei $p\text{-value} < 0,05$). Dabei wurden die Gene *zp2*, *zp2.2* und *zp2.4* der Funktion mit der Bezeichnung „virale Umhüllung“ zugeordnet. Die Gene *vtg1*, *vtg3* und *vtg5* zeigten eine Häufung bei den Funktionen „Lipidtransport“ und „Lipidtransportaktivität“. Das Gen *chn1* wurde in vier verschiedenen GOs eingeteilt, denen eine GTPase-Regulation oder Enzym-Aktivität zugeschrieben wird. Weiteren Genen konnten Funktionen zum Katabolismus aromatischer Verbindungen (GO:0019439), zur Blutgerinnung (GO:0007596) und zur Einleitung der DNA-Replikation (GO:0006270) zugeordnet werden.

3.5 Subset-Arrays

Mit den selbst hergestellten *Subset-Arrays*, die eine Auswahl von Sonden trugen, für die eine Regulation erwartet wurde, wurden weitere Konzentrationen von E2, BPA und Genistein untersucht. Die Fertigung der Microarrays, die Hybridisierung der Proben, das Scannen sowie die Auswertung erfolgten nach den in den Abschnitten 2.2.4 bis 2.2.7 beschriebenen Methoden. Dabei wurden für die Hybridisierungen ausschließlich Fluoreszenz-markierte cDNA-Proben verwendet, die zuvor mit Hilfe der Kontroll-PCR überprüft wurden. Insgesamt wurden bei E2 50, bei BPA 56 und bei Genistein 48 Hybridisierungsexperimente durchgeführt. In jedem Hybridisierungsexperiment wurden zwei unterschiedlich Fluoreszenz-markierte Proben aus einem exponierten Fisch und einem Kontrollfisch eingesetzt. Die überlagerten Bilddaten der gescannten Microarrays zeigten bei allen Experimenten, dass die *Subset-Arrays* im Vergleich zu kommerziell erhältlichen Arrays von sehr hoher Qualität waren und die Hybridisierungen der Proben erfolgreich durchgeführt wurden. Abbildung 34 zeigt exemplarisch die überlagerten Bilddaten von zwei *Subset-Arrays*, die mit verschiedenen Proben hybridisiert wurden.

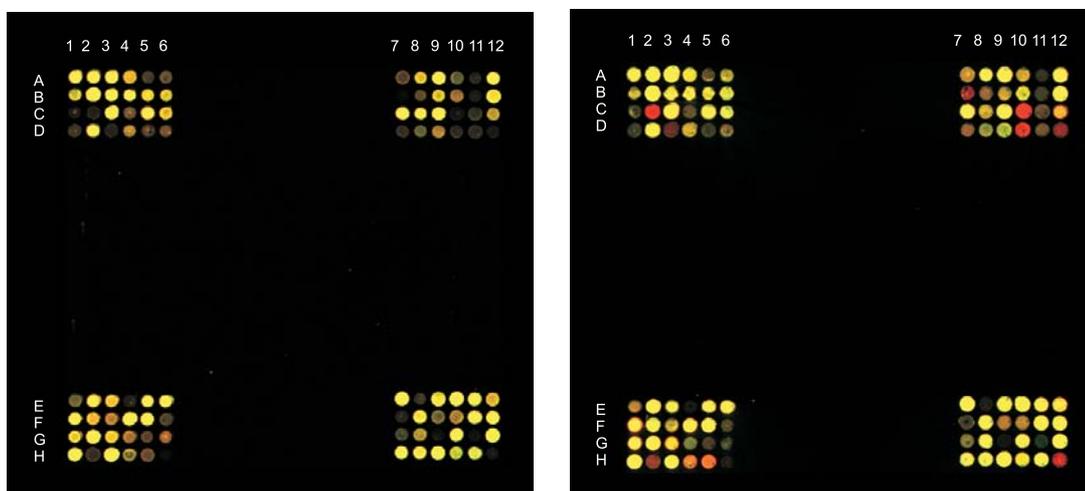


Abbildung 34: *Subset-Arrays* nach Hybridisierung mit verschiedenen Proben

- links: Hybridisierung mit einer Cy3-markierten Probe eines männlichen Kontrolltieres und einer Cy5-markierten Probe eines Zebraabärbling-Männchens, das mit 1 $\mu\text{g/L}$ Genistein exponiert wurde
- rechts: Hybridisierung mit einer Cy3-markierten Probe eines männlichen Kontrolltieres und einer Cy5-markierten Probe eines Zebraabärbling-Männchens, das mit 5000 $\mu\text{g/L}$ Genistein exponiert wurde

In Abbildung 34 links sind vorwiegend gelbe Spots zu erkennen. Dies weist auf eine gleichstarke Expression im männlichen Kontrolltier und dem mit 1 $\mu\text{g/L}$ Genistein ex-

ponierten Zebraärbling-Männchen hin. Eine Exposition mit dieser verhältnismäßig geringen Konzentration hatte somit bei den zwei untersuchten Fischen keinen Einfluss auf die Genexpression des Lebergewebes. Nach der Hybridisierung von Proben eines Kontrolltieres und eines mit 5000 µg/L Genistein exponierten Fisches sind vermehrt intensive, rote Signale erkennbar, die auf eine erhöhte Expression im exponierten Männchen schließen lässt (siehe Abbildung 34 rechts). Die Spots mit deutlichen, roten Signalen sind an den Positionen B7 (hemopexin, *hpx*), C2 (mesoderm posterior b, *mespb*), C10 (zona pellucida glycoprotein 2.4, *zp2.4*), D10 (zona pellucida glycoprotein 2.2, *zp2.2*), D12 (zona pellucida glycoprotein 3b, *zp3b*) und H12 (zgc:114012, *vtg5*) vorzufinden.

Für eine erfolgreiche Auswertung der überlagerten Bilddaten sind die Qualität der einzelnen Spots und ein geringes Hintergrundsignal entscheidend. In Abbildung 35 ist ein Bereich eines *Subset-Arrays* vergrößert dargestellt. Die einzelnen Spots sind kreisrund und heben sich deutlich vom dunklen Hintergrund ab.

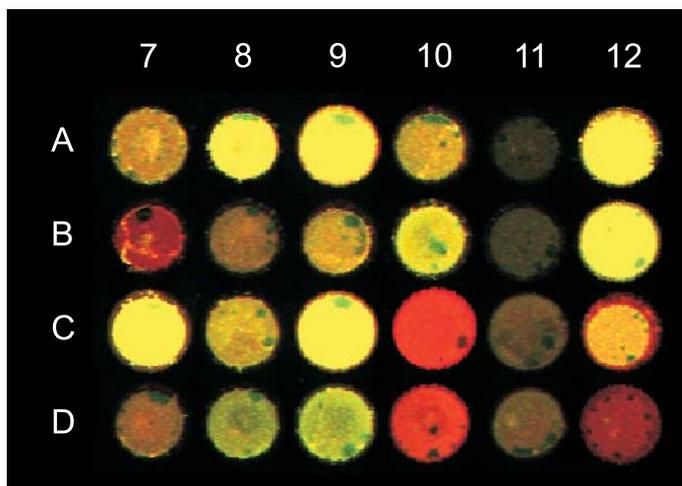


Abbildung 35: Vergrößerter Bereich eines *Subset-Arrays* nach Hybridisierung zur Darstellung von einzelnen Spots, um die Qualität zu überprüfen
Hybridisierung einer Cy3-markierten Probe eines männlichen Kontrolltieres und einer Cy5-markierten Probe eines Zebraärbling-Männchens, das mit 5000 µg/L Genistein exponiert wurde

Nach der Überlagerung der Bilddaten erfolgte mit Hilfe der *Microarray Analysis Software ImaGene 5.0* die Auslesung der Intensitäten und Hintergrundsignale der einzelnen Spots. Dabei wurden je nach untersuchter Substanz das entsprechende *Grid* (Raster) und die *Gene ID* verwendet (siehe Abschnitt 2.2.4). Das *Grid* wurde so ausgerichtet, dass jeder Spot exakt erfasst wurde (siehe Abbildung 36).

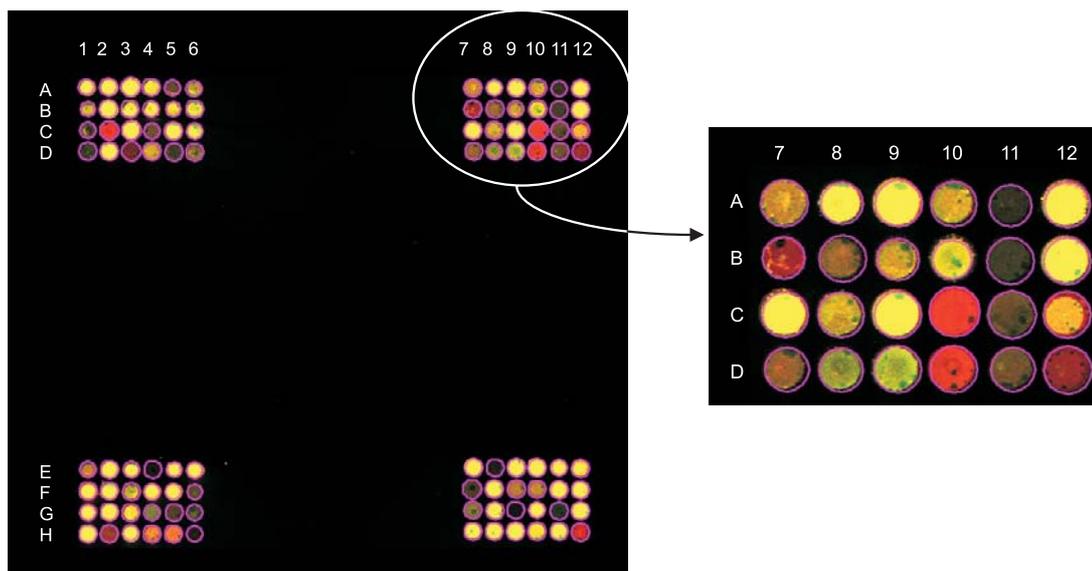


Abbildung 36: Erfassung und Zuordnung der Spots eines *Subset-Arrays* mit 96 Sonden (Genistein-Experiment) durch Verwendung des *Grids* (Rasters)

Insgesamt umfassten die Arbeiten mit den *Subset-Arrays* für jede Substanz die in Tabelle 8 aufgeführte Anzahl von Konzentrationsstufen, Proben und Experimenten. Als Proben dienten die Lebergewebe von männlichen Zebrafärblingen, die für elf Tage den in Tabelle 9 aufgeführten Konzentrationen ausgesetzt wurden oder in den Kontrollbecken des Durchflusssystemes gehalten wurden (Negativkontrollen). Wegen des unterschiedlich guten Einbaus von Cy3- und Cy5-dCTP in die cDNA erfolgte wie bei den Gesamtgenom-Arrays ein *color-flip* der Proben.

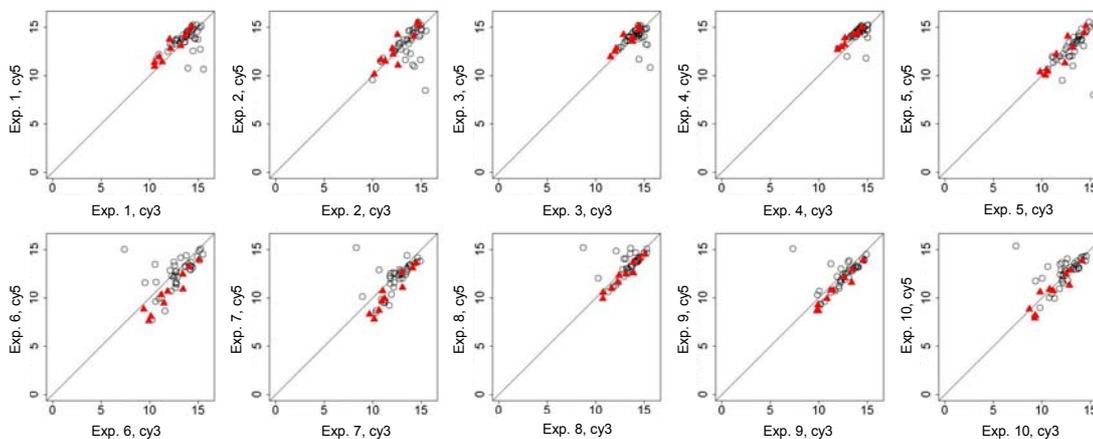
Tabelle 8: Umfang der Arbeiten mit *Subset-Arrays*

Substanz	Konzentrationsstufen	Proben je Konzentrationsstufe	Anzahl		
			Negativkontrollen	Proben gesamt	Hybridisierungsexperimente
E2	5	10	50	100	50
BPA	7	8	56	112	56
Genistein	6	8	48	96	48

Tabelle 9: Konzentrationen der Substanzen bei Experimenten mit Subset-Arrays

Substanz	Konzentrationen
E2	5; 50; 100; 200; 500 ng/L
BPA	0,1; 2; 20; 200; 400; 1000; 2000 $\mu\text{g/L}$
Genistein	1; 10; 100; 500; 1000; 5000 $\mu\text{g/L}$

Die Datenauswertung der Messergebnisse erfolgte nach den in Abschnitt 2.2.7.2 beschriebenen Verfahren. Dabei wurden die Daten über zehn Sonden normalisiert, die spezifisch an *Housekeeping* Gene des Zebrafärblings binden. Die Normalisierung umfasste die *On-chip*- und *Inter-chip*-Normalisierung. Bei der *On-chip*-Normalisierung wurden die Expressionswerte als *Scatterplot* (Punktwolke) dargestellt (Cy3 gegen Cy5). In Abbildung 37 sind exemplarisch die Expressionswerte der zehn Hybridisierungsexperimente abgebildet, bei denen jeweils die Proben eines Kontrolltieres und eines mit 500 ng/L E2 exponierten Tieres hybridisiert wurden. Im Anschluss wurde eine Ursprungsgerade an die *Housekeeping* Gene angelegt und die Expressionswerte an dieser linear normalisiert (siehe Abbildung 38).

**Abbildung 37:** *Scatterplots* (Punktwolken) der Expressionswerte vor Durchführung der *On-chip*-Normalisierung (Cy3 gegen Cy5).

Aufgetragen sind die Expressionswerte der Hybridisierungsexperimente mit Proben von Kontrolltieren und exponierten Tieren (500 ng/L E2). Die Expressionswerte der *Housekeeping* Gene sind als rote Dreiecke dargestellt. Exp.: Experiment, cy3: Expressionswert der Cy3-dCTPs, cy5: Expressionswert der Cy5-dCTPs

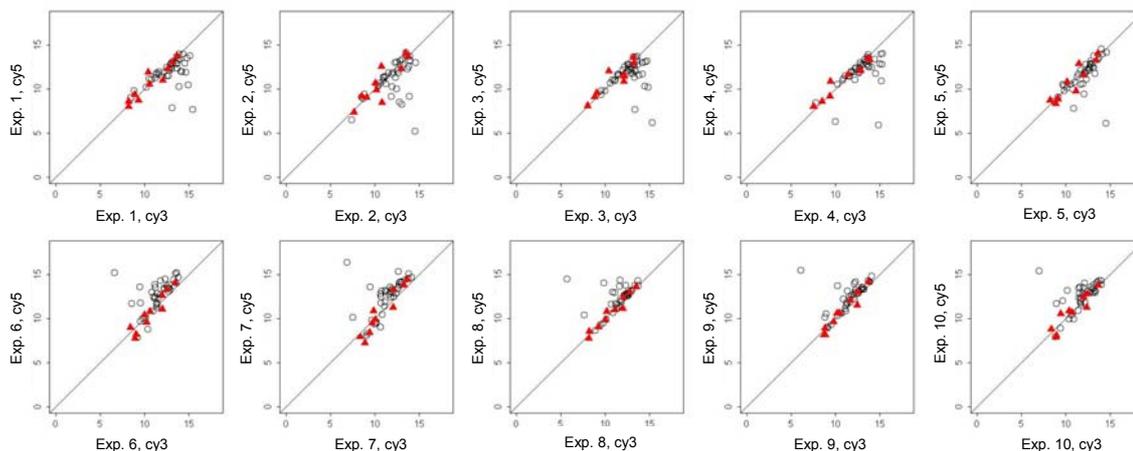


Abbildung 38: Scatterplots (Punktwolken) der Expressionswerte nach Durchführung der *On-chip*-Normalisierung (Cy3 gegen Cy5).

Aufgetragen sind die Expressionswerte der Hybridisierungsexperimente mit Proben von Kontrolltieren und exponierten Tieren (500 ng/L E2). Die Expressionswerte der *Housekeeping* Gene sind als rote Dreiecke dargestellt. Exp.: Experiment, cy3: Expressionswert der Cy3-dCTPs, cy5: Expressionswert der Cy5-dCTPs

Bei der nachfolgenden *Inter-chip*-Normalisierung wurden für jedes Experiment die Expressionswerte der Cy3-dCTPs und Cy5-dCTPs des jeweiligen Microarrays über den Mittelwerten der Cy3-dCTPs und Cy5-dCTPs der anderen Microarrays als *Scatterplot* dargestellt (siehe Abbildung 39). Dann wurde eine Gerade an die aufgetragenen Werte der *Housekeeping* Gene angelegt und die Expressionswerte gegen diese linear normalisiert (siehe Abbildung 40).

Nach der Normalisierung der Daten war bei allen Experimenten die Verteilung der Expressionswerte geglättet und es wurde mit der statistischen Auswertung fortgefahren (siehe Abschnitt 2.2.7.2). Dabei wurden für alle untersuchten Substanzen Listen erstellt, die Auskunft über die Regulation der gespotteten Sonden bei den verschiedenen Konzentrationen geben. Bei der Erstellung der Listen wurde der *p-value* auf kleiner 0,05 gesetzt. Das bedeutet, dass die einzelne Sonde mit 95%iger Wahrscheinlichkeit signifikant reguliert wurde. Im Anschluss wurden die Ergebnisse mit Hilfe der Bonferroni-Methode korrigiert. Die Bonferroni-Methode beruht auf dem Prinzip, bei jedem Einzeltest die Signifikanz so hoch zu wählen, dass insgesamt wieder eine Signifikanz von 95% erreicht wird. Die Abschätzung der Fehlerwahrscheinlichkeit erfolgte beim multiplen Testen (Bonferroni-Korrektur) über die **Family-Wise Error Rate (FWER)**. Sie ist definiert als die Wahrscheinlichkeit von mindestens einem falsch positiven Wert unter der Kandidatenliste.

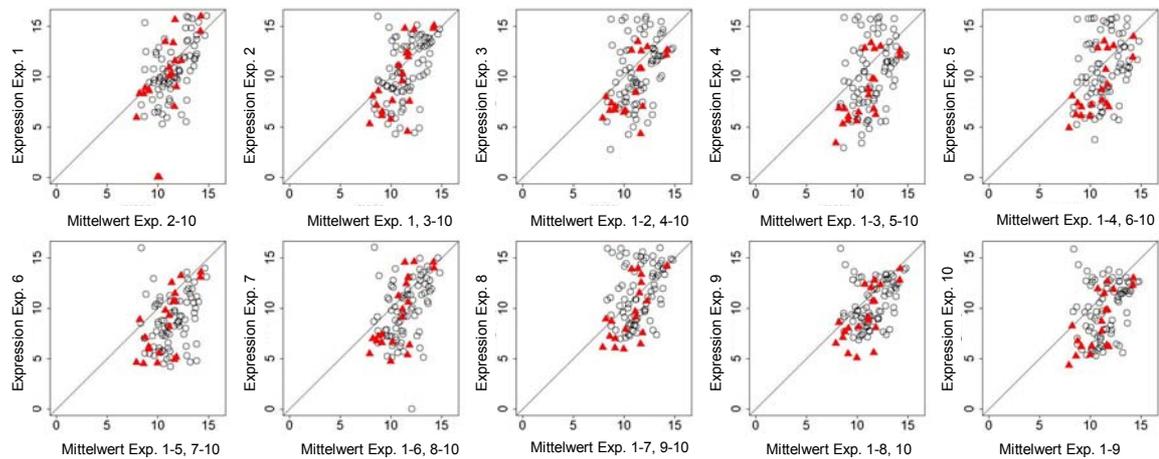


Abbildung 39: Scatterplots (Punktwolken) der Expressionswerte vor Durchführung der *Inter-chip*-Normalisierung (Cy3 und Cy5).

Aufgetragen sind die entsprechenden Mittelwerte der anderen Microarrays (Cy3 und Cy5) gegen die Expressionswerte des jeweiligen Experiments/Microarrays. Die Proben der Hybridisierungsexperimente stammten von Kontrolltieren und mit 500 ng/L E2 exponierten Tieren. Die Expressions-/Mittelwerte der *Housekeeping* Gene sind als rote Dreiecke dargestellt. Exp.: Experiment, Expression: Expressionswert

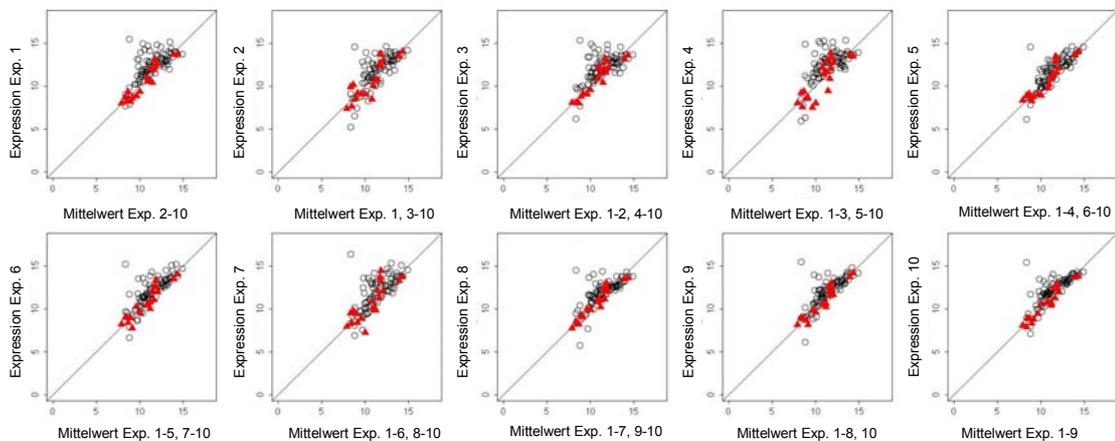


Abbildung 40: Scatterplots (Punktwolken) der Expressionswerte nach Durchführung der *Inter-chip*-Normalisierung (Cy3 und Cy5).

