

Eawag News



Zebrabärblinge – Sensoren in der Ökotoxikologie

Ein neuer molekularer Toxizitätstest. Seite 10

Zebrabärblinge ohne Östrogenrezeptoren. Seite 18

Veränderte Genaktivität durch Rohöl. Seite 24



Rik Eggen, Molekularbiologe, leitete bis zu seiner Ernennung zum Eawag-Vize-Direktor die Abteilung Umwelttoxikologie.

Zebrabärbling – die aquatische Maus

Als der Zebrabärbling (lat. *Danio rerio*) 1822 erstmals beschrieben wurde, deutete nichts auf die steile Karriere hin, die er einmal machen würde. So ist der schillernd blau-weiss gestreifte Fisch nicht nur bei Aquarianern sehr beliebt. Auch die Wissenschaft hat ihn für sich entdeckt und in den Labors heisst er kurz «Zebrafisch», ausgehend vom englischen Namen «zebrafish». Auf der Suche nach einem Wirbeltiermodell interessierten sich zunächst vor allem Mediziner und Entwicklungsbiologen für die nur 5–6 cm langen Fische. Ihre günstigen Eigenschaften – sie sind robust, leicht zu halten, liefern eine grosse Nachkommenschar, entwickeln sich in nur 24 Stunden vom befruchteten Ei zur Larve und eignen sich hervorragend für genetische Analysen – überzeugten die Forscher.

Vor etwa acht Jahren reifte an der Eawag die Idee, den Zebrabärbling als Modellorganismus in der Ökotoxikologie zu verwenden. Damals war man alarmiert durch Berichte von hormonaktiven Chemikalien und vermutete, dass diese Stoffe für das vermehrte Auftreten von Fischen mit missgebildeten Geschlechtsorganen verantwortlich sein könnten. Es gab zwar bereits einfach durchzuführende Reagenzglas-Tests, mit denen hormonaktive Stoffe in Wasserproben nachgewiesen werden konnten; diese auch heute noch verwendeten Techniken arbeiten mit Einzellern (Bakterien, Hefen), Zellkulturen oder Zellbestandteilen. Aber es fehlte ein ganzheitlicher Modellorganismus, an dem der kausale Zusammenhang zwischen den hormonaktiven Substanzen und den Geschlechtsanomalien untersucht werden kann. Hier schienen Zebrabärblinge äusserst geeignet und so begannen wir Anfang 2001 unser Fischlabor aufzubauen. Gemeinsam mit dem Entwicklungsbiologen Stephan Neuhauss von der Universität Zürich und dem Fischphysiologen Helmut Segner von der Universität Bern, die beide bereits länger mit Zebrabärblingen gearbeitet hatten, erforschten wir im Rahmen des Nationalen Forschungsprogramms NFP 50 «Hormonaktive Stoffe» sowie eines EU-Projekts den ge-

nauen Wirkmechanismus der hormonaktiven Substanzen. Ein Teil unserer Ergebnisse wird schwerpunktmässig in dieser Ausgabe der Eawag News beschrieben.

Ein weiterer Fokus unserer ökotoxikologischen Forschung am Zebrabärbling liegt in der Entwicklung neuer Toxizitätstests. Ziel ist es einerseits, auf den Einsatz adulter Tiere zu verzichten. Andererseits sollen uns die Tests Einblick in die Wirkungsweise der Substanzen geben. Da liegt es nahe, sie auf molekulare Endpunkte hin auszurichten, anstatt wie bisher relativ unspezifische Kriterien, z.B. morphologische Veränderungen oder die Sterblichkeitsrate, zu betrachten. Der an der Eawag entwickelte und bereits auf seine Praxistauglichkeit getestete MolDarT (molekularer *Danio rerio*-Teratogenitätstest) ist ein grosser Schritt in diese Richtung. Mit der Identifizierung neuer molekularer Biomarker kann dieses Testsystem jederzeit um zusätzliche Module erweitert werden.

Gab es vor einigen Jahren nur wenige Gruppen in der Ökotoxikologie, die mit Zebrabärblingen arbeiteten, so ist der Trend heute stark ansteigend. Zudem werden vielerorts in den biowissenschaftlichen Laboratorien Mäuse und Ratten durch Zebrabärblinge ersetzt. Da wundert es nicht, dass diese Fische als aquatische Mäuse bezeichnet werden. Auch die Eawag wird u. a. in ihrem neuen Zentrum für angewandte Ökotoxikologie, das sie gemeinsam mit der ETH Lausanne betreibt, weiter auf Zebrabärblinge setzen. Denn eins ist klar: das Potenzial dieser Modellorganismen für die Forschung in der Umwelttoxikologie ist noch lange nicht ausgereizt.

Leitartikel

4 Zebraärblinge stehen Modell



Auch in der Ökotoxikologie werden Zebraärblinge vermehrt eingesetzt. Dass sie sehr fruchtbar sind und sich rasch entwickeln, sind nur zwei der günstigen Eigenschaften, die sie als Modellorganismen auszeichnen.

Forschungsberichte

8 Gut versorgt

Ungefähr 600 kleine Zebraärblinge schwimmen in den Aquarien der Eawag. Wie sieht ihr Tagesablauf aus? Und wie viele Eier legen sie eigentlich täglich? Zwei Eawag-Technikerinnen berichten.

10 Der MolDarT – ein neuer Toxizitätstest



Mit dem an der Eawag entwickelten molekularen Zebraärblingstest, MolDarT, können Wasserproben auf Schadstoffe analysiert werden. Der Test verzichtet auf den Einsatz adulter Fische.

13 Rätselhaft: missgebildete Thunersee-Felchen



Warum viele Felchen im Thunersee missgebildete Gonaden aufweisen, ist bis heute unbekannt. Die Eawag beteiligt sich an der Spurensuche und testet, ob die Anomalien durch Schadstoffe ausgelöst werden.

16 Funktionen der Östrogene in der Organentwicklung

Östrogene haben vielfältige Funktionen im Organismus. Spielen sie auch bei der Festlegung des Geschlechts und bei der Bildung des Seitenlinienorgans eine Rolle?

18 Zebraärblinge ohne Östrogenrezeptoren

Östrogene werden in der Zelle durch Östrogenrezeptoren erkannt. Doch was geschieht, wenn die Bildung der Rezeptoren experimentell ausgeschaltet wird?

20 Östrogenähnliche Wirkung von Dioxinen



Dioxine sind weitverbreitete Umweltschadstoffe, die in das Hormonsystem von Organismen eingreifen. Eine Studie der Eawag fand heraus, dass sie sowohl östrogene als anti-östrogene Effekte haben können.

24 Veränderte Genaktivität durch Rohöl

Immer wieder kommt es zu Ölunfällen, und noch Jahre später ist das Öl im Wasser nachweisbar. Experimente mit Genchips zeigen die Gefahren dieser chronischen Exposition auf.

27 Analyse des Proteoms

Die Proteomanalyse deckt auf, welche Proteine bei Belastung mit Schadstoffen verstärkt ausgeschüttet bzw. unterdrückt werden. Nun konnte das Verfahren auch an der Eawag etabliert werden.

Verschiedenes

30 Publikationen

34 Forum

Eawag-Spin-off: Sinnvoller Umgang mit Oberflächenabflüssen

Neues Zentrum für angewandte Ökotoxikologie

36 In Kürze

eawag
aquatic research

Herausgeberin, Vertrieb: Eawag, Postfach 611, 8600 Dübendorf, Schweiz, Tel. +41 (0)44 823 55 11, Fax +41 (0)44 823 53 75, www.eawag.ch

Redaktion: Martina Bauchrowitz, Eawag

Copyright: Nachdruck möglich nach Absprache mit der Redaktion.

Erscheinungsweise: unregelmässig in Deutsch, Englisch und Französisch. Chinesische Ausgabe in Zusammenarbeit mit INFOTERRA China National Focal Point.

Abbildungen: Peter Nadler, Küsnacht

Konzept: TBS Identity, Zürich

Satz, Bild und Layout: Peter Nadler, Küsnacht

Gedruckt: auf Recyclingpapier

Abonnement und Adressänderung: NeuabonnentInnen willkommen.

eawag.news@eawag.ch

ISSN 1420-3979



Martina Bauchrowitz,
Biologin und Redaktorin
der Eawag News.

Zebrabärblinge stehen Modell

Vor gut 8 Jahren wurde in der Abteilung Umwelttoxikologie die Forschung an Zebrabärblingen gestartet. Ein aktives Team rund um den Molekularbiologen Rik Eggen arbeitet seither mit diesem neuen Modellorganismus. Nun ist es an der Zeit, die Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler zu Wort kommen zu lassen.

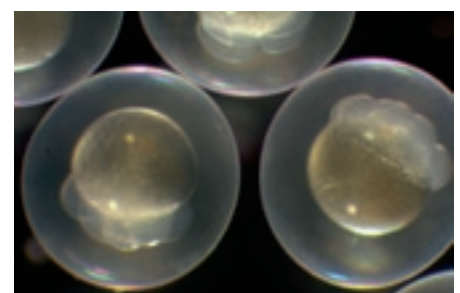
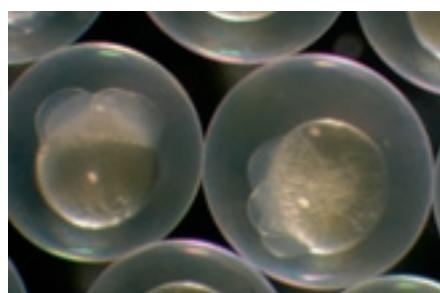
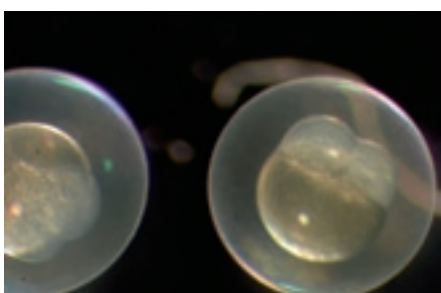
«Die Idee geisterte schon lange in meinem Kopf herum.» Enthusiastisch erzählt Rik Eggen, ehemaliger Leiter der Abteilung Umwelttoxikologie und jetziger Eawag-Vize-Direktor, wie es dazu kam, den Zebrabärbling als ökotoxikologisches Modellsystem an der Eawag zu etablieren. Statt wie bisher mit einzelligen Organismen (wie z. B. Bakterien, Hefen und Algen) oder Zellkulturen zu arbeiten, war er Ende der 1990er Jahre auf der Suche nach einem ganzheitlichen und höher entwickelten Modellorganismus. In der Literatur las er über Zebrabärblinge, die insbesondere in der Medizin und der Entwicklungsbiologie mächtig Furore machten. Die nur 5–6 cm langen Fische hätten eine ganze Reihe von Vorteilen, erklärt Rik Eggen. Sie haben einen kurzen Generationszyklus und sind bereits nach 3–4 Monaten geschlechtsreif; die Weibchen laichen grosse Mengen von Eiern ab, die danach von den Männchen befruchtet werden; und die optisch durchsichtigen Embryonen entwickeln sich vollständig ausserhalb der Mutterfische (siehe Fotos), so dass es ein Leichtes ist, morphologische Missbildungen zu erkennen.

Zebrabärblinge liebens warm. Im Jahr 2001 war es endlich soweit: die ersten 20 Zebrabärblinge wurden in Kultur genommen. Heute schwimmen etwa 600 Zebrabärblinge in den Aquarien der Eawag und tagtäglich werden die befruchteten Eier für die ökotoxikologischen Experimente verwendet. Die Technikerin Karin Rüfenacht war von Anfang an mit dabei (siehe Artikel auf Seite 8). Ihr liegt das Wohlergehen der Fische sehr am Herzen: Es komme

zwar nicht oft vor, dass einer ihrer Schützlinge eingeschlüfert werden muss, aber wenn doch, mache sie das auch nach all den Jahren noch traurig. Zum Glück sind Zebrabärblinge jedoch eher genügsame Fische und leicht zu halten: ihre Ansprüche an Wasser, Futter und Beckengrösse sind gering. Nur warm haben sie es gerne, denn schliesslich sind sie in den Zuflüssen des Ganges in Indien, Bangladesch und Pakistan beheimatet. Taxonomisch gehört der Zebrabärbling (*Danio rerio*) zur Familie der Karpfenfische (Cyprinidae), die mit mehr als 1400 Arten eine der umfangreichsten Fischfamilien überhaupt ist.

Ein neuer Toxizitätstest. Jane Muncke war die erste Eawag-Doktorandin, die mit den Zebrabärblingen arbeitete. Zusammen mit ihrer damaligen Betreuerin Nina Schweigert hatte sie die Aufgabe, einen molekularen Zebrabärblingstest zu entwickeln, der im Wasser enthaltene Umweltschadstoffe anzeigt (siehe Artikel auf Seite 10). «Man ging einfach davon aus, dass sich die Wirkung der Schadstoffe, wie man sie durch Toxizitätstests mit einzelligen Organismen oder Zellkulturen beobachtete, genauso auch bei Wirbeltieren manifestieren. Ob das stimmt, ist völlig unklar – und eigentlich ist es nicht zu erwarten.» Tatsächlich kommen hier zwei Aspekte, die die toxische Wirkung von Chemikalien stark beeinflussen, mit ins Spiel: zum einen ist die Aufnahme von Stoffen aus der Umwelt bei Wirbeltieren wesentlich komplexer als bei Einzellern und zum anderen sind Wirbeltiere in der Lage, Chemikalien in ihrem Stoffwechsel umzuwandeln. «Darum war es

Die befruchteten Eizellen teilen sich: 2-Zell-, 4-Zell- und 8-Zellstadium.



uns so wichtig, einen Wirbeltier-Toxizitätstest zu entwickeln. Dass dieser auch noch auf den Einsatz erwachsener Fische verzichtet und zudem Einblick in die molekularen Wirkmechanismen der Chemikalien gibt, sind weitere grosse Pluspunkte.»

Missgebildete Felchen im Thunersee – eine Spurensuche. Die erste Möglichkeit den neuen Zebraabärbling-Toxizitätstest in der Praxis zu erproben, ergab sich vor nicht langer Zeit im Thunersee-projekt. «Der See hütet ein Geheimnis. Niemand weiss, warum dort seit einigen Jahren so viele Felchen mit missgebildeten Geschlechtsorganen auftreten» erläutert Anja Liedtke. Die Wissenschaftlerin, die nach ihrer Dissertation am Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung (UFZ) in Leipzig an die Eawag gekommen ist, untersucht hier, ob die Missbildungen durch Schadstoffe und insbesondere durch hormonaktive Substanzen ausgelöst werden (siehe Artikel auf Seite 13). Neben anderen Toxizitätstests wendete sie dabei auch den Zebraabärblingtest an.

Effekte hormonaktiver Substanzen auf Fische. Fische mit missgebildeten Geschlechtsorganen sind jedoch nicht nur im Thunersee ein Problem. In den 1990er Jahren mehrten sich weltweit Berichte über die Verweiblichung männlicher Fische. Man vermutete einen direkten Zusammenhang zwischen dem Auftreten hormonaktiver Schadstoffe (siehe Kasten) – sie wurden seinerzeit immer häufiger in den Gewässern nachgewiesen – und den Geschlechtsveränderungen. «Dass sich diese Kausalität im Endeffekt nur nachweisen lässt, wenn man auch mit Fischen arbeitet, war eine weitere wichtige Überlegung, warum wir an der Eawag auf Zebraabärblinge setzten» begründet Rik Eggen erneut die Wahl des Modellorganismus. Als Ziel der hormonaktiven Stoffe kamen damals insbesondere die Östrogene, die weiblichen Sexualhormone, in Frage. Im Rahmen des Nationalen Forschungsprogramms NFP50 «Hormonaktive Stoffe – Bedeutung für Menschen, Tiere und Ökosysteme» des Schweizer Nationalfonds, an dem sich insgesamt 26 Forschungsgruppen beteiligten, beleuchtete sein Team daher das Thema mit Hilfe der Zebraabärblinge von verschiedenen Seiten her [1].

Frühes Blastula-Stadium (nach ~2,3 Stunden): Die Zellen sammeln sich an einem Ende des Dottersacks.



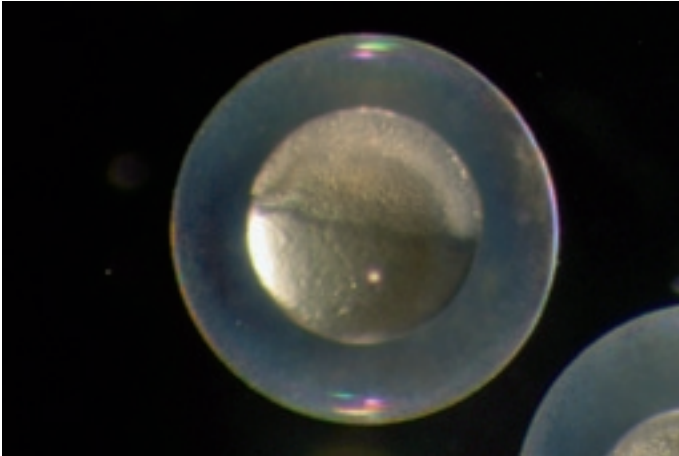
Fotos: Steve Baskauf 2002. <http://biomages.vanderbilt.edu/>

Geschlechtsdifferenzierung von Fischen. Will man hinter die Ursachen der Geschlechtsveränderungen kommen, muss man zunächst einmal den Prozess der normalen Geschlechtsdifferenzierung genauer verstehen. Allgemein ging man in der Literatur davon aus, dass Zebraabärblinge weibliche Geschlechtsorgane ausbilden, wenn der Östrogenspiegel im Gehirn in einer bestimmten Entwicklungsphase hoch ist, wogegen männliche Gonaden bei niedrigem Östrogenspiegel entstehen. Man nahm an, dass dabei ein bestimmtes Enzym der Östrogenbiosynthese eine Schlüsselrolle spielt. Evi Kallivretaki überprüfte diese Hypothese in ihrer Dissertation. Ihre Ergebnisse zeigen jedoch, dass dieser Prozess deutlich komplexer ist und wahrscheinlich das Zusammenspiel von Geschlechtshormonen mit verschiedenen anderen fein aufeinander abgestimmten Faktoren verlangt (siehe Artikel auf Seite 16).

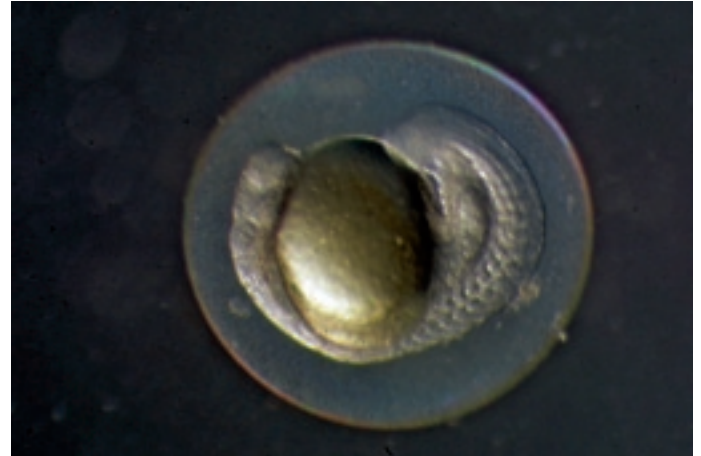
Was sind hormonaktive Stoffe?