Aufgetragen sind die entsprechenden Mittelwerte der anderen Microarrays (Cy3 und Cy5) gegen die Expressionswerte des jeweiligen Experiments/Microarrays. Die Proben der Hybridisierungsexperimente stammten von Kontrolltieren und mit 500 ng/L E2 exponierten Tieren. Die Expressions-/Mittelwerte der *Housekeeping* Gene sind als rote Dreiecke dargestellt. Exp.: Experiment, Expression: Expressionswert

Experimente mit E2

Tabelle 10 zeigt für die verschiedenen Konzentrationen von E2 den *mean fold change* der regulierten *Open Reading Frames (ORFs)*. Mit 34 von den insgesamt 50 gespotteten Sonden konnten regulierte *ORFs* nachgewiesen werden. Die blau markierten Werte

wurden mit Hilfe der Bonferroni-Methode korrigiert. Für diese war nach der Abschätzung der *FWER* eine Signifikanz bei einem individuellen *p-value* von $p < 0,001$ gegeben. Die Werte in Klammern wurden unter Ignorieren des multiplen Testens ermittelt und zeigten nach Durchführung der Bonferroni-Korrektur keine signifikante Regulation mehr auf.

Tabelle 10: Regulation der ORFs nach elftägiger Exposition mit 5, 50, 100, 200 und 500 ng/L E2 bei $p < 0,05$.

Angegeben ist der mean fold change. Werte in Klammern zeigen mean fold change für unkorrigierte *p-values*. n. s.: nicht signifikant

Bezeichnung des Open Reading Frame	5 ng/L	50 ng/L	100 ng/L	200 ng/L	500 ng/L
DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 15	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	[1,4]
estrogen receptor 1	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	[1,4]
integrin beta1 subunit-like protein 2	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	[1,4]
vitellogenin 1; <i>vtg1</i>	n. s.	n. s.	n. s.	[5,7]	5,3
hemopexin	n. s.	n. s.	n. s.	[-1,5]	n. s.
similar to vitellogenin 3 precursor	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	1,5
Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-14F20 in linkage group 8	n. s.	n. s.	[-1,2]	[-1,3]	1,5
carbohydrate (chondroitin) synthase 1	[-1,3]	n. s.	[-1,3]	n. s.	1,7
<i>zgc:56425</i>	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	1,7
mesoderm posterior b	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	[-1,3]
excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 3	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	4,5
Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-225F5 in linkage group 3	[-1,4]	n. s.	[-1,3]	n. s.	2,0
elongation factor 1-alpha	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	2,0
forkhead box P2	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	2,0
<i>Danio rerio</i> vitellogenin 7 (<i>vtg7</i>) mRNA, partial cds	n. s.	n. s.	n. s.	27,3	457,5
<i>pdgfa</i> associated protein 1; <i>pdap1</i>	[-1,5]	n. s.	n. s.	[1,8]	15,2
receptor interacting protein kinase 5	n. s.	n. s.	[-1,2]	[1,5]	3,8
<i>zgc:92055</i>	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	-1,3
similar to Forkhead box protein P1	[-1,3]	n. s.	n. s.	n. s.	2,2
Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-8O19 in linkage group 20	[-1,5]	n. s.	n. s.	n. s.	1,8
similar to ubiquitin specific protease 8	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	[1,5]
<i>zgc:76908, gapdhs</i>	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	[-1,4]
Zebrafish DNA sequence from clone CH211-162M14	[-1,3]	n. s.	n. s.	n. s.	1,6
<i>zgc:65956</i>	n. s.	n. s.	n. s.	[-1,4]	[1,3]
nicotinamide nucleotide transhydrogenase	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	3,0
bactin2	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	-2,4
elongation factor 1-alpha	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	1,5
similar to myosin containing PDZ domain	n. s.	n. s.	n. s.	[-1,3]	[1,4]
homeo box A3a	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	[-1,1]
<i>zgc:65770, ctnnb2</i>	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	[1,3]
<i>zgc:109868</i>	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	11,1
decapentaplegic and Vtg-related 1; <i>dvr1</i>	n. s.	n. s.	n. s.	[1,8]	4,2
<i>zgc:55856</i>	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	[-1,5]
vitellogenin 3, phosvitinless; <i>vtg3</i>	n. s.	n. s.	n. s.	[2,3]	2,9

Die Ergebnisse aus Tabelle 10 zeigen, dass nach Durchführung der Bonferroni-Methode 22 verschiedene *ORFs* signifikant reguliert wurden (blau markiert). Diese sind alle in der Gruppe von 500 ng/L E2 vertreten. Das für Vitellogenin 7 kodierende Gen *vtg7* zeigte mit einem *mean fold change* von 457,5 mit Abstand die stärkste Hochregulation. Dieses war auch nach einer Exposition mit 200 ng/L E2 das einzige Gen/*ORF*, das reguliert wurde (27,3-fach). Bei den niedrigeren Konzentrationen von 5, 50 und 100 ng/L E2 konnte keine signifikante Regulation eines *ORFs* nachgewiesen werden.

Fast alle der regulierten *ORFs* wurden hochreguliert. Dieser Effekt wurde auch bei den Untersuchungen mit den Gesamtgenom-Arrays festgestellt und war erwartet. Auffällig war die Regulation von *ef1a*, das um das 1,5- und 2,0-fache hochreguliert wurde. Dieses Gen zeigte bei den Untersuchungen mit den Gesamtgenom-Arrays keine Regulation und wurde deshalb als *Housekeeping* Gen für die Normalisierung der Daten verwendet.

Die Ergebnisse unter Ignorieren des multiplen Testens (Werte in Klammern) sind mit einer relativ großen Fehlerwahrscheinlichkeit behaftet und können daher nur bedingt verwendet werden. Durch Festsetzung eines Grenzwertes beim *mean fold change* bei $> 1,5$ sind jedoch relative Aussagen über die Regulation möglich.

Betrachtet man die vorliegenden Ergebnisse unter diesem Kriterium, waren bei den Konzentrationen 5, 50 und 100 ng/L E2 keine regulierten *ORFs* feststellbar. Bei 200 ng/L E2 zeigten hingegen zusätzlich die *ORFs vtg1* (5,7), *vtg3* (2,9) *pdap1* (1,8) und *dvr1* (1,8) eine Regulation. Diese vier Gene wiesen auch nach Durchführung der Bonferroni-Korrektur eine deutliche, signifikante Regulation bei 500 ng/L E2 auf. In der Gruppe von 500 ng/L E2 wurden durch Anwendung dieses Kriteriums sonst keine weiteren *ORFs* reguliert.

Experimente mit BPA

In Tabelle 11 sind für die verschiedenen Konzentrationen von BPA die *mean fold changes* der regulierten *ORFs* aufgeführt. Mit 47 von den insgesamt 87 gespotteten Sonden konnten eine Regulation von *ORFs* nachgewiesen werden, allerdings ausschließlich unter Ignorieren des multiplen Testens. Nach Abschätzung der *FWER* war für eine signifikante Regulation ein individueller *p-value* von $p < 0,00057$ einzuhalten.

Die Ergebnisse zu den Experimenten mit BPA zeigen, dass auch unter Ignorieren des multiplen Testens (Werte in Klammern) lediglich eine geringe Regulation der *ORFs* nachgewiesen werden konnte. Bei Berücksichtigung der Ergebnisse mit einem *mean fold change* von $> 1,5$ waren bei den Konzentrationen 0,1, 2, 20, 200 und 400 $\mu\text{g/L}$ BPA keine regulierten *ORFs* feststellbar. Bei 1000 $\mu\text{g/L}$ BPA zeigte ausschließlich das Gen *vtg7* eine Hochregulation auf (3,8-fach). Bei 2000 $\mu\text{g/L}$ BPA wurden die *ORFs* *vtg7* (9,9) *pdap1* (2,6), *vtg6* (2,3), *zgc:109868* (2,3) und *zgc:92237* (2,0) reguliert.

Experimente mit Genistein

Tabelle 12 zeigt für die verschiedenen Konzentrationen von Genistein den *mean fold change* der regulierten *ORFs*. Mit 41 von den insgesamt 96 gespotteten Sonden konnten regulierte *ORFs* detektiert werden. Die mit Hilfe der Bonferroni-Methode korrigierten Ergebnisse sind blau markiert. Für diese war nach der Abschätzung der *FWER* eine Signifikanz bei einem individuellen *p-value* von $p < 0,00052$ gegeben. Die Werte in Klammern wurden unter Ignorieren des multiplen Testens ermittelt und zeigten nach Durchführung der Bonferroni-Korrektur keine signifikante Regulation mehr auf.

Die Ergebnisse aus Tabelle 12 zeigen, dass nach Durchführung der Bonferroni-Methode ausschließlich das Gen *slc2a5* (solute carrier family 2 [facilitated glucose/fructose transporter], member 5) mit einem *mean fold change* von 1,1 bei einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/L}$ Genistein signifikant reguliert wurde (blau markiert). Beim Ignorieren des multiplen Testens wies dieses Gen ebenfalls eine geringe Regulation bei 1 $\mu\text{g/L}$ Genistein (1,1) und 100 $\mu\text{g/L}$ Genistein (1,2) auf.

Nach der Überprüfung der unkorrigierten Werte unter Beachtung des Grenzwertes von $> 1,5$ beim *mean fold change* konnten für die Konzentrationen 1, 10, 100, 500 und 1000 $\mu\text{g/L}$ Genistein keine regulierten *ORFs* nachgewiesen werden. Bei 5000 $\mu\text{g/L}$ Genistein zeigten die drei Gene *vtg7* (3,8), *vtg5* (2,7) und *bf* (2,0) eine Hochregulation.

Tabelle 12: Regulation der ORFs nach elftägiger Exposition mit 1, 10, 100, 500, 1000 und 5000 µg/L Genistein bei $p < 0,05$.

Angegeben ist der mean fold change. Werte in Klammern zeigen mean fold change für unkorrigierte p-values. n. s.: nicht signifikant

Bezeichnung des Open Reading Frame	1 µg/L	10 µg/L	100 µg/L	500 µg/L	1000 µg/L	5000 µg/L
zgc:56330	n. s.	n. s.	[1,2]	n. s.	n. s.	n. s.
Zebrafish DNA sequence from clone BUSM1-186F8 in linkage group 7	[-1,1]	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
similar to vitellogenin 3 precursor	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	[1,2]
midkine-related growth factor	n. s.	[1,1]	[1,2]	n. s.	n. s.	[-1,1]
similar to kinesin family member 1B isoform alpha	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	[-1,2]
coagulation factor V	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	[1,3]
<i>Danio rerio</i> mitochondrial genome, complete sequence	n. s.	[1,4]	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
similar to prominin	n. s.	n. s.	[1,1]	n. s.	n. s.	[-1,2]
decapentaplegic and Vtg-related 1	[-1,1]	[-1,2]	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
complement component factor B; <i>bf</i>	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	[-2,0]
zgc:65956	[-1,1]	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
zgc:92055	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	[-1,3]
NADH dehydrogenase subunit 5	n. s.	[1,5]	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
solute carrier family 2 (facilitated glucose/fructose transporter), member 5; <i>slc2a5</i>	[1,1]	1,1	[1,2]	n. s.	n. s.	n. s.
GATA-binding protein 2	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	[-1,3]
aldehyde dehydrogenase 3 family, member A2	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	[-1,1]	n. s.
claudin d	n. s.	n. s.	[1,1]	n. s.	n. s.	n. s.
vitellogenin 1	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	[1,3]
THO complex 2	[-1,3]	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
carbohydrate (chondroitin) synthase 1	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	[1,1]	n. s.
Kallmann syndrome 1b sequence	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	[-1,3]
swelling dependent chloride channel	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	[1,2]
zgc:92055	n. s.	[-1,2]	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
Zebrafish DNA sequence from clone CH211-162M14, complete sequence	[-1,1]	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
zgc:85811	n. s.	[1,5]	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
<i>Danio rerio</i> vitellogenin 7 (<i>vtg7</i>) mRNA, partial cds	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	[1,1]	[3,8]
homeo box A3a	n. s.	n. s.	[-1,1]	n. s.	n. s.	n. s.
similar to ubiquitin specific protease 8	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	[-1,3]
v-mos Moloney murine sarcoma viral oncogene homolog	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	[1,2]
forkhead box P2	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	[-1,1]
sine oculis homeobox homolog 4.2	[1,2]	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	[-1,3]
similar to Forkhead box protein P1	n. s.	[1,3]	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
ephrin B2a	[1,1]	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	[-1,3]
pdgfa associated protein 1	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	[1,3]
ras homolog gene family, member E	n. s.	[1,5]	[1,2]	n. s.	n. s.	[-1,3]
tubulin, alpha 7 like	[1,1]	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	[-1,3]
DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 15	n. s.	[1,2]	[1,1]	n. s.	n. s.	n. s.
zgc:114012, <i>vtg5</i>	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	[2,7]
receptor interacting protein kinase 5	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	[1,5]
zgc:103765, <i>cox17</i>	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	[-1,3]
Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-8019 in linkage group 20	n. s.	[1,1]	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.

4 Diskussion

Die DNA-Microarray-Technologie entwickelte sich in den letzten zehn Jahren zu einer der effektivsten Methoden zur gleichzeitigen Erfassung der Genexpression von tausenden von Genen sowie zur Bewertung von großen Mengen an biologischer Information (Skena *et al.* 1995; Duggan *et al.* 1999). Ihre Anwendung am Modellorganismus Zebrafisch (*Danio rerio*) konzentrierte sich bisher vorwiegend auf entwicklungsbiologische Fragestellungen, bei denen ausgewählte Gene untersucht wurden (Ton *et al.* 2002; Lo *et al.* 2003; Linney *et al.* 2004; Mathavan *et al.* 2005). Thema dieser Arbeit war die Erfassung und die Bewertung von Genexpressionsmustern von Zebrafischen nach Belastung mit östrogen wirksamen Substanzen. Hierfür wurde zunächst die Microarray-Technologie erfolgreich etabliert. Die Expositionen mit den östrogenen Substanzen 17 β -Östradiol (E2), Bisphenol A (BPA), Genistein und 17 α -Ethinylöstradiol (EE2) erfolgten im Durchflusssystem, das durch konstante Expositionsbedingungen eine kontinuierliche Belastung der Fische gewährleistete. Die Effektkonzentrationen der östrogenen Substanzen wurden mit Hilfe der quantitativen PCR (qPCR) ermittelt. Im Anschluss wurden für die Konzentrationen, bei denen eine deutliche Änderung der Genexpression von Vitellogenin nachgewiesen wurde, Experimente mit Gesamtgenom-Arrays durchgeführt und Listen mit signifikant regulierten Genen erstellt. Durch den Vergleich der regulierten Gene zwischen den Substanzen wurden schließlich Markergene identifiziert, die zum Nachweis östrogenen Wirkungen verwendet werden können. Die Bewertung der Genexpressionsmuster erfolgte durch funktionelle Analyse unter Verwendung von *Gene Ontologies*, die biologische Prozesse im Zebrafisch beschreiben. Schließlich erfolgte eine Untersuchung weiterer Konzentrationen mit *Subset-Arrays*, die eine Auswahl von Genen trugen, für die eine Regulation erwartet wurde. Dabei konnten aufschlussreiche Erfahrungen zu der Methodik gesammelt und die Nachweisgrenzen der Microarray-Technologie aufgezeigt werden.

4.1 Probennahme und -aufarbeitung

Für die vorliegende Arbeit wurden insgesamt 534 Proben aus verschiedenen Fischen verwendet. Aus diesem Grund war es besonders wichtig, bei der Probennahme und -aufarbeitung Verfahren anzuwenden, die sich zuverlässig, zeitsparend und anwen-

dungsfreundlich durchführen ließen. Daher wurden für die verschiedenen Arbeitsschritte mehrere Methoden ausprobiert und einzelne Arbeitsvorgänge optimiert.

Bei der **Probennahme** erwies es sich als bedeutend, die Fische nach dem Töten sofort auf Eis zu legen und mit der Entnahme der Lebergewebe so schnell wie möglich fortzuführen. Die Lebergewebe wurden dann in RNase-freie Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Dies verminderte deutlich die Aktivität von RNasen, die allgegenwärtig sind und die RNA abbauen.

Die sich anschließende **RNA-Extraktion** wurde mit dem „TRI REAGENT™ RNA-Isolationssystem“ durchgeführt, das auf einer Phenolisierung beruht. Dieses stellte sich gegenüber anderen Verfahren als außerordentlich zuverlässig, preiswert, anwendungsfreundlich und zeitsparend heraus. Die Homogenisierung der Gewebe erfolgte dabei mit Hilfe von Glaskügelchen in der Schwingmühle, wodurch der Zellaufschluss am Besten gelang. Als Optimierung zum Protokoll wurde der Phenolisierungsschritt wiederholt, um eine möglichst reine RNA zu erhalten. Die in der wässrigen Phase gelöste RNA wurde mit Hilfe des „Phase Lock Gels“ von Eppendorf separiert. Dieses lagert sich in der Interphase ein und ermöglicht so ein rückstandsfreies Abgießen der RNA-Lösung. Es zeigte sich außerdem, dass sich die RNA-Qualität durch restloses Beseitigen des Lösungsmittels durch Zentrifugation in der SpeedVac sowie durch Resuspendieren des RNA-Rückstands in warmen DEPC-H₂O (65°C) erhöhte. Die Überprüfung der extrahierten Proben erfolgte mit Hilfe von RNA-Gelen. Dabei zeigten alle Proben deutliche, scharfe Banden. Außerdem wurden die Konzentrationen und die Reinheit der extrahierten RNA photometrisch bestimmt. Hierfür wurden RNase-freie Einwegküvetten verwendet, so dass die Proben nach der Messung für weitere Anwendungen zur Verfügung standen. Schließlich wurde den extrahierten Proben ein RNase-Inhibitor zugegeben, um die Aktivität von RNasen zu minimieren. Für den Umgang mit RNA wurde ein eigenes Labor eingerichtet, in dem ausschließlich steril mit RNase-freien Verbrauchsmaterialien gearbeitet und nicht gesprochen wurde. Dadurch konnten Kontaminationen von Proben erfolgreich verhindert werden und eine hohe Qualität der RNA-Proben war gewährleistet.

Für die **Reverse Transkription** wurden zwei unterschiedliche Methoden angewendet. Die Synthese von cDNA für die Verwendung in qPCR-Experimenten erfolgte mit dem „1st Strand cDNA Synthesis (AMV)“-Kit von Roche. Die Synthese Fluoreszenzmarkierter cDNA für die Verwendung in Microarray-Experimenten wurde mit dem

„CyScribe First-Strand cDNA Labelling“-Kit von Amersham Biosciences durchgeführt. Da die synthetisierte cDNA aufgrund ihrer geringen Mengen nicht direkt mit Hilfe eines Gels überprüft werden konnte, wurde mit weiteren Methoden fortgefahren, die eine einwandfreie Funktion der zwei verwendeten Kits bestätigten. Bei der Durchführung der Fluoreszenz-markierenden Reversen Transkription war darauf zu achten, dass die lichtempfindlichen Cy3- und Cy5-dCTPs durch amberfarbige Reaktionsgefäße geschützt wurden.

Die **Polymerase-Kettenreaktion (PCR)** diente zur Kontrolle der Reversen Transkription, die mit dem „CyScribe First-Strand cDNA Labelling“-Kit von Amersham Biosciences durchgeführt wurde. Insgesamt wurden mit dieser Methode alle 368 Fluoreszenz-markierten cDNA-Proben überprüft, die für Microarray-Experimente verwendet wurden. Dabei wurden Primer für *β-actin* verwendet, da für dieses bei allen Tieren eine Expression erwartet wurde. Die PCR lieferte bei allen Proben Amplifikate mit einer Größe von 278 bp, die auf den DNA-Gelen deutlich sichtbar waren. Folglich waren die eingesetzten cDNA-Proben einwandfrei und die PCR funktionierte sehr gut.

Die **Einschritt-Reverse Transkription/PCR (RT/PCR)** erfolgte mit dem „cMaster™ RTplusPCR“-Kit von Eppendorf, der sich als sehr zuverlässig und schnell in der Durchführung erwies. Die RT/PCR diente vorwiegend zur Überprüfung der Qualität von RNA-Proben und Primern, die bei der qPCR eingesetzt wurden. Daneben wurde die RT/PCR angewendet, um bei einzelnen Proben die Expression des Vitellogenin 1-Gens (*vtg1*) semiquantitativ nachzuweisen. Die Vitellogenin-Genexpression findet normalerweise nur in weiblichen Fischen statt, kann jedoch unter Einwirkung östrogen wirksamer Substanzen auch in männlichen Individuen induziert werden (Bowman *et al.* 2000; Lattier *et al.* 2001). Für den Nachweis der Expression wurde ein Abschnitt von *vtg1* amplifiziert und das PCR-Produkt von 210 bp Länge mit einem DNA-Gel nachgewiesen. Dabei ist anzumerken, dass bei Durchführung dieser Arbeiten noch nicht die Sequenzen aller *vtg*-Gene, die von Wang *et al.* (2005) charakterisiert wurden, bekannt waren. Deshalb stellte sich später heraus, dass das verwendete Primerpaar nicht *vtg1*-spezifisch war, sondern auch andere *vtg*-Gene amplifizierte. Dies hatte jedoch keinen Einfluss auf den Nachweis der Vitellogenin-Synthese. Daher wird nachfolgend weiterhin von *vtg1* gesprochen.

Bei den durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass bei sieben von zehn männlichen Zebrafischen nach einer elftägigen Exposition mit 1000 µg/L BPA eine

deutliche *vtg1*-Induktion auftrat. Bei Genistein wiesen vier von fünf Männchen, die mit 1000 µg/L Genistein exponiert wurden, eine relativ schwache *vtg1*-Synthese auf. Bei 5000 µg/L Genistein war jedoch bei allen fünf untersuchten Männchen eine deutliche *vtg1*-Synthese erkennbar. Für E2 konnte eine *vtg1*-Induktion ab einer Konzentration von 200 ng/L E2 gezeigt werden.

Somit konnte der Einfluss der östrogenen Substanzen E2, BPA und Genistein auf die Expression von Vitellogenin erfolgreich nachgewiesen werden. Die erzielten Ergebnisse erlaubten zwar nur eine Abschätzung von Konzentrationsbereichen, bei denen eine östrogene Wirkung eingetreten war, waren aber für die Planung weiterer Expositionsexperimente hilfreich. Zur Bestimmung von Effektkonzentrationen waren daher quantitative Untersuchungen notwendig, die mit Hilfe der qPCR durchgeführt wurden.

4.2 Quantitative PCR

Die quantitative PCR (qPCR) wurde verwendet, um die Effektkonzentrationen der östrogenen Substanzen E2, BPA und Genistein zu ermitteln. Für die Messungen wurde das Primerpaar für *vtg1* benutzt, mit dem bereits semiquantitativ eine Vitellogenin-Regulation nachgewiesen wurde. Die Durchführung erfolgte dabei mit dem „LightCycler® FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I“-Kit im zugehörigen Gerät „LightCycler® 2.0“ von Roche. Die Methodik erwies sich dabei als sehr zuverlässig, zeitsparend und kostengünstig. Die Auswertung der gemessenen Fluoreszenzkurven erfolgte mit Hilfe der „LightCycler®-Software 3.5“. Für die Quantifizierung der Genexpressionsstärken wurde eine Kalibrator-normalisierte relative Quantifizierung mit Effizienzkorrektur nach der Methode von Pfaffl *et al.* (2002) durchgeführt. Als Kalibrator diente eine cDNA-Mischprobe von vier nicht exponierten weiblichen Zebrabärblingen. Diese wurde für die Normalisierung der verschiedenen qPCR-Läufe verwendet. Die relative Quantifizierung der Genexpressionsstärke einer Probe erfolgte über die Berechnung des Verhältnisses vom Zielgen zum Referenzgen (*Housekeeping*-Gen). Als Zielgen diente bei allen Proben *vtg1*. Bei den Experimenten zu E2 wurde als Referenzgen *efla* verwendet. Für die Experimente zu BPA und Genistein musste jedoch *β-actin1* als Referenzgen benutzt werden, da zwischenzeitlich bei Experimenten mit Gesamtgenom-Arrays festgestellt wurde, dass *efla* durch BPA reguliert wurde. Über Kalibrationsreihen wurden die Effizienzen der qPCRs für die Primerkombinationen *vtg1/efla* und

vtg1/β-actin1 ermittelt. Diese lagen für *vtg1/ef1α* bei 1,87 (*vtg1*) und 1,86 (*ef1α*) sowie für *vtg1/β-actin1* bei 1,81 (*vtg1*) und 1,88 (*β-actin1*). Die Effizienz von *vtg1* war somit unterschiedlich groß. Dieser Unterschied war durch die verschiedenen qPCR-Programme der Primerpaare bedingt, war jedoch bei der Datenauswertung nicht relevant. Die berechneten Effizienzen der beiden Primerkombinationen lagen im üblichen Bereich und waren somit für die Auswertung ausreichend hoch genug.

Ergebnisse der qPCR-Experimente

Die Ergebnisse der qPCR-Experimente sind in Abbildung 26 (Seite 68) zusammenfassend dargestellt. Die statistische Auswertung ergab eine signifikante *vtg1*-Induktion in den Lebergeweben der männlichen Zebra­bär­blinge nach einer elf­tä­gi­gen Exposition mit 200 ng/L E2, 2000 µg/L BPA und 5000 µg/L Genistein.

17β-Östradiol

Bei E2 zeigten die Fische in den Expositionsgruppen mit 1, 10 und 100 ng/L E2 eine starke individuelle Antwort. Betrachtet man hingegen die gemittelte Ratio bei diesen Expositionsgruppen, fällt ein konzentrationsabhängiger Anstieg auf. Bei der Expositionsgruppe mit 200 ng/L E2 war die gemittelte Ratio um das 1100-fache größer als bei der Gruppe der Kontrolltiere. Bei der Gruppe mit 300 ng/L E2 war noch ein weiterer Anstieg der gemittelten Ratio zu erkennen, bis bei der Gruppe mit 400 ng/L E2 ein Höchstwert von 5000 erreicht wurde. Dieser Wert wurde auch von der Gruppe mit 500 ng/L E2 nicht überstiegen.

Die durchgeführten Experimente führten in den Lebergeweben der männlichen Zebra­bär­blinge zu einer signifikanten *vtg1*-Induktion bei 200 ng/L E2. Die Exposition der Fische erfolgte dabei im Durchflusssystem für elf Tage. Van den Belt *et al.* (2003) wiesen für eine Vtg-Induktion in Zebra­bär­bling-Männchen einen *LOEC (Lowest Observed Effect Concentration)* von 20 ng/L E2 nach. Diese Experimente gingen jedoch über einen Zeitraum von drei Wochen und die Fische wurden unter semistatischen Bedingungen gehalten. Zudem wurde die Vtg-Induktion nicht auf Expressions-, sondern auf Proteinebene gemessen. Einen vergleichbaren Messwert stellten Rose *et al.* (2002) in einem achttägigen Experiment fest, bei dem die Fische im Durchflusssystem gehalten wurden. Auf Proteinebene konnte hier in Ganzkörperhomogenaten ein *LOEC* von 21 ng/L E2 nachgewiesen werden. Da Vitellogenin im Blut der Fische akkumuliert, ist bei Messungen auf Proteinebene ein niedrigerer Messwert für die Effektkonzentration

vorstellbar. Auf Expressionsebene haben Tong *et al.* (2004) für Zebra­bärblinge eine *vtg1*-Induktion bei 1 µg/L E2 festgestellt. Die Expositionen erfolgten dabei in einem statischen System für zwei Tage. Für eine Exposition mit 1 µg/L E2 wurde auch gezeigt, dass der Expressionswert für *vtg1* am Tag 3 der Exposition unter den Wert von Tag 2 fiel. Von Tag 5 bis Tag 12 wurde *vtg1* dann wieder konstant auf Niveau von Tag 2 exprimiert. An den Tagen 17, 23 und 30 der Exposition konnten weitere Anstiege der *vtg1*-Expression beobachtet werden. Diese Ergebnisse bestätigen die gewählte Expositionsdauer, da nach elf Tagen von einer konstanten *vtg1*-Expression ausgegangen werden kann. Vergleichende Untersuchungen der Vtg-Induktion auf Expressions- und Proteinebene zeigten auch bei Japanischen Reiskärpflingen (*Oryzias latipes*), dass bei kurzer Expositionsdauer ein Nachweis auf Expressionsebene ausreicht (Scholz *et al.* 2004).

Bisphenol A

Bei BPA war eine ausgesprochen breite Verteilung der Expressionswerte (Ratios) innerhalb der Expositionsgruppen feststellbar. Das bedeutet, dass die Fische eine starke individuelle Antwort auf diese Substanz zeigten. Die gemittelte Ratio war bei der Gruppe mit 200 µg/L BPA sogar niedriger als bei der Gruppe mit 20 µg/L BPA. Eine signifikante *vtg1*-Induktion konnte erst für die Gruppe mit 2000 µg/L BPA nachgewiesen werden.

Van den Belt *et al.* (2003) ermittelten für die Vtg-Induktion in Zebra­bärbling-Männchen einen *LOEC* von 1000 µg/L. Dieser Wert bezieht sich allerdings wieder auf Proteinebene. Die Exposition erfolgte dabei für drei Wochen unter semistatischen Bedingungen. In einem umfangreichen Versuch konnten Segner *et al.* (2003) sogar einen *LOEC* von 375 µg/L BPA auf Proteinebene nachweisen. Dabei wurden jedoch so genannte *Life Cycle Tests* durchgeführt, bei denen die Exposition von der befruchteten Eizelle bis zum Erwachsenenstadium anhielt. Bei diesen Versuchen wurden nach einer Exposition mit 1500 µg/L BPA ein signifikanter Rückgang des Wachstums von juvenilen Zebra­bärblingen, ein verspätetes Abläichen sowie ein Rückgang der Befruchtungserfolge festgestellt. Die juvenilen Fische reagierten folglich sehr empfindlich auf eine dauerhafte Exposition mit 1500 µg/L BPA.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigten für einzelne Fische aus der Gruppe mit 1000 µg/L BPA eine deutliche *vtg1*-Synthese, die auf gleichem Niveau lag wie die von Tieren aus der signifikant eingestuften Gruppe mit 200 ng/L E2. Durch die hohe Variabilität innerhalb der Gruppe mit 1000 µg/L BPA war jedoch keine Signifikanz gegeben. Die starke

individuelle *vtgI*-Antwort der Fische kann durch eine geringe Spezifität des Östrogenrezeptors gegenüber BPA bedingt sein. BPA bindet an den Östrogenrezeptor mit einer 2000-fach geringeren Affinität als E2 (Routledge *et al.* 1996).

Genistein

Bei Genistein war eindeutig eine konzentrationsabhängige Verteilung der individuellen und gemittelten Expressionswerte zu erkennen. Die individuellen Expressionswerte wiesen dabei eine breitere Verteilung auf als bei E2. Eine signifikante *vtgI*-Induktion wurde für die Gruppe mit 5000 µg/L Genistein nachgewiesen. Dabei wurde aber nicht das Expressionsniveau wie bei den mit E2 exponierten Proben erreicht.

In der Literatur sind zur Vtg-Induktion in Zebra-Ärblingen durch Genistein keine Angaben zu finden. Auch zu anderen Fischarten sind nur wenige Studien publiziert. Beim Sibirischen Stör (*Acipenser baeri*) konnte durch intraperitoneale Injektion von gereinigtem Genistein die Vtg-Synthese induziert werden (Pelissero *et al.* 1991). Japanische Reiskarpfinglinge (*Oryzias latipes*) zeigten hingegen durch intraperitoneale Injektion mit bis zu 30 µg Genistein pro Fisch keine Vtg-Induktion in Männchen und Weibchen. Die exponierten Weibchen zeigten jedoch einen Anstieg von E2 im Blutplasma und bei den exponierten Männchen wurde eine verminderte Testosteron-Produktion festgestellt (Zhang *et al.* 2002). Bei Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) konnte wiederum eine Vtg-Induktion beobachtet werden. Männchen, denen über einen Zeitraum von einem Jahr genisteinhaltiges Futter verabreicht wurde, zeigten eine schwache, aber konstante Vtg-Synthese (Bennetau-Pelissero *et al.* 2001). Auch bei männlichen Goldfischen (*Carassius auratus*) konnte die Vtg-Synthese induziert werden. Nach einer 31-tägigen Fütterung der Männchen mit handelsüblichen Fischfuttern, die neben Genistein noch weitere Phytoöstrogene enthielten, wurden im Blutplasma erhöhte Vtg-Mengen nachgewiesen (Ishibashi *et al.* 2002). Schließlich wurde bei Japanischen Reiskarpfingling-Männchen (*Oryzias latipes*), die mit 1000 µg/L Genistein von kurz nach dem Schlüpfen bis zum Alter von 100 Tagen semistatisch exponiert wurden, eine Feminisierung von sekundären, männlichen Geschlechtsmerkmalen beobachtet (Kiparissis *et al.* 2003).

Die durchgeführten Untersuchungen zeigten erstmals eine Vtg-Induktion bei Zebra-Ärblingen auf Genexpressionsebene. Die nachgewiesene Effektkonzentration von 5000 µg/L Genistein ist zwar im Vergleich zu den bisher gemessenen Grenzwerten bei anderen Fischarten relativ hoch, wird aber auch durch die Expositionsdauer (elf Tage), das Entwicklungsstadium (Adulttier) und den Expositionspfad (Kiemen, Haut) bedingt sein.

17 α -Ethinyl-Östradiol

Das höchste Expressionsniveau wiesen die Proben der mit 30 ng/L EE2 exponierten Zebrabärbling-Männchen auf. EE2 verfügte bei gleichen Konzentrationen über einen deutlich größeren Einfluss auf die *vgt1*-Expression als das natürliche Hormon E2. Rose *et al.* (2002) bestätigten für EE2 eine starke Wirkung auf die Vtg-Synthese in Zebrabärblingen. Dabei konnte nach einer achttägigen Exposition im Durchflusssystem auf Proteinebene ein *LOEC* von 3 ng/L EE2 in Ganzkörperhomogenaten nachgewiesen werden. Daher wurde EE2 bei den durchgeführten Experimenten als Positivkontrolle verwendet.

4.3 Gesamtgenom-Arrays

Die Experimente mit den Gesamtgenom-Arrays wurden mit den „Zebrafish 14k OciChipsTM“ von Ocimum Biosolutions durchgeführt. Streng genommen handelt es sich bei diesen Microarrays nicht wie bezeichnet um Gesamtgenom-Arrays, da sie nicht das gesamte Genom des Zebrabärblings (*Danio rerio*) repräsentieren. Das Zebrabärbling-Genom wurde noch nicht gänzlich durch das Sanger Institute⁸ in Cambridge entschlüsselt. Bis dato konnten zwei Drittel der bekannten Sequenzen eindeutig den entsprechenden Genen zugeordnet werden. Aus diesem Grund trägt der „Zebrafish 14k OciChipTM“ neben den Sonden für Zebrabärbling-Gene eine Vielzahl von Sonden für Transkripte, die noch keinem Gen zugeordnet werden konnten oder die aus verschiedenen Zebrabärbling-Klonen stammen. Die Geninformationen zu den Sonden wurden erst im Juli 2006 umfassend durch Abgleich mit Genbanken überarbeitet. Dabei erfolgte bei ca. 30 Prozent der Sonden eine erstmalige Zuordnung zu Genen. Durch den Abgleich mit Genbanken wurden auch viele Sonden neuen Genen oder Transkripten mit unbekannter Funktion zugeordnet, so dass einige Sonden für mehrere Gene/Transkripte kodieren. Zum besseren Verständnis wurden die Sonden entsprechend der an sie bindenden Gene/Transkripte in zwei Gruppen unterteilt: *Expressed Transcripts (ETs)* bei Zebrabärbling-Genen und *Tentative Consensus Sequences (TCs)* bei anderen Transkripten. Beim „Zebrafish 14k OciChipsTM“ beträgt der Anteil von *ETs* 54 Prozent. Für diese liegen Informationen über Funktionen im Zebrabärbling vor.

⁸ http://www.sanger.ac.uk/Projects/D_rerio/

Trotz der genannten Einschränkung bietet der „Zebrafish 14k OciChip™“ gute Voraussetzungen, umfangreiche Genexpressionsanalysen beim Zebrafisch durchzuführen. Durch die große Anzahl von *TCs*, für die in Zukunft eine Zuordnung zu Genen erfolgen wird, können die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse für zukünftige Analysen herangezogen werden.

Die Experimente mit den Gesamtgenom-Arrays sind verhältnismäßig teuer. Daher war eine hohe Qualität der eingesetzten cDNA unbedingt erforderlich. Die Überprüfung der eingesetzten cDNA erfolgte mit Hilfe der Kontroll-PCR, die für alle verwendeten Proben einwandfreie Amplifikate lieferte. Als Optimierung zum Protokoll wurden die Gesamtgenom-Arrays während der Hybridisierung in Hybridisierungskammern platziert. Dadurch konnte eine Verdunstung von Hybridisierungslösung verhindert werden. Beim Waschen der Gesamtgenom-Arrays zeigte sich, dass das Hintergrundsignal der gescannten Arrays durch intensives Waschen minimiert werden konnte. Da die Fluoreszenz der Cy3- und Cy5-dCTPs mit der Zeit nachlässt, wurden die Gesamtgenom-Arrays so bald wie möglich gescannt.

Als Proben dienten für die Experimente die Lebergewebe von unterschiedlichen männlichen Zebrafischen, die für elf Tage folgenden Konzentrationen ausgesetzt wurden: 500 ng/L E2, 1000 µg/L BPA und 5000 µg/L Genistein. Als Referenz-Proben dienten die Lebergewebe von verschiedenen männlichen Zebrafischen, die in den Kontrollbecken des Durchflusssystemes gehalten wurden. Die Untersuchungen umfassten bei jeder Substanz zehn exponierte Tiere und zehn Kontrolltiere. Für E2 und Genistein wurden diese Konzentrationen gewählt, weil in den qPCR-Experimenten eine signifikante *vtg1*-Induktion nachgewiesen werden konnte. Für BPA wurde in den qPCR-Experimenten bei 2000 µg/L eine signifikante *vtg1*-Induktion festgestellt. Einige Fische zeigten jedoch bei dieser hohen Konzentration ein verändertes Verhalten. Dieses wurde auf eine mögliche toxische Wirkung des BPA zurückgeführt. Über die Toxizität von BPA ist jedoch wenig bekannt. Die jüngste Studie hierzu wurde von Kashiwada *et al.* (2002) mit Japanischen Reiskarpfingern (*Oryzias latipes*) durchgeführt. Dabei wurde nach 72 h Exposition eine LC_{50} (*lethal concentration*₅₀) von 6,8 mg/L bei BPA und 3,5 mg/L bei E2 festgestellt. Die LC_{50} ist definiert als die Konzentration, bei der 50% der Versuchstiere Mortalität zeigen. Ziel der Experimente mit den Gesamtgenom-Arrays war die Erfassung der Gen-Antwort auf östrogenen Einfluss. Zur Vermeidung der Messung von möglichen toxischen Effekten des BPA wurden deshalb für die Experimente

gezielt Fische aus der Gruppe mit 1000 µg/L BPA ausgewählt, bei denen eine deutliche *vtg1*-Synthese semiquantitativ nachgewiesen werden konnte.

Bei der Datenauswertung zeigte sich bei jedem Gesamtgenom-Array, dass die Expressionswerte der zwei hybridisierten Proben eine ungleichmäßige Verteilung aufwiesen. Dies war durch die unterschiedliche Struktur der Cy3- und Cy5-dCTPs bedingt (siehe Abbildung 8, Seite 36). Die Cy3-dCTPs wurden besser in die cDNA eingebaut und führten zu höheren Expressionswerten. Dies wurde bereits bei der Methodik berücksichtigt, indem für jeweils die Hälfte der Proben von exponierten Tieren und Kontrolltieren eine verschieden farbige Markierung, ein so genannter *color-flip*, erfolgte. Zudem erwiesen sich die durchgeführten Normalisierungen, durch die die Expressionswerte auf den Arrays untereinander sowie die Expressionswerte zwischen den Arrays auf einen Bereich skaliert wurden, als sehr effektiv (siehe Abbildung 29, Seite 72).

Die statistische Auswertung umfasste für jede Substanz die Erstellung von Listen mit regulierten Sonden. Dabei wurden über verschiedene Kombinationen der Parameter *p-value* und *mean fold change* unterschiedlich strenge Kriterien berücksichtigt. Zudem wurde über die *False Discovery Rate (FDR)* die Spezifität der verschiedenen Auswahlverfahren (Kombinationen) abgeschätzt. Für die Selektion der regulierten Sonden wurde schließlich das Auswahlverfahren mit der Kombination [$p < 0,05$; $f.c. > 2$] gewählt, da bei diesem alle drei Substanzen eine große Anzahl an regulierten Sonden bei hoher Signifikanz und niedriger *FDR* aufwiesen (siehe Tabelle 2, Seite 73). Der statistische Ansatz, die Auswahl der regulierten Sonden über einen strengen *p-value* unter Ignorieren des *mean fold change* zu treffen, hätte zu einer deutlich geringeren Anzahl an regulierten Sonden geführt.

Ergebnisse der Experimente mit Gesamtgenom-Arrays

Mit den Gesamtgenom-Arrays wurde die Genexpression von männlichen Zebrafischen erfasst, die für elf Tage im Durchflusssystem mit 500 ng/L E2, 1000 µg/L BPA und 5000 µg/L Genistein exponiert wurden. Dabei zeigten insgesamt 211 Gene/Transkripte durch E2 eine Änderung in ihrer Expression, sowie 47 durch BPA und 231 durch Genistein. Auffällig war, dass die regulierten Gene/Transkripte bei allen drei Substanzen eine deutlich stärkere Hoch- als Herunterregulation aufwiesen. Bei E2 lag die maximal erreichte Hochregulation eines Gens/Transkripts beim 445-fachen, bei Genistein beim

91-fachen und bei BPA beim 13-fachen. Die maximal erreichte Herunterregulation war durch Genistein 7-fach, durch E2 5-fach und durch BPA 3-fach.