Hormonaktive Substanzen sind Stoffe, die in den Hormonhaushalt und insbesondere in das System der Sexualhormone von Mensch und Tier eingreifen. Von den rund 100 000 Chemikalien, die heute auf dem Markt sind, wurde bisher nur ein geringer Teil auf eine mögliche hormonelle Aktivität untersucht. Es gibt jedoch eine Reihe von bekannten hormonaktiven Stoffen, die immer wieder in Gewässern nachgewiesen werden. Dazu gehören unter anderem: natürliche und synthetische Östrogene wie z. B. der Wirkstoff der Antibabypille, manche Moschusverbindungen aus künstlichen Duftstoffen, einige in Sonnencrèmes verwendete UV-Filter, gewisse Antioxidantien in Kosmetikprodukten und Konservierungsmittel in Nahrungsmitteln, eine ganze Reihe unterschiedlicher Industriechemikalien sowie Dioxine (siehe separater Kasten).

Dass östrogene Steroidhormone als Hauptursache für östrogene Effekte bei aquatischen Lebewesen anzusehen sind, zu dieser Aussage kommt die Konsensplattform «Hormonaktive Stoffe in Abwasser und Gewässer» [2], die zum Abschluss des Forschungsprogramms NFP50 «Hormonaktive Stoffe – Bedeutung für Menschen, Tiere und Ökosysteme» des Schweizer Nationalfonds den aktuellen Wissensstand und weitere Massnahmen zusammenfasste. Die Arbeitsgruppe, die aus Vertretern der Industrie, Behörden und Verbänden sowie der Forschung bestand, setzt sich ausserdem für die Einführung eines Qualitätsziels für die östrogene Aktivität ein. Dies gilt insbesondere für empfindliche Fliessgewässer, die durch Kläranlagen beeinflusst sind, deren gereinigtes Abwasser schlecht verdünnt wird.



Frühes Gastrula-Stadium (nach ~5,3 Stunden): Entstehung der drei Keimblätter (Ecto-, Endo- und Mesoderm), aus denen sich die Organe bilden.

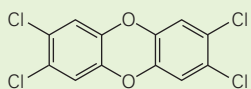


24 Stunden alter Embryo: Bereits ist die so genannte Chorda cordalis – die Urform der Wirbelsäule – erkennbar.

Ohne Östrogenrezeptoren kein Seitenlinienorgan. Östrogene können ihre Funktionen in den verschiedenen Organen in der Regel nur dann ausüben, wenn sie in den Zellen von Östrogenrezeptoren erkannt werden und so die Expression spezifischer Gene auslösen. Doch was passiert, wenn man die Östrogenrezeptoren in der sensiblen Phase der Embryonalentwicklung ausschaltet, und zwar dann, wenn die Geschlechtsorgane gebildet werden? «Wir waren ziemlich überrascht, als wir sahen, dass Zebrafärblinge ohne Östrogenrezeptoren immer nur im Kreis schwimmen und sich offensichtlich gar nicht mehr richtig orientieren können» erklärt Mirjam Fröhlicher. Die Doktorandin, die gerade dabei ist, ihre Ergebnisse zusammenzuschreiben, vermutete, dass das gestörte Schwimmverhalten auf Veränderungen im Seitenlinienorgan beruht. Dieses Organ ist der Ferntastsinn der Fische, mit dem sie sich im Raum zurechtfinden. Und tatsächlich:

Dioxine

Chemisch gesehen gibt es zwei Klassen von Dioxinen: die einen besitzen ein Grundgerüst vom Typ Dibenzo-para-dioxin und die anderen vom Typ Dibenzofuran. Die mit Abstand giftigste Verbindung ist das 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-para-dioxin, das auch als Seveso-Dioxin eine traurige Bekanntheit erlangte. Im Jahr 1976



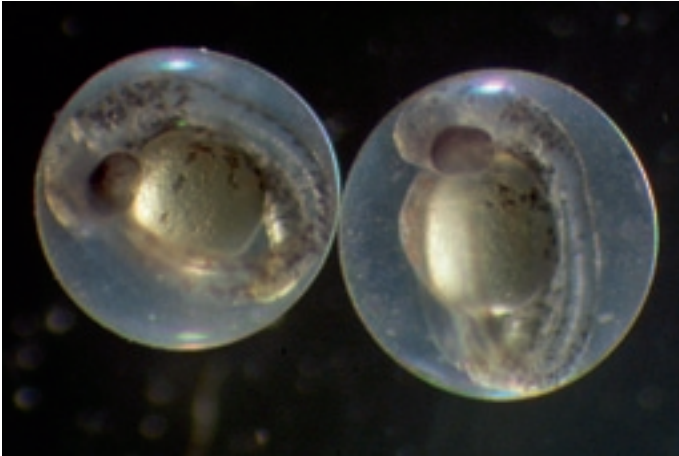
entwich aus dem Reaktor

einer Chemiefabrik in der norditalienischen Stadt Seveso eine grosse Menge dieser Chemikalie. Dioxine entstehen als ungewollte Nebenprodukte bei Verbrennungsvorgängen und chemischen Synthesen; sie werden aber auch natürlicherweise, z. B. bei Vulkanausbrüchen oder Waldbränden gebildet. Die Substanzen sind äusserst langlebig und reichern sich deshalb in der Umwelt an.

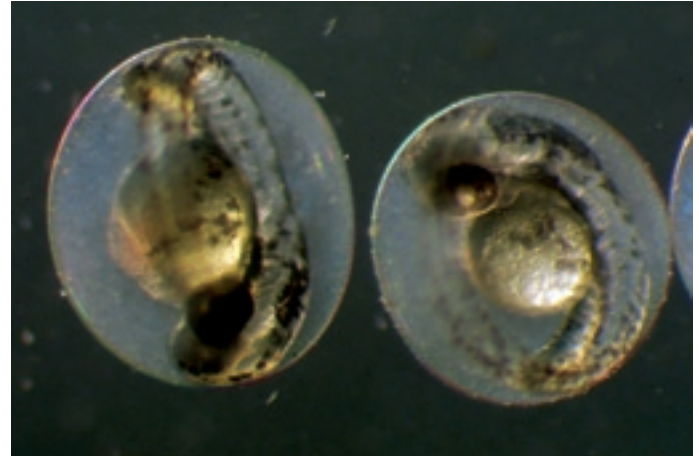
den im Kreis schwimmenden Zebrafärblingen fehlen die Neuro-masten, das sind die eigentlichen Sinneszellen im Seitenlinienorgan (siehe Artikel auf Seite 18). Dass Östrogene bei der Entwicklung des Seitenlinienorgans eine wichtige Rolle spielen, konnte zudem durch ein weiteres Experiment untermauert werden. Denn auch Zebrafärblinge, in denen eins der beiden Schlüsselgene der Östrogenbiosynthese ausgeschaltet worden war, bildeten deutlich weniger Neuromasten als normale Fische (siehe Artikel auf Seite 16). Insgesamt belegen diese Ergebnisse eindrücklich, dass Östrogene nicht nur im Sexualsystem eine Rolle spielen, sondern, wie bereits aus anderen Studien bekannt, ebenfalls die Entwicklung von Sinnesorganen beeinflusst.

Wirkung von Dioxinen. Eine andere Möglichkeit, mehr über die Bedeutung der hormonaktiven Stoffe herauszufinden, war, die Zebrafärblinge direkt mit diesen Substanzen in Kontakt zu bringen. Dabei entschied man sich unter anderen auch mit Dioxinen (siehe Kasten) zu arbeiten, über deren östrogene Wirkungen sehr Widersprüchliches in der Literatur zu lesen war. «Dioxine sind äusserst gefährliche Stoffe, die schon bei geringsten Konzentrationen in das Hormonsystem eingreifen können. Und mich interessierte, was genau auf molekularer Ebene abläuft.» Nachdrücklich vertritt Ksenia Groh ihren Standpunkt. Im Anschluss an ihr Studium an der Universität Moskau doktorierte sie an der Eawag. Sie erforschte, wie die Dioxine auf eine wichtige molekulare Schaltstelle im Hormonsystem wirken. Es ging um dasjenige Schlüsselgen der Östrogenbiosynthese, das vorwiegend im Gehirn der Fische aktiv ist und normalerweise durch Östrogene gesteuert wird. In ihrer Studie konnte Ksenia Groh die unstimulierten Literaturdaten aufklären. Sie fand heraus, dass von aussen zugefügte Dioxine die Expression des Schlüsselgens verändern und auf diese Weise den Hormonhaushalt durcheinander bringen (siehe Artikel auf Seite 20).

Genomanalyse. Dass das Genom der Zebrafärblinge als eines der ersten Wirbeltiergenome vollständig sequenziert wurde, ist ein weiterer Vorzug dieser Modellorganismen. Damit seien alle



2 Tage alte Embryonen: deutlich sichtbar sind die Augenanlagen.



3 Tage alte Embryonen kurz vor dem Schlüpfen.

Gene dieser Fischart bekannt, was eine Grundvoraussetzung für die Genomanalyse sei, erklärt Jules Kemadjou. Der Wissenschaftler konnte schon während seiner Doktorarbeit an der Universität Karlsruhe Erfahrungen mit der Technik der Genomanalyse bei Zebrafischarten sammeln. Diese Methode arbeitet mit so genannten Genchips, auf denen Tausende Gene gebunden sind. An der Eawag untersucht Jules Kemadjou nun den Einfluss von Rohöl auf die Zebrafischarten. Mittels der Genchips will er sich ein Bild davon machen, was genau auf molekularer Ebene abläuft, d. h. welche Gene aktiviert und gehemmt werden, nachdem die Zebrafischarten an Rohöl exponiert wurden (siehe Artikel auf Seite 24).

Proteomanalyse. «Es ist ein ähnliches Konzept, aber die beiden Methoden sind grundverschieden.» Mit schnellem Stift skizziert Marc Suter, Chemiker und Experte im Bereich Massenspektroskopie, die Unterschiede. Wird bei der Genomanalyse die Gesamtheit der Gene betrachtet, so stehen bei der Proteomanalyse die Proteine im Mittelpunkt. Die Methode zeigt auf, welche Proteine in einer bestimmten Situation vermehrt ausgeschüttet bzw. unterdrückt werden. Obschon äusserst komplex, konnte die Proteomanalyse in den vergangenen Jahren aufgrund von Fortschritten in der Analytik – heute identifiziert man die Proteine z. B. meist per Massenspektroskopie – stark verbessert werden. Vor kurzem

verbrachte Marc Suter ein Auslandsjahr am Scripps Research Institute in La Jolla, USA, bei John Yates, einem der führenden Wissenschaftler auf dem Gebiet der Proteomanalyse. Ziel seines Sabbaticals sei es gewesen, so Suter, intensive Einsicht in die Technik zu bekommen, um sie im Anschluss an der Eawag für die ökotoxikologische Forschung an Zebrafischarten zu etablieren. Dass dies in der Tat gelungen ist und die Proteomanalyse dabei sogar noch weiter verbessert werden konnte, davon zeugen nun die ersten Ergebnisse, die in den Labors der Eawag erarbeitet wurden (siehe Artikel auf Seite 27).

Das Puzzle fügt sich zusammen. «Wir haben in den vergangenen Jahren nicht nur viel Neues gelernt und grundsätzliche Fragen beantwortet, sondern auch manch Überraschendes entdeckt. Und wie immer in der Wissenschaft eröffnet sich damit ein weiteres Feld spannender Fragen.» resümiert Rik Eggen. Auf jeden Fall haben sich die Zebrafischarten als sehr vorteilhafte Modellorganismen herausgestellt und werden weiter in der ökotoxikologischen Forschung an der Eawag genutzt. Und das erarbeitete Know-how, sei es der molekulare Zebrafischartentest sowie die Techniken der Genom- und Proteomanalyse, wird sicher nicht nur an der Eawag, sondern auch im neuen Zentrum für angewandte Ökotoxikologie, das die Eawag gemeinsam mit der ETH Lausanne betreibt, seine Anwendung finden (siehe Artikel auf Seite 35). ○○○

3 Tage alter Fisch kurz nach dem Schlüpfen.



- [1] <http://www.nfp50.ch>
 [2] Konsensplattform (2008): Hormonaktive Stoffe in Abwasser und Gewässern. Schweizer Nationalfonds, 15 S. http://www.nrp50.ch/uploads/media/finaldocumentwater_german.pdf

Gut versorgt

Ungefähr 600 kleine Zebra­bär­blin­ge (*Danio rerio*) wer­den in den Aquari­en der Eawag gehalten. Sie liefern die befruchteten Fischeier, die tagtäglich für die ökotoxikologischen Experimente gebraucht werden.

8.30 Uhr: Das Licht geht an im Fischlabor. Dies ist das Signal für die Zebra­bär­blin­ge, mit der Vermehrung zu beginnen. Die Weibchen legen ihre Eier in eine dafür vorbereitete Schale im Aquarium und die Männchen geben ihr Bestes, um möglichst alle Eier zu befruchten. In dieser Zeit brauchen die Fische absolute Ruhe, denn jegliche Art von Störung würde sie dazu veranlassen, die Eiablage und -befruchtung sofort abzubrechen. Ein Männchen kann die Eier von zwei Weibchen befruchten, wobei ein Weibchen zwischen 100 und 200 Eier legt.

10.00 Uhr: Nun erst beginnt unsere Arbeit. Als erstes entnehmen wir die Schalen mit den Eiern, sammeln sie in einem Sieb und waschen Futterreste und Fischkot ab. Anschliessend werden die befruchteten Eier von den unbefruchteten getrennt und an die Forschenden weitergegeben, die für diesen Tag Experimente planen. Befruchtete Eier erscheinen durchsichtig, während die unbefruchteten weiss aussehen.

Die Zebra­bär­blin­ge legen ihre Eier in einer mit Glaskiesel gefüllten Schale ab.



Kleine frisch geschlüpfte Krebschen, so genannte Artemien, sind die Leibspeise der Zebra­bär­blin­ge.



Karin Rüfenacht und Kerstin Dannenhauer, Technikerinnen in der Abteilung Umwelttoxikologie. Sie sind für die Aufzucht der Zebra­bär­blin­ge verantwortlich.

10.15 Uhr: Einmal alle 2–3 Monate verwenden wir einen Teil der befruchteten Eier für die Aufzucht neuer Zebra­bär­blin­ge. Die Eier werden einen Tag nach der Befruchtung mit verdünnter Natriumhypochlorit-Lösung gebleicht, wodurch Krankheitserreger, die auf der Oberfläche der Eier haften, abgetötet werden. Danach geben wir jeweils 15–20 Eier in ein Quarantänebecken, wo sie sich entwickeln können. Schon einen Tag später schlüpfen die Zebra­bär­blin­ge aus, bleiben aber weitere 14 Tage in Quarantäne. In dieser Zeit werden sie mit einem Spezialfutter für Fischbabys grossgezogen. Bereits nach 3–6 Monaten sind die Jungfische geschlechtsreif.

10.30 Uhr: Jeden Vormittag werden die Fische mit frisch geschlüpfte Artemien (kleine Ruderfusskrebse) gefüttert. Das bedeutet, dass wir jeden Morgen einen frischen Kolben mit Artemieneiern ansetzen, die am nächsten Morgen verfüttert werden. Ältere Artemien – die Krebschen sterben nach nur 40 Stunden ab und



Damit immer frisches Fischfutter zur Verfügung steht, setzen wir zweimal am Tag einen neuen Kolben mit Artemieneiern an.

verpilzen – sowie ungeschlüpfte Artemieneier würden den Zebra-
bärblingen schwer im Magen liegen und im schlimmsten Fall zum
Tode führen.

10.45 Uhr: Während und nach der Fütterung inspizieren wir die
Zebra-
bärblinge sehr genau: Gibt es Anzeichen für Krankheiten?
Sind alle unverseht oder gibt es Fische die bei Kämpfen mit ihren
Artgenossen verletzt wurden? Schwimmen gar tote Fische in den
Becken? Sobald kranke oder tote Fische entdeckt werden, fischen
wir sie aus den Becken heraus und schläfern sie mit einem hoch-
dosierten Betäubungsmittel ein. Die schlimmste Krankheit der
Zebra-
bärblinge ist die so genannte Fischtuberkulose. Damit befal-
lene Fische erkennt man an ihren dicken Bäuchen, abstehenden
Schuppen und herausstehenden Augen. Da die Fischtuberkulose
extrem ansteckend ist, kann es passieren, dass alle Fische eines
Beckens eingeschlüpfert werden müssen – eine Arbeit, die uns
nicht leicht fällt, schliesslich haben wir die Zebra-
bärblinge ja so-
zusagen von Kindesbeinen an aufgezogen.

11.00 Uhr: Da wir dem Veterinäramt des Kantons Zürich zur
Rechenschaft verpflichtet sind, protokollieren wir genau, wie viele
der Fische unter natürlichen oder unnatürlichen Bedingungen

zu Tode kamen und wie viele für unsere Experimente genutzt
wurden.

15.30 Uhr: Erst am Nachmittag schauen wir wieder ins Fisch-
labor. Jetzt bekommen die Zebra-
bärblinge zusätzlich zu den frisch
geschlüpfen Artemien ihren Vitamincocktail zur Stärkung. Wie
am Vormittag wird ein weiterer Kolben mit Artemieneiern ange-
setzt, damit wir auch am morgigen Nachmittag frisch geschlüpfte
Artemien verfüttern können. Am Wochenende übrigens werden
die Fische meist weniger regelmässig gefüttert.

16.00 Uhr: Jeden Tag füllen wir die Aquarien mit frischem
Wasser auf und einmal pro Woche werden sie zudem von Hand
gesäubert. Dabei entfernen wir die Futterreste und den Fischkot
und wechseln etwa 20% des Wassers aus. Zum Abschluss
werden die Schalen, in die die Zebra-
bärblinge allmorgendlich ihre
Eier ablegen, wieder in die Aquarien versenkt. Damit ist unsere
tägliche Arbeit im Fischlabor beendet und mit einem letzten
prüfenden Blick verabschieden wir uns von unseren Zöglingen.

22.30 Uhr: Spät wird es dunkel im Fischlabor und die Zebra-
bär-
linge richten sich für die Nacht ein. ○○○

Der MolDarT – ein neuer Toxizitätstest



Jane Muncke, Umwelt-naturwissenschaftlerin, hat ihre Doktorarbeit Ende 2006 zu diesem Thema in der Abteilung Umwelttoxikologie abgeschlossen.