Von besonderem Interesse sind die Gene/Transkripte, die von allen drei Substanzen gemeinsam reguliert wurden. Diese können als Markergene zum Nachweis östrogenen Wirkungen herangezogen werden. Die Ergebnisse zeigten, dass ausschließlich verschiedene Vitellogenin-Gene von allen drei Substanzen gemeinsam reguliert wurden. Insgesamt werden in der Literatur sieben Vitellogenin-Gene beschrieben (Wang *et al.* 2000). Auf den Gesamtgenom-Arrays sind zu sechs dieser Gene verschiedene Sonden gespottet (*vtg1*, *vtg2*, *vtg3*, *vtg5*, *vtg6* und *vtg7*). Von diesen wurden fünf durch alle drei untersuchten Substanzen reguliert (*vtg2*, *vtg3*, *vtg5*, *vtg6* und *vtg7*). Dabei zeigte sich, dass *vtg5* und *vtg7* als Markergene für den Nachweis der Vtg-Synthese am Besten geeignet sind, da sie bei allen drei Substanzen eine deutliche Expression aufwiesen. *vtg3* wurde bei allen Substanzen am geringsten reguliert. Bei allen *vtg*-Genen war das Expressionsniveau bei den mit E2 exponierten Tieren am höchsten, gefolgt von Genistein und BPA.

vtg1 wurde nur durch E2 und Genistein reguliert. Das Expressionsniveau lag dabei bei beiden Substanzen im Vergleich zu den anderen *vtg*-Genen im mittleren Bereich. Bei der Überprüfung mit den qPCR-Experimente fällt auf, dass dort für *vtg1* eine signifikante Induktion nach einer Exposition mit 2000 µg/L BPA nachgewiesen werden konnte. Dieser Widerspruch ist auf die verwendeten Primer zurückzuführen. Beim Primerdesign waren noch nicht die Sequenzen aller *vtg*-Gene bekannt, die von Wang *et al.* (2005) charakterisiert wurden. Aus diesem Grund ist das verwendete Primerpaar nicht *vtg1*-spezifisch, sondern amplifizierte auch andere *vtg*-Gene.

Neben den *vtg*-Genen wurden 39 weitere Gene/Transkripte gemeinsam durch E2 und Genistein reguliert. Das lässt auf eine ähnliche Wirkungsweise der beiden Substanzen schließen. Beim Vergleich der regulierten Gene/Transkripte zwischen BPA und E2 sowie zwischen BPA und Genistein konnten außer den *vtg*-Genen keine nennenswerten Gemeinsamkeiten beobachtet werden.

Bewertung der Genexpressionsmuster

Die Bewertung der Genexpressionsmuster erfolgte durch funktionelle Analyse unter Verwendung von *Gene Ontologies (GOs)*, die biologische Prozesse im Zebrafisch (*Danio rerio*) beschreiben. Dabei wurden die Annotationen für Genprodukte und Prote-

ine des Zebrafisch verwendet, die vom *Zebrafish Information Network* (ZFIN)⁹ bereit gestellt wurden und die Struktur der *GOs* berücksichtigt. Von den 14067 Genen und Transkripten, die auf dem Gesamtgenom-Array repräsentiert waren, konnten ungefähr die Hälfte in *GOs* eingruppiert werden. Auch bei den durch die drei Substanzen regulierten Genen und Transkripten betrug dieser Anteil nur ca. 60%. Die Annotationen des Zebrafisch waren folglich noch nicht vollständig erfasst und es bestand eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass nicht alle angereicherten Funktionen aufgeklärt wurden.

Bei den Experimenten mit **E2** konnten durch die funktionelle Analyse keine signifikant angereicherten Funktionen (*GOs*) festgestellt werden. Betrachtete man hingegen die Ergebnisse unter Ignorieren des multiplen Testens, ließen sich einige angereicherte Funktionen nachweisen. Die Vitellogenin-Gene *vtg1*, *vtg3* und *vtg5* konnten mit hoher Einzelsignifikanz den Funktionen „Lipidtransportaktivität“ (99,8%) und „Lipidtransport“ (99,0%) zugeordnet werden. Diese *GOs* würden unter Berücksichtigung der stark regulierten Vitellogenin-Gene *vtg2*, *vtg6* und *vtg7*, die noch nicht in der Datenbank enthalten waren, erheblich an Bedeutung gewinnen. In unmittelbarem Zusammenhang mit der Vitellogenese steht das Gen *esr1*, das für den Östrogenrezeptor α kodiert und um das 6,7-fache hochreguliert wurde. Das stark regulierte Gen *nr1d1* aus der Funktion „Thyroidhormonrezeptoraktivität“ kodiert für den *nuclear receptor subfamily 1 group d, member 1* (NR1D1). NR1D1 bildet eine Untereinheit des Thyroidrezeptors. Thyroidrezeptoren liegen an DNA gebunden vor und fungieren als Transkriptionshemmer. Durch Hormonbindung erfolgt eine Konformationsänderung, die zu einer Aktivierung der Transkription führt (Tsai *et al.* 1994). Dabei werden in der Literatur Regulationen verschiedenartiger physiologischer Prozesse wie Tagesrhythmus, Blutdruck oder Entzündungshemmung beschrieben (Ramakrishnan und Muscat 2006). *nr1d1* zeigte bei den durchgeführten Experimenten eine deutliche Hochregulation um das 18,6-fache. Eine Regulation von Genen, die für den Thyroidrezeptor kodieren, konnte auch bei Elritzen (*Pimephales promelas*) nachgewiesen werden, die für 14 Tage mit 35 ng/L E2 exponiert wurden (Filby *et al.* 2006). In dieser Arbeit wird neben dem vielfach beschriebenen östrogenen Effekt von E2 der Einfluss auf Gene beschrieben, die bei verschiedenartigen molekularen Mechanismen beteiligt sind. Dies wird von den vorliegenden Ergebnissen unterstützt, die eine Häufung von Genen bei Funktionen feststellten,

⁹ Homepage des ZFIN: <http://zfin.org/>

die mit dem Zytoskelett (*acta1*, *bactin1*, *bactin2*, *myo6a*) oder dem Glukose-/ Alkoholmetabolismus (*adh8a*, *aldob*, *eno1*, *gapdh*, *gapdhs*, *hibadh*) in Zusammenhang stehen.

Bei den Experimenten mit **BPA** konnten durch die funktionelle Analyse drei signifikant angereicherte Funktionen (*GOs*) nachgewiesen werden. Diese beschreiben Funktionen an den Ribosomen. Die regulierten Gene dieser *GOs* kodieren ausschließlich für verschiedene ribosomale Proteine L (*rpl13a*, *rpl18a*, *rpl24*, *rpl4*, *rpl7a*) oder für das ribosomale Protein S7 (*rps7*). Zudem waren diese Gene bei weiteren *GOs* vertreten, die unter Ignorieren des multiplen Testens als angereichert eingestuft werden konnten. Dabei werden Vorgänge der Proteinbiosynthese beschrieben. Weitere, bei der Proteinbiosynthese beteiligte Gene, die durch BPA reguliert wurden, waren *eef2l* (*eukaryotic translation elongation factor 2, like*), *sfrs1l* (*splicing factor, arginine/serine-rich 1, like*) und *tctp* (*translationally controlled tumor protein*). Alle genannten Gene wurden um das 2,0 bis 2,4-fache hochreguliert. Die Vitellogenin-Gene *vtg3* und *vtg5* waren wie erwartet den Funktionen „Lipidtransport“ und „Lipidtransportaktivität“ zugeordnet, wiesen aber eine deutlich niedrigere Regulation auf als bei E2. *vtg1* wurde durch BPA nicht reguliert.

Die Ergebnisse belegen, dass die Exposition mit BPA zu einer Änderung der Transkriptionsrate führte. In der Literatur wird für das dabei beteiligte Gen *rpl13a* eine erhöhte Expression in humanen Krebszellen von Bauchspeicheldrüse (Crnogorac-Jurcevic *et al.* 2001) und Prostata (Ohl *et al.* 2005) beschrieben. In humanen Hepatozyten-Krebszelllinien konnte eine Änderung der Regulation von *rpl13a* und *rpl4* nachgewiesen werden (Yoon *et al.* 2006). Auch das Genprodukt von *tctp* steht unter translationaler Kontrolle und wird vermehrt in Tumorzellen gebildet (Tuynder *et al.* 2004). Folglich ist eine kanzerogene Wirkung des BPA auf die Zebraabärblinge wahrscheinlich.

Bei den Experimenten mit **Genistein** konnte durch die funktionelle Analyse eine signifikant angereicherte Funktion (*GO*) festgestellt werden. Diese beschreibt die Funktion „Zellteilung“. Als regulierte Gene wurden dieser Funktion die für verschiedene Zykline kodierenden Gene *ccna1*, *ccna2*, *ccnb1*, *ccnb2* sowie die Gene *cdc2*, *cdc20* und *smarca2* zugeordnet. *cdc2* und *cdc20* kodieren für bestimmte Zyklin-abhängige Kinasen. Alle diese Gene wurden um das 2,1 bis 3,6-fache hochreguliert und sind entscheidend bei der Zellzykluskontrolle beteiligt. Eine abschließende Bewertung über die Wirkmechanismen von Genistein auf die Zellteilung beim Zebraabärbling ist jedoch nicht möglich, da die Annotationen noch unvollständig und die Vorgänge bis heute

nicht vollständig geklärt sind. Beim Menschen sind die Zykline A und B sowie die Zyklin-abhängige Kinase Cdc2, die beim Zebrafisch reguliert wurden, entscheidend bei der prämitotischen Phase (G₂-Phase) und Mitosephase (M-Phase) beteiligt. In der Literatur werden vorwiegend Studien mit humanen Krebszellen beschrieben, bei denen durch Genistein eine Hemmung der Zellproliferation erreicht wurde (Shen *et al.* 2000; Ouchi *et al.* 2005; Touny und Banerjee 2006). Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen zweifellos einen unmittelbaren Einfluss von Genistein auf die Zellzykluskontrolle beim Zebrafisch.

Unter Ignorieren des multiplen Testens wurde die Funktion mit der unpassenden Bezeichnung „virale Umhüllung“ für die Zona pellucida-Gene *zp2*, *zp2.2* und *zp2.4* mit einer hohen Einzelsignifikanz von 99,9% nachgewiesen. Die Zona pellucida-Gene zeigten durch Genistein eine deutliche Hochregulation um das 7 bis 8-fache und kodieren für das Eihüllenprotein Zonagenin, das von der reifenden Oozyte als extrazellulärer Baustein benötigt wird. In der Literatur findet sich eine uneinheitliche Nomenklatur zu den Eihüllenproteinen (siehe Abschnitt 1.1). Erfolgt eine Synthese des Zonagenin in der Leber, spricht man von Zona radiata-Proteinen. Werden die Eihüllenproteine hingegen wie beim Zebrafisch in den Ovarien gebildet, bezeichnet man sie als Zona pellucida-Proteine (Mold *et al.* 2001). Bisher konnte bei männlichen Fischen eine Induktion der Zona radiata-Proteine durch östrogen aktive Substanzen nachgewiesen werden (Arukwe *et al.* 1997; Arukwe *et al.* 1998; Celius *et al.* 1998b; Celius *et al.* 1999; Oppen-Berntsen *et al.* 1999; Celius *et al.* 2000; Arukwe *et al.* 2001). Ein Einfluss auf die Zona pellucida-Proteine wurde hingegen bisher nicht festgestellt (Liu *et al.* 2006). Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen diese Arbeiten insoweit, dass die Expression der Zona pellucida-Gene beim Zebrafisch nicht durch E2 und BPA reguliert wurde. Durch Genistein konnte hingegen erstmalig eine deutliche Induktion der Zona pellucida-Gene nachgewiesen werden.

Neben den Zona pellucida-Genen zeigten die Gene *vtg1*, *vtg3* und *vtg5* eine starke Hochregulation. Diese konnten wie erwartet mit hoher Einzelsignifikanz den Funktionen „Lipidtransportaktivität“ (99,7%) und „Lipidtransport“ (98,8%) zugeordnet werden. Auffällig ist auch die angereicherte Funktion „Blutgerinnung“, in der die beteiligten Gene *f2* (Blutgerinnungsfaktor II), *fgg* (Fibrinogen) und *plg* (Plasminogen) eine Herunterregulation um das 2,2- bis 5,8-fache zeigten. Der Einfluss östrogen Substanzen auf die Blutgerinnung wurde auch beim Japanischen Reiskarpfisch (*Oryzias latipes*) nachgewiesen (Kawamura *et al.* 2002). Zudem wurden dem für Chimerin 1 kodierendem

Gen *chn1*, das um das 2,3-fache herunterreguliert wurde, vier Funktionen zugeordnet, die eine Regulation von GTPasen beschreiben. GTPasen fungieren durch alternierende Bindung der Nukleotide GDP oder GTP als molekulare Schalter in Signaltransduktionsketten. Sie regulieren den Aufbau des Zytoskeletts und wirken somit an der Zellgestalt, Zellmigration und Proliferation mit. Für Zebrabärblinge konnte nachgewiesen werden, dass *chn1* in der frühen Entwicklung eine entscheidende Rolle spielt. *chn1*-Knockdown-Embryos zeigten schwere Missbildungen und eine GAP-Hyperaktivität, die zu einer beschleunigten Entwicklung und schmalen Wachstum führte (Leskow *et al.* 2006).

Die Ergebnisse der funktionellen Analysen zeigen, dass die Substanzen E2, BPA und Genistein eine östrogene Wirkung auf die Zebrabärblinge ausübten. Diese Wirkung lässt sich am Besten durch die Funktionen „Lipidtransportaktivität“ und „Lipidtransport“ beschreiben, die entscheidende Bestandteile der Vitellogenese darstellen. Daneben zeigten die Zebrabärblinge angereicherte Funktionen, die sich zwischen den Substanzen erheblich unterschieden. Dabei waren bei BPA insbesondere Funktionen an den Ribosomen (Proteinbiosynthese) und bei Genistein Funktionen zur Zellteilung und Zonagenese ausgeprägt.

4.4 Subset-Arrays

Die Herstellung der Microarrays war mit einem großen Aufwand verbunden und es bedurfte einiger Optimierungsmaßnahmen, bis eine gleich bleibende, hohe Qualität gewährleistet war. Beim Spotten waren die verwendeten Slide-Rohlinge, der Spotting-Puffer, die Endkonzentration der Sondenlösung sowie die Justierung der Nadeln als entscheidende Faktoren maßgeblich. Es erwies sich als sinnvoll, die gesamte Anzahl von Microarrays, die für die Untersuchung einer Substanz notwendig waren, in einem Ablauf zu fertigen. Bei der Vorbereitung der Microarrays für die Hybridisierungsexperimente war eine gründlich durchgeführte Blockierungsreaktion wichtig, da das Hintergrundsignal der gescannten Microarrays durch diese entscheidend beeinflusst wurde. Die Verwendung von *Gene Frames* (Kunststoffrähmchen), die ein relativ großes Volumen an Hybridisierungslösung ermöglichen, stellte sich als sehr zweckmäßig heraus. Zudem konnte durch den Einsatz von Hybridisierungskammern eine Verdunstung von Hybridisierungslösung verhindert werden.

Insgesamt wurden bei E2 50, bei BPA 56 und bei Genistein 48 Hybridisierungsexperimente mit *Subset-Arrays* durchgeführt. Als Proben dienten die Lebergewebe von männlichen Zebrafärblingen, die für elf Tage den in Tabelle 13 aufgeführten Konzentrationen ausgesetzt wurden oder in den Kontrollbecken des Durchflusssystems gehalten wurden (Negativkontrollen). Die überlagerten Bilder der *Subset-Arrays* zeugten von sehr hoher Qualität und erfolgreicher Durchführung der Hybridisierungen.

Tabelle 13: Konzentrationen der Substanzen bei Experimenten mit *Subset-Arrays*

Substanz	Konzentrationen
E2	5; 50; 100; 200; 500 ng/L
BPA	0,1; 2; 20; 200; 400; 1000; 2000 µg/L
Genistein	1; 10; 100; 500; 1000; 5000 µg/L

Die Datenauswertung umfasste eine Normalisierung, bei der die Expressionswerte auf den Arrays untereinander sowie die Expressionswerte zwischen den Arrays auf einen Bereich skaliert wurden. Da für die Normalisierung konstante Intensitätssignale zwischen den Experimenten und Konditionen (Kontrolltier ↔ exponiertes Tier) notwendig sind, besteht bei den *Subset-Arrays* nicht wie bei den Gesamtgenom-Arrays die Möglichkeit der Normalisierung über die gesamte Anzahl von Sonden auf dem Array. Bei den Gesamtgenom-Arrays war dieses Vorgehen sinnvoll, da für die meisten Sonden keine Änderung der Expression erwartet wird. Bei den *Subset-Arrays* wurde deshalb über zehn Sonden normalisiert, die spezifisch an *Housekeeping* Gene des Zebrafärblings binden. Diese Methode ist derzeit für *Subset-Arrays* am weitesten verbreitet (Allison *et al.* 2006). Durch die durchgeführten Normalisierungen konnte eine deutliche Verbesserung bei der Verteilung der Expressionswerte erzielt werden (siehe Abbildung 37, Seite 89 bis Abbildung 40, Seite 91).

Die statistische Auswertung umfasste für jede Substanz die Erstellung von Listen mit regulierten Sonden für die verschiedenen Konzentrationen. Dabei wurde der Parameter *p-value* auf kleiner 0,05 gesetzt. Das bedeutet, dass die einzelne Sonde mit 95%iger Wahrscheinlichkeit signifikant reguliert wurde. Im Anschluss wurden die Ergebnisse mit Hilfe der Bonferroni-Methode korrigiert. Die Bonferroni-Methode beruht auf dem Prinzip, bei jedem Einzeltest die Signifikanz so hoch zu wählen, dass insgesamt wieder eine Signifikanz von 95% erreicht wird. Die Abschätzung der Fehlerwahrscheinlichkeit erfolgte beim multiplen Testen (Bonferroni-Korrektur) über die *Family-Wise Error*

Rate (FWER). Die *FWER* wählt man, falls möglichst viele der als signifikant ermittelten Gene auch tatsächlich differenziell exprimiert sein sollen (Dudoit *et al.* 2002). Dieser Ansatz erscheint bei der experimentellen Methodik mit *Subset-Arrays* als sinnvoll, da eine Änderung der Expression bei Genen detektiert werden soll, für die eine Regulation erwartet wird. Die **False Discovery Rate (FDR)** wählt man hingegen, falls möglichst viele der tatsächlich differenziell exprimierten Gene auch als signifikant gefunden werden sollen und ein gewisser Anteil an falsch-positiven Genen toleriert werden kann (Benjamini und Hochberg 1995). Dieser Ansatz erwies sich bei den Gesamtgenom-Arrays als sehr zweckmäßig, da als Untersuchungsziel das Auffinden von Markergenen sowie die Erstellung möglichst umfangreicher Genlisten im Vordergrund standen.

Ergebnisse der Experimente mit *Subset-Arrays*

Mit den *Subset-Arrays* wurde die Genexpression von männlichen Zebrafärblingen erfasst, die für elf Tage im Durchflusssystem mit verschiedenen Konzentrationen E2, BPA und Genistein exponiert wurden. Ziel der Arbeiten war die Untersuchung des Einflusses der östrogenen Substanzen auf die Genexpression von niedrigen bis hohen Konzentrationen. Dabei konnte die Funktionalität und Nachweisgrenze der Microarray-Technologie bei Verwendung von *Subset-Arrays* aufgezeigt werden.

Bei den *Subset-Arrays* wurde bei allen gespotteten Sonden zumindest bei der höchsten Konzentration eine Änderung der Expression erwartet (ausgenommen bei den *Housekeeping* Genen). Es zeigte sich jedoch, dass bei E2 lediglich 85%, bei BPA 60% und bei Genistein 50% der Sonden reguliert wurden.

Bei **E2** wurden nach Durchführung der Bonferroni-Methode 22 verschiedene Gene/Transkripte signifikant reguliert. Diese waren alle in der Gruppe von 500 ng/L E2 vertreten. *vtg7* zeigte dabei mit Abstand die stärkste Hochregulation auf gleichem Expressionsniveau wie bei den Gesamtgenom-Arrays. Bei den anderen Genen/Transkripten lag das Expressionsniveau zum Teil deutlich niedriger als bei den Gesamtgenom-Arrays. *vtg7* war auch das einzige Gen, das durch 200 ng/L E2 signifikant reguliert wurde. Bei den niedrigeren Konzentrationen von 5, 50 und 100 ng/L E2 konnte keine signifikante Änderung der Expression eines Gens/Transkripts nachgewiesen werden. Besonders auffällig war die Regulation von *efla*, das um das 1,5- und 2,0-fache hochreguliert wurde. Dieses Gen zeigte bei den Untersuchungen mit den Gesamtgenom-Arrays keine Änderung der Expression und wurde deshalb als *Housekeeping* Gen für die Normalisierung der Daten von den *Subset-Arrays* verwendet. Da für eine optimale

Normalisierung gleich bleibende Intensitätssignale notwendig sind, war die Auswertung der *Subset-Arrays* nicht so spezifisch wie bei den Gesamtgenom-Arrays. Daher kann davon ausgegangen werden, dass insbesondere niedrig regulierte Gene/Transkripte nicht erfasst wurden.

Betrachtete man die Ergebnisse zu E2 unter Ignorieren des multiplen Testens, was nur durch Festsetzung eines Grenzwertes beim *mean fold change* ($> 1,5$) sinnvoll erschien, konnten in der Gruppe mit 200 ng/L E2 vier weitere Gene als reguliert eingestuft werden.

Bei **BPA** zeigten nach Durchführung der Bonferroni-Methode keine Gene/Transkripte eine signifikante Regulation. Auch unter Ignorieren des multiplen Testens konnten lediglich wenige Gene/Transkripte als reguliert eingestuft werden. Dabei zeigte *vtg7* wieder als einziges Gen bei 1000 µg/L BPA eine Hochregulation. Bei 2000 µg/L BPA wurden insgesamt fünf Gene/Transkripte reguliert. Das Expressionsniveau lag dabei deutlich unter dem bei E2, für *vtg7* um das 45-fache niedriger.

Bei **Genistein** zeigte ausschließlich das Gen *slc2a5* eine signifikante Hochregulation um das 1,1-fache bei einer Konzentration von 10 µg/L Genistein. Zu den Funktionen von *slc2a5* im Zebrafisch ist in der Literatur nichts beschrieben. Bei Mäusen (*Mus musculus*) und Ratten (*Rattus norvegicus*) wird diesem Gen eine vermittelnde Funktion beim Transport von Fruktose zugeschrieben (Corpe *et al.* 2002; Cui *et al.* 2004).

Unter Ignorieren des multiplen Testens zeigten bei Genistein nur drei Gene eine Hochregulation bei 5000 µg/L. Das Expressionsniveau war dabei sogar noch niedriger als bei den BPA-Experimenten. *vtg7* wurde dabei wieder am stärksten reguliert.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass mit den *Subset-Arrays* im Vergleich zu den Gesamtgenom-Arrays weniger regulierte Sonden und niedrigere Expressionsniveaus detektiert wurden. Dies war zum einen durch das strenge, statistische Verfahren bei der Fehlerkorrektur bedingt. Einen wesentlicheren Einfluss hatte aber vermutlich das Normalisierungsverfahren. Die Ergebnisse der *Subset-Arrays* und der Gesamtgenom-Arrays belegen eindeutig, dass *Housekeeping* Gene bis um den Faktor 2 reguliert wurden. Eine Regulation von *Housekeeping* Genen wurde durch verschiedene Arbeitsgruppen bestätigt (Chang *et al.* 1998; Zou und Ing 1998; Weisinger *et al.* 1999; Moe *et al.* 2001). Da bei der durchgeführten Methodik über *Housekeeping* Gene normalisiert wurde, war ein Rückgang der Spezifität unvermeidbar. Ein moderner Ansatz, diesem

Effekt entgegen zu wirken, ist die Verwendung von *Microarray Spike Controls*. Dabei handelt es sich um externe RNA von anderen Organismen, die den Proben in definierter Menge zugegeben und mit umgeschrieben werden. Bei der Hybridisierung binden diese dann an spezifische Sonden, die über den Microarray verteilt vorliegen und somit zur Normalisierung und sogar Quantifizierung der Expressionsniveaus herangezogen werden können (Allison *et al.* 2006).

Besonders auffällig war zudem, dass bei den Experimenten zu BPA und Genistein 25 bis 35% weniger Sonden reguliert wurden als bei den Experimenten zu E2. Ferner war nach Durchführung der Bonferroni-Methode keine statistische Signifikanz mehr gegeben (außer bei einem Gen). Ursache hierfür war die Anzahl der durchgeführten Hybridisierungsexperimente. Bei E2 wurden zu jeder Konzentrationsstufe zehn Experimente durchgeführt, bei BPA und Genistein hingegen nur jeweils acht. Die Reduzierung auf acht Experimente erfolgte aufgrund von statistischen Berechnungen bei Gesamtgenom-Arrays, die für diese Anzahl eine ausreichend hohe Spezifität versprochen (siehe Abschnitt 3.3, Abbildung 31, Seite 75). Weitere Gründe, die für eine Reduzierung der Experimente sprachen, waren eine erhebliche Minimierung des experimentellen Aufwands und der Kosten sowie die Vermeidung von unnötigen Tierversuchen. Wegen der bereits aufgeführten, methodischen Gründe waren die Berechnungen von den Gesamtgenom-Arrays jedoch nicht auf die *Subset-Arrays* übertragbar.

Die durchgeführten Experimente mit den *Subset-Arrays* zeigten, dass die Methodik im Grunde gut funktionierte. *vtg7* wies bei allen drei Substanzen die höchste Regulation auf. Dadurch konnten die Ergebnisse der Gesamtgenom-Arrays bestätigt werden, dass *vtg7* als Markergen für den Nachweis östrogenen Wirkungen hervorragend geeignet ist.

Für E2 wurde mit den *Subset-Arrays* eine signifikante Vitellogenin-Induktion bei 200 ng/L E2 nachgewiesen. Dieses Ergebnis wurde durch die quantitative PCR (qPCR) bestätigt. Folglich ermöglicht die Microarray-Technologie bei durchdachter Methodik eine zuverlässige Bestimmung von Effektkonzentrationen.

Einen entscheidenden Einfluss auf die Spezifität der *Subset-Arrays* hat das angewandte Normalisierungsverfahren. Dabei empfiehlt sich eine Normalisierung über *Microarray Spike Controls*. Die Arbeiten zeigten, dass *Subset-Arrays* insbesondere für Untersuchungen geeignet sind, die auf eine Erfassung der Expression einer Vielzahl von Markergenen abzielen. Für diese stellen sie eine kostengünstige, praktikable und zuverlässige Methode dar.

5 Zusammenfassung

Thema der vorliegenden Arbeit war die Erfassung und Bewertung von Genexpressionsmustern von Zebra­bärblingen (*Danio rerio*) nach Belastung mit östrogenen Substanzen. Hierfür wurde zunächst die DNA-Microarray-Technologie etabliert. Die Expositionen mit den östrogenen Substanzen 17 β -Östradiol (E2), Bisphenol A (BPA), Genistein und 17 α -Ethinylöstradiol (EE2) als Positivkontrolle erfolgten im Durchflusssystem, das durch konstante Expositionsbedingungen eine kontinuierliche Belastung der Fische gewährleistete. Der Konzentrationsbereich der Substanzen erstreckte sich von niedrigen bis zu hohen Dosen, für die bereits eine östrogene Wirkung nachgewiesen wurde. Die Effektkonzentrationen der östrogenen Substanzen wurden mit Hilfe der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) ermittelt, die eine Analyse der Expression einzelner Markergene erlaubt. Als Markergen fand hierbei das Gen *vtg1* Anwendung, das für das Eidotter-Vorläuferprotein Vitellogenin kodiert. Die Vitellogenin-Synthese ist normalerweise nur in weiblichen Fischen existent, kann aber in Männchen durch östrogene Substanzen induziert werden. Nach elftägiger Exposition wurde in männlichen Zebra­bärblingen eine signifikante Vitellogenin-Induktion bei 200 ng/L E2, 2000 μ g/L BPA und 5000 μ g/L Genistein nachgewiesen.

Im Anschluss wurde mit der DNA-Microarray-Technologie die Expression einer Vielzahl von Genen parallel untersucht. Zu diesem Zweck wurden Gesamtgenom-Arrays mit 14067 unterschiedlichen Sonden verwendet. Die Experimente mit den Gesamtgenom-Arrays wurden mit den Konzentrationen 500 ng/L E2, 1000 μ g/L BPA und 5000 μ g/L Genistein durchgeführt, da für diese eine deutliche Änderung der Genexpression von Vitellogenin beobachtet wurde. Dabei wurden für jede Substanz Listen mit signifikant regulierten Genen erstellt. Durch den Vergleich der regulierten Gene zwischen den Substanzen wurden schließlich die Vitellogenin-Gene *vtg5* und *vtg7* als am Besten geeignete Markergene zum Nachweis östrogenen Wirkungen identifiziert.

Die Bewertung der Genexpressionsmuster erfolgte durch funktionelle Analyse unter Verwendung von *Gene Ontologies*, die biologische Prozesse im Zebra­bärbling beschreiben. Die Ergebnisse bestätigten die östrogene Wirkung von E2, BPA und Genistein. Daneben zeigten die Zebra­bärblinge angereicherte Funktionen, die sich zwischen den Substanzen erheblich unterschieden. Bei BPA waren insbesondere Funktio-

nen an den Ribosomen (Proteinbiosynthese) und bei Genistein Funktionen zur Zellteilung und Zonagenese ausgeprägt.

Schließlich erfolgte eine Untersuchung weiterer Konzentrationen mit *Subset-Arrays*, die eine Auswahl von Genen trugen, für die eine Regulation erwartet wurde. Dabei konnten aufschlussreiche Erfahrungen zu der Methodik gesammelt und unter geeigneten Versuchsbedingungen die Nachweisgrenze der qPCR bestätigt werden. Ebenso zeigte sich, dass *Subset-Arrays* bei der Verwendung geeigneter Normalisierungsverfahren eine kostengünstige, praktikable und zuverlässige Methode sind, die eine gleichzeitige Erfassung der Expression einer Vielzahl von Markergenen ermöglicht.

Literatur

Allison, D.B.; Page, G.P.; Beasley, T.M. und Edwards, J.W. (2006). „DNA Microarrays and Related Genomics Techniques - Design, Analysis, and Interpretation of experiments.“ Chapman & Hall/CRC, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, USA.

Amsterdam, A.; Burgess, S.; Golling, G.; Chen, W.; Sun, Z.; Townsend, K.; Farrington, S.; Haldi, M. und Hopkins, N. (1999). „A large-scale insertional mutagenesis screen in zebrafish.“ *Genes Dev.* 13 (20): 2713-2724.

Anstead, G.M.; Carlson, K.E. und Katzenellenbogen, J.A. (1997). „The estradiol pharmacophore: ligand structure-estrogen receptor binding affinity relationship and a model for the receptor binding site.“ *Steroids.* 62 (3): 268-303.

Arbeitman, M.N.; Furlong, E.E.; Imam, F.; Johnson, E.; Null, B.H.; Baker, B.S.; Krasnow, M.A.; Scott, M.P.; Davis, R.W. und White, K.P. (2002). „Gene expression during the life cycle of *Drosophila melanogaster*.“ *Science.* 297 (5590): 2270-2275.

Arukwe, A.; Knudsen, F.R. und Goksøyr, A. (1997). „Fish zona radiata (eggshell) protein: a sensitive biomarker for environmental estrogens.“ *Environ. Health Perspect.* 105 (4): 418-422.

Arukwe, A.; Celius, T.; Walther, B.T. und Goksøyr, A. (1998). „Plasma-levels of vitellogenin and eggshell zona radiata proteins in 4-Nonylphenol and *o,p'*-DDT treated juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*).“ *Marine Environ. Res.* 46: 133-136.

Arukwe, A.; Yadetie, F.; Male, R. und Goksoyr, A. (2001). „In vivo modulation of nonylphenol-induced zonation and vitellogenesis by the antiestrogen, 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl (PCB-77) in juvenile fish.“ *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 10 (1-2): 5-15.

Bartosiewicz, M.J.; Jenkins, D.; Penn, S.; Emery, J. und Buckpitt, A. (2001a). „Unique gene expression patterns in liver and kidney associated with exposure to chemical toxicants.“ *J Pharmacol Exp Ther.* 297 (3): 895-905.

Bartosiewicz, M.J.; Penn, S. und Buckpitt, A. (2001b). „Applications of gene arrays in environmental toxicology: fingerprints of gene regulation associated with cadmium chloride, benzo(a)pyrene, and trichloroethylene.“ *Environ. Health Perspect.* 109 (1): 71-74.

- Begovac, P.C. und Wallace, R.A. (1989). „Major vitelline envelope proteins in pipefish oocytes originate with the follicle and are associated with Z3 layer.“ J. Exp. Zool. 251: 56-73.
- Benjamini, Y. und Hochberg, Y. (1995). „Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing.“ J. Roy. Stat. Soc. B 57: 289-300.
- Bennetau-Pelissero, C.; Breton, B.B.; Bennetau, B.; Corraze, G.; Le Menn, F.; Davail-Cuisset, B.; Helou, C. und Kaushik, S.J. (2001). „Effect of genistein-enriched diets on the endocrine process of gametogenesis and on reproduction efficiency of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*.“ Gen. Comp. Endocrinol. 121 (2): 173-187.
- Bigsby, R.; Chapin, R.E.; Daston, G.P.; Davis, B.J.; Gorski, J.; Gray, L.E.; Howdeshell, K.L.; Zoeller, R.T. und vom Saal, F.S. (1999). „Evaluating the effects of endocrine disruptors on endocrine function during development.“ Environ. Health Perspect. 107 (4): 613-618.
- Böhm, T.; Bleul, C.C. und Schorpp, M. (2003). „Genetic dissection of thymus development in mouse and zebrafish.“ Immunol. Rev. 195: 15-27.
- Bowman, C.J.; Kroll, K.J.; Hemmer, M.J.; Folmar, L.C. und Denslow, N.D. (2000). „Estrogen-induced vitellogenin mRNA and protein in sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*).“ Gen. Comp. Endocrinol. 120 (3): 300-313.
- Celius, T. und Walther, B.T. (1998a). „Oogenesis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) occurs by zonagenesis preceding vitellogenesis in vivo and in vitro.“ J. Endocrinol. 158: 259-266.
- Celius, T. und Walther, B.T. (1998b). „Differential sensitivity of zonagenesis and vitellogenesis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) to DDT pesticides.“ J. Exp. Zool. 281: 346-353.
- Celius, T.; Haugen, T.B.; Grotmol, T. und Walther, B.T. (1999). „A sensitive zonagenetic assay für rapid in vitro assessment of estrogenic potency of xenobiotics and mycotoxins.“ Environ. Health Perspect. 107: 63-68.
- Celius, T.; Matthews, J.B.; Giesy, J.P. und Zacharewski, T.R. (2000). „Quantification of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) zona radiata and vitellogenin mRNA levels using real-time PCR after in vivo treatment with estradiol-17 beta or alpha-zearalenol.“ J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 75 (2-3): 109-119.

- Chang, T.J.; Juan, C.C.; Yin, P.H.; Chi, C.W. und Tsay, H.J. (1998). „Up-regulation of beta-actin, cyclophilin and GAPDH in N1S1 rat hepatoma.“ *Oncol. Rep.* 5 (2): 469-471.
- Chang, Y.S.; Wang, S.C.; Tsao, C.C. und Huang, F.L. (1996). „Molecular cloning, structural analysis, and expression of carp ZP3 gene.“ *Mol. Reprod. Dev.* 44 (3): 295-304.
- Chang, Y.S.; Hsu, C.C.; Wang, S.C.; Tsao, C.C. und Huang, F.L. (1997). „Molecular cloning, structural analysis, and expression of carp ZP2 gene.“ *Mol. Reprod. Dev.* 46 (3): 258-267.
- Chee, M.; Yang, R.; Hubbell, E.; Berno, A.; Huang, X.C.; Stern, D.; Winkler, J.; Lockhart, D.J.; Morris, M.S. und Fodor, S.P. (1996). „Assessing genetic information with high-density DNA arrays.“ *Science.* 274 (5287): 610-614.
- Cleveland, W.S. (1979). „Robust locally weighted regression and smoothing scatterplots.“ *J. Amer. Statist. Assoc.* 74: 829-836.
- Corpe, C.P.; Bovelander, F.J.; Munoz, C.M.; Hoekstra, J.H.; Simpson, I.A.; Kwon, O.; Levine, M. und Burant, C.F. (2002). „Cloning and functional characterization of the mouse fructose transporter, GLUT5.“ *Biochim. Biophys. Acta.* 1576 (1-2): 191-197.
- Creaser, C.W. (1934). „The technic of handling the zebra fish (*BrachyDanio rerio*) for the production of eggs, which are favorable for embryological research and are available at any specified time throughout the year.“ *Copeia* (4): 159-161.
- Crnogorac-Jurcevic, T.; Efthimiou, E.; Capelli, P.; Blaveri, E.; Baron, A.; Terris, B.; Jones, M.; Tyson, K.; Bassi, C.; Scarpa, A. und Lemoine, N.R. (2001). „Gene expression profiles of pancreatic cancer and stromal desmoplasia.“ *Oncogene.* 20 (50): 7437-7446.
- Cui, X.L.; Soteropoulos, P.; Toliás, P. und Ferraris, R.P. (2004) „Fructose-responsive genes in the small intestine of neonatal rats.“ *Physiol. Genomics.* 18 (2): 206-217.
- Custodia, N.; Won, S.J.; Novillo, A.; Wieland, M.; Li, C. und Callard, I.P. (2001). „Caenorhabditis elegans as an environmental monitor using DNA microarray analysis.“ *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 948: 32-42.
- DeRisi, J.L.; Iyer, V.R. und Brown, P.O. (1997). „Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale.“ *Science.* 278 (5338): 680-686.

- Dooley, K. und Zon, L.I. (2000). „Zebrafish: a model system for the study of human disease.“ *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10 (3): 252-256.
- Dosch, R.; Wagner, D.S.; Mintzer, K.A.; Runke, G.; Wiemelt, A.P. und Mullins, M.C. (2004). „Maternal control of vertebrate development before the midblastula transition: mutants from the zebrafish I.“ *Dev. Cell.* 6 (6):771-780.
- Drastichova, J.; Svobodova, Z.; Groenland, M.; Dobsikova, R.; Zlabek, V.; Weissova, D. und Szotkowska, M. (2005). „Effect of Exposure to Bisphenol A and 17 β -estradiol on the Sex Differentiation in Zebrafish (*Danio rerio*).“ *Acta Vet. Brno.* 74: 287-291.
- Dudoit, S.; Yang, Y.H.; Callow, M.J. und Speed, T.P. (2002). „Statistical Methods for Identifying Differentially Expressed Genes in Replicated cDNA Microarray Experiments.“ *Stat. Sinica.* 12: 111-139.
- Duggan, D.J.; Bittner, M.; Chen, Y.; Meltzer, P. und Trent, J.M. (1999). „Expression profiling using cDNA microarrays.“ *Nat. Genet.* 21 (1): 10-14.
- Eaton, R.C. und Farley, R.D. (1974a). „Spawning cycle and egg production of zebrafish, *Brachydanio rerio*, in the laboratory.“ *Copeia* 1: 195-204.
- Eaton, R.C. und Farley, R.D. (1974b). „Growth and the reduction of depensation of zebrafish, *Brachydanio rerio*, reared in the laboratory.“ *Copeia* 1: 204-209.
- Filby, A.L.; Thorpe, K.L. und Tyler, C.R. (2006). „Multiple molecular effect pathways of an environmental oestrogen in fish.“ *J. Mol. Endocrinol.* 37 (1): 121-134.
- Flouriot, G.; Pakdel, F. und Valotaire, Y. (1996). „Transcriptional and post-transcriptional regulation of rainbow trout liver estrogen receptor and vitellogenin gene expression.“ *Mol. Cell. Endocrin.* 124 (1-2): 173-183.
- Flouriot, G.; Pakdel, F.; Ducouret, B.; Lederean, Y. und Valotaire, Y. (1997). „Differential Regulation of two Genes Implicated in Fish Reproduction: Vitellogenin and Estrogen Receptor Genes.“ *Mol. Reprod. Develop.* 48 (3): 317-323.
- Fry, D.M. (1995). „Reproductive effects in birds exposed to pesticides and industrial chemicals.“ *Environ. Health Perspect.* 103 (7): 165-171.
- Funkenstein, B.; Bowman, C.J.; Denslow, N.D.; Cardinali, M. und Carnevali, O. (2000). „Contrasting effects of estrogen on transthyretin and vitellogenin expression in males of the marine fish, *Sparus aurata*.“ *Mol. Cell. Endocrinol.* 167 (1-2): 33-41.

- Gabig, M. und Wegrzyn, G. (2001). „An introduction to DNA chips: principles, technology, applications and analysis.” *Acta Biochim. Pol.* 48 (3): 615-622.
- Gaiano, N.; Allende, M.; Amsterdam, A.; Kawakami, K. und Hopkins, N. (1996). „Highly efficient germ-line transmission of proviral insertions in zebrafish.“ *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 93 (15): 7777-7782.
- 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. und Zhang, J. (2004). „Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics.“ *Genome Biol.* 5 (10): R80.
- Golling, G.; Amsterdam, A.; Sun, Z.; Antonelli, M.; Maldonado, E.; Chen, W.; Burgess, S.; Haldi, M.; Artzt, K.; Farrington, S.; Lin, S.Y.; Nissen, R.M. und Hopkins, N. (2002). „Insertional mutagenesis in zebrafish rapidly identifies genes essential for early vertebrate development.“ *Nat. Genet.* 31 (2): 135-140.
- Goolish, E.M.; Evans, R.; Okutake, K. und Max, R. (1998). „Chamber volume requirements for reproduction of the zebrafish *Danio rerio*.“ *The Progressive Fish-Culturist* 60: 127-132.
- Guillette, L.J.; Gross, T.S.; Mason, G.R.; Matter, J.M.; Percival, H.F. und Woodward, A.R. (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): 680-688.
- Guillette, L.J., Jr.; Gross, T.S.; Gross, D.A.; Rooney, A.A. und Percival, H.F. (1995). „Gonadal steroidogenesis in vitro from juvenile alligators obtained from contaminated or control lakes.“ *Environ. Health Perspect.* 103 (4): 31-36.
- Guillette, L.J., Jr. und Guillette, E.A. (1996a). „Environmental contaminants and reproductive abnormalities in wildlife: implications for public health?“ *Toxicol. Ind. Health* 12 (3-4): 537-550.
- Guillette, L.J., Jr.; Pickford, D.B.; Crain, D.A.; Rooney, A.A. und Percival, H.F. (1996b). „Reduction in penis size and plasma testosterone concentrations in juvenile alligators living in a contaminated environment.“ *Gen. Comp. Endocrinol.* 101 (1): 32-42.