Viele Toxizitätstests arbeiten mit adulten Fischen und nutzen die Letalität als einziges Kriterium, um die Giftigkeit einer Substanz zu beschreiben. Wo die einzelnen Stoffe jedoch genau angreifen, bleibt unklar. Wir haben deshalb einen Test entwickelt, der Auskunft über die molekularen Effekte der Schadstoffe gibt und zudem auf adulte Fische verzichtet.

Über hunderttausend kommerziell genutzte Chemikalien sind gegenwärtig in der Europäischen Union registriert [1]. Diese und alle neu hinzukommenden Stoffe, Ausgangsverbindungen und Zwischenprodukte müssen – wenn sie ein jährliches Produktionsvolumen von 1 t oder mehr aufweisen – mit Inkrafttreten der neuen EU-Chemikaliengesetzgebung REACH (Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals [2]) im Juni 2007 auf ihre toxischen Effekte hin geprüft werden. Dabei handelt es sich schätzungsweise um 30000 Substanzen. Die Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD) schlägt dafür sowohl geeignete Modellorganismen als auch eine

Reihe von Tests vor, mit denen die akute und chronische Toxizität bestimmt werden kann. Dabei verwendet man jeweils ausgewachsene Fische, die 96 Stunden (akut) bzw. mindestens 14 Tage (chronisch) in schadstoffhaltigem Wasser exponiert werden. Als toxikologisches Kriterium dient die Letalität, ein allgemeiner und integrativer Endpunkt, der von der Konzentration und der Giftigkeit der getesteten Verbindungen abhängt. Solche *In-vivo*-Tests sind mit einem erheblichen zeitlichen Aufwand verbunden und aus Tierschutzgründen bedenklich. Zudem erhält man damit zwar die tödliche (akut toxische) Dosis, jedoch keine weiteren Informationen zur Wirkungsweise der Substanzen. Unser Ziel

Zebrabärblinge haben es gerne warm. Im Aquarienraum herrscht eine konstante Temperatur von 29°C.



Andri Bryner, Eawag

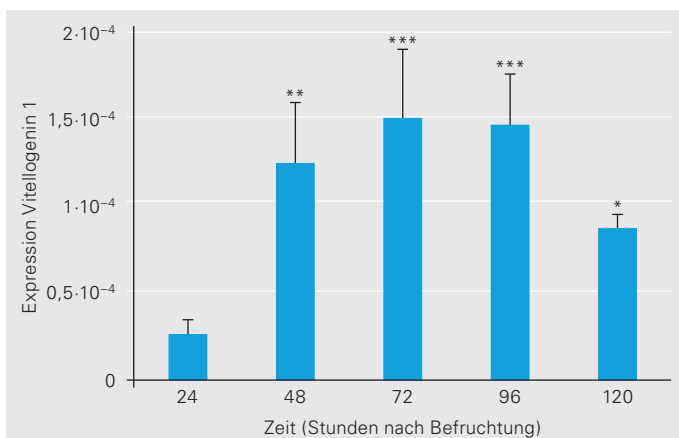
war es deshalb, einen Test zu entwickeln, der nicht nur rasch und ohne Einsatz adulter Tiere durchgeführt werden kann, sondern der es darüber hinaus erlaubt, die Effekte von Chemikalien auf molekularer Ebene zu untersuchen.

Unsere Vorüberlegung: positive Eigenschaften von *In-vivo*- und *In-vitro*-Tests vereinen. Bereits seit mehreren Jahren gibt es Bemühungen, die Ansatzpunkte toxischer Chemikalien auf molekularer Ebene zu identifizieren und so ihre Wirkmechanismen besser zu verstehen [3]. Die entsprechenden Tests werden üblicherweise *in vitro* (im Reagenzglas) mit Einzellern (Bakterien, Hefen), Zellkulturen oder Zellbestandteilen – anstatt *in vivo* mit vielzelligen Organismen – durchgeführt und detektieren spezifische molekulare Effekte. So misst beispielsweise der YES-Test («Yeast Estrogen Screen» [4]) mit genetisch modifizierten Hefezellen, ob Chemikalien östrogenaktiv sind und zeigt dies durch eine Farbänderung an.

Meist kurze Expositionszeiten, der Einsatz kleiner Mengen von Lebendmaterial und die Vermeidung von Tierversuchen sind die wesentlichen Vorteile der *In-vitro*-Testsysteme. Nachteilig dagegen ist die geringe biologische Relevanz. Man nimmt an, dass die an Einzellern beobachteten Effekte genauso auch in Wirbeltieren vorkommen. Dies obwohl die komplexe Aufnahme von Stoffen aus der Umwelt sowie die Umwandlung der Substanzen im Stoffwechsel bei Einzellern fehlen und gerade diese beiden Prozesse die toxische Wirkung von Chemikalien auf höhere Lebewesen stark beeinflussen. Ideal wäre deshalb ein Testsystem, das die positiven Eigenschaften der klassischen *In-vivo*-Tests und der molekularen *In-vitro*-Tests kombiniert.

Der Zebraförling als Modellorganismus. In der Ökotoxikologie wird seit einigen Jahren der DarT-Test (*Danio-rerio*-Teratogenitätstest, [5]) verwendet, um die akute Toxizität von Chemikalien zu bestimmen. Im Gegensatz zu anderen Fischtests werden dabei keine adulten Tiere verwendet, sondern Fischeier und -embryos.

Abb. 1: Natürliche Expression des Indikatorgens Vitellogenin 1 im Verlauf der Entwicklung von Zebraförlingembryonen. Die mit Sternen bezeichneten Werte sind signifikant unterschiedlich zur ersten Messung nach 24 Stunden, wobei * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ und *** = $p < 0,001$.



Die Zebraförlingeier entwickeln sich sehr rasch; rund 48 h nach der Befruchtung sind die Embryonen komplett ausgebildet und schlüpfen. Sie zeigen bereits Anlagen für die verschiedensten Gewebe und bei manchen Organen ist die Differenzierung weit fortgeschritten. Mit dem DarT-Test werden Entwicklungsstörungen, wie z. B. die Ablösung des Schwanzes vom Dottersack, und die Letalität der Embryonen aufgezeichnet, die nach Exposition mit Chemikalien auftreten. Der genaue Ablauf des DarT-Tests ist im Rahmen einer DIN-Norm standardisiert [6].

Darüber hinaus hat der Zebraförling, *Danio rerio*, in den letzten Jahrzehnten verstärkt Einzug im Life-Science-Bereich gefunden. Sein Genom wurde als eines der ersten Wirbeltiergenome komplett sequenziert. Zudem stehen viele molekularbiologische Methoden zur Verfügung, die speziell für den Zebraförling entwickelt wurden – insgesamt sehr gute Voraussetzungen, um auf den Zebraförling als Modellorganismus zu setzen. Das an der Eawag neu entwickelte Testsystem basiert daher auf dem Prinzip des DarT-Tests, erweitert ihn aber um molekulare Effekte, die bereits im sub-akuten Toxizitätsbereich nachweisbar sind. Aus diesem Grund nennen wir den neuen Test «molekularer *Danio-rerio*-Teratogenitätstest» oder kurz MolDarT [7, 8].

Wie funktioniert der MolDarT? Gene, deren Expression durch bestimmte Chemikalien entweder herauf- oder herunterreguliert werden, sind die Endpunkte im MolDarT. Die Expression dieser Indikatorgene verfolgt man auf mRNA-Ebene, der Zwischenstufe zwischen Gen und Protein. Durch den Vergleich mit der unexponierten Kontrolle können wir feststellen, ob die Chemikalienexposition einen Einfluss auf die mRNA-Menge und damit auf die Expression des Indikatorgens hatte.

In der Praxis ist der MolDarT-Test relativ einfach durchzuführen: Frisch befruchtete Zebraförlingeier werden in Gruppen von ca. 50 Stück in Petrischalen mit chemikalienhaltigem Wasser aufbewahrt. Da die Exposition beim MolDarT im sub-akuten Konzentrationsbereich erfolgt, unterscheiden sich die exponierten Eier/Larven bezüglich Morphologie und Verhalten nicht von der Kontrolle. Nach 120 Stunden bzw. 5 Tagen Expositionszeit wird die gesamte mRNA aus den Embryonen isoliert, und mittels Real-Time-PCR quantifiziert man die mRNA-Mengen der zu untersuchenden Gene. Um Verluste zu korrigieren, die während der Isolierung und Verarbeitung der mRNA erfolgen, wird eine interne Normalisierung durchgeführt. Dazu setzt man die Expression der Indikatorgene in Relation zu einem Gen, das unabhängig vom Zelltyp, Zellstadium und von äusseren Einflüssen exprimiert wird und somit auch durch Schadstoffe nicht beeinträchtigt wird (ein so genanntes Haushaltsgen).

Erstes Indikatorgen im MolDarT: Vitellogenin. Wir wollten wissen, ob sich Vitellogenin 1, ein bereits recht gut untersuchtes Gen, als Indikatorgen für östrogenaktive Substanzen im MolDarT eignet. Vitellogenin kodiert für ein Eidotterprotein und seine Aktivität wird durch körpereigene Östrogene reguliert. Normalerweise wird es nur in adulten Weibchen exprimiert. Es lässt sich aber ebenfalls in Männchen induzieren und zwar dann, wenn sie in der Umwelt mit östrogenaktiven Substanzen in Kontakt kommen [9].

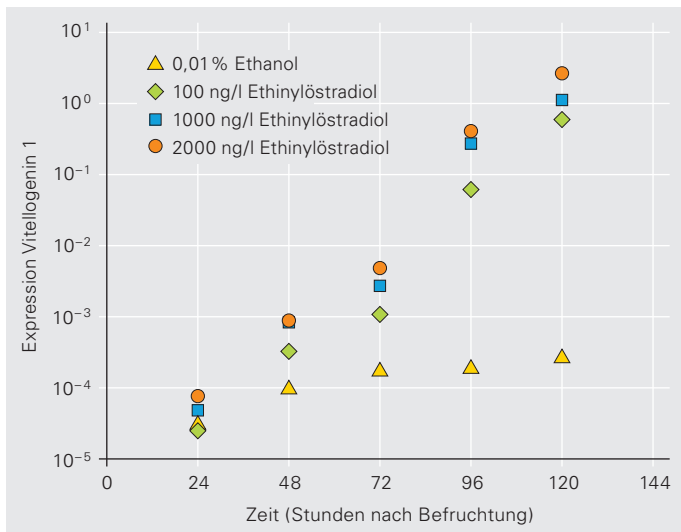


Abb. 2: Expression des Indikators Vitellogenin 1 in Zebrafärbärling-embryonen nach unterschiedlich langer Exposition mit verschiedenen Konzentrationen von Ethinylöstradiol. Der Standardfehler ist im Durchschnitt nicht grösser als 30 %.

Vor den ersten Expositionsversuchen haben wir zunächst überprüft, ob das Vitellogenin-Gen nach der Befruchtung auch in den noch nicht geschlechtsdifferenzierten Zebrafärbärlingeiern und -embryonen exprimiert wird.

Vier Stunden nach der Befruchtung lässt sich noch keine Vitellogenin-mRNA nachweisen, aber nach 24 Stunden steigt die Aktivität des Vitellogenin-Gens an und bleibt in der Zeit zwischen 48–120 Stunden nach der Befruchtung auf einem relativ hohem Niveau (Abb. 1).

Östrogene und andere hormonaktive Substanzen aktivieren das Vitellogenin-Gen. Wie sehen nun im Vergleich dazu die Expressionsmuster von Vitellogenin aus, wenn die Zebrafärbärlingeier mit Östrogenen und anderen hormonaktiven Stoffen in Kontakt gebracht werden? Bei dieser Versuchsreihe verwendeten wir östrogenaktive Substanzen, die immer wieder in der aquatischen Umwelt nachgewiesen werden.

Tatsächlich regt das synthetische Hormon, Ethinylöstradiol, das in der Verhütungspille verwendet wird, die Genaktivität an, wobei die Stärke der Expression sowohl von der Expositionskonzentration, als auch von der Expositionsdauer abhängig ist (Abb. 2). Ein vergleichbares Bild ergab sich für Östradiol, das natürliche Östrogen. Darüber hinaus wurde Vitellogenin durch Bisphenol A induziert. Grosse Mengen dieser Verbindung werden für die Herstellung von Polycarbonatplastik verwendet. Bisphenol A ist eine der weltweit am meisten produzierten Chemikalien.

Ethinylöstradiol, Östradiol und Bisphenol A hatten ihre östrogene Wirkung vorab auch im YES-Test gezeigt. Für andere bekannte hormonaktive Substanzen wie z. B. das Fungizid Cyproconazol konnten wir im MolDarT keine Induktion des Vitellogenin-Gens messen. Cyproconazol, das zwar im YES-Test positiv wirkte, wird in den Zebrafärbärlingeiern vermutlich verstoffwechselt, wobei die

Abbauprodukte nicht mehr östrogenaktiv sind. Hier zeigt sich, dass der MolDarT als *In-vivo*-Test den tatsächlichen Gegebenheiten in der Realität näher ist, als ein *In-vitro*-Test wie der YES.

Der MolDarT kann jederzeit erweitert und an spezifische Fragestellungen angepasst werden. Grundsätzlich ist es möglich, beliebig viele Indikatorgene in einer Exposition zu untersuchen. Dabei kann der MolDarT an neue Erkenntnisse und individuelle Fragestellungen angepasst werden. An der Eawag wurden bisher vier Module etabliert (siehe auch Beitrag von Anja Liedtke auf S. 13):

- ▶ Östrogenität (Vitellogenin-1-Gen),
- ▶ Immuntoxizität (Rekombinationsaktivierungsgen),
- ▶ Metalltoxizität (Metallothionein-2-Gen),
- ▶ Toxizität von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen und Dioxin (Cytochrom-P450-Aromatase-Gen).

Der MolDarT erlaubt es, in kurzer Zeit, mit geringem Aufwand, wenig Zellmaterial und vor allem ohne Verwendung adulter Tiere gezielte Screenings von Chemikalien durchzuführen. Auch wenn die ökologische Relevanz für die bisher untersuchten Indikatorgene noch gezeigt werden muss, ist der MolDarT damit potenziell geeignet, das ökotoxikologische Risiko der vielen Chemikalien abzuschätzen, die seit Inkrafttreten der neuen EU-Chemikaliengesetzgebung REACH auf eine Beurteilung warten. Darüber hinaus kann der MolDarT auch in der ökotoxikologischen Beurteilung von Umweltproben mit unbekannter Zusammensetzung eingesetzt werden. ○○○

- [1] <http://ecb.jrc.it/esis/>
- [2] http://ec.europa.eu/environment/chemicals/reach/reach_intro.htm
- [3] Schweigert N. (2001): Wie können Schadstoffeinflüsse auf Fließgewässer nachgewiesen werden? Eawag News 51, 10–12.
- [4] Routledge E.J., Sumpter J.P. (1996): Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. Environmental Toxicology and Chemistry 15 (3), 241–248.
- [5] Nagel R. (2002): DarT: The embryo test with the zebrafish *Danio rerio* – a general model in ecotoxicology and toxicology. Altex-Alternativen zu Tierexperimenten 19, 38–48.
- [6] DIN-Norm 38415-6 (2003): DarT-Test: Suborganismische Testverfahren (Gruppe T), Teil 6: Giftigkeit gegenüber Fischen; Bestimmung der nicht akut giftigen Wirkung von Abwasser auf die Entwicklung von Fischeiern über Verdünnungsstufen (T 6).
- [7] Muncke J., Eggen R.I.L. (2006): Vitellogenin 1 mRNA as an early molecular biomarker for endocrine disruption in developing zebrafish (*Danio rerio*). Environmental Toxicology and Chemistry 25 (10), 2734–2741.
- [8] Muncke J., Junghans M., Eggen R.I.L. (2007): Testing estrogenicity of known and novel (xeno-)estrogens in the MolDarT using developing zebrafish (*Danio rerio*). Environmental Toxicology 22 (2), 185–193.
- [9] Sumpter J.P., Jobling S. (1995): Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. Environmental Health Perspectives 103, 173–178.

Rätselhaft: missgebildete Thunersee-Felchen



Anja Liedtke, Biologin, wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung Umwelttoxikologie.

Seit 2000 zeigen viele Felchen im Thunersee veränderte Geschlechtsorgane. Trotz intensiver Forschung weiss man bis heute nicht, woran das liegt. Als Ursachen kommen u. a. genetische Veränderungen, Pathogene und Umweltschadstoffe in Betracht. Derzeit testet die Eawag die Schadstoffhypothese und wendet dabei erstmals auch den in ihren Labors entwickelten Zebrabärbling-Biotest an – ein Zwischenbericht.

Der Thunersee hütet ein Geheimnis. Ein Grossteil seiner Felchen weist deformierte Gonaden (Hoden, Eierstöcke) auf (siehe Kasten und Abb. 1). Seit dem ersten Auftreten der kranken Fische im Jahr 2000 wird dieses einmalige Phänomen intensiv untersucht, doch ist die Ursache bis heute unbekannt. Eine Hypothese geht davon aus, dass die veränderten Geschlechtsorgane durch einen Schadstoff oder ein Schadstoffgemisch verursacht werden. Mittels chemischer Analytik versuchte man deshalb, die verantwortlichen Substanzen im See aufzuspüren, stellte jedoch bald fest, dass chemische Untersuchungen allein nicht ausreichen, da sie nur die Suche nach bereits bekannten Stoffen erlauben. Unser Ziel ist es nun, Umweltproben aus dem Thunersee erst einmal an Indikatororganismen zu testen und nur solche Proben chemisch weiter zu charakterisieren, die einen biologischen Effekt haben. Dabei kommt erstmals auch der an der Eawag entwickelte molekulare Zebrabärbling-Test MolDarT zum Einsatz (siehe auch Artikel von Jane Muncke auf S. 10).

Breite Probenahme. Um ein umfassendes Bild vom Thunersee zu erhalten, haben wir 2 Jahre lang (2005 und 2006) alle Kompartimente beprobt, mit denen die Felchen im Laufe ihrer Entwicklung in Kontakt kommen:

- ▶ Sediment, weil sich darauf die Fischlarven entwickeln;
 - ▶ Plankton, denn das ist die Nahrungsgrundlage der Felchen;
 - ▶ Wasser als umgebendes Medium und ständiger Lebensraum.
- Darüber hinaus haben wir auch das Muskelfleisch der Felchen untersucht, denn darin können sich aufgenommene Schadstoffe über längere Zeit anreichern.

Alle Proben benötigen eine spezifische Aufarbeitung, bevor sie in einem biologischen Testsystem charakterisiert werden können. In der Regel werden die aktiven Substanzen mit einem

Abb. 1: Normale und veränderte Geschlechtsorgane von Felchen aus dem Thunersee:

- A) Normale Eierstöcke.
 - B) Asymmetrische Eierstöcke.
 - C) Zwitter: Gewebe von Eierstock und Hoden befinden sich im selben Geschlechtsorgan.
 - D) Normale Hoden.
 - E) Kompartimentierte Hoden: Die Hoden sind in mehrere Abschnitte unterteilt.
 - F) Verwachsungen: Ein mit der Bauchdecke verwachsenes Hodenpaket.
- Grösse der Gonaden: ca. $\frac{1}{3}$ der Körperlänge, hier etwa 7–10 cm.