- Gülden, M.; Turan, A. und Seibert H. (1997). „Substanzen mit endokriner Wirkung in Oberflächengewässern.“ UBA-Texte 46/97, Umweltbundesamt Berlin.
- Hamatani, T.; Carter, M.G.; Sharov, A.A. und Ko, M.S. (2004). „Dynamics of global gene expression changes during mouse preimplantation development.“ *Dev. Cell.* 6 (1): 117-131.
- Harries, J.E.; Sheahan, D.A.; Jobling, S.; Matthiessen, P.; Neall, P.; Routledge, E.; Rycroft, R.; Sumpter, J.P. und Tylor, T. (1996). „A survey of estrogenic activity in United Kingdom inland waters.“ *Environ. Toxicol. Chem.* 15 (11): 1993-2002.
- Harries, J.E.; Sheahan, D.A.; Jobling, S.; Matthiessen, P.; Neall, P.; Sumpter, J.P.; Tylor, T. und Zaman, N. (1997). „Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout.“ *Environ. Toxicol. Chem.* 16 (3): 534-542.
- Hisaoka, K.K. und Battle, H. (1958). „The normal developmental stages of the zebrafish *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan).“ *J. Morph.* 102: 311-328.
- Hisaoka, K.K. und Firlit, C.F. (1962). „Ovarian cycle and egg production in the zebrafish, *Brachydanio rerio*.“ *Copeia* (4): 788-792.
- Ibelgaufits, H. (1993). „Gentechnologie von A bis Z.“ VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- Ihaka, R. und Gentleman, R.C. (1996). „A language for data analysis and graphics.“ *J. Comput. Graph. Statist.* 5(3): 299-314.
- Ishibashi, H.; Kobayashi, M.; Koshiishi, T.; Moriwaki, T.; Tachibana, K.; Tsuchimoto, M.; Soyano, K.; Iguchi, T.; Mori, C. und Arizono, K. (2002). „Induction of Plasma Vitellogenin Synthesis by the Commercial Fish Diets in Male Goldfish (*Carassius auratus*) and Dietary Phytoestrogens.“ *J. Health Sci.* 48 (5): 427-434.
- Kashiwada, S.; Ishikawa, H.; Miyamoto, N.; Ohnishi, Y. und Magara, Y. (2002). „Fish test for endocrine-disruption and estimation of water quality of Japanese rivers.“ *Water Res.* 36 (8): 2161-2166.
- Kato, N.; Shibutani, M.; Takagi, H.; Uneyama, C.; Lee, K.Y.; Takigami, S.; Mashima, K. und Hirose, M. (2004). „Gene expression profile in the livers of rats orally administered ethinylestradiol for 28 days using a microarray technique.“ *Toxicology.* 200 (2-3): 179-192.

- Katzenellenbogen, B.S.; Bhardwaj, B.; Fang, H.; Ince, B.A.; Pakdel, F.; Reese, J.C.; Schodin, D. und Wrenn C.K. (1993). „Hormone binding and transcription activation by estrogen receptors: analysis using mammalian and yeast systems.“ *J. Steroid. Biochem. Methods.* 47 (1-6): 39-48.
- Kawamura, T.; Sakai, S.; Omura, S.; Hori-e, R.; Kawahara, T.; Kinoshita, M. und Yamashita, I. (2002). „Estrogen inhibits development of yolk veins and causes blood clotting in transgenic medaka fish overexpressing estrogen receptor.“ *Zoolog. Sci.* 19 (12): 1355-1361.
- Kelce, W.R.; Stone, C.R.; Laws, S.C.; Gray, L.E.; Kemppainen, J.A. und Wilson, E.M. (1995). „Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist.“ *Nature.* 375 (6532): 581-585.
- Kim, J.H.; Kim, H.Y. und Lee, Y.S. (2001). „A novel method using edge detection for signal extraction from cDNA microarray image analysis.“ *Exp. Mol. Med.* 33 (2): 83-88.
- Kime D.E. (1998). „Endocrine disruption in fish.“ Kluwer Academic Publishers, Boston-Dordrecht-London.
- Kiparissis, Y.; Balch, G.C.; Metcalfe, T.L. und Metcalfe, C.D. (2003). „Effects of the isoflavones genistein and equol on the gonadal development of Japanese medaka *Oryzias latipes*.“ *Environ. Health Perspect.* 111 (9): 1158-1163.
- Knippers R. (2001). „Molekulare Genetik.“ Thieme Verlag, Stuttgart.
- Laale, H.W. (1977). „The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio* in fisheries research. A literature review.“ *Journal of Fish Biology* 10: 121-173.
- Landel, C.C.; Kushner, P.J. und Greene, G.L. (1995). „Estrogen receptor accessory proteins: effects on receptor-DNA interactions.“ *Environ. Health Perspect.* 103 (7): 23-28.
- Larkin, P.; Sabo-Attwood, T.; Kelso, J. und Denslow, N.D. (2002). „Gene expression analysis of largemouth bass exposed to estradiol, nonylphenol, and p,p'-DDE.“ *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 133 (4): 543-557.
- Larkin, P.; Sabo-Attwood, T.; Kelso, J. und Denslow, N.D. (2003a). „Analysis of gene expression profiles in largemouth bass exposed to 17-beta-estradiol and to anthropogenic contaminants that behave as estrogens.“ *Ecotoxicology.* 12 (6): 463-468.

- Larkin, P.; Folmar, L.C.; Hemmer, M.J.; Poston, A.J. und Denslow, N.D. (2003b). „Expression profiling of estrogenic compounds using a sheepshead minnow cDNA macroarray.“ *EHP Toxicogenomics*. 111: 29-36.
- Lattier, D.L.; Gordon, D.A.; Burks, D.J. und Toth, G.P. (2001). „Vitellogenin gene transcription: a relative quantitative exposure indicator of environmental estrogens.“ *Environ. Toxicol. Chem.* 20 (9): 1979-1985.
- Lee, Y.M.; Oleszkiewicz, J.A.; Cicek, N. und Londry, K. (2004). „Endocrine disrupting compounds (EDC) in municipal wastewater treatment: a need for mass balance.“ *Environ. Technol.* 25 (6): 635-645.
- Leskow, F.C.; Holloway, B.A.; Wang, H.; Mullins, M.C. und Kazanietz, M.G. (2006). „The zebrafish homologue of mammalian chimerin Rac-GAPs is implicated in epiboly progression during development.“ *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 103 (14): 5373-5378. Epub 2006 Mar 28.
- Lim, E.H.; Ding, J.L. und Lam, T.J. (1991). „Estradiol-induced vitellogenin gene expression in a teleost fish, *Oreochromis aureus*.“ *Gen. Comp. Endocrinol.* 82 (2): 206-214.
- Linney, E.; Dobbs-McAuliffe, B.; Sajadi, H. und Malek, R.L. (2004). „Microarray gene expression profiling during the segmentation phase of zebrafish development.“ *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 138 (3): 351-362.
- Little, R.J.A. und Rubin, C.B. (1987). „Statistical Analysis with Missing Data.“ Wiley, New York.
- Liu, X.; Wang, H. und Gong, Z. (2006) „Tandem-repeated Zebrafish zp3 genes possess oocyte-specific promoters and are insensitive to estrogen induction.“ *Biol. Reprod.* 74 (6): 1016-1025. Epub 2006 Feb 15.
- Lo, J.; Lee, S.; Xu, M.; Liu, F.; Ruan, H.; Eun, A.; He, Y.; Ma, W.; Wang, W.; Wen, Z. und 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): 455-466.
- Long, Q.; Meng, A.; Wang, H.; Jessen, J.R.; Farrell, M.J. und Lin, S. (1997). „GATA-1 expression pattern can be recapitulated in living transgenic zebrafish using GFP reporter gene.“ *Development.* 124 (20): 4105-4111.

- Lyons, C.E.; Payette, K.L.; Price, J.L. und Huang, R.C. (1993). „Expression and structural analysis of a teleost homolog of a mammalian zona pellucida gene.“ *J. Biol. Chem.* 268 (28): 21351-21358.
- MacKay, M.E.; Raelson, J. und Lazier, C.B. (1996). „Up-regulation of estrogen receptor mRNA and estrogen receptor activity by estradiol in liver of rainbow trout and other teleostean fish.“ *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 115 (3): 201-209.
- Mankame, T.; Hokanson, R.; Chowdhary, R. und Busbee, D. (2004). „Altered gene expression in human cells induced by the agricultural chemical Enable.“ *Toxicol. Ind. Health.* 20 (6-10): 89-102.
- Mathavan, S.; Lee, S.G.; Mak, A.; Miller, L.D.; Murthy, K.R.; Govindarajan, K.R.; Tong, Y.; Wu, Y.L.; Lam, S.H.; Yang, H.; Ruan, Y.; Korzh, V.; Gong, Z.; Liu, E.T. und Lufkin, T. (2005). „Transcriptome analysis of zebrafish embryogenesis using microarrays.“ *PLoS Genet.* 1 (2): 260-276.
- Merz, W.; Metzger, J.W.; Kempter, C. und Jenkins, E. (1998). „Untersuchungen zum Eintrag, Verhalten und Verbleib von Sexualhormonen im Abwasser und Klärschlamm“, Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte und Abfallwirtschaft der Universität Stuttgart, Abteilung Hydrochemie, Stuttgart.
- Metscher, B.D. und Ahlberg, P.E. (1999). „Zebrafish in context: uses of a laboratory model in comparative studies.“ *Dev. Biol.* 210 (1): 1-14.
- Miguel-Queralt, S.; Knowlton, M.; Avvakumov, G.V.; Al-Nouno, R.; Kelly, G.M. und Hammond, G.L. (2004). „Molecular and functional characterization of sex hormone binding globulin in zebrafish.“ *Endocrinology.* 145 (11): 5221-5230.
- Moe, T.K.; Ziliang, J.; Barathi, A. und Beuerman, R.W. (2001). „Differential expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), beta actin and hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) in postnatal rabbit sclera.“ *Curr. Eye Res.* 23 (1): 44-50.
- Mold, D.E.; Kim, I.F.; Tsai, C.M.; Lee, D.; Chang, C.Y. und Huang, R.C. (2001). „Cluster of genes encoding the major egg envelope protein of zebrafish.“ *Mol. Reprod. Dev.* 58 (1): 4-14.
- Murata, K.; Sugiyama, H.; Yasumasu, S.; Iuchi, I.; Yasumasu, I. und Yamagami, K. (1997). „Cloning of cDNA and estrogen-induced hepatic gene expression for chorioge-

nin H, a precursor protein of the fish egg envelope (chorion).“ Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (5): 2050-2055.

Nasevicius, A. und Ekker, S.C. (2000). „Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish.“ Nat. Genet. 26 (2): 216-220.

Ohl, F.; Jung, M.; Xu, C.; Stephan, C.; Rabien, A.; Burkhardt, M.; Nitsche, A.; Kristiansen, G.; Loening, S.A.; Radonic, A. und Jung, K. (2005). „Gene expression studies in prostate cancer tissue: which reference gene should be selected for normalization?“ J. Mol. Med. 83 (12): 1014-1024. Epub 2005 Oct 7.

Oostenbrink, B.C.; Pitera, J.W.; van Lipzig, M.M.; Meerman, J.H. und van Gunsteren, W.F. (2000). „Simulations of the estrogen receptor ligand-binding domain: affinity of natural ligands and xenoestrogens.“ J. Med. Chem. 43 (24): 4594-4605.

Oppen-Berntsen, D.O.; Gram-Jensen, E. und Walther, B.T. (1992a). „Zona radiata proteins are synthesized by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes in response to oestradiol-17 beta.“ J. Endocrinol. 135 (2): 293-302.

Oppen-Berntsen, D.O.; Hyllner, S.J.; Haux, C.; Helvik, J.V. und Walther, B.T. (1992b). „Eggshell zona radiata-proteins from cod (*Gadus morhua*) extra-ovarian origin and induction by estradiol-17 beta.“ Int. J. Dev. Biol. 36 (2): 247-254.

Oppen-Berntsen, D.O.; Arukwe, A.; Yadetie, F.; Lorens, J.B. und Male, R. (1999). „Salmon Eggshell Protein Expression: A Marker for Environmental Estrogens.“ Mar. Biotechnol. 1 (3): 252-260.

Ouchi, H.; Ishiguro, H.; Ikeda, N.; Hori, M.; Kubota, Y. und Uemura, H. (2005). „Genistein induces cell growth inhibition in prostate cancer through the suppression of telomerase activity.“ Int. J. Urol. 12 (1): 73-80.

Parker, M.G. (1993). „Steroid and related receptors.“ Curr. Opin. Cell. Biol. 5 (3): 499-504.

Pelissero, C.; Bennetau, B.; Babin, P.; Le Menn, F. und Dunogues, J. (1991). „The estrogenic activity of certain phytoestrogens in the Siberian sturgeon *Acipenser baeri*.“ J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 38 (3): 293-299.

Pfaffl, M.W.; Horgan, G.W. und Dempfle, L. (2002). „Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR.“ Nucleic Acids Res. 30 (9): e36.

- Purdom, C.E.; Hardiman, P.A.; Bye, V.J.; Eno, N.C.; Tyler, C.R. und Sumpter, J.P. (1994). „Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works.” *Chem. Ecol.* 8: 275-285.
- Ramakrishnan, S.N. und Muscat, G.E. (2006). „The orphan Rev-erb nuclear receptors: a link between metabolism, circadian rhythm and inflammation?“ *Nucl. Recept. Signal.* 4: e009. Epub 2006 Apr 28.
- Routledge, E.J. und Sumpter, J.P. (1996). „Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen.” *Environ. Toxicol. Chem.* 15 (3): 241-248.
- Rose, J.; Holbech, H.; Lindholst, C.; Norum, U.; Povlsen, A.; Korsgaard, B. und Bjerregaard, P. (2002) „Vitellogenin induction by 17beta-estradiol and 17alpha-ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*).” *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 131 (4): 531-539.
- Saiki, R.K.; Gelfand, D.H.; Stoffel, S.; Scharf, S.J.; Higuchi, R.; Horn, G.T.; Mullis, K.B. und Erlich, H.A. (1988). „Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase.“ *Science.* 239 (4839): 487-491.
- Santti, R.; Makela, S.; Strauss, L.; Korkman, J. und Kostian, M.L. (1998). „Phytoestrogens: potential endocrine disruptors in males.” *Toxicol. Ind. Health* 14 (1-2): 223-237.
- Schena, M.; Shalon, D.; Davis, R.W. und Brown, P.O. (1995). „Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray.“ *Science.* 270 (5235): 467-470.
- Schena, M.; Shalon, D.; Heller, R.; Chai, A.; Brown, P.O. und Davis, R.W. (1996). „Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes.“ *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93 (20): 10614-10619.
- Schena, M.; Heller, R.A.; Theriault, T.P.; Konrad, K.; Lachenmeier, E. und Davis, R.W. (1998). „Microarrays: biotechnology’s discovery platform for functional genomics.“ *Trends Biotechnol.* 16 (7): 301-306.
- Scholz, S.; Kordes, C.; Hamann, J. und Gutzeit, H.O. (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): 235-244.

- Segner, H.; Carroll, K.; Fenske, M.; Janssen, C.R.; Maack, G.; Pascoe, D.; Schafers, C.; Vandenberg, G.F.; Watts, M. und Wenzel, A. (2003). „Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA project.“ *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 54 (3): 302-314.
- Seifert, M.; Haindl, S. und Hock, B. (1998). „In vitro analysis of xenoestrogens by enzyme-linked receptor assays (ELRA).“ *Adv. Exp. Med. Biol.* 444: 113-117.
- Shen, J.C.; Klein, R.D.; Wie, Q.; Guan, Y.; Contois, J.H.; Wang, T.T.; Chang, S. und Hursting, S.D. (2000). „Low-dose genistein induces cyclin-dependent kinase inhibitors and G(1) cell-cycle arrest in human prostate cancer cells.“ *Mol. Carcinog.* 29 (2): 92-102.
- Shimizu, M.; Fukada, H.; Fujita, T.; Hiramatsu, N. und Hara, A. (2000). „Serum levels of precursors to vitelline envelope proteins (choriogenins) in Sakhalin taimen after treatment with oestrogen and during oocyte growth.“ *J. Fish Biol.* 57: 170-181.
- Shore, L.S.; Gurevitz, M. und Shemesh, M. (1993). „Estrogen as an environmental pollutant.“ *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 51 (3): 361-366.
- Southern, E.M. (1975). „Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.“ *J. Mol. Biol.* 98 (3): 503-517.
- Stumpf, M.; Ternes, T.A.; Haberer, K. und Baumann W. (1996). „Nachweis von natürlichen und synthetischen Östrogenen in Kläranlagen und Fließgewässern.“ *Vom Wasser* 87: 251-261.
- Sumpter, J.P. und Jobling, S. (1995). „Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment.“ *Environ. Health Perspect.* 103 (7): 173-178.
- Takahashi, H. (1977). „Juvenile hermaphroditism in the zebrafish, *Brachydanio rerio*.“ *Bull. Fac. Fish Hokkaido Univ.* 28: 57-65.
- Ternes, T.A.; Stumpf, M.; Müller, J.; Haberer, K.; Wilken, R.D. und Servos, M. (1999a). „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.
- Ternes, T.A.; Kreckel, P. und Müller, J. (1999b). „Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants--II. Aerobic batch experiments with activated sludge.“ *Sci. Total Environ.* 225(1-2): 91-99.

- Ton, C.; Stamatiou, D.; Dzau, V.J. und Liew, C.C. (2002). „Construction of a zebrafish cDNA microarray: gene expression profiling of the zebrafish during development.“ *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296 (5): 1134-1142.
- Tong, Y.; Shan, T.; Poh, Y.K.; Yan, T.; Wang, H.; Lam, S.H. und Gong, Z. (2004). „Molecular cloning of zebrafish and medaka vitellogenin genes and comparison of their expression in response to 17beta-estradiol.“ *Gene.* 328: 25-36.
- Touny, L.H. und Banerjee, P.P. (2006). „Identification of both Myt-1 and Wee-1 as necessary mediators of the p21-independent inactivation of the cdc-2/cyclin B1 complex and growth inhibition of TRAMP cancer cells by genistein.“ *Prostate.* 66 (14): 1542-1555.
- Tsai, M.J. und O'Malley, B.W. (1994). „Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members.“ *Annu. Rev. Biochem.* 63: 451-486.
- Tuynder, M.; Fiucci, G.; Prieur, S.; Lespagnol, A.; Geant, A.; Beaucourt, S.; Duflaut, D.; Besse, S.; Susini, L.; Cavarelli, J.; Moras, D.; Amson, R. und Telerman, A. (2004). „Translationally controlled tumor protein is a target of tumor reversion.“ *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 101 (43): 15364-15369. Epub 2004 Oct 15.
- Tyler, C.R. und Sumpter, J.P. (1996). „Oocyte growth and development in teleost.“ *Rev. Fish Biol. Fisheries.* 6: 287-318.
- Tyler, C.R.; Jobling, S. und Sumpter, J.P. (1998). „Endocrine disruption in wildlife: a critical review of the evidence.“ *Crit. Rev. Toxicol.* 28 (4): 319-361.
- Van den Belt, K.; Verheyen, R. und Witters, H. (2003). „Comparison of vitellogenin responses in zebrafish and rainbow trout following exposure to environmental estrogens.“ *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 56 (2): 271-81.
- Wagner, D.S.; Dosch, R.; Mintzer, K.A.; Wiemelt, A.P. und Mullins, M.C. (2004). „Maternal control of development at the midblastula transition and beyond: mutants from the zebrafish II.“ *Dev. Cell.* 6 (6): 781-790.
- Wahli, W. (1988). „Evolution and expression of vitellogenin genes.“ *Trends Genet.* 4: 227-232.
- Wang, H. und Gong, Z. (1999). „Characterization of two zebrafish cDNA clones encoding egg envelope proteins ZP2 and ZP3.“ *Biochim. Biophys. Acta.* 1446 (1-2): 156-160.

- Wang, H.; Yan, T.; Tan, J.T. und Gong, Z. (2000) „A zebrafish vitellogenin gene (*vg3*) encodes a novel vitellogenin without a phosvitin domain and may represent a primitive vertebrate vitellogenin gene.” *Gene*. 256 (1-2): 303-310.
- Wang, D.Y.; McKague, B.; Liss, S.N. und Edwards, E.A. (2004a). „Gene expression profiles for detecting and distinguishing potential endocrine-disrupting compounds in environmental samples.“ *Environ. Sci. Technol.* 38 (23): 6396-6406.
- Wang, Q.T.; Piotrowska, K.; Ciemerych, M.A.; Milenkovic, L.; Scott, M.P.; Davis, R.W. und Zernicka-Goetz, M. (2004b). „A genome-wide study of gene activity reveals developmental signaling pathways in the preimplantation mouse embryo.“ *Dev. Cell*. 6 (1): 133-44.
- Wang, H.; Tan, J.T.; Emelyanov, A.; Korzh, V. und Gong, Z. (2005). „Hepatic and extrahepatic expression of vitellogenin genes in the zebrafish, *Danio rerio*.” *Gene*. 356: 91-100.
- Watanabe, H.; Suzuki, A.; Goto, M.; Lubahn, D.B.; Handa, H. und Iguchi, T. (2004). „Tissue-specific estrogenic and non-estrogenic effects of a xenoestrogen, nonylphenol.“ *J. Mol. Endocrinol.* 33 (1): 243-252.
- Weigel, N.J. (1996). „Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation.“ *Biochem. J.* 319 (3): 657-667.
- Weisinger, G.; Gavish, M.; Mazurika, C. und Zinder, O. (1999). „Transcription of actin, cyclophilin and glyceraldehyde phosphate dehydrogenase genes: tissue- and treatment-specificity.“ *Biochim. Biophys. Acta.* 1446 (3): 225-232.
- White, K.P.; Rifkin, S.A.; Hurban, P. und Hogness, D.S. (1999). „Microarray analysis of *Drosophila* development during metamorphosis.“ *Science*. 286 (5447): 2179-2184.
- Yoon, S.Y.; Kim, J.M.; Oh, J.H.; Jeon, Y.J.; Lee, D.S.; Kim, J.H.; Choi, J.Y.; Ahn, B.M.; Kim, S.; Yoo, H.S.; Kim, Y.S. und Kim, N.S. (2006). „Gene expression profiling of human HBV- and/or HCV-associated hepatocellular carcinoma cells using expressed sequence tags.“ *Int. J. Oncol.* 29 (2): 315-327.
- Zhang, L.; Khan, I.A. und Foran, C.M. (2002). „Characterization of the estrogenic response to genistein in Japanese medaka (*Oryzias latipes*).“ *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 132 (2): 203-211.

Zon, L.I. (1999). „Zebrafish: a new model for human disease.“ *Genome Res.* 9 (2): 99-100.