Vielfältige Gonadenanomalien an Thunersee-Felchen

Etwa 40% der Männchen und 26% der Weibchen im Thunersee zeigen Veränderungen an Hoden und Eierstöcken (Abb. 1) [1]. So findet man stark verkleinerte oder nur einseitig statt paarig vorkommende Geschlechtsorgane, die zudem mit dem Bauchfell verwachsen sein können. Viele Hoden und manche Eierstöcke sind eingeschnürt oder vollständig in Kompartimente unterteilt. Es treten selbst Zwitterfische auf, die sowohl einen Hoden als auch einen Eierstock haben oder gar beide Gewebetypen im selben Gonadenstrang vereinen.



Fotos: D. Bernet, Universität Bern

Gemisch aus organischen Lösungsmitteln aus den Proben extrahiert, wobei ein flüssiger Extrakt entsteht.

Fremdstoffeinträge in den Thunersee. Zwei Ereignisse, die Fremdstoffe in den Thunersee brachten, werden in der Presse immer wieder als mögliche Ursachen für die Gonadenveränderungen genannt: So versenkte die Schweizer Armee zwischen 1920 und 1963 u. a. in der Beatenbucht grössere Mengen Munition, und während des Baus der Lötschbergbahn wurden die geklärten Abwässer der NEAT-Baustelle in die Kander, einem Zufluss des Thunersees, geleitet.

Obwohl es unwahrscheinlich ist, dass sich diese lokalisierten Einträge auf die Felchen des gesamten Sees auswirken, haben wir insbesondere auch Sedimentproben in der Beatenbucht genommen und wollten die Wasserqualität der Kander unterhalb der Einleitstelle überprüfen. Mehrere Monate sollten die speziellen Probenahmegeräte in der Kander verbleiben und dabei mögliche im Wasser enthaltene Schadstoffe in ihrem Innern aufkonzentrieren. Leider sind diese Geräte jedoch sowohl 2005 als auch 2006 in der Strömung verloren gegangen, so dass wir für diesen Standort keine Aussage machen können.

Erste Hinweise durch den Hefetest. Da bei den Felchen neben den Gonaden keine weiteren Organe beeinträchtigt sind, vermuteten wir, dass diese Veränderungen durch hormonaktive Stoffe hervorgerufen werden. Das können die natürlichen Geschlechtshormone Östradiol und Testosteron sein oder künstlich hergestellte Stoffe wie z. B. Ethinylöstradiol, ein Wirkstoff der Antibabypille. Es können aber auch Substanzen sein, die überhaupt nicht als Geschlechtshormone klassifiziert sind und trotzdem eine hormonelle Wirkung aufweisen, beispielsweise Bisphenol A und Phtalate. Ob in den Proben aus dem Thunersee hormonaktive Stoffe enthalten sind, kann man mit dem YES/YAS-System (Yeast Estrogen Screen/Yeast Androgen Screen) überprüfen – einem Biotest mit gentechnisch veränderten Hefezellen.

Keine speziellen Hinweise auf hormonaktive Stoffe ergaben sich für die Wasser- und Muskelfleischproben. Dagegen konnten wir für die Plankton- und die Sedimentproben von 2006 eine östrogene Wirkung feststellen. Und auch die Extrakte von den im Jahr 2005 gesammelten Sedimenten lieferten auffällige Ergebnisse: zwar waren keine östrogenen Effekte nachweisbar, jedoch

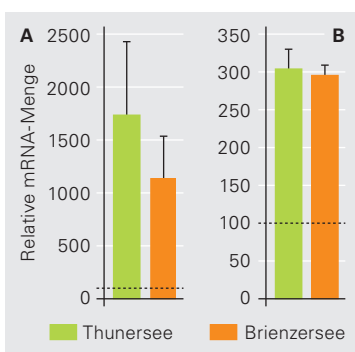


Abb. 2: Aktivität des Östrogen-Indikatorgens Vitellogenin (A) und des Dioxin-Indikatorgens Cytochrom-P450-Aromatase (B) nach Exposition von Zebrafischembryonen mit Planktonextrakten aus dem Thuner- und dem Brienzsee. Die Genexpressionen sind ausgedrückt als relative mRNA-Mengen prozentual zu den jeweiligen Negativkontrollen (nur Lösungsmittel), die auf 100% gesetzt wurden (waagrechte Linie).

starb jeweils ein Grossteil der Hefezellen ab, was auf eine generell hohe Toxizität hinweist. Bei unseren weiteren Untersuchungen fokussierten wir deshalb auf Plankton und Sediment.

Analyse der Planktonproben im MolDarT. Tritt der östrogene Effekt der Planktonproben auch in einem komplexen und – mit den Felchen nahe verwandten – Organismus in Erscheinung? Diese Frage klärten wir mit dem molekularen Zebrafisch-Test ab. Es wäre durchaus möglich, dass die verantwortliche Substanz von den Fischen gar nicht aufgenommen werden kann oder metabolisiert wird, bevor sie ihre Wirkung entfaltet.

Im MolDarT brachten wir Zebrafischlarven 5 Tage lang mit den Planktonextrakten in Kontakt und überprüften anschliessend, ob es Effekte auf molekularer Ebene gibt. Im diesem Fall untersuchten wir zwei Markergene: das Vitellogenin-Gen, das bei Anwesenheit von östrogenwirksamen Stoffen aktiviert wird, und ein Gen aus der Cytochrom-P450-Familie (Aromatase *cyp19*), dessen Expression durch dioxinähnliche Substanzen erhöht wird. Für dieses Experiment wurde das im Jahr 2005 gesammelte Plankton homogenisiert. Als Vergleich dient Plankton aus dem Brienzsee. Der Brienzsee wurde ursprünglich ausgewählt, weil er nicht weit oberhalb des Thunersees liegt, die Seen durch die Aare verbunden und damit ähnlichen Umwelteinflüssen ausgesetzt sind.

Sowohl das Östrogen- als auch das Dioxin-Indikatorgen werden nach Exposition mit den Planktonproben in den Zebrafischlarven exprimiert. Für uns überraschend ist, dass beide Gene ebenfalls durch den Planktonextrakt aus dem Brienzsee, unserem Vergleichsgewässer, aktiviert wurden (Abb. 2). Dieses Ergebnis sagt uns, dass die Planktonproben aus beiden Seen höchstwahrscheinlich östrogenwirksame und dioxinähnliche Substanzen enthalten, dass jedoch das Plankton nicht der Auslöser für die Missbildungen an den Felchen im Thunersee ist.

Wie toxisch sind die Sedimente? Um diese Frage zu beantworten, wurden jeweils 15 Zebrafischlarven eine Stunde nach der Befruchtung in luftgesättigtem Medium auf die Sedimentproben gegeben [2]. Damit simulierten wir die natürliche Umgebung während der Fischentwicklung. Als Negativkontrollen wurden einerseits reiner Quarzsand und andererseits Sediment aus dem Brienzsee verwendet.

Nach 48 Stunden, dem natürlichen Schlupfzeitpunkt, wurden die Zebrafischlarven in 3 Kategorien eingeteilt: «geschlüpft», «nicht geschlüpft» und «tot» (Abb. 3). Anhand der Negativkontrolle mit reinem Quarzsand zeigt sich, dass die Bedingungen im Sedimentkontakt-Test insgesamt nicht optimal waren, denn 35% der Fischembryonen erleben die 48-Stunden-Grenze nicht. Ähnlich hohe Prozentsätze an toten Tieren findet man auch für die Sedimentproben aus dem Thunersee sowie für die Kontrolle aus dem Brienzsee. Anscheinend sterben die Embryonen, weil der im Medium vorhandene Sauerstoff nicht ausreicht.

Trotzdem kann man einen wichtigen Schluss aus diesem Experiment ziehen: Die Entwicklung der Embryonen ist deutlich verzögert. Wir konnten keine einzige geschlüpfte Larve auf den Seesedimenten zählen, wohingegen zum selben Zeitpunkt bereits

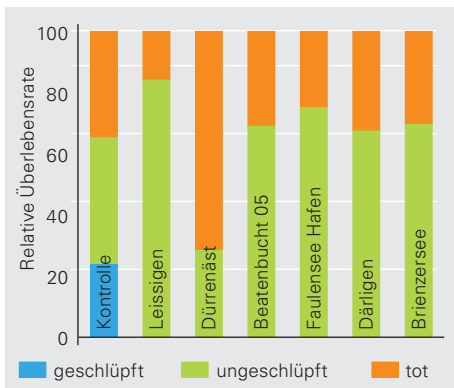


Abb. 3: Überlebens- bzw. Schlupfrate von Zebraabblingembryonen nach 48-stündiger Exposition auf Sedimentproben, die 2005 an 5 verschiedenen Laichplätzen im Thunersee gesammelt worden waren. 100% = Anzahl aller lebenden Embryonen nach 24-stündiger Exposition.

20% der Embryonen in der Negativkontrolle mit reinem Quarzsand ausgeschlüpft waren. Vermutlich sind in den Sedimenten des Thuner- und des Brienzersees unerwünschte Stoffe vorhanden, die die Entwicklung der Zebraabblingeier bremsen.

Veränderte Genexpression in Zebraabblinglarven nach Exposition auf Seesedimenten.

Die nach 48 Stunden noch nicht geschlüpften Zebraabblingembryonen wurden für weitere 4 Tage auf dem Sediment belassen. Im Anschluss daran wurde analog zum MolDarT die Expression ausgewählter Gene in den überlebenden Fischlarven untersucht (Abb. 4) [3]. Als Markergene dienten wieder das Östrogen-Indikatorgen Vitellogenin und das Dioxin-Indikatorgen Cytochrom-P450-Aromatase. Darüber hinaus interessierten wir uns für drei weitere Gene:

- ▶ das Hänoxigenase-1-Gen, es wird bei jeder Art von Stresssituation exprimiert;
- ▶ das so genannte Rekombinationsaktivierungsgen 1 (*rag1*), es wirkt bei der Ausbildung des Immunsystems mit;
- ▶ und das Metallothionein-2-Gen, das eine Rolle in der Selbstregulierung des Metallhaushalts spielt.

Leider überlebten jeweils nur 1–2 Fischlarven die 6-tägige Inkubation auf den Sedimentproben von 2005, die bereits im

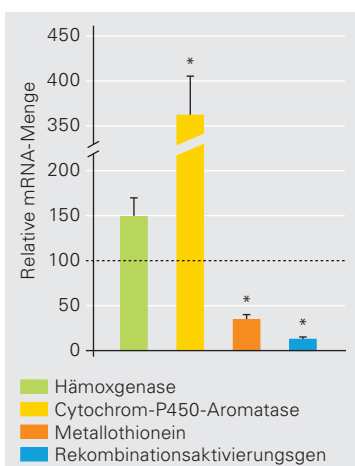


Abb. 4: Aktivität von 4 Markergenen (Details siehe Text) nach Laborexposition von Zebraabblingembryonen auf Sedimenten, die 2006 in der Beatenbucht im Thunersee gesammelt worden waren. Die Genexpressionen sind ausgedrückt als relative mRNA-Mengen prozentual zu den jeweiligen Negativkontrollen (nur Lösungsmittel), die auf 100% gesetzt wurden (waagrechte Linie). Sternchen = signifikante Unterschiede.

Hefetest durch eine hohe Toxizität aufgefallen waren. Eine molekulare Untersuchung war deshalb nicht möglich. Dagegen starben weniger Fische auf den Sedimentproben von 2006 und es war genügend Material vorhanden, um die Genexpression zu analysieren. Im Jahr 2006 hatten wir uns bei der Probenahme auf die Beatenbucht konzentriert und dort 5 verschiedene Stellen beprobt.

Unsere Ergebnisse (Abb. 4) zeigen, dass das Vitellogenin-Gen nicht aktiviert wurde, wir also die östrogenen Wirkung, die die Sedimentproben im Hefetest hatten, bei den Zebraabblingen nicht bestätigen konnten. Unverändert blieb auch die Transkription des Hänoxigenase-Gens. Indessen wurde die Expression des Cytochrom-Gens stimuliert und die Transkription am Rekombinations- und Metallothionein-Gen gehemmt. Das sind Hinweise auf einen dioxinähnlichen Stoff im Sediment sowie auf Substanzen, die den Metallhaushalt und die Entwicklung des Immunsystems stören.

Wie weiter? Aufgrund der in den Biotests nachgewiesenen Effekte geht es uns derzeit darum, die potenziellen Schadstoffe chemisch zu charakterisieren. Dazu werden die komplexen Probenextrakte, z.B. entlang der Polarität und Molekülgrösse ihrer Inhaltsstoffe, in mehrere Fraktionen aufgetrennt und erneut im Biotest überprüft. Die jeweils positiv getestete Fraktion wird weiter untersucht, bestenfalls solange bis eine Reinsubstanz oder ein eingegengtes Substanzgemisch im Biotest die gleiche Wirkung zeigt wie der Ausgangsextrakt.

Auch wenn damit noch nicht eindeutig bewiesen ist, dass die identifizierten Schadstoffe die Gonadenveränderungen an den Felchen tatsächlich ausgelöst haben – denn schliesslich werden die Biotests an Hefezellen und Zebraabblingen und nicht an Felchen vorgenommen – wäre die Indizienkette doch recht überzeugend.

Das Projekt ist ein Gemeinschaftsprojekt des Zentrums für Fisch- und Wildtiermedizin an der Universität Bern und der Eawag. Es ist Teil des Nationalen Forschungsprojekts 50 «Hormonaktive Stoffe: Bedeutung für Menschen, Tiere und Ökosysteme», das vom Schweizerischen Nationalfonds finanziert wird. Weiter wird es unterstützt von der Fischzuchtanlage Faulensee und vom Fischereinspektorat Bern sowie durch das Gewässer- und Bodenschutzlabor des Kantons Bern.

- [1] Bernet D., Wahl T., Küng C., Segner H. (2004): Frequent and unexplained gonadal abnormalities in whitefish (central alpine *Coregonus* sp) from an alpine oligotrophic lake in Switzerland. *Diseases of Aquatic Organisms* 61, 137–148.
- [2] Hollert H., Keiter S., König N., Rudolf M., Ulrich M., Braunbeck T. (2003): A new sediment contact assay to assess particle-bound pollutants using zebrafish embryos. *Journal of Soils & Sediments* 3 (3), 197–203.
- [3] Liedtke A., Muncke J., Rüfenacht K., Eggen R. (2008): Molecular multi-effect screening of environmental pollutants using the MolDarT. *Environmental Toxicology* 23, 59–67.

Rolle der Östrogene in der Organogenese

Schlüsselenzym der Östrogen-Biosynthese ist die Cytochrom-P450-Aromatase. Sie katalysiert die entscheidende Reaktion, nämlich die Umwandlung der Androgene in Östrogene und bestimmt so die Höhe des Östrogenspiegels. Anhand von Zebra- bärblingen untersuchten wir, ob die Aromatase die Entstehung der Geschlechtsorgane und des Seitenlinienorgans steuert.

Östrogene sind Steroidhormone, die in allen aquatischen und land- lebenden Wirbeltieren vorkommen [1]. Während im Organismus von Natur aus mehrere Östrogentypen vorhanden sind, ist 17β - Östradiol verantwortlich für fast alle biologischen Aktivitäten. So sind Östrogene insbesondere an der Steuerung der Geschlechts- differenzierung und -reifung sowie der Fortpflanzung beteiligt. Daneben üben sie aber noch zahlreiche weitere Funktionen in der Entwicklung und Differenzierung anderer Organe aus, z. B. beim Nervensystem. Damit sie ihre vielfältigen Aufgaben erfolgreich erfüllen können, muss der Östrogenspiegel in den verschiedenen Lebensphasen sorgfältig ausbalanciert und reguliert sein.

Östrogene entstehen über eine Reihe von Zwischenprodukten aus Cholesterin. Zwar sind verschiedene Enzyme an der Östrogen- Biosynthese beteiligt, doch entscheidet die letzte Etappe, in der Androgene zu Östrogene umgewandelt werden [2], über die Höhe des Östrogenspiegels. Katalysiert wird die Schlüsselreak- tion durch das Enzym Cytochrom-P450-Aromatase. Beim Zebra- bärbling kodieren zwei Gene für dieses Protein, wobei *cyp19a1* primär in den Eierstöcken und *cyp19a2* hauptsächlich im Gehirn exprimiert werden. Beide Gene sind potenzielle Ziele für die in der Umwelt weit verbreiteten Schadstoffe, die auf diese Weise störend in östrogenregulierte Prozesse eingreifen, und damit indirekt hormonaktiv wirken können. Mit Hilfe von Zebra bärblingen als Modellorganismen analysierten wir die Rolle der Aromatase – und damit auch die der Östrogene – in der Entwicklung der Geschlechtsorgane sowie des spezifisch bei Fischen vorkommende Seitenlinienorgans, mit dem die Tiere Druckveränderungen fühlen. Die gewonnenen Erkenntnisse helfen, die Wirkmechanismen hormonaktiver Schadstoffe besser zu verstehen.

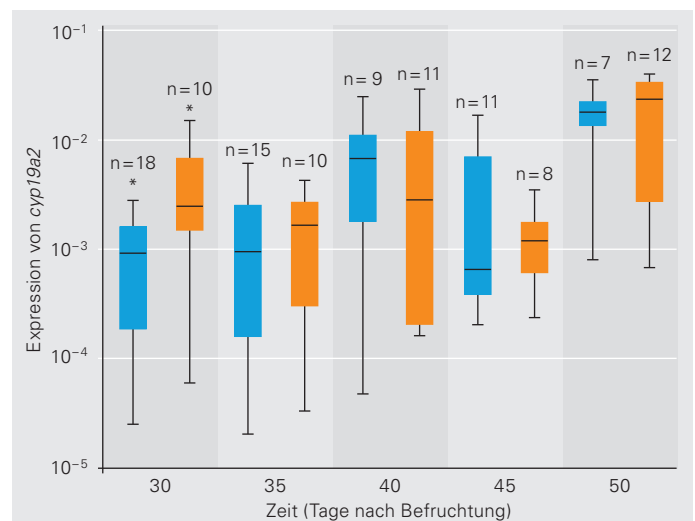
Wird die sexuelle Differenzierung der Gonaden durch *cyp19a2* bestimmt? Zebra bärblinge sind undifferenzierte Gonochoristen, d. h. sie werden als Weibchen geboren und besitzen zunächst nicht-funktionelle Eierstöcke, die im weiteren Verlauf der Entwicklung zu weiblichen oder männlichen Gonaden ausreifen. Zu Beginn unserer Untersuchungen ging man generell davon aus, dass die Geschlechtsdifferenzierung der Gonaden von der Konzentration und Verteilung der im Gehirn exprimierten Aromatase abhängig



Rik Eggen, Molekular- biologe, leitete bis zu seiner Ernennung zum Eawag-Vize-Direktor die Abteilung Umwelttoxikologie. Koautoren: Evangelina Kallivretaki, Helmut Segner (Universität Bern)

ist. Im Detail hiess das: Je öfter das *cyp19a2*-Gen abgelesen wird, desto mehr Aromatase ist in den Gehirnzellen vorhanden und desto höher ist der Östrogenspiegel – eine Situation, die zur Entwicklung weiblicher Gonaden führen würde. Männliche Gonaden dagegen würden sich bei niedrigem Östrogenspiegel bilden. Die Richtigkeit dieser Annahme überprüften wir an Zebra- bärblingen, die sich in der Phase der Gonadendifferenzierung befanden, d. h. zwischen dem 30. und den 50. Tag nach Befruchtung. Wir verwendeten die Köpfe der Fische, um anhand der gebildeten Gentranskripte (mRNA) zu quantifizieren, wie stark die Gehirn-Aromatase exprimiert wird und um die Verteilung der Aromatase-Proteine im Gehirn zu charakterisieren. Gleichzeitig dienten die Körper der Fische dazu, den Entwicklungsstand

Abb. 1: Expression des *cyp19a2*-Gens im Gehirn junger männlicher (blaue Balken) und weiblicher (orange Balken) Zebra bärblinge. Die Ober- und Unterkante der Balken entsprechen der höchsten bzw. niedrigsten gemessenen mRNA-Menge, während die Linie im Balken den Mittelwert (\pm Standardabweichung) anzeigt. n = Anzahl Fische, in der jeweiligen Geschlechtskategorie. * = Signifikanter Unterschied in der mRNA-Menge zwischen beiden Geschlechtern am Tag 30 nach Befruchtung ($p < 0,012$).