Zou, K. und Ing, N.H. (1998). „Oestradiol up-regulates oestrogen receptor, cyclophilin, and glyceraldehyde phosphate dehydrogenase mRNA concentrations in endometrium, but down-regulates them in liver.“ *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 64 (5-6): 231-237.

Anhang A: Bestellnummern und Geninformationen der Sonden

Bestellnummer	Zugangsnummer	Bezeichnung des <i>Open Reading Frame</i>	Symbol
#00032	NM_131829.1	zona pellucida glycoprotein 2.4	<i>zp2.4</i>
#00043	NM_131263.1	elongation factor 1-alpha	<i>ef1a</i>
#00054	NM_131241.1	complement component bfb	<i>bfb</i>
#00167	NM_199683.1	zgc:56330	<i>zgc:56330</i>
#00181	BC065653.1	type I cytokeratin, enveloping layer	<i>cyt1</i>
#00186	AL591391.5	Zebrafish DNA sequence from clone BUSM1-186F8 in linkage group 7	
#00226	BC095596.1	zona pellucida glycoprotein 2.4	<i>zp2.4</i>
#00374	NM_130912.1	catalase	<i>cat</i>
#00430	NM_152954.1	cytochrome P450, subfamily IIIJ (arachidonic acid epoxygenase) polypeptide a	<i>cyp2ja</i>
#00562	XM_688789.1	similar to vitellogenin 3 precursor	<i>LOC565509</i>
#00651	NM_200752.1	ribosomal protein S7	<i>rps7</i>
#00937	NM_131070.2	midkine-related growth factor	<i>mdka</i>
#01171	NM_213094.1	zgc:76908	<i>gapdhs</i>
#01364	NM_131438.1	octamer-binding transcription factor 1	<i>oct1</i>
#01821	BC055167.1	<i>Danio rerio</i> cDNA clone IMAGE:5602480	
#02130	NM_152949.1	cyclin A2	<i>ccna2</i>
#02156	NM_130939.1	cth1	<i>cth1</i>
#02178	NM_131603.2	runt-related transcription factor 1	<i>runx1</i>
#02197	XM_686311.1	similar to kinesin family member 1B isoform alpha	<i>LOC562945</i>
#02353	NM_001007208.1	coagulation factor V	<i>f5</i>
#02595	AL954384.11	Zebrafish DNA sequence from clone CH211-146L13 in linkage group 6, complete sequence	
#02612	NM_199526.1	discs, large (<i>Drosophila</i>) homolog 1	<i>dlg1</i>
#02721	NM_131040.1	engrailed 2b	<i>eng2b</i>
#02741	AC024175.3	<i>Danio rerio</i> mitochondrial genome, complete sequence	
#02980	XM_694955.1	similar to prominin	<i>LOC571374</i>
#03055	NM_152966.1	homogentisate 1,2-dioxygenase	<i>hgd</i>
#03126	NM_001005953.1	zgc:103632	<i>zgc:103632</i>
#03268	NM_130948.1	decapentaplegic and Vtg-related 1	<i>dvr1</i>
#03336	NM_131338.1	complement component factor B	<i>bf</i>
#03427	NM_178298.2	selenoprotein P, plasma, 1b	<i>sepp1b</i>
#03495	XM_682144.1	similar to 10 kda Ca(2+)-binding S-100 protein	<i>LOC558870</i>
#03519	NM_199577.1	zgc:65956	<i>zgc:65956</i>
#03807	NM_001007768.1	zgc:92055	<i>zgc:92055</i>
#03985	AC024175.3	NADH dehydrogenase subunit 5	<i>nd5</i>
#04050	AF254638.1	vitellogenin 3, phosvitinless	<i>vtg3</i>
#04068	NM_131540.1	homeo box A5a	<i>hoxa5a</i>
#04173	NM_131513.1	cyclin B1	<i>ccnb1</i>
#04431	NM_001013272.1	im:6892314	<i>im:6892314</i>
#04492	XM_678470.1	solute carrier family 2 (facilitated glucose/fructose transporter), member 5	<i>slc2a5</i>
#04531	NM_200892.1	thioredoxin domain containing 4 (endoplasmic reticulum)	<i>txndc4</i>
#04614	XM_686594.1	hemopexin	<i>hpx</i>
#04672	NM_131233.1	GATA-binding protein 2	<i>gata2</i>
#05003	NM_178222.2	single-minded homolog 1 (<i>Drosophila</i>)	<i>sim1</i>
#05176	XM_703310.1	similar to Hypothetical UPF0195 protein CGI-128 homolog	<i>LOC562168</i>
#05346	NM_212649.1	aldehyde dehydrogenase 3 family, member A2	<i>aldh3a2</i>
#05368	NM_201060.1	ribosomal protein L18a	<i>rpl18a</i>
#05463	BC095386.1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>gapdh</i>
#05637	NM_213107.1	ribosomal protein L4	<i>rpl4</i>
#05667	NM_200458.2	eukaryotic translation elongation factor 2, like	<i>eef2l</i>
#05830	NM_198140.1	translationally controlled tumor protein	<i>tctp</i>

Bestellnummer	Zugangsnummer	Bezeichnung des <i>Open Reading Frame</i>	Symbol
#05851	BC049404.1	phosphoglycerate mutase 1	<i>pgam1</i>
#05946	NM_180964.2	claudin d	<i>clnd</i>
#05981	BX569779.35	Zebrafish DNA sequence from clone CH211-11319 in linkage group 11, complete sequence	
#06147	XM_682549.1	vitellogenin 6	<i>vtg6</i>
#06233	NM_131552.1	mesoderm posterior b	<i>mespb</i>
#06261	BC056276.1	zgc:65770	<i>ctnb2</i>
#06947	XM_682299.1	similar to myosin containing PDZ domain	<i>LOC559005</i>
#06962	NM_170767.1	vitellogenin 1	<i>vtg1</i>
#07030	NM_001003847.1	THO complex 2	<i>thoc2</i>
#07050	NM_131853.1	neuroglobin	<i>ngb</i>
#07095	NM_212678.1	carbohydrate (chondroitin) synthase 1	<i>chys1</i>
#07195	NM_130920.1	retinol binding protein 4, plasma	<i>rhp4</i>
#07343	NM_131379.1	Kallmann syndrome 1b sequence	<i>kallb</i>
#07441	BC066713.1	swelling dependent chloride channel	<i>icln</i>
#07666	NM_199989.1	zgc:56425	<i>zgc:56425</i>
#07758	NM_001007768.1	zgc:92055	<i>zgc:92055</i>
#07832	NM_173240.1	BRG1/brm-associated factor 53A	<i>baf53a</i>
#07850	NM_131827.1	zona pellucida glycoprotein 2.2	<i>zp2.2</i>
#07971	BX682558.6	Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-225F5 in linkage group 3, complete sequence	
#07990	NM_001003728.1	zgc:92237	<i>zgc:92237</i>
#08000	AL935053.6	Zebrafish DNA sequence from clone CH211-162M14, complete sequence	
#08036	NM_213284.1	zgc:85811	<i>zgc:85811</i>
#08049	NM_199662.1	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 1, like	<i>dnaj11</i>
#08087	AY729649.1	<i>Danio rerio</i> vitellogenin 7 (<i>vtg7</i>) mRNA, partial cds	<i>vtg7</i>
#08103	NM_131804.1	nothepsin	<i>nots</i>
#08109	NM_131534.1	homeo box A3a	<i>hoxa3a</i>
#08162	XM_688719.1	similar to ubiquitin specific protease 8	<i>LOC565434</i>
#08169	BX927163.31	Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-126A1 in linkage group 22, complete sequence	
#08214	NM_205580.1	v-mos Moloney murine sarcoma viral oncogene homolog	<i>mos</i>
#08233	BC064291.1	elongation factor 1-alpha	<i>ef1a</i>
#08534	NM_001030082.1	forkhead box P2	<i>foxp2</i>
#08728	BC067580.1	ribosomal protein L4	<i>rpl4</i>
#08756	NM_001001946.1	alcohol dehydrogenase 8a	<i>adh8a</i>
#08758	NM_131696.1	zona pellucida glycoprotein 3 b	<i>zp3b</i>
#08765	NM_213015.1	splicing factor, arginine/serine-rich 1, like	<i>sfrs11</i>
#08858	NM_131718.1	sine oculis homeobox homolog 4.2	<i>six4.2</i>
#08874	NM_201298.1	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily e, member 1	<i>smarce1</i>
#08886	NM_212641.2	proliferation-associated 2G4 ,b	<i>pa2g4b</i>
#09054	CR550308.6	Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-14F20 in linkage group 8, complete sequence	
#09080	NM_131189.1	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1	<i>dnmt1</i>
#09301	NM_200235.1	zgc:55856	<i>zgc:55856</i>
#09391	NM_182863.1	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade C (antithrombin), member 1	<i>serpinc1</i>
#09458	NM_131674.1	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 2	<i>arnt2</i>
#09580	XM_687486.1	similar to Forkhead box protein P1	<i>LOC564127</i>
#09662	NM_131802.1	ceruloplasmin	<i>cp</i>
#09694	NM_152960.1	fatty acid binding protein 10, liver basic	<i>fabp10</i>
#09754	NM_131023.1	ephrin B2a	<i>efnb2a</i>
#09758	XM_687486.1	similar to Forkhead box protein P1	<i>LOC564127</i>
#09776	XM_687533.1	similar to brain-selective kinase 2 isoform gamma	<i>LOC564185</i>
#09943	NM_173235.1	ribosomal protein L24	<i>rpl24</i>
#09965	NM_131128.1	apolipoprotein A-I	<i>apoa</i>
#10198	NM_001017824.1	zgc:109868	<i>zgc:109868</i>
#10274	NM_131347.1	uroporphyrinogen decarboxylase	<i>urod</i>
#10283	NM_131151.1	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 5	<i>psmb5</i>
#10285	NM_200210.1	pdgfa associated protein 1	<i>pdap1</i>

Bestellnummer	Zugangsnummer	Bezeichnung des <i>Open Reading Frame</i>	Symbol
#10451	NM_152959.1	estrogen receptor 1	<i>esr1</i>
#10542	NM_199522.1	ras homolog gene family, member E	<i>arhe</i>
#10706	NM_214756.1	nicotinamide nucleotide transhydrogenase	<i>nnt</i>
#10792	NM_200047.1	ribosomal protein L7a	<i>rpl7a</i>
#10815	NM_213481.1	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 1, like	<i>gnb11</i>
#10879	NM_001003840.1	EBNA1 binding protein 2-like	<i>ebna1bp2l</i>
#11036	NM_001002378.1	zgc:92066	<i>zgc:92066</i>
#11056	NM_001034178.1	zgc:123245	<i>zgc:123245</i>
#11421	XM_685205.1	similar to Ankyrin repeat domain protein 11 (Ankyrin repeat-containing cofactor-1)	<i>LOC561805</i>
#11494	NM_173247.1	solute carrier family 25 alpha, member 5	<i>slc25a5</i>
#11552	BC067566.1	bactin2	<i>bactin2</i>
#11761	CR759865.13	Zebrafish DNA sequence from clone CH211-118E11 in linkage group 18, complete sequence	
#11857	NM_001034987.1	integrin beta1 subunit-like protein 2	<i>itgb1</i>
#11927	NM_001002448.1	zgc:92346	<i>zgc:92346</i>
#12026	NM_001002230.1	tubulin, alpha 7 like	<i>tuba7l</i>
#12110	NM_201582.1	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 3	<i>ercc3</i>
#12152	XM_693517.1	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 15	<i>dhx15</i>
#12161	BX537342.6	Zebrafish DNA sequence from clone CH211-198P11 in linkage group 3, complete sequence	
#12685	XM_703516.1	similar to non-neuronal splice variant nPTB4	<i>LOC562434</i>
#12936	NM_001025189.1	zgc:114012	<i>vtg5</i>
#12988	NM_131329.2	myosin, light polypeptide 7, regulatory	<i>myl7</i>
#13048	NM_212690.1	phospholipase A2-activating protein	<i>plaa</i>
#13164	NM_205627.2	receptor interacting protein kinase 5	<i>ripk5</i>
#13260	NM_212986.1	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	<i>hpri1</i>
#13370	NM_001004652.1	zgc:103765	<i>cox17</i>
#13870	NM_212784.1	ribosomal protein L13a	<i>rpl13a</i>
#13940	BX545848.23	Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-8019 in linkage group 20	

Anhang B: Gene IDs

Nachfolgend sind die *Gene IDs* der *Subset-Arrays* aufgeführt. Sie beinhalten Informationen über die Lokalisierung der Sonden auf den Microarrays und geben die Bestellnummern von Ocimum Biosolutions an.

B.1 Gene ID der Microarrays für E2-Proben

Meta-Reihe	Meta-Spalte	Reihe	Spalte	Bestell-Nr.
2	1	2	3	#00043
1	1	2	3	#00562
2	1	1	4	#01171
2	2	2	2	#03268
2	1	1	6	#03519
2	2	2	4	#04050
1	1	2	1	#04614
2	2	2	5	#04672
1	1	1	2	#05176
2	1	1	1	#05346
1	1	3	1	#06233
2	2	1	5	#06261
2	1	2	4	#06947
1	1	1	5	#06962
1	2	1	1	#07030
1	1	2	5	#07095
2	2	1	4	#07343
1	1	2	6	#07666
1	2	2	4	#07758
1	2	2	5	#07832
1	2	1	3	#07971
2	1	1	5	#08000
1	2	1	5	#08049
1	2	2	1	#08087
2	1	2	6	#08103
2	2	1	3	#08109
2	1	1	2	#08162
2	2	1	6	#08169
1	2	1	4	#08233
1	2	1	6	#08534
1	1	2	4	#09054
2	2	2	3	#09301
1	2	2	6	#09580
2	2	1	1	#09754
1	1	2	2	#09758
2	2	2	1	#10198
1	2	2	2	#10285

Meta-Reihe	Meta-Spalte	Reihe	Spalte	Bestell-Nr.
1	1	1	3	#10451
2	1	2	1	#10706
2	1	1	3	#10815
2	1	2	2	#11552
1	1	1	4	#11857
2	2	2	6	#12026
1	2	1	2	#12110
1	1	1	1	#12152
1	1	1	6	#12161
1	2	2	3	#13164
2	2	1	2	#13260
2	1	2	5	#13370
1	2	3	1	#13940

B.2 Gene ID der Microarrays für BPA-Proben

Meta-Reihe	Meta-Spalte	Reihe	Spalte	Bestell-Nr.
2	1	2	3	#00043
1	1	2	3	#00562
2	1	1	4	#01171
2	2	2	2	#03268
2	1	1	6	#03519
2	2	2	4	#04050
1	1	2	1	#04614
2	2	2	5	#04672
1	1	1	2	#05176
2	1	1	1	#05346
1	1	3	1	#06233
2	2	1	5	#06261
2	1	2	4	#06947
1	1	1	5	#06962
1	2	1	1	#07030
1	1	2	5	#07095
2	2	1	4	#07343
1	1	2	6	#07666
1	2	2	4	#07758
1	2	2	5	#07832
1	2	1	3	#07971
2	1	1	5	#08000
1	2	1	5	#08049
1	2	2	1	#08087
2	1	2	6	#08103
2	2	1	3	#08109
2	1	1	2	#08162
2	2	1	6	#08169
1	2	1	4	#08233
1	2	1	6	#08534

Meta-Reihe	Meta-Spalte	Reihe	Spalte	Bestell-Nr.
1	1	2	4	#09054
2	2	2	3	#09301
1	2	2	6	#09580
2	2	1	1	#09754
1	1	2	2	#09758
2	2	2	1	#10198
1	2	2	2	#10285
1	1	1	3	#10451
2	1	2	1	#10706
2	1	1	3	#10815
2	1	2	2	#11552
1	1	1	4	#11857
2	2	2	6	#12026
1	2	1	2	#12110
1	1	1	1	#12152
1	1	1	6	#12161
1	2	2	3	#13164
2	2	1	2	#13260
2	1	2	5	#13370
1	2	3	1	#13940
1	1	3	2	#00651
1	2	3	2	#01364
1	1	3	3	#02595
1	2	3	3	#02612
1	1	3	4	#03126
1	2	3	4	#03495
1	1	3	5	#04050
1	2	3	5	#04068
1	1	3	6	#04431
1	2	3	6	#04531
2	1	3	1	#05368
2	2	3	1	#05463
2	1	3	2	#05637
2	2	3	2	#05667
2	1	3	3	#05830
2	2	3	3	#05851
2	1	3	4	#05981
2	2	3	4	#06147
2	1	3	5	#07050
2	2	3	5	#07990
2	1	3	6	#08728
2	2	3	6	#08765
1	1	4	1	#08874
1	2	4	1	#08886
1	1	4	2	#09943
1	2	4	2	#10283
1	1	4	3	#10792
1	2	4	3	#10879
1	1	4	4	#11036
1	2	4	4	#11056
1	1	4	5	#11494

Meta-Reihe	Meta-Spalte	Reihe	Spalte	Bestell-Nr.
1	2	4	5	#11761
1	1	4	6	#11927
1	2	4	6	#12685
2	1	4	1	#12988
2	2	4	1	#13048
2	1	4	2	#13870

B.3 Gene ID der Microarrays für Genistein-Proben

Meta-Reihe	Meta-Spalte	Reihe	Spalte	Bestell-Nr.
2	1	2	3	#00043
1	1	2	3	#00562
2	1	1	4	#01171
2	2	2	2	#03268
2	1	1	6	#03519
2	2	2	4	#04050
1	1	2	1	#04614
2	2	2	5	#04672
1	1	1	2	#05176
2	1	1	1	#05346
1	1	3	1	#06233
2	2	1	5	#06261
2	1	2	4	#06947
1	1	1	5	#06962
1	2	1	1	#07030
1	1	2	5	#07095
2	2	1	4	#07343
1	1	2	6	#07666
1	2	2	4	#07758
1	2	2	5	#07832
1	2	1	3	#07971
2	1	1	5	#08000
1	2	1	5	#08049
1	2	2	1	#08087
2	1	2	6	#08103
2	2	1	3	#08109
2	1	1	2	#08162
2	2	1	6	#08169
1	2	1	4	#08233
1	2	1	6	#08534
1	1	2	4	#09054
2	2	2	3	#09301
1	2	2	6	#09580
2	2	1	1	#09754
1	1	2	2	#09758
2	2	2	1	#10198
1	2	2	2	#10285

Meta-Reihe	Meta-Spalte	Reihe	Spalte	Bestell-Nr.
1	1	1	3	#10451
2	1	2	1	#10706
2	1	1	3	#10815
2	1	2	2	#11552
1	1	1	4	#11857
2	2	2	6	#12026
1	2	1	2	#12110
1	1	1	1	#12152
1	1	1	6	#12161
1	2	2	3	#13164
2	2	1	2	#13260
2	1	2	5	#13370
1	2	3	1	#13940
1	1	3	2	#00032
1	2	3	2	#00054
1	1	3	3	#00167
1	2	3	3	#00181
1	1	3	4	#00186
1	2	3	4	#00226
1	1	3	5	#00374
1	2	3	5	#00430
1	1	3	6	#00937
1	2	3	6	#01821
2	1	3	1	#02130
2	2	3	1	#02156
2	1	3	2	#02178
2	2	3	2	#02197
2	1	3	3	#02353
2	2	3	3	#02721
2	1	3	4	#02741
2	2	3	4	#02980
2	1	3	5	#03055
2	2	3	5	#03336
2	1	3	6	#03427
2	2	3	6	#03807
1	1	4	1	#03985
1	2	4	1	#04173
1	1	4	2	#04492
1	2	4	2	#05003
1	1	4	3	#05946
1	2	4	3	#07195
1	1	4	4	#07441
1	2	4	4	#07850
1	1	4	5	#08036
1	2	4	5	#08214
1	1	4	6	#08756
1	2	4	6	#08758
2	1	4	1	#08858
2	2	4	1	#09080
2	1	4	2	#09391
2	2	4	2	#09458

Meta-Reihe	Meta-Spalte	Reihe	Spalte	Bestell-Nr.
2	1	4	3	#09662
2	2	4	3	#09694
2	1	4	4	#09776
2	2	4	4	#09965
2	1	4	5	#10274
2	2	4	5	#10542
2	1	4	6	#11421
2	2	4	6	#12936

Anhang C: Signifikant regulierte Sonden für $p < 0,05$ und $f.c. > 2$

C.1 Regulierte Sonden nach Exposition mit 500 ng/L E2 für elf Tage

Bezeichnung des <i>Open Reading Frame</i>	Symbol	Zugangsnummer	<i>f.c.</i>	<i>p-value</i>
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
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

Bezeichnung des Open Reading Frame	Symbol	Zugangsnummer	f.c.	p-value
forkhead box A2	<i>foxa2</i>	NM_130949.1	4,59	1,33E-02
S-adenosylhomocysteine hydrolase-like 2	<i>ahcyl2</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>plekhal</i>	NM_213436.1	2,28	1,11E-03
talin 1	<i>tlm1</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
TCs hochreguliert				
similar to vitellogenin	<i>LOC557092</i>	XM_680074.1	159,18	1,11E-06
zgc:92055	<i>zgc:92055</i>	NM_001007768.1	43,46	3,58E-06
similar to myosin containing PDZ domain	<i>LOC559005</i>	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	<i>zgc:56425</i>	NM_199989.1	18,52	8,98E-05