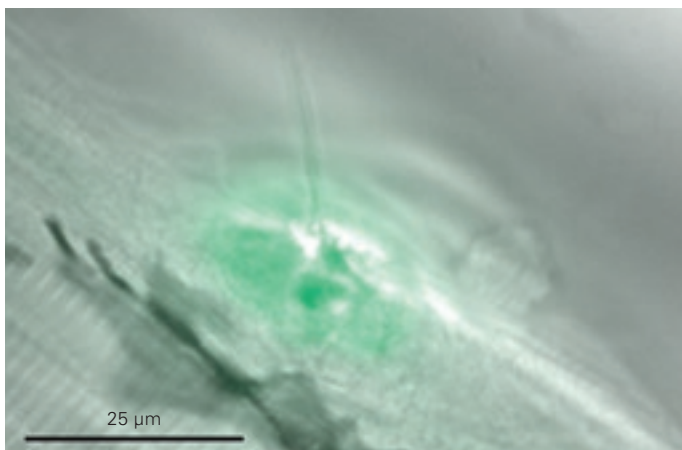


der Geschlechtsorgane zu bestimmen. Tiere, deren Gonaden Anteile von Hoden zeigten oder die bereits entwickelte Hoden besaßen, wurden als männlich eingestuft, während Fische mit nicht-funktionellen Eierstöcken zu den Weibchen gezählt wurden. Bis etwa um den 50. Tag nach der Befruchtung besitzen die weiblichen Gonaden die Fähigkeit, sich in Hoden umzuwandeln. Erst wenn die Eizellen zu reifen beginnen, ist eine definitive Aussage über das Geschlecht der Tiere möglich.

Keine geschlechtsabhängige Expression von *cyp19a2*. Tatsächlich konnten wir Aromatase-Transkripte während der gesamten Untersuchungsdauer in den Köpfen der Zebraabärblinge nachweisen, wobei die mRNA-Mengen einerseits innerhalb der Geschlechtsgruppen recht variierten und andererseits unabhängig von den Geschlechtsgruppen mit der Zeit leicht anstiegen. Die Menge an Aromatase-Transkripten war jedoch nicht mit dem Geschlecht korreliert (Abb. 1). Das *cyp19a2*-Gen wird also kontinuierlich im Verlauf der Geschlechtsdifferenzierung und zwar unabhängig vom Geschlecht exprimiert. Ein ähnliches Muster konnte auch bei den Proteinmengen beobachtet werden (ohne Abbildung). Darüber hinaus waren die Aromatase-Proteine im Gehirn der sich entwickelnden Fische bei beiden Geschlechtern gleich verteilt. Das Enzym wird, wie schon für adulte Fische bekannt, hauptsächlich in Teilen des Grosshirns (im Telencephalon und im Diencephalon) und in der Hypophyse gebildet.

Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Geschlechtsdifferenzierung beim Zebraabärbling nicht, wie ursprünglich angenommen, allein durch die Expression des *cyp19a2*-Gens und die Höhe des Östrogenspiegels reguliert wird. Dieser Prozess scheint deutlich komplexer zu sein und verlangt vermutlich ein Zusammenspiel verschiedener Gene sowie möglicherweise auch anderer Faktoren, die fein aufeinander abgestimmt sein müssen. Ausgehend von dieser Erkenntnis arbeiten wir derzeit daran, den sexuellen Differenzierungsprozess im Rahmen eines Projekts, das vom Schweizerischen Nationalfonds finanziert wird, weiter zu entschlüsseln.

Sensorische Haarzellen eines Neuromasts. Überlagerung einer Lichtmikroskopaufnahme mit einem am Fluoreszenzmikroskop aufgenommenen Foto, bei dem die Haarzellen mit einem fluoreszierenden Farbstoff angefärbt wurden.



Miriam Fröhlicher, Eawag

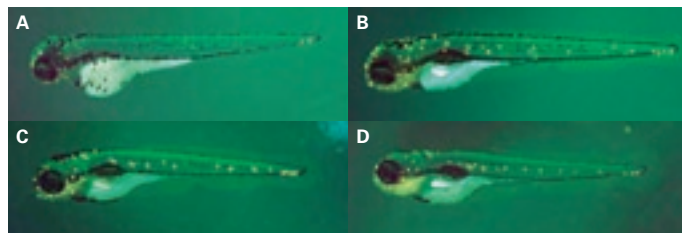


Abb. 2: Effekt des *cyp19a1*-«Knock downs» auf die Anzahl Neuromasten im Seitenlinienorgan von Zebraabärblingen. A: mit *cyp19a1*-Morpholino behandelter Embryo; B: unbehandelter Kontrollembryo; C: mit Kontroll-Morpholino behandelter Embryo; D: mit *cyp19a2*-Morpholino behandelter Embryo.

Wird die Entwicklung des Seitenlinienorgans durch *cyp19a1* beeinflusst?

Nicht nur bei der Geschlechtsdifferenzierung, auch bei der Entwicklung von Sinnesorganen spielen Östrogene eine wichtige Rolle. Dies wurde u.a. bei Fischen gezeigt. Unsere Beobachtung, dass das *cyp19a1*-Gen im Seitenliniensystem exprimiert wird, ist im Einklang mit diesen Ergebnissen. Dieses auf Wasserdruck reagierende Organ ist normalerweise als schwache Linie um die Augen und entlang beider Körperflanken sichtbar und verleiht den Fischen die Fähigkeit, Bewegungen in ihrem Umfeld wahrzunehmen (siehe auch Artikel von M. Fröhlicher auf Seite 18). Die Rezeptoren des Seitenlinienorgans, die so genannten Neuromasten, bestehen jeweils aus einer Ansammlung von sensorischen Haarzellen. Um zu untersuchen, ob das *cyp19a1*-Gen tatsächlich in die Entwicklung der Neuromasten und des Seitenlinienorgans involviert ist, haben wir seine Expression mit Hilfe der «Knock down»-Technik künstlich gehemmt (siehe Kasten auf Seite 18). So genannte Morpholino-Oligonukleotide werden dafür in Zebraabärblingeier injiziert. Dort hybridisieren sie mit den *cyp19a1*-Transkripten, wodurch die Proteinsynthese blockiert und die Aromatase-Aktivität in den Neuromasten unterdrückt wird.

Eine Unterdrückung von *cyp19a1* reduziert die Anzahl Neuromasten.

Unser Experiment ergab, dass deutlich weniger Neuromasten in «Knock down»-Zebraabärblingen ausgebildet wurden (Abb. 2A) als in unbehandelten Fischen (Abb. 2B) und als in Fischen, denen ein Kontroll-Morpholino (Abb. 2C) oder ein gegen *cyp19a2* gerichtetes Morpholino injiziert worden war (Abb. 2D). Daraus schliessen wir, dass die Aromatase *cyp19a1* tatsächlich bei der Entwicklung des Seitenlinienorgans beteiligt ist – eine neue und überraschende Erkenntnis. Dies bedeutet, dass hormonaktive Schadstoffe nicht nur auf das Geschlechtssystem wirken, sondern noch ganz andere Entwicklungsprozesse in den Organismen stören können. ○○○

- [1] Lange I.G., Hartel A., Meyer H.H.D. (2003): Evolution of oestrogen functions in vertebrates. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 83, 219–226.
- [2] Cheshenko K., Pakdel F., Segner H., Kah O., Eggen R.I.L. (2008): Interference of endocrine disrupting chemicals with aromatase CYP19 expression or activity, and consequences for reproduction of teleost fish. *General and Comparative Endocrinology* 155, 31–62.

Zebrabärblinge ohne Östrogenrezeptoren



Mirjam Fröhlicher, Biologin und Doktorandin in der Abteilung Umwelttoxikologie.

Weibliche Geschlechtshormone, die Östrogene, können ihre Wirkung erst ausüben, wenn sie von Östrogenrezeptoren erkannt werden. Doch was geschieht, wenn die Bildung der Rezeptoren unterdrückt wird? Dies untersuchten wir an Zebrabärblingen. Ein besonders auffälliges Merkmal dieser «Knock down»-Zebrabärblinge war ihr Verhalten, ständig im Kreis zu schwimmen. Ihnen fehlte das Seitenlinienorgan, mit dem sie sich normalerweise orientieren.

Schadstoffe, die das Hormonsystem beeinflussen, so genannte endokrin wirksame Substanzen, werden weltweit in den Gewässern nachgewiesen. Sie können sich bereits in geringen Konzentrationen schädigend auf die Gewässerorganismen auswirken. Einerseits kann der endokrine Schadstoff anstelle des natürlichen Hormons die Bildung bestimmter Proteine veranlassen; andererseits kann er aber auch die Aktivität eines körpereigenen Hormons be-

Das «Knock down»

Die so genannte Morpholino-Technologie ermöglicht es, die Synthese spezifischer Proteine für eine bestimmte Zeitperiode zu blockieren. Bei diesem «Knock down» injiziert man ein kurzes synthetisches Oligonukleotid, das so genannte Morpholino [3]. Es wird während des Vierzellstadiums in den Dottersack des Zebrabärblingeis gespritzt und diffundiert von dort in die Zellen. Die Sequenz des Morpholinos wird jeweils so gewählt, dass sie komplementär ist zur Abfolge am Startcodon des betreffenden Gens. Dadurch hybridisiert das Morpholino mit den mRNA-Transkripten und unterbindet so die Proteinsynthese. Nach etwa fünf Tagen kann der Organismus das fremde Oligonukleotid abbauen und seine Proteine wiederherstellen. Das «Knock down» ist nicht zu verwechseln mit dem «Knock out», bei dem funktionsstörende Mutationen im Genom integriert und an die Nachkommen weitergegeben wird.

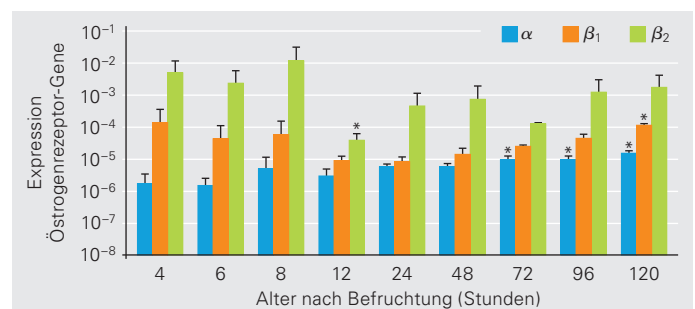
Um nachzuweisen, dass die morphologischen Effekte nach Morpholino-Injektion spezifisch sind, arbeitet man ausserdem mit einem Kontroll-Morpholino. Das ist ein Standardoligonukleotid, das im Organismus keine komplementäre Sequenz findet und deshalb nicht binden kann.

einträchtigen. Dabei ist entscheidend, wann die Organismen mit den hormonaktiven Schadstoffen in Kontakt kommen. Geschieht dies beispielsweise während der Embryonalentwicklung, wenn die Geschlechtsorgane und das Gehirn ausdifferenziert werden, kann es zu bleibenden Defekten und Funktionsstörungen wie zur Verweiblichung ganzer Fischpopulationen [1] kommen.

Ein Grossteil der endokrinen Substanzen, und zwar solche, die den Östrogenen, den weiblichen Geschlechtshormonen, ähnlich sind, wird im Organismus von Östrogenrezeptoren erkannt (siehe auch Abb. 1 auf S. 20). Genau wie die endogenen Östrogene binden die östrogenähnlichen Schadstoffe an den Rezeptor und aktivieren diesen. So verändert, wandert der aktivierte Komplex in den Zellkern und heftet sich an spezifische DNA-Abschnitte, an die östrogenempfindlichen Elemente. Man findet sie in den Kontrollregionen bestimmter Gene, deren Expression durch die Anlagerung des Rezeptorkomplexes angekurbelt wird [2].

Was aber passiert, wenn die Bildung von Östrogenrezeptoren künstlich unterdrückt wird, und zwar insbesondere während der Embryogenese? Um diese Frage zu beantworten, haben wir mit Zebrabärblingembryonen gearbeitet. Unsere Studie ist Teil eines umfassenden Projekts über die molekularen Zusammenhänge im

Abb. 1: Expression der drei Östrogenrezeptorgene α , β_1 und β_2 während der Embryonalentwicklung von Zebrabärblingen. Signifikant unterschiedliche Resultate sind mit einem Stern gekennzeichnet ($p < 0,05$).



Östrogensystem – grundlegendes Wissen, das benötigt wird, um die Effekte endokrin wirksamer Schadstoffe besser beurteilen zu können (siehe auch Artikel von Rik Eggen auf S. 16 und Ksenia Groh auf S. 20).

Der β_2 -Östrogenrezeptor wird bei Zebra­bärblingen besonders stark in der Embryonalentwicklung exprimiert. Zebra­bärblinge besitzen drei verschiedene Östrogenrezeptoren: α , β_1 und β_2 . In einem Vorversuch analysierten wir zunächst, welches der drei Östrogenrezeptor-Gene am stärksten in der embryonalen Entwicklung exprimiert ist. Es zeigte sich, dass das β_2 -Gen in den ersten 5 Tagen nach der Befruchtung am häufigsten abgelesen wurde, so dass wir davon die grösste mRNA-Menge nachweisen konnten (Abb. 1). Wir haben uns deshalb entschieden, den β_2 -Rezeptor auszuschalten und liessen uns dafür ein spezifisches β_2 -Morpholino synthetisieren (siehe Kasten zur «Knock down»-Technik).

Übrigens findet man in den ersten Stunden mehr β_2 -mRNA als nach 12 Stunden (Abb. 1). Dabei handelt es sich jedoch um Transkripte, die von den Mutterfischen an die Fischeier weitergegeben werden. Erst nach 12 Stunden beginnen die Fische­m­bryonen mit der endogenen Transkription, worauf die Konzentration der eigenen β_2 -mRNA stetig ansteigt.

«Knock down» des Östrogenrezeptors: Geringe Ausschlüpf­raten und kreisförmiges Schwimmen. Welches sind die besten Morpholinokonzentrationen zum Ausschalten des β_2 -Östrogenrezeptors? Wir wiesen nach, dass sie zwischen 25 und 50 μM liegen. In diesem Konzentrationsbereich waren die morphologischen Veränderungen eindeutig erkennbar und gleichzeitig wurden die Zebra­bärbling­embryonen nicht zu stark belastet. Ab einer Konzentration von 100 μM jedoch wirkt das Morpholino toxisch.

Zebra­bärbling­embryonen, denen 25 oder 50 μM β_2 -Morpholino injiziert worden war, zeigten ein ungewöhnliches Schwimmverhalten: Sie schwammen unablässig im Kreis. Ausserdem schlüpften bei einer Konzentration von 50 μM β_2 -Morpholino nur 30% der Embryonen nach 72 Stunden aus (Abb. 2).

«Knock down»-Zebra­bärblingen fehlt der Ferntastsinn zur Orientierung. Wir vermuteten, dass das gestörte Schwimmverhalten auf Veränderungen im Seitenlinienorgan der Zebra­bärblinge

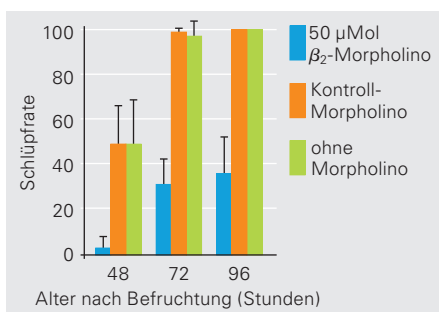


Abb. 2: Schlüpf­rate von «Knock down»-Zebra­bärblingen (Injektion von 50 μM β_2 -Morpholino) 48, 72 und 96 Stunden nach der Befruchtung im Vergleich zu unbehandelten Fischen bzw. Embryonen, denen ein bindungsunfähiges Kontroll-Morpholino eingespritzt worden war.

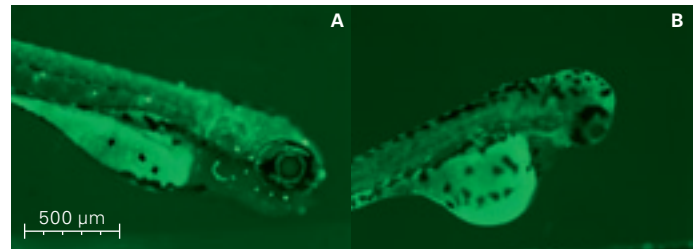


Abb. 3: Neuromasten des Seitenlinienorgans in Zebra­bärbling­embryonen nach Injektion des Kontroll-Morpholinos (A) unter dem Mikroskop. Sie fehlen in «Knock down»-Zebra­bärblingen (B) Morpholinokonzentration: 25 μM .

beruht. Dieses Organ ist der Ferntastsinn der Fische, mit dem sie feinste Strömungsänderungen und Wasserdruckwellen wahrnehmen und sich somit orientieren können. Die eigentlichen sensorischen Komponenten des Seitenlinienorgans sind die Neuromasten. In ihrem Zentrum befindet sich eine Ansammlung von Haarzellen, wobei die Haare an der Basis mit Nervenzellen verbunden sind, die die Signale aufnehmen. Um die Haarzellen herum liegen Stützzellen. Normalerweise besitzen Zebra­bärblinge Neuromasten am Kopf, rund um die Augen, und jeweils entlang einer Linie auf beiden Körperflanken, die leicht mit einem fluoreszierenden Farbstoff sichtbar gemacht werden können (Abb. 3 A). Nicht so die «Knock down»-Zebra­bärblinge. Diesen immer im Kreis schwimmenden Fischen fehlen die Neuromasten entweder komplett oder sie sind nicht funktionell und können deshalb nicht angefärbt werden (Abb. 3 B).