Bezeichnung des <i>Open Reading Frame</i>	Symbol	Zugangsnummer	f.c.	p-value
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	<i>zgc:109973</i>	NM_001020540.1	16,08	6,82E-04
similar to vitellogenin 3 precursor	<i>LOC565509</i>	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	<i>LOC564127</i>	XM_687486.1	13,15	1,75E-04
similar to vitellogenin 1	<i>LOC559475</i>	XM_686219.1	12,00	4,24E-04
zgc:123049	<i>zgc:123049</i>	BC086809.1	11,05	3,31E-04
zgc:63647	<i>zgc:63647</i>	NM_201077.1	10,65	8,78E-05
zgc:110689	<i>zgc:110689</i>	NM_001020477.1	10,50	4,06E-03
similar to tuberous sclerosis 2	<i>LOC567524</i>	XM_690820.1	10,41	2,74E-03
zgc:109868	<i>zgc:109868</i>	NM_001017824.1	10,20	1,59E-05
zgc:100913	<i>zgc:100913</i>	NM_001003751.1	9,86	4,44E-03
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	<i>LOC557091</i>	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	<i>zgc:55456</i>	NM_197942.1	5,47	4,39E-03
zgc:77836	<i>zgc:77836</i>	NM_213196.1	4,77	2,28E-03
zgc:112538	<i>zgc:112538</i>	NM_001017741.2	4,53	1,16E-03
similar to tensin-like SH2 domain containing 1	<i>CH211-191A24.2</i>	XM_693973.1	4,47	8,57E-03
similar to RAN binding protein 5	<i>LOC569455</i>	XM_692846.1	4,09	1,18E-02

Bezeichnung des <i>Open Reading Frame</i>	Symbol	Zugangsnummer	<i>f.c.</i>	<i>p-value</i>
Danio rerio clone CH211-218M15, complete sequence		AC144711.2	4,07	1,51E-03
<i>zgc:56142</i>	<i>zgc:56142</i>	NM_213003.1	4,00	7,95E-03
Zebrafish DNA sequence from clone CH211-89M19, complete sequence		BX004832.9	3,81	3,69E-03
<i>zgc:63663</i>	<i>zgc:63663</i>	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)	<i>LOC567311</i>	XM_690606.1	3,71	1,56E-03
<i>zgc:110312</i>	<i>zgc:110312</i>	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	<i>LOC567732</i>	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	<i>LOC568810</i>	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
<i>zgc:55652</i>	<i>zgc:55652</i>	NM_199775.1	3,09	1,05E-02
Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-21007 in linkage group 6, complete sequence		BX571728.14	2,99	1,81E-02
similar to ubiquitin specific protease 10	<i>LOC564632</i>	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)	<i>LOC562666</i>	XM_686041.1	2,75	3,48E-02
<i>zgc:77407</i>	<i>zgc:77407</i>	NM_213266.1	2,73	1,98E-02
similar to putative protein, with a coiled coil-4 domain, of bilateral origin (4H869)	<i>LOC571179</i>	XM_694744.1	2,67	3,76E-03
<i>zgc:112431</i>	<i>zgc:112431</i>	NM_001017782.1	2,56	1,24E-02
hypothetical protein LOC554662	<i>LOC554662</i>	XM_697410.1	2,50	1,62E-02

Bezeichnung des Open Reading Frame	Symbol	Zugangsnummer	f.c.	p-value
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	<i>LOC563470</i>	XM_686831.1	2,25	1,21E-02
zgc:110658	<i>zgc:110658</i>	NM_001017879.1	2,21	3,40E-03
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 coll1a2 gene for collagen type XI alpha-2, the fabgl 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	<i>LOC568842</i>	XM_692198.1	2,07	3,67E-02
zgc:55283	<i>zgc:55283</i>	NM_200997.1	2,05	1,21E-06
similar to sodium-calcium exchanger	<i>LOC557499</i>	XM_680579.1	2,02	1,30E-02
ETs herunterreguliert				
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
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

Bezeichnung des <i>Open Reading Frame</i>	Symbol	Zugangsnummer	f.c.	p-value
membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain containing 1	<i>magil</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 (<i>S. cerevisiae</i>)	<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>serpinc1</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
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, <i>Drosophila</i>) 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 herunterreguliert				
Zebrafish DNA sequence from clone CH211-234P6 in linkage group 24, complete sequence		BX001030.7	-4,16	1,46E-02

Bezeichnung des <i>Open Reading Frame</i>	Symbol	Zugangsnummer	<i>f.c.</i>	<i>p-value</i>
enolase 1	<i>enol</i>	NM_212722.1	-3,98	1,94E-03
zgc:103710	<i>zgc:103710</i>	NM_001008582.1	-3,21	2,19E-02
zgc:63517	<i>zgc:63517</i>	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	<i>zgc:92479</i>	NM_001003489.1	-2,93	2,11E-02
similar to Zinc finger homeobox protein 1b (Smad interacting protein 1) (SMADIPI)	<i>LOC563104</i>	XM_686470.1	-2,90	1,37E-02
zgc:123027	<i>zgc:123027</i>	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)	<i>LOC571748</i>	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
similar to kinesin family member 1B isoform alpha	<i>LOC562945</i>	XM_686311.1	-2,63	1,49E-02
zgc:55856	<i>zgc:55856</i>	NM_200235.1	-2,60	3,00E-04
similar to 7-transmembrane receptor frizzled-1	<i>LOC557384</i>	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	<i>LOC564619</i>	XM_687953.1	-2,54	4,20E-03
similar to ATP synthase beta-subunit	<i>LOC571176</i>	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	<i>LOC562139</i>	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

Bezeichnung des <i>Open Reading Frame</i>	Symbol	Zugangsnummer	<i>f.c.</i>	<i>p-value</i>
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)	<i>LOC555348</i>	XM_677839.1	-2,29	2,12E-02
zgc:92061	<i>zgc:92061</i>	NM_001002383.1	-2,27	3,95E-02
similar to Collagen alpha 1(XIX) chain precursor (Collagen alpha 1(Y) chain)	<i>LOC570837</i>	XM_694359.1	-2,25	3,06E-03
zgc:110585	<i>zgc:110585</i>	NM_001017906.1	-2,24	7,58E-03
similar to Notch 2	<i>LOC559948</i>	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
zgc:91973	<i>zgc:91973</i>	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	<i>zgc:92631</i>	NM_001002695.1	-2,20	4,06E-02
zgc:66198	<i>zgc:66198</i>	NM_199554.1	-2,16	3,15E-02
zgc:64115	<i>zgc:64115</i>	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	<i>LOC567110</i>	XM_690399.1	-2,10	8,65E-03
similar to basic transcription factor 3	<i>LOC556625</i>	XM_678080.1	-2,09	2,69E-02
similar to WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1	<i>LOC570676</i>	XM_694182.1	-2,08	1,73E-02
similar to WD and tetratricopeptide repeats 1	<i>LOC570606</i>	XM_694107.1	-2,07	1,09E-03
similar to integrin alpha 11 subunit	<i>LOC570776</i>	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)	<i>LOC569730</i>	XM_693133.1	-2,06	4,62E-03
similar to SMC2 protein	<i>LOC563640</i>	XM_686996.1	-2,04	4,54E-03
zgc:64091	<i>zgc:64091</i>	NM_213146.1	-2,03	1,10E-02
zgc:63744	<i>zgc:63744</i>	BC054136.1	-2,02	2,29E-02
similar to ubiquitin specific protease 8	<i>LOC565434</i>	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	<i>zgc:55705</i>	NM_213078.1	-2,02	1,52E-03

Bezeichnung des <i>Open Reading Frame</i>	Symbol	Zugangsnummer	f.c.	p-value
similar to Dimethylglycine dehydrogenase, mitochondrial precursor (ME2GLYDH)	<i>LOC566241</i>	XM_689510.1	-2,02	4,59E-02

C.2 Regulierte Sonden nach Exposition mit 1000 µg/L BPA für elf Tage

Bezeichnung des <i>Open Reading Frame</i>	Symbol	Zugangsnummer	f.c.	p-value
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>eef2l</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
TCs hochreguliert				
im:6892314	<i>im:6892314</i>	NM_001013272.1	3,53	2,13E-02
zgc:123245	<i>zgc:123245</i>	NM_001034178.1	2,60	1,00E-02
zgc:103632	<i>zgc:103632</i>	NM_001005953.1	2,49	5,67E-04
im:6892314	<i>im:6892314</i>	BC069831.1	2,45	2,40E-02

Bezeichnung des Open Reading Frame	Symbol	Zugangsnummer	f.c.	p-value
zgc:92346	<i>zgc:92346</i>	NM_001002448.1	2,44	3,34E-02
similar to 10 kda Ca(2+)-binding S-100 protein	<i>LOC558870</i>	XM_682144.1	2,35	2,61E-02
zgc:92237	<i>zgc:92237</i>	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	<i>zgc:92066</i>	NM_001002378.1	2,15	3,29E-03
zgc:109934	<i>zgc:109934</i>	NM_001020531.1	2,12	2,31E-02
similar to Ferritin heavy chain (Ferritin H subunit) (Proliferation-inducing gene 15 protein)	<i>LOC559768</i>	XM_682988.1	2,04	1,12E-02
ETs herunterreguliert				
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 4 (endoplasmic reticulum)	<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 herunterreguliert				
Zebrafish DNA sequence from clone CH211-113I9 in linkage group 11, complete sequence		BX569779.35	-2,74	1,50E-02
zgc:103512	<i>zgc:103512</i>	NM_001006016.1	-2,54	3,52E-02
similar to solute carrier family 5, member 7	<i>LOC556699</i>	XM_679550.1	-2,38	8,40E-03
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	<i>LOC558578</i>	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	<i>LOC562434</i>	XM_703516.1	-2,02	4,84E-02

C.3 Regulierte Sonden nach Exposition mit 5000 µg/L Genistein für elf Tage

Bezeichnung des <i>Open Reading Frame</i>	Symbol	Zugangsnummer	f.c.	p-value
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>cldnd</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
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

Bezeichnung des Open Reading Frame	Symbol	Zugangsnummer	f.c.	p-value
basic leucine zipper and W2 domains 1	<i>bzwl</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
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>hyoul</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
cth1	<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

Bezeichnung des Open Reading Frame	Symbol	Zugangsnummer	f.c.	p-value
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
TCs hochreguliert				
similar to dentin sialophosphoprotein pre-protein	<i>LOC555353</i>	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	<i>LOC564185</i>	XM_687533.1	6,43	4,83E-02
similar to dentin sialophosphoprotein pre-protein	<i>LOC555353</i>	XM_677844.1	6,02	3,61E-02
si:dkeyp-50f7.2	<i>si:dkeyp-50f7.2</i>	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	<i>LOC557092</i>	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	<i>LOC561528</i>	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)	<i>LOC561928</i>	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	<i>zgc:123174</i>	NM_001037110.1	4,42	2,62E-02

Bezeichnung des Open Reading Frame	Symbol	Zugangsnummer	f.c.	p-value
similar to RNA (guanine-7-) methyltransferase	<i>LOC562801</i>	XM_686175.1	4,39	4,28E-02
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)	<i>LOC563175</i>	XM_686544.1	4,28	3,63E-02
similar to zinc finger protein 289, ID1 regulated	<i>LOC572425</i>	XM_696138.1	4,25	2,48E-02
similar to Stathmin (Phosphoprotein p19) (pp19) (Oncoprotein 18) (Op18) (Leuke- mia-associated phosphoprotein p18) (pp17) (Prosolin) (Metablastin) (Pr22 protein)	<i>LOC571906</i>	XM_695550.1	4,24	4,19E-02
<i>zgc:56330</i>	<i>zgc:56330</i>	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
<i>zgc:55343</i>	<i>zgc:55343</i>	NM_200252.1	3,76	4,48E-02
<i>zgc:100994</i>	<i>zgc:100994</i>	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
<i>zgc:66165</i>	<i>zgc:66165</i>	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)	<i>LOC555348</i>	XM_677839.1	3,38	2,64E-02
<i>zgc:92194</i>	<i>zgc:92194</i>	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	<i>LOC561234</i>	XM_684640.1	2,83	4,87E-02
similar to GCN1 general control of amino- acid synthesis 1-like 1	<i>LOC570396</i>	XM_693873.1	2,77	4,37E-02
similar to Transcription factor IIIA (Factor A) (TFIIIA)	<i>LOC570186</i>	XM_693633.1	2,67	2,36E-02
hypothetical protein LOC570896	<i>LOC570896</i>	XM_694426.1	2,67	3,05E-02
Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-274M14 in linkage group 23, complete sequence		BX511310.13	2,67	2,96E-02
similar to ZP2	<i>LOC555180</i>	XM_677704.1	2,64	1,04E-02

Bezeichnung des <i>Open Reading Frame</i>	Symbol	Zugangsnummer	f.c.	p-value
sphingolipid delta 4 desaturase/C-4 hydroxylase 2	<i>LOC402799</i>	XM_689103.1	2,58	1,78E-02
<i>zgc:56034</i>	<i>zgc:56034</i>	BC065323.1	2,52	3,54E-02
similar to Sulfotransferase 4A1 (Brain sulfotransferase-like protein) (hBR-STL) (hBR-STL-1) (Nervous system sulfotransferase) (NST)	<i>LOC568494</i>	XM_691824.1	2,51	3,84E-02
similar to NKX2-8 protein	<i>LOC565596</i>	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
<i>zgc:55879</i>	<i>zgc:55879</i>	NM_199875.1	2,47	1,72E-02
<i>zgc:110395</i>	<i>zgc:110395</i>	NM_001033107.1	2,40	2,80E-02
<i>zgc:77429</i>	<i>zgc:77429</i>	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	<i>LOC562885</i>	XM_686254.1	2,34	8,94E-03
similar to ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 2	<i>LOC560253</i>	XM_683647.1	2,28	4,99E-02
<i>zgc:92148</i>	<i>zgc:92148</i>	NM_001002353.1	2,25	3,26E-02
<i>zgc:66378</i>	<i>zgc:66378</i>	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
<i>zgc:110553</i>	<i>zgc:110553</i>	NM_001013550.1	2,20	3,20E-02
similar to Ankyrin repeat domain protein 11 (Ankyrin repeat-containing cofactor-1)	<i>LOC561805</i>	XM_685205.1	2,16	7,50E-03
similar to Serine/threonine-protein kinase Pim-3	<i>LOC561011</i>	XM_684410.1	2,15	1,36E-02
hypothetical protein LOC562425	<i>LOC562425</i>	XM_685812.1	2,14	4,30E-02
similar to eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 1 isoform 4	<i>LOC572435</i>	XM_696148.1	2,14	1,56E-03
similar to mitochondrial ribosomal protein L22	<i>LOC560937</i>	XM_684337.1	2,12	2,71E-02
<i>zgc:109957</i>	<i>zgc:109957</i>	NM_001024407.1	2,12	1,99E-02
<i>zgc:101095</i>	<i>zgc:101095</i>	NM_001004644.1	2,12	9,25E-03
<i>zgc:66045</i>	<i>zgc:66045</i>	NM_212647.1	2,10	8,05E-03
similar to R31546_1	<i>LOC570545</i>	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
<i>zgc:65979</i>	<i>zgc:65979</i>	NM_200066.1	2,09	3,94E-02
<i>zgc:77126</i>	<i>zgc:77126</i>	NM_206829.1	2,09	2,59E-02

Bezeichnung des Open Reading Frame	Symbol	Zugangsnummer	f.c.	p-value
similar to ATP-dependent metalloprotease YME1L1 (YME1-like protein 1) (ATP-dependent metalloprotease FtsH1)	<i>LOC555390</i>	XM_677883.1	2,07	1,44E-03
similar to pyrroline-5-carboxylate synthetase isoform 1	<i>LOC557186</i>	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	<i>zgc:101879</i>	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 herunterreguliert				
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>serpina1</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
serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade C (antithrombin), member 1	<i>serpincl1</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>magi1</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

Bezeichnung des Open Reading Frame	Symbol	Zugangsnummer	f.c.	p-value
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>dmbx1</i>	AF398526.1	-2,19	6,53E-03
plasminogen	<i>plg</i>	NM_201472.1	-2,18	4,43E-02
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 herunterreguliert				
similar to complement C3-H1	<i>LOC571670</i>	XM_695278.1	-6,74	1,11E-03
similar to complement C4-2	<i>LOC562579</i>	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	<i>LOC562945</i>	XM_686311.1	-3,04	2,96E-03
similar to complement C3-Q1	<i>LOC567902</i>	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)	<i>LOC563104</i>	XM_686470.1	-2,87	3,65E-03
similar to Heat shock protein HSP 90-alpha (HSP 86)	<i>DKEY-241L7.8</i>	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	<i>LOC568842</i>	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

Bezeichnung des Open Reading Frame	Symbol	Zugangsnummer	f.c.	p-value
<i>zgc:77825</i>	<i>zgc:77825</i>	NM_205643.1	-2,66	3,53E-02
<i>zgc:123136</i>	<i>zgc:123136</i>	NM_205741.1	-2,58	3,13E-02
<i>zgc:92631</i>	<i>zgc:92631</i>	NM_001002695.1	-2,47	1,09E-02
<i>zgc:92061</i>	<i>zgc:92061</i>	NM_001002383.1	-2,44	2,50E-02
Zebrafish DNA sequence from clone CH211-26211 in linkage group 11, complete sequence		CR847939.13	-2,43	1,69E-02
hypothetical protein LOC553425	<i>LOC553425</i>	BC095066.1	-2,42	1,37E-03
<i>zgc:103471</i>	<i>zgc:103471</i>	NM_001008612.1	-2,40	6,68E-03
Danio rerio mitochondrial genome, complete sequence		AC024175.3	-2,39	3,16E-02
<i>zgc:64091</i>	<i>zgc:64091</i>	NM_213146.1	-2,39	1,63E-03
similar to Receptor-type tyrosine-protein phosphatase kappa precursor (Protein-tyrosine phosphatase kappa) (R-PTP-kappa)	<i>LOC555348</i>	XM_677839.1	-2,35	6,60E-03
<i>zgc:92903</i>	<i>zgc:92903</i>	NM_001002461.1	-2,31	1,19E-02
similar to complement C4-1	<i>LOC566261</i>	XM_689530.1	-2,31	1,50E-03
<i>zgc:92055</i>	<i>zgc:92055</i>	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
<i>zgc:92763</i>	<i>zgc:92763</i>	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
<i>zgc:91973</i>	<i>zgc:91973</i>	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
<i>zgc:92061</i>	<i>zgc:92061</i>	NM_001002383.1	-2,26	2,36E-02
similar to WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1	<i>LOC570676</i>	XM_694182.1	-2,26	2,31E-02
<i>zgc:64115</i>	<i>zgc:64115</i>	NM_213136.1	-2,23	2,42E-02
similar to Notch 2	<i>LOC559948</i>	XM_683343.1	-2,23	2,04E-02
<i>zgc:92479</i>	<i>zgc:92479</i>	NM_001003489.1	-2,20	2,59E-02
<i>zgc:101640</i>	<i>zgc:101640</i>	NM_001007444.1	-2,19	8,98E-03
<i>zgc:92010</i>	<i>zgc:92010</i>	NM_001003994.1	-2,18	2,53E-02
<i>zgc:85811</i>	<i>zgc:85811</i>	NM_213284.1	-2,17	3,62E-02
<i>zgc:92630</i>	<i>zgc:92630</i>	NM_001002696.1	-2,15	4,99E-02
similar to Collagen alpha 1(XIX) chain precursor (Collagen alpha 1(Y) chain)	<i>LOC570837</i>	XM_694359.1	-2,14	1,14E-02
<i>zgc:112032</i>	<i>zgc:112032</i>	BC095650.1	-2,14	2,29E-02
similar to tyrosine aminotransferase	<i>LOC561410</i>	XM_684816.1	-2,12	1,63E-02

Bezeichnung des Open Reading Frame	Symbol	Zugangsnummer	f.c.	p-value
similar to Suclg2 protein	<i>LOC561735</i>	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	<i>zgc:56326</i>	AY398361.1	-2,05	1,94E-02
similar to PHD finger protein 20 (Hepatocellular carcinoma-associated antigen 58 homolog)	<i>LOC563332</i>	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

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Bertold Hock für die Überlassung des Themas und die fachliche Unterstützung während meiner Arbeit an seinem Lehrstuhl.

Herrn Dr. Martin Seifert danke ich für seine Betreuung und die Organisation des Projektes.

Für seine Unterstützung im Projekt und insbesondere bei der Haltung und Exposition der Fische bedanke ich mich bei meinem Kollegen Ulf Kausch.

Ich danke Frau Stefanie Haindl für ihre stets freundliche Unterstützung im Labor sowie ihre unkomplizierte und humorvolle Art.

Herrn Dr. Jan Budczies von der Fa. provitro GmbH möchte ich ganz herzlich für die umfangreiche Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Daten bedanken.

Ich danke Herrn PD Dr. Karl Kramer für die Durchsicht und Kritik an meiner Arbeit sowie die gemeinsamen Mittagessen.

Ebenso möchte ich mich bei allen weiteren Mitarbeitern am Lehrstuhl für Zellbiologie für ihre verlässliche Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei meiner Familie und Freunden, die über die Jahre viel Verständnis aufbrachten und mich motivierten.

Herrn PD Dr. Michael Pfaffl danke ich für die Hilfe bei der quantitativen PCR und dem Lehrstuhl für Tierhygiene für die Bereitstellung des LightCyclers.

Schließlich danke ich der Europäischen Union für die Förderung des EDEN Projekts und die finanzielle Unterstützung.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Martin Alberti
Geburtsdatum: 8. Mai 1975
Geburtsort: München
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1981 - 1985 Grundsule Berner Str. in München
1985 – 1994 Städtisches Thomas-Mann Gymnasium in München
(Abschluss: Allgemeine Hochschulreife)

Hochschulstudium:

Okt. 1994 – Jul. 2002 Studium der Biologie an der Technischen Universität
München Freising-Weihenstephan
(Abschluss: Diplom-Biologe)

Praktische Tätigkeiten:

Okt. 2002 – Dez. 2002 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Zellbiologie
der Technischen Universität München
Freising-Weihenstephan
Jan. 2003 – Dez. 2005 Wissenschaftlicher Angestellter am Lehrstuhl für Zellbiologie
der Technischen Universität München
Freising-Weihenstephan

Von September 2002 bis September 2006 wurde die vorliegende Dissertation angefertigt.