Östrogenrezeptoren sind wichtig während der Organent­wicklung. Unsere Ergebnisse sprechen klar für eine wichtige Rolle des Östrogenrezeptors β_2 während der Embryonalentwicklung und dafür, dass Östrogene nicht nur die sexuelle Differenzierung und Fortpflanzung steuern, sondern auch die allgemeine Organogenese. Neben der Schlüpf­rate beeinflusst das Zusammenspiel von Östrogen und Östrogenrezeptor die Bildung oder das Funktionieren von Neuromasten, die für ein normales Schwimmverhalten essenziell sind. Das nächste Ziel ist nun, spezifische Gene zu identifizieren, die in den «Knock down»-Zebra­bärblingen herauf- oder herabreguliert werden. ○ ○ ○

- [1] Jobling S. et al. (2006): Predicted exposures to steroid estrogens in U.K. rivers correlate with widespread sexual disruption in wild fish populations. *Environmental Health Perspectives* 114 (1), 32–39.
- [2] Klinge C.M., Jernigan S.C., Mattingly K.A., Risinger K.E., Zhang J. (2004): Estrogen response element-dependent regulation of transcriptional activation of estrogen receptors α and β by coactivators and corepressors. *Journal of Molecular Endocrinology* 33 (2), 387–410.
- [3] Ekker S.C. (2000): Morphants: a new systematic vertebrate functional genomics approach. *Yeast* 17 (4), 302–306.

Östrogenähnliche Wirkung von Dioxinen



Ksenia Groh schloss ihre Doktorarbeit zum Thema Ende 2006 ab und arbeitet nun als Postdoktorandin in der Abteilung Umwelttoxikologie.

Dioxine sind weit verbreitete Umweltschadstoffe. Ähnlich wie die weiblichen Geschlechtshormone, die Östrogene, sind sie in der Lage, in das Hormonsystem wild lebender Arten einzugreifen. So beeinträchtigen sie z. B. die Fortpflanzungsfähigkeit von Fischen. Um die Risiken von Dioxinen auf Gewässerorganismen besser einschätzen zu können, untersuchten wir, ob sie die Expression eines normalerweise durch Östrogene regulierten Gens verändern.

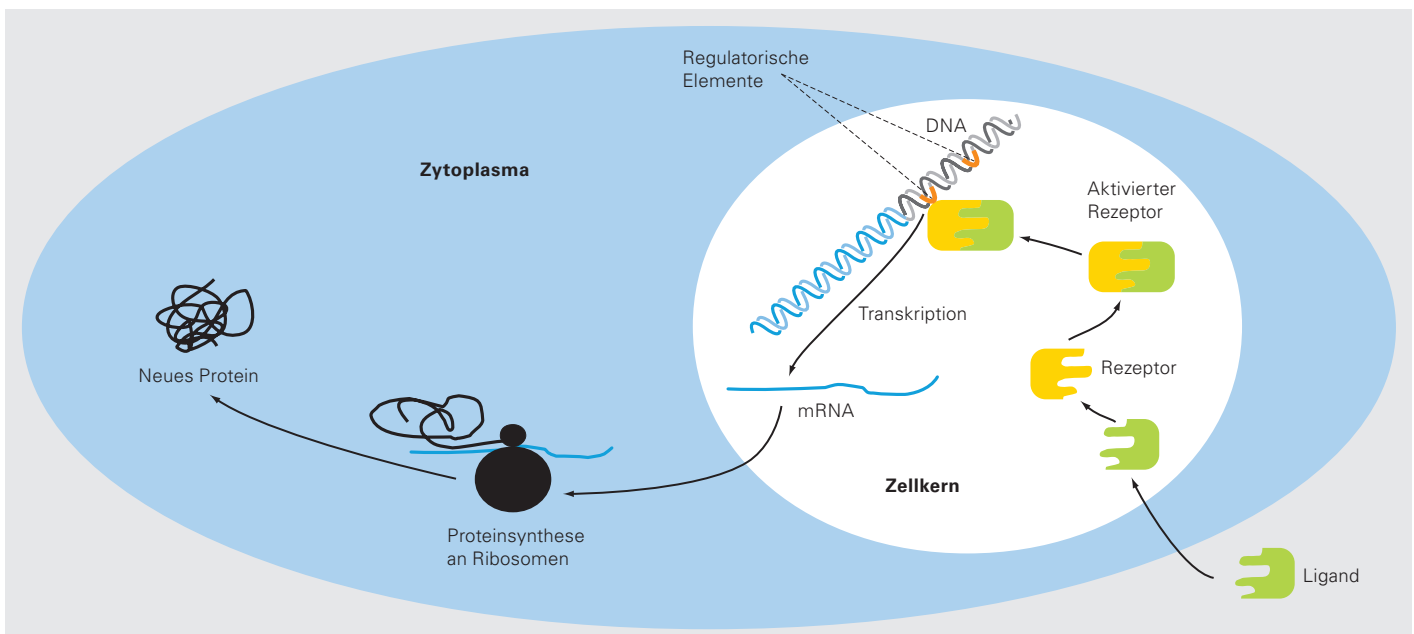
In den letzten Jahren häufen sich die Berichte über Entwicklungs- und Fortpflanzungsstörungen bei Fischen, wie z. B. Gonadenmissbildungen und reduzierte Fruchtbarkeit. Die Anomalien werden zumindest teilweise mit so genannten endokrin wirksamen Substanzen in Verbindung gebracht. Diese natürlichen oder synthetischen Stoffe sind in der Umwelt weit verbreitet. Sie beeinflussen das Hormonsystem, indem sie die Wirkung natürlicher Hormone nachahmen oder stören.

Bis heute sind etwa 1000 Substanzen als endokrin wirksam identifiziert bzw. verdächtig [1], darunter viele östrogen- und dioxinähnliche Chemikalien. Der klassische Wirkmechanismus all dieser Substanzen ist recht ähnlich (Abb. 1). Nach Bindung

des Liganden am Östrogen- oder Dioxinrezeptor heftet sich der aktivierte Komplex an kurze DNA-Abschnitte, so genannte östrogen- oder dioxinempfindliche Elemente, in der Promotorregion spezifischer Zielgene. Aufgrund dieses Vorgangs kann die Gentranskription initiiert werden.

Ein wichtiges Zielgen in diesem Zusammenhang ist *cyp19*. Es kodiert das Enzym Cytochrom-P450-Aromatase, das den letzten Schritt der Östrogen-Biosynthese katalysiert. Eine gestörte Expression des Aromatase-Gens kann die Produktionsraten von Östrogenen verändern, das Gleichgewicht zwischen lokalen und systemischen Östrogenen gefährden und somit die östrogenregulierten biologischen Prozesse negativ beeinflussen. Ziel un-

Abb. 1: Prinzip der Genaktivierung durch Bindung eines Rezeptor-Ligand-Komplexes an die DNA – stark vereinfachtes Schema.



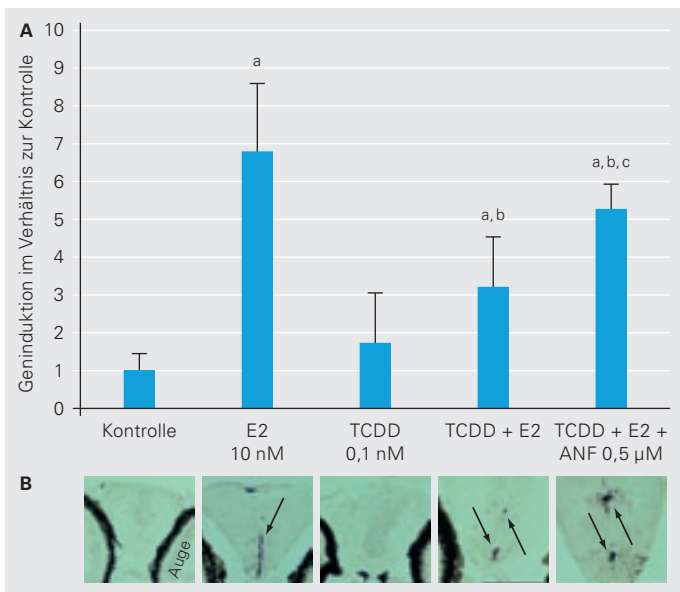


Abb. 2: Reaktion der cerebralen Aromatase nach Exposition von Zebrafish-Embryonen mit Liganden des Östrogen- und Dioxinrezeptors.

A: Aromatase-mRNA-Mengen. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert aus drei unterschiedlichen Versuchen mit je 2 Parallelmessungen \pm Standardabweichung relativ zur Lösungsmittelkontrolle. a = signifikanter Unterschied zur Kontrolle; b = signifikanter Unterschied zur E2-Exposition; c = signifikanter Unterschied zur Co-Exposition mit E2 und TCDD; $p < 0,05$ in allen Fällen.

B: Nachweis des Aromatase-Proteins im Gehirn mit Aromatase-Antikörpern. Die Pfeile markieren die immunoreaktiven Gliazellen.

serer Studie war es deshalb, die molekularen Mechanismen aufzuklären, durch die die Transkription dieses Schlüsseligens reguliert wird. Insbesondere wollten wir aufzeigen, welche Effekte dioxinähnliche Substanzen – allein oder in Verbindung mit exogenen Östrogenen – auf dieses System haben. Dafür untersuchten wir die Expression des Aromatase-Gens im Modellorganismus Zebrafish (*Danio rerio*).

Zwei Aromatase-Gene im Zebrafish. Wie viele Echte Knochenfische (Teleostei) besitzen Zebrafish zwei Aromatase-Gene, die in unterschiedlichen Organen exprimiert werden: *cyp19a1* hauptsächlich in den Gonaden und *cyp19a2* vorwiegend im Gehirn. Damit kommt diesem Gen eine wichtige Funktion in der Entwicklung und Fortpflanzung der Fische zu. So ist die cerebrale Aromatase (*cyp19a2*) beteiligt an der Steuerung neuroendokriner Prozesse, die durch Östrogene vermittelt werden, wie z. B. die Entwicklung des Gehirns oder die Gestaltung des männlichen Sexualverhaltens. Anhand von Sequenzvergleichen konnten drei potenzielle Elemente im Promotor des cerebralen Aromatase-Gens identifiziert werden, an denen aktivierte Dioxin- oder Östrogenrezeptor-Komplexe binden und die folglich in der Regulation der Genexpression involviert sein könnten (Abb. 1). Dass einer dieser DNA-Abschnitte tatsächlich als östrogenempfindliches Element fungiert, wurde kürzlich nachgewiesen [2]. Dagegen ist

noch unklar, ob die beiden anderen Abschnitte als potenziell dioxinempfindliche Elemente wirken [3, 4].

Wir stellten uns deshalb zwei spezifische Forschungsfragen:

- Sind die beiden dioxinempfindlichen Elemente des cerebralen Aromatase-Gens funktionell und folgt die Regulation dieses Gens dem klassischen, in Abbildung 1 vorgestellten Muster?
- Können Dioxine die Genexpression der Aromatase verändern, indem sie die Wirkung des Östrogens durch einen ungewollten Signalaustausch zwischen den Rezeptoren stören?

In-vivo- und in-vitro-Tests kombinieren. Angesichts dieser Fragestellungen haben wir uns methodologisch für eine Kombination aus *In-vivo*-Expositionsversuchen mit Zebrafish-Embryonen und *In-vitro*-Tests mit Reportergenkonstrukten entschieden. Für die *In-vivo*-Expositionsversuche wurden Zebrafish-Embryonen vom 17. bis zum 20. Tag nach Befruchtung mit östrogen- und/oder dioxinähnlichen Substanzen in Kontakt gebracht. Am Ende der Expositionszeit wurde die mRNA aus den Embryonen isoliert bzw. wurden die Embryonen zur Proteinquantifizierung präpariert.

Da das cerebrale Aromatase-Gen hauptsächlich in so genannten Gliazellen exprimiert wird – das sind spezielle Gehirnzellen, die die Neuronen stützen und ernähren – arbeiteten wir mit einer menschlichen Glia-Zelllinie als *In-vitro*-Testsystem [2]. Im Rahmen unserer Studie schleusten wir verschiedene Kombination aus DNA-Konstrukten in die Zellen ein:

- Reporterkonstrukte: Als Reportergen diente das Luciferase-Gen. Es stand entweder unter Kontrolle des Wildtyp-Aromatase-Promotors oder eines mutierten Aromatase-Promotors der keins der beiden potenziell dioxinempfindlichen Elemente trug. Bei aktiviertem Promotor wird proportional zur Stärke der Stimulierung das Protein Luciferase in den Zellen produziert. Es kann anschließend anhand seiner Lumineszenz nachgewiesen werden.
- Expressionskonstrukte: Will man überprüfen, ob die Promotoren der Reporterkonstrukte durch Östrogene oder Dioxine *via* ihrer jeweiligen Rezeptoren aktiviert werden, müssen notwendigerweise alle Komponenten in den Zellen vorhanden sein. Darum wurden Reporter- und Expressionskonstrukte gemeinsam in die Zellen eingeschleust. Die Expressionsvektoren enthalten die kodierenden Sequenzen der Zebrafish-Rezeptorproteine, die konstitutiv exprimiert werden.

Nach 48-stündiger Exposition mit Östrogen oder Dioxin wurden die so veränderten Gliazellen lysiert, um die Luciferasemenge zu bestimmen.

Die dioxinempfindlichen Elemente im Promotor des cerebralen Aromatase-Gens sind nicht funktionell. Im ersten Versuch behandelten wir Zebrafish-Embryonen mit dem prototypischen Liganden des Dioxinrezeptors, 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD), einer der stärksten Aktivatoren des Dioxinrezeptorsystems. Da die Menge an Aromatase-mRNA (Abb. 2A) oder Protein (Abb. 2B) gleich blieb, schlossen wir, dass TCDD keine Auswirkungen auf die Gehirn-Aromatase hatte.

Mit dem *In-vitro*-Testsystem untersuchten wir, wie der Wildtyp- bzw. der mutierte Promotor ohne dioxinempfindliche Elemente auf TCDD reagierten. Dazu wurden in die Gliazellen neben den

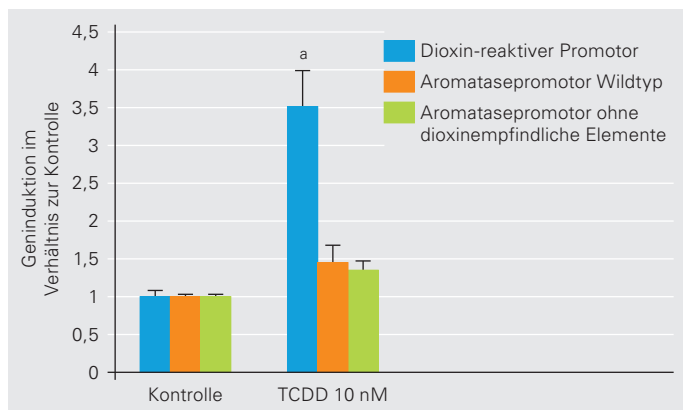
Reporterkonstrukten auch Expressionsvektoren eingeschleust, so dass die Proteine des Dioxinrezeptorkomplexes stets in den Zellen vorhanden waren. Die Aktivität beider Aromatase-Promotoren blieb unverändert, während der Kontrollpromotor mit einem funktionellen dioxinempfindlichen Element unter denselben Bedingungen aktiviert wurde (Abb. 3). Wir konnten zudem zeigen, dass andere DNA-Fragmente, die ähnliche dioxinempfindliche Elemente trugen wie die im Gehirn-Aromatase-Promotor identifizierten, auch nicht in der Lage waren, den aktivierten Dioxinrezeptorkomplex zu binden (ohne Abbildung).

Aus diesen Beobachtungen folgern wir, dass die beiden dioxinempfindlichen Elemente im Promotor des cerebralen Aromatase-Gens nicht funktionell sind, und dass Dioxine dieses Gen nicht direkt über die klassische Dioxinrezeptorsignalkette steuern können.

Signalaustausch zwischen den Rezeptoren: die anti-östrogene Wirkung von TCDD. Als nächstes untersuchten wir, ob ein möglicher Signalaustausch zwischen den Östrogen- und Dioxinrezeptoren die Expression der cerebralen Aromatase im Zebrafisch beeinflusst. Infolge Exposition mit Dioxinen kam es tatsächlich – und zwar je nach An- oder Abwesenheit von Östrogenen – zu anti-östrogenen oder zu östrogenen Effekten.

Wie bereits in früheren Arbeiten dokumentiert [2], wurde die Expression der Gehirn-Aromatase auch in unserem Experiment durch das natürliche Östrogen 17β -Östradiol (E2) deutlich induziert. Dies führte zu erhöhten Mengen an Aromatase-mRNA und an Proteinen in den Zebrafischembryonen (Abb. 2A + B). E2 aktivierte ebenfalls den Promotor des cerebralen Aromatasegens im *In-vitro*-System – und zwar dann, wenn der Östrogenrezeptor

Abb. 3: Reaktion des Promotors der cerebralen Aromatase – mit oder ohne potenziell dioxinempfindliche Elemente – auf Behandlung mit TCDD. Als positive Kontrolle diente ein Vektor mit einem funktionellen dioxinempfindlichen Promotor der Regenbogenforelle. In die Gliazellen wurde neben den Reporterkonstrukten auch ein Expressionsvektor mit der kodierenden Sequenz für die Proteine des Zebrafisch-Dioxinrezeptorkomplexes eingeschleust. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert aus drei unterschiedlichen Versuchen mit je 3 Parallelmessungen \pm Standardabweichung relativ zur Lösungsmittelkontrolle. a = signifikanter Unterschied zur Lösungsmittelkontrolle; $p < 0,01$ in allen Fällen.



tor und der Dioxinrezeptorkomplex in den Zellen vorhanden waren (Abb. 4A). Eine Co-Exposition von E2 mit TCDD wieder in Anwesenheit beider Rezeptoren verminderte die E2-induzierte Expression der cerebralen Zebrafisch-Aromatase. Diese anti-östrogene Wirkung wurde sowohl *in vivo* (Abb. 2) als auch *in vitro* beobachtet (Abb. 4A). Darüber hinaus zeigten der veränderte Aromatase-Promotor ohne die potenziell dioxinempfindlichen Elemente und der Kontrollpromotor mit einem einzigen östrogenempfindlichen Element dasselbe Expressionsmuster wie der Wildtyp-Aromatase-Promotor (Abb. 4A). Die Hemmung der Genexpression erfolgt damit scheinbar unabhängig von den potenziell dioxinempfindlichen Elementen, die im Promotor der cerebralen Aromatase identifiziert wurden.

Der anti-östrogene Effekt von TCDD konnte teilweise (*in vivo*, Abb. 2A + B) oder vollständig (*in vitro*, Abb. 4A) durch Zugabe eines Dioxinrezeptor-Antagonisten, α -Naphthoflavon (ANF), aufgehoben werden. Ein Antagonist ist eine Substanz, die zwar am Rezeptor bindet, ihn aber nicht aktiviert. Dies ist ein Hinweis darauf, dass der Dioxinrezeptor an der Hemmung der Aromatase-Genexpression durch TCDD beteiligt ist.

Das im Gehirn durch die Aromatase produzierte E2 ist ein wichtiger neurotropher Faktor und spielt eine wesentliche Rolle für den Schutz der Neuronen. Es ist denkbar, dass TCDD die normale E2-induzierte Aromatase-Expression hemmt, so dass weniger Östrogen im Gehirn synthetisiert und damit das neuroendokrine System insgesamt gestört wird.

Signalaustausch zwischen den Rezeptoren: die östrogene Wirkung des TCDD. Einen aktivierten Aromatase-Promotor beobachteten wir in TCDD-exponierten Gliazellen (Abb. 4B), wenn sowohl der Östrogenrezeptor als auch die Proteine des Dioxinrezeptorkomplexes in den Zellen vorhanden waren. Dieser Effekt konnte mit Zugabe des Östrogenrezeptor-Antagonists ICI 162,780 (ICI) oder des Dioxinrezeptor-Antagonists ANF blockiert werden, woraus wir ableiten, dass beide Rezeptoren an dem Prozess beteiligt sind (Abb. 4B).

Die Tatsache, dass nur das östrogenempfindliche Element des Promotors an den Interaktionen mit dem Dioxin- oder Östrogenrezeptor beteiligt ist, wurde durch Experimente mit dem mutierten Aromatasepromotor, dem beide potenziell dioxinempfindlichen Elemente fehlen, und dem Kontrollpromotor mit einem einzigen östrogenempfindlichen Element bestätigt. Beide Konstrukte ergeben dasselbe Reaktionsmuster wie der Vektor mit dem Wildtyppromotor des Zebrafisch-Aromatase-Gens, wenn die Gliazellen mit Liganden der Dioxin- und Östrogenrezeptoren in Kontakt kamen (Abb. 4B).

Neuere Studien an menschlichen Zellen zeigen, dass sich aktivierte Dioxinrezeptoren direkt mit freien Östrogenrezeptoren zusammenlagern, dann an das östrogenempfindliche Element binden und somit zu einer Genaktivierung führen können [5]. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass diese Interaktion zwischen den beiden Rezeptortypen sehr wahrscheinlich auch im Fisch existiert.

Doch Achtung: die schwach östrogene Wirkung des TCDD konnte nur *in vitro* und in vollständiger Abwesenheit von Liganden

des Östrogenrezeptors beobachtet werden. Es ist deshalb denkbar, dass die östrogene Wirkung von Dioxinen, d. h. die Aktivierung der Aromatase-Expression durch TCDD, die wir *in vivo* nachweisen konnten (Abb. 2A), durch endogene Östrogene verhindert wird. Trotzdem könnte der Wirkungsweg des TCDD via Östrogenrezeptoren in bestimmten Entwicklungsphasen oder Zelltypen funktionieren, dann nämlich wenn Östrogene abwesend oder nur in minimalen Mengen vorhanden sind.

Das empfindliche Gleichgewicht endogener Östrogene wird durch externe östrogen- und dioxinähnliche Stoffe gestört.

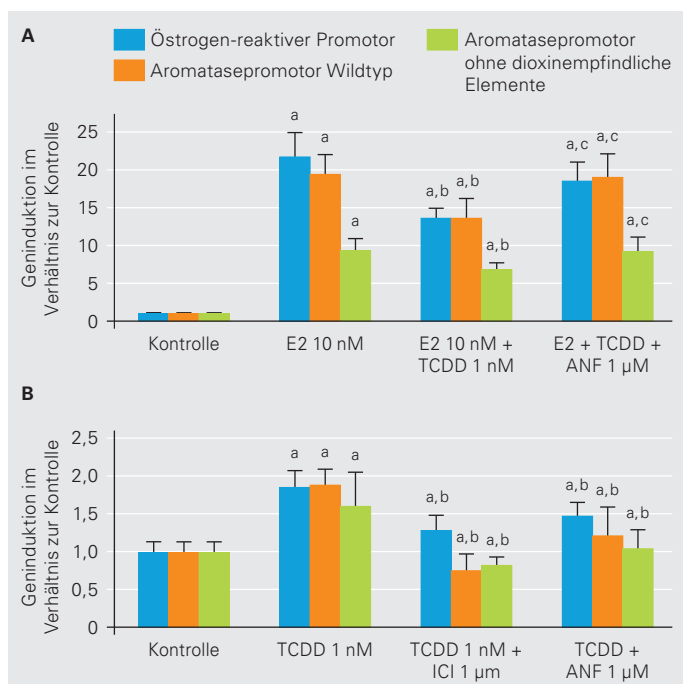
Unsere Analyse der Genregulation der cerebralen Aromatase beim Zebrafisch zeigt, dass östrogen- und dioxinähnliche hormonaktive Substanzen bei der Expression dieses Gens interferieren können [6]. Unsere Ergebnisse erlauben folgende Schlussfolgerungen:

- ▶ Endokrin wirksame Substanzen, die in der Lage sind, an den Östrogenrezeptor zu binden und diesen zu aktivieren, können die Zebrafisch-Gehirn-Aromatase in ihrer Funktion stören, indem sie ihre Expression ankurbeln.
- ▶ Die beiden dioxinempfindlichen Elemente, die in der Promotorregion des Aromatase-Gens identifiziert wurden, sind – ver-

mutlich wegen geringer Übereinstimmung mit der Sequenz eines typischen dioxinempfindlichen Elements – nicht funktionell. Es ist deshalb unwahrscheinlich, dass dioxinähnliche hormonaktive Substanzen in der Lage sind, die Expression der cerebralen Aromatase beim Zebrafisch über den klassischen Signaltransduktionsweg *via* Dioxinrezeptorkomplex und dioxinempfindliches Element zu beeinflussen. Dieses Beispiel verdeutlicht, wie wichtig es ist, die Funktionalität der über Sequenzvergleiche identifizierten Promotorelemente direkt zu überprüfen.

- ▶ Dioxine können die Expression von Genen mit funktionellen östrogenempfindlichen Promotorelementen beeinflussen. Ihre Wirkung kann dabei je nach Ab- oder Anwesenheit von Liganden des Östrogenrezeptors eine östrogene (Stimulierung des Östrogenrezeptors und Aktivierung der Genexpression über das östrogenempfindliche Element) oder anti-östrogene Form (Abschwächung der normalen E2-induzierten Genaktivität) annehmen. Folglich zeigen Dioxine in unterschiedlichen Entwicklungsstadien oder in Zielorganen mit unterschiedlichen Östrogengehalten eine andere Wirkung. Genauso kann diese Wirkung in der aquatischen Umwelt sehr unterschiedlich sein, je nachdem ob in den Gewässern neben den Dioxinen noch weitere endokrin wirksame Substanzen vorhanden sind oder nicht. ○○○

Abb. 4: Reaktion des Promotors der cerebralen Aromatase – mit oder ohne potenziell dioxinempfindliche Elemente – auf eine Behandlung mit Liganden des Östrogen- und des Dioxinrezeptors. Zum Einsatz kam zudem ein Vektor mit einem einzelnen östrogenempfindlichen Element in der Promotorregion. In die Gliazellen wurde neben den Reporterkonstrukten auch ein Expressionsvektor mit der kodierenden Sequenz des Östrogenrezeptors und des Dioxinrezeptorkomplexes eingeschleust. a = signifikanter Unterschied zur Lösungsmittelkontrolle in (A) und (B); b = signifikanter Unterschied zur Behandlung mit E2 (A) und TCDD (B); c = signifikanter Unterschied zur Doppelbehandlung mit E2 und TCDD; $p < 0,01$ in allen Fällen.



- [1] IEH (2005): Chemicals purported to be endocrine disruptors: A compilation of published lists. Web Report W20, Leicester, UK, MRC Institute of Environment and Health. Available at <http://www.silsoe.cranfield.ac.uk/ieh/pdf/w20.pdf>
- [2] Menuet A., Pellegrini E., Brion F., Gueguen M. M., Anglade I., Pakdel F., Kah O. (2005): Expression and estrogen-dependent regulation of the zebrafish brain aromatase gene. *Journal of Comparative Neurology* 485, 304–320.
- [3] Kazeto Y., Ijiri S., Place A.R., Zohar Y., Trant, J.M. (2001): The 5'-flanking regions of CYP19A1 and CYP19A2 in zebrafish. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 288, 503–508.
- [4] Kazeto Y., Place A.R., Trant J.M. (2004): Effects of endocrine disrupting chemicals on the expression of CYP19 genes in zebrafish (*Danio rerio*) juveniles. *Aquatic Toxicology* 69, 25–34.
- [5] Ohtake F., Takeyama K.-i., Matsumoto T., Kitagawa H., Yamamoto Y., Nohara K., Tohyama C., Krust A., Mimura J., Chambon P., Yanagisawa J., Fujii-Kuriyama Y., Kato S. (2003): Modulation of estrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature* 423, 545–550.
- [6] Cheshenko K., Brion F., Le Page Y., Hinfray N., Pakdel F., Kah O., Segner H., Eggen R.I.L. (2007): Expression of zebrafish aromatase *cyp19a* and *cyp19b* genes in response to the ligands of estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor. *Toxicological Sciences* 96, 255–267.

Veränderte Genaktivität durch Rohöl



Jules Kemadjou,
Biologe und wissenschaftlicher Mitarbeiter
in der Abteilung
Umwelttoxikologie.

Immer wieder kommt es zu Ölkatastrophen. Die akuten Schäden für die aquatischen Organismen sind meist dramatisch. Aber selbst Jahrzehnte später können das Öl oder seine wasserlöslichen Komponenten noch nachgewiesen werden. Unser Ziel war es deshalb, die Effekte von Rohöl auf Fische unter subakuten Bedingungen zu untersuchen. Mittels Zebrafärblingen als Modellorganismen identifizierten wir mehrere hundert Gene, deren Expression nach einer Ölexposition verändert ist.

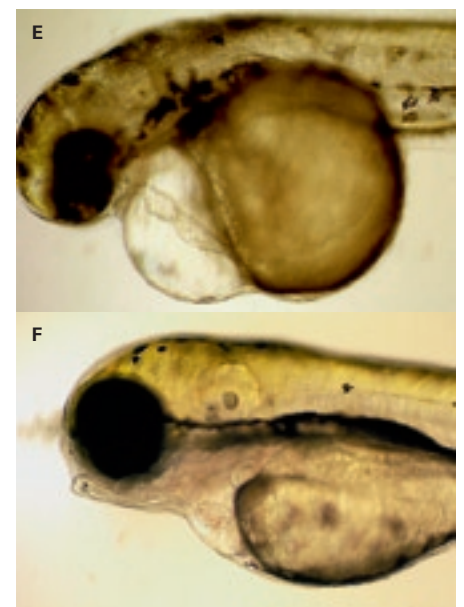
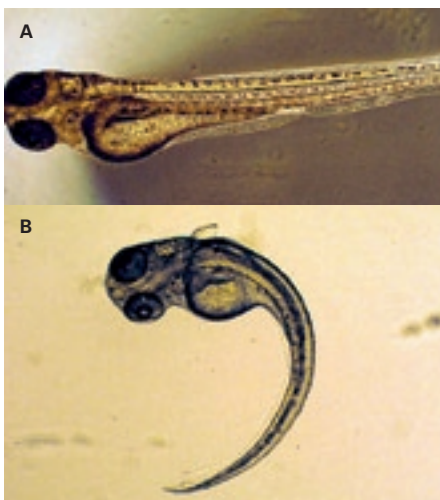
Es ist noch nicht lange her, dass die letzte Ölpest die Schlagzeilen dominierte. Ende 2007 flossen ca. 200 000 Liter Öl aus einem Schiff in der San Francisco Bay, nachdem es mit einer Brücke kollidiert war. Den Ölteppich stufte man in der langen Reihe der unfallbedingten Ölverschmutzungen als mittelgross ein. Obwohl dieser Unfall nicht annähernd das Ausmass der Exxon-Valdez-Katastrophe von 1989 in Alaska erreichte – damals flossen 41 Millionen Liter in den Ozean – ist jeder akute Ölunfall eine Bedrohung für die aquatische Pflanzen- und Tierwelt.

Der grösste Teil des im Meerwasser befindlichen Öls stammt jedoch nicht von akuten Ereignissen, sondern wird aus natürlichen oder diffusen anthropogenen Quellen eingetragen [1] und stellt somit eine chronische Gefährdung der aquatischen Umwelt dar. Mit dem Ziel, die Auswirkungen von Rohöl auf Fische zu untersuchen, entschieden wir uns, Zebrafärblingembryonen

als Modellorganismen zu nutzen. Insbesondere interessierten uns die – noch mehrheitlich unbekannt – Effekte auf die Fischentwicklung. Da sich die meisten Studien am Zebrafärbling auf morphologische Veränderungen fokussieren, man anhand dessen aber kaum auf die verursachenden Schadstoffe zurückschliessen kann, haben wir einen toxikogenomischen Ansatz gewählt. Dieser erlaubt es, jene Gene zu identifizieren, die durch Schadstoffexposition entweder aktiviert oder gehemmt werden.

Durch Öl verursachte morphologische Veränderungen während der Embryonalentwicklung. Unsere Untersuchungen führten wir mit norwegischem Rohöl durch, weil Norwegen ein wichtiger europäischer Ölproduzent ist. Da sich einige Ölkomponenten unter realen Bedingungen im Wasser lösen, haben wir zudem mit einem wässrigen Extrakt des Öls gearbeitet [3].

Abb. 1: Morphologische Veränderungen nach Exposition mit Rohöl oder dem wässrigen Extrakt. A: unbehandelte Kontrolle, B: gekrümmter Schwanz, C: abgeknickter Schwanz, D: Ödem und abgeknickter Schwanz, E: vergrössertes Herz, F: unbehandelte Kontrolle, normales Herz



Für unsere Experimente definierten wir zunächst geeignete Schadstoffkonzentrationen. Sie sollten nicht letal wirken, aber bei mindestens 40 % der exponierten Embryonen zu morphologisch sichtbaren Veränderungen führen. Dafür testeten wir das Rohöl in Verdünnungen zwischen 0,5 und 1000 ppm (= «parts per million», Teile pro Million) und den wässrigen Extrakt in Konzentrationen zwischen 5 und 100 %.

Optimale Effekte lieferten der 30%ige wässrige Extrakt sowie Rohölkonzentrationen zwischen 100 und 1000 ppm, wobei die morphologischen Veränderungen bei 100 ppm deutlich weniger ausgeprägt waren. Die markantesten Symptome, die wir beobachteten, waren ein länglich vergrössertes Herz, Ödeme, eine dorsale Krümmung der Körperachse und die Verbiegung des Schwanzes (Abb. 1). Dagegen entwickelten sich die Kontrollfische normal.

Starke veränderte Genexpression in Zebraabrlingembryonen nach Ölexposition. Aufbauend auf den Voruntersuchungen, starteten wir nun die toxikogenomischen Experimente mit Zebraabrlingen unterschiedlicher Entwicklungsstadien:

- ▶ 4 Stunden alte Embryonen, am Anfang der Gastrulation (d. h. Bildung verschiedener Zelltypen);
- ▶ 24 Stunden alte Embryonen, ein Entwicklungsstadium, in dem die meisten Organe angelegt werden;
- ▶ 96 Stunden alte Fische, kurz nach dem Schlüpfen.

Die Zebraabrlinge wurden mit Rohöl und dessen wässrigem Extrakt in Kontakt gebracht, wobei die Exposition in allen Fällen 24 Stunden dauerte, d. h. von der 4. bis zur 28. Stunde für die erste, von der 24. bis zur 48. Stunde für die zweite und von der 96. bis zur 120. Stunde nach Befruchtung für die dritte Gruppe. Mit Hilfe so genannter Genchips (siehe Kasten) konnten wir Hunderte von Genen identifizieren, die nach Exposition mit 100 oder 1000 ppm Rohöl eine signifikante Veränderung ihrer Expression im Vergleich zu den Kontrollfischen aufwiesen (Tabelle). Am auffälligsten war, dass in etwa gleich viele Gene auf 100 wie auf 1000 ppm Rohöl reagierten. Unser Test ist also in der Lage,



Die Zebraabrlinge werden unter dem Mirooskop auf Anomalien untersucht.

kleinste Schadstoffkonzentrationen nachzuweisen, die noch keine akuten morphologischen Schäden verursachen.

Im Vergleich zum Rohöl hat der wässrige Extrakt wesentlich weniger Gene beeinflusst (Tabelle). Ein Grund dafür könnte sein, dass Komponenten, die zwar im Rohöl, nicht jedoch im wässrigen Extrakt enthalten sind, synergetisch wirken und sich dadurch der toxische Effekt durch Rohöl erhöht. Während in nicht geschlüpfen Fischen nur ca. 40 Gene eine veränderte Expression aufwiesen, stieg diese Anzahl auf 230 kurz nach dem Schlüpfen (Tabelle); dies ist wahrscheinlich auf die weiter fortgeschrittene Organentwicklung der Fische zurückzuführen.

Effekte auf Gene, die während der Embryonalentwicklung oder bei der Schadstoffabwehr exprimiert werden. In der Absicht, geeignete Biomarker zu finden, haben wir uns auf die

Anzahl der Gene, die durch Rohöl oder seinen wässrigen Extrakt beeinträchtigt werden.

		Alter der Embryonen während der Exposition		
		4–28 Stunden nach Befruchtung	24–48 Stunden nach Befruchtung	96–120 Stunden nach Befruchtung
100 ppm Rohöl	Gesamtanzahl der betroffenen Gene	634	639	719
	aktiviert	326	353	387
	gehemmt	308	286	332
1000 ppm Rohöl	Gesamtanzahl der betroffenen Gene	564	752	983
	aktiviert	315	533	428
	gehemmt	249	219	555
30%iger wässriger Extrakt	Gesamtanzahl der betroffenen Gene	46	40	230
	aktiviert	9	9	86
	gehemmt	37	31	144
Anzahl der Gene, beeinträchtigt sowohl durch Rohöl als auch durch den wässrigen Extrakt		7	16	3

wenigen Gene konzentriert, die sowohl durch Rohöl als auch durch seinen wässrigen Extrakt beeinflusst wurden: es handelt sich um 7 Gene in der frühen Embryonalentwicklung, 16 Gene in den 24 bis 48 Stunden alten Embryonen und 3 Gene in den frisch geschlüpften Fischen. Dass sich die Expressionsprofile der Zebra-bärblinge in unterschiedlichen Entwicklungsstadien kaum ähneln, ist ein weiterer Hinweis auf die hohe Spezifität der toxikogenomischen Effekte.

Unter den beeinflussten Genen identifizierten wir solche, die in die Embryonalentwicklung oder in die Schadstoffabwehr involviert sind. So kodiert beispielsweise eins der aktivierten Gene für ein Protein, das in der Blutzellenbildung eine grosse Rolle spielt. Höhere Transkriptmengen konnten wir auch für *Cyp19* nachweisen. Dieses Gen trägt die Information für ein Enzym der Cytochrom-P450-Familie, die hauptsächlich in die Schadstoffabwehr involviert ist.

Zebra-bärblingembryonen: Ein effizientes Modellsystem für die Bewertung von Schadstoffen. Unsere Untersuchungen zeigen, dass Zebra-bärblingembryonen ein spezifisches und höchst empfindliches Tiermodell für das Monitoring toxikogenomischer Effekte von Chemikalien sind [4]. Obwohl Wirbeltierzelllinien und

andere *In-vitro*-Testsysteme für die toxikologische Bewertung von Wirk- und Schadstoffen sehr nützlich sind, können sie Tierversuche nicht vollständig ersetzen. Zebra-bärblingembryonen sind ein kostengünstiges und aus ethischer Sicht vertretbares Wirbeltier-Modellsystem, das sicher weite Anwendungsmöglichkeiten finden wird. Dies nicht nur in der toxikologischen Evaluierung der unzähligen Stoffe, die im Rahmen des REACH-Programms der EU getestet werden müssen, sondern auch, um die Toxizität neuer Wirkstoffe in einem frühen Stadium der Arzneimittelentwicklung abzuschätzen. Darüber hinaus eignen sich Zebra-bärblingembryonen besonders gut, um die Effekte von Schadstoffen während der Zelldifferenzierung und der Morphogenese zu analysieren, was mit Zellkulturen oder anderen *In-vitro*-Systemen nicht möglich wäre.

Um ein komplettes Bild der Toxizität von Rohöl zu gewinnen, werden wir als nächstes die Proteomprofile im Verlauf der frühen Stadien der Zebra-bärblingentwicklung untersuchen. Durch die Proteomanalyse eines Organismus können subtile Veränderungen der Proteinmengen infolge von Umwelt-Stressfaktoren aufgezeichnet werden (siehe auch Artikel von Marc Suter auf S. 27). Sie gibt also Aufschluss über grundlegende Mechanismen der Toxizität, was möglicherweise zur Entdeckung neuer, universell einsetzbarer Expositionsbiomarker führt, die als molekulare Evaluierungswerkzeuge verwendet werden können. ○ ○ ○

Toxikogenomische Studien mit Genchips

Unter Genchips – auch DNA-, Biochips oder Microarrays genannt – versteht man mikroskopische DNA-Spots, die auf einer festen Matrix aufgebracht sind und in der Regel einzelnen Genen entsprechen. Mit Hilfe von Genchips kann man die Expressionsintensität Tausender von Genen simultan beobachten. Die in unserer Studie verwendeten Chips umfassen das Genom des Zebra-bärblings.

Nach Schadstoffexposition wird die gesamte messenger-RNA (mRNA = Gentranskripte) aus den Zebra-bärblingembryonen extrahiert. So erhält man die Transkripte aller während der Exposition aktiven Gene. Parallel dazu wird die mRNA aus nicht exponierten Embryonen isoliert. Beide mRNA-Fraktionen werden über das Enzym Reverse Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben und die cDNA mit einem roten (exponierte Embryonen) bzw. grünen (nicht exponierte Embryonen) Fluoreszenzfarbstoff markiert. Nach Vermischung der beiden fluoreszierenden Sonden werden sie auf einen Genchip gegeben. An welchen DNA-Spots die markierte cDNA hybridisiert, wird anschliessend mit einem Genchip-Scanner bestimmt. Dabei wird die Fluoreszenz durch Anregung mit einem Laserstrahl bestimmter Wellenlänge sichtbar gemacht und die aktivierten bzw. gehemmten Gene werden anhand der relativen Intensitätsverhältnisse beider Fluorophore identifiziert.

- [1] National Research Council (2002): Most oil enters sea from nonaccidents – Environment. Science News. Science Service, Inc.
- [2] Voelker D., Vess C., Tillmann M., Nagel R., Otto G.W., Geisler R., Schirmer K., Scholz S. (2007): Differential gene expression as a toxicant-sensitive endpoint in zebrafish embryos and larvae. *Aquatic Toxicology* 81, 355–364.
- [3] Smith L., Galloway T. (2006): Preparation of water accommodated fraction. School of Earth, Ocean and Environmental Sciences, University of Plymouth.
- [4] Braunbeck T., Boettcher M., Hollert H., Kosmehl T., Lammer E., Leist E., Rudolf M., Seitz N. (2005): Towards an alternative for the acute fish LC(50) test in chemical assessment: The fish embryo toxicity test goes multi-species – an update. *Altex* 22 (2), 87–102.

Proteinmuster zeigen Schadstoffbelastung an



Marc Suter, Chemiker und Gruppenleiter in der Abteilung Umwelttoxikologie
Koautoren: Ksenia Groh, Victor Nesatyy

Die Proteomanalyse ist nicht nur in der Medizin eine Erfolg versprechende Methode. Seit knapp 10 Jahren wird sie auch in der Ökotoxikologie angewendet. Sie deckt auf, welche Proteine verstärkt ausgeschüttet bzw. unterdrückt werden, wenn Organismen Umweltschadstoffen ausgesetzt sind. An der Eawag ist das Verfahren nun für Zebraabräblinge etabliert worden.

Fische können negativen chemischen oder physikalischen Veränderungen in ihrem Habitat oft nur schlecht ausweichen. Deswegen gelten sie als Indikatoren für den Zustand der Gewässer. Sind Fische durch chemische Belastung gestresst, aktiviert ihr Körper die passende Abwehr: spezifische Gene werden exprimiert und die entsprechenden Proteine synthetisiert. So werden beispielsweise Metallothioneine gebildet, wenn das Wasser mit Schwermetallen belastet ist, oder es wird die Synthese von Proteinen aus der Cytochrom-P450-Familie angekurbelt, wenn organische Schadstoffe das Wasser verschmutzen.

Will man die Reaktion der Fische auf geänderte Umweltbedingungen erforschen, ist dies anhand einer so genannten Proteomanalyse möglich. Dabei wird das Proteom – die Gesamtheit aller Proteine, die in einer Zelle, einem Gewebe oder einem Organismus vorkommt – auf Proteine untersucht, die verstärkt synthetisiert (induziert) oder unterdrückt (supprimiert) werden. Eine interessante und zugleich komplexe Methode (siehe Kasten), die zwar in den vergangenen Jahren stark weiterentwickelt wurde, aber durchaus noch einige Knackpunkte birgt [1]. Unser Ziel war es, sie weiter zu verbessern und für die ökotoxikologische Forschung an der Eawag zu etablieren. Wir fokussierten auf Zebraabräblingen, denn ihr Genom ist komplett sequenziert und somit sind theoretisch alle Proteine identifizierbar.

Mehr Proteine identifizieren. Eine grössere methodische Schwierigkeit der Proteomanalyse lag darin, dass nur ein geringer Anteil aller Proteine, deren Expression durch Schadstoffkontakt verändert ist, identifiziert werden konnte. Dies weil die Proteine, die als Reaktion auf den chemischen Stress gebildet werden, oft nur in geringen Mengen vorhanden sind und durch höher konzentrierte allgemein benötigte Proteine, wie z. B. Strukturproteine, überlagert werden.

Bei unseren Experimenten mit Zebraabräblingen zeigte sich, dass ein Grossteil der insgesamt 900 Proteine, die identifiziert werden konnten, zur Familie der Vitellogenine, der Eidotterproteine, gehörte. Wahrscheinlich jedoch konnten wir andere wichtige Proteine gar nicht nachweisen, weil sie im Rauschen untergingen. Wir haben daraufhin untersucht, ob es möglich ist, den Anteil

identifizierbarer Proteine zu erhöhen, in dem wir die Dottersäcke der Zebraabräblinglarven vor der Extraktion der Proteine entfernten. Denn schliesslich kommen Vitellogenine vor allem in diesem

Prinzip der Proteomanalyse

Die Proteomanalyse charakterisiert die Gesamtheit aller in einer Zellart, einem Gewebe oder einem Organismus unter definierten Bedingungen und zu einem bestimmten Zeitpunkt vorliegenden Proteine. In unseren Labors sind wir an den Proteinmustern von unbehandelten oder mit Schadstoffen exponierten Zebraabräblingen interessiert. Dazu werden die Proteine nach der Inkubationsphase aus den Fischen extrahiert, aufgetrennt und sequenziert. Früher kam hier die zweidimensionale Gelelektrophorese zum Einsatz; man schnitt einzelne Spots aus dem Gel heraus und sequenzierte die darin enthaltenen Proteine. Doch lassen sich mit dieser Methode nur zwischen 50 und 100 Proteine identifizieren. Heute wenden wir darum die so genannte multidimensionale Proteinidentifikationstechnologie oder kurz mudPIT [2] mit gekoppelter Flüssigchromatographie/Massenspektrometrie an. Dabei werden die Proteine zunächst mit Trypsin in kürzere Fragmente zerschnitten. Die entstehenden Peptide trennt man durch Flüssigchromatographie auf zwei nacheinander geschalteten Säulen auf und löst sie mit ansteigenden Salzkonzentrationen (NH_4Ac) nach und nach wieder von den Säulen ab (Abb. 1). Schliesslich bestimmt man die Aminosäuresequenzen der Peptide im Massenspektrometer, vergleicht die Sequenzen mit der Zebraabräbling-Datenbank und kann so die entsprechenden Proteine identifizieren. Zwischen 8 und 10 mudPIT-Experimente sind notwendig, um 95 % der bestimmmbaren Proteine zu identifizieren (Abb. 2A).

von der Mutter gebildeten Organ vor. Tatsächlich war die Massnahme sehr erfolgreich, denn die Liste der identifizierten Proteine enthielt daraufhin praktisch keine Vitellogenine mehr und die Anzahl der insgesamt nachgewiesenen Proteine erhöhte sich von 900 auf 1200.

Eine noch grössere Anzahl von identifizierten Proteinen, nämlich insgesamt 2700, konnten wir durch biologische Fraktionierung des Extrakts erreichen. Mit Hilfe eines kommerziellen Extraktionskits werden Membran-, Zellkern- und Cytoplasmaproteine voneinander getrennt, bevor sie separat weiter analysiert werden (Abb. 2B).

Reproduzierbarkeit erhöhen und den Zeitaufwand senken.

Ein weiterer Problemkomplex der Proteomanalyse lag in der schlechten Reproduzierbarkeit und dem grossen zeitlichen Aufwand, der betrieben werden musste, um möglichst viele der durch Schadstoffe induzierten oder supprimierten Proteine zu identifizieren. Etwa 10 mudPIT-Experimente (siehe Kasten) waren nötig, um 95 % der bestimmaren Proteine zu identifizieren [3]. Da ein solches Experiment 24 Stunden dauert, brauchte man also mindestens 10 Tage reine Analysenzeit für eine Probe. Aber nicht nur der grosse Zeitaufwand war unbefriedigend. Oft lieferten die 10 Wiederholungsexperimente stark voneinander abweichende Resultate (Abb. 2A). Wir suchten daher nach einen Weg, die Methode in dieser Hinsicht zu verbessern.

Klassische mudPIT-Analysen berücksichtigten nur zwei- und dreifach geladene Peptide, die nach Verdauung des Proteinextrakts mit Trypsin häufig sind. Einfach geladene Moleküle wurden bisher von der Sequenzbestimmung völlig ausgeschlossen, weil es sich dabei häufig um Nicht-Peptide handelt. Nun hat sich aber gezeigt, dass der Einbezug einfach geladener Ionen bei unserer Methode durchaus lohnenswert ist. Abb. 3 illustriert am Beispiel eines Peptids aus der schweren Kette von Myosin (Motorprotein der Muskelfasern), dass das einfach geladene Molekül nur unwesentlich schwächer als das zweifach geladene, das dreifach geladene Ion hingegen ohne Zoom bei 374,3 m/z (m/z = Verhältnis von Masse zu Ladung eines Moleküls) nicht sichtbar ist. Um aber die Sequenz eines Peptids möglichst eindeutig bestimmen

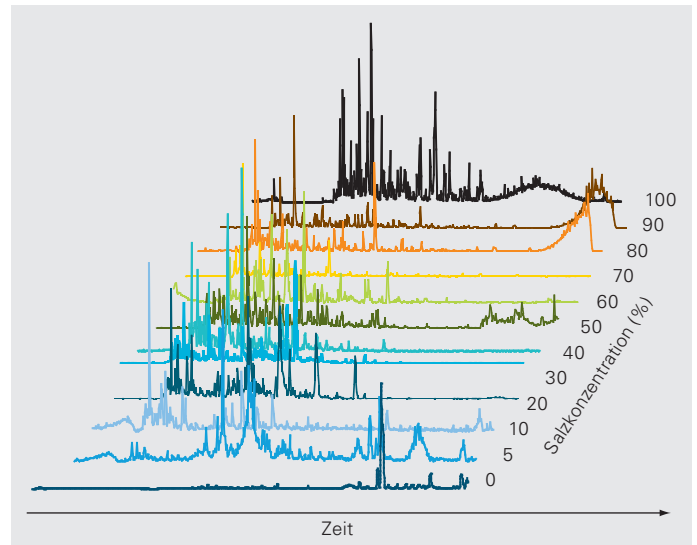


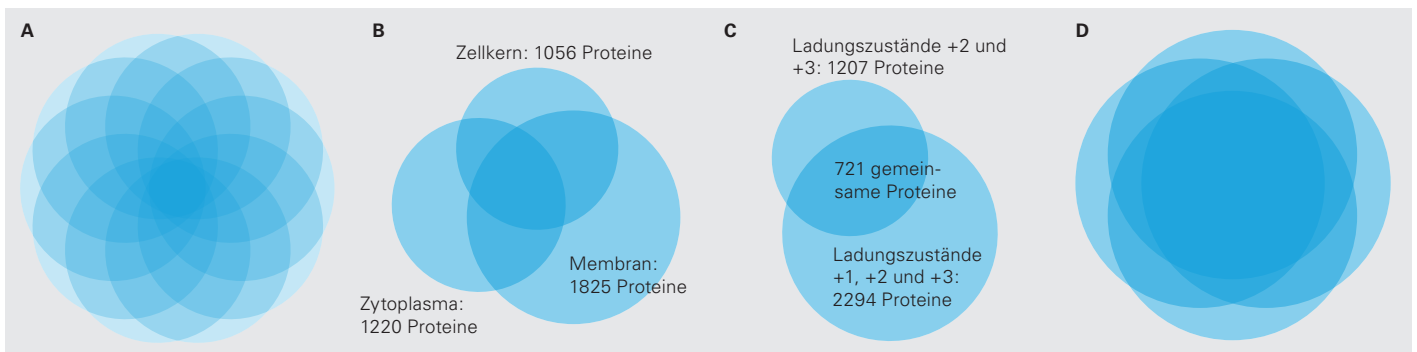
Abb. 1: Die Peptide werden mit Hilfe der Flüssigchromatographie auf zwei nacheinander geschalteten Säulen aufgetrennt und mit steigender Salzkonzentration wieder abgelöst.

zu können, muss sich das Signal deutlich vom Rauschen abheben. Daher war die Anzahl identifizierter Proteine, wenn nur zwei- und dreifach geladene Ionen berücksichtigt wurden, wesentlich geringer, als wenn auch die einfach geladenen Peptide einbezogen wurden (Abb. 2C).

Insgesamt stellte sich der Einbezug der einfach geladenen Peptide in unsere Analytik als vorteilhaft heraus. Es konnte nicht nur die Reproduzierbarkeit deutlich verbessert werden. Heute kommen wir auch mit 3–4 Wiederholungsexperimenten aus, um 95 % der bestimmaren Proteine zu identifizieren (Abb. 2D). Damit reduziert sich der zeitliche Aufwand für eine Probe auf 3–4 Tage.

Erste Experimente mit der weiterentwickelten Methode. Der Aufbau der Proteinanalytik ist aufwändig, jetzt aber an der Eawag grösstenteils abgeschlossen. Diese Technik ist für unsere ökotoxi-

Abb. 2: Anzahl Proteine, die durch die Proteomanalyse identifiziert werden können. Ein Kreis entspricht jeweils einem mudPIT-Experiment. Je stärker die Kreise überlappen, desto grösser ist die Reproduzierbarkeit. A: Um das Proteom zu analysieren, sind durchschnittlich 8–10 mudPIT-Experimente notwendig. B: Durch biologische Fraktionierung können mehr Proteine identifiziert werden. C: Durch Einbezug der einfach geladenen Peptide steigt die Anzahl der identifizierten Proteine. D: Neu sind mit unserem Verfahren nur noch 3–4 mudPIT-Experimente zur Analyse des Proteoms nötig.





Eawag-Wissenschaftler Victor Nesatyy am Massenspektrometer.

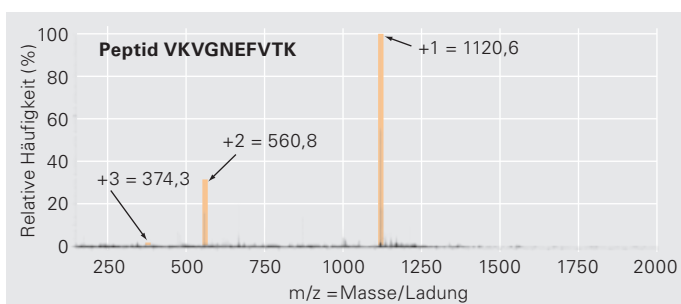
kologische Forschung äusserst interessant, da sie uns einerseits Einblick in die zugrunde liegenden toxischen Mechanismen gibt und es andererseits erlaubt, Proteine zu identifizieren, die zukünftig als Biomarker für bestimmte Schadstoffe bzw. Schadstoffgruppen dienen können. Biomarker, mit denen heute schon gearbeitet wird, sind z. B. die beiden eingangs erwähnten Entgiftungsenzyme oder auch das Eidotterprotein Vitellogenin, das im Fall einer Belastung mit Umwelthormonen verstärkt ausgeschüttet wird [4].

Erste Expositionsversuche haben nun gezeigt, dass Zebra- bärblinge, die an 1 μM Cadmium exponiert wurden, ein gegenüber unbehandelten Kontrolltieren stark verändertes Proteinmuster aufweisen. So hat beispielsweise die Konzentration der schweren Kette von Myosin im Vergleich zur Kontrolle zugenommen. Den gleichen Effekt konnten wir überdies auf Genebene beobachten: das Myosin-Gen wurde verstärkt in Zebra bärblinglarven exprimiert, die mit schwermetallhaltigem Rohöl inkubiert worden

waren. In beiden Fällen wiesen die Fische zudem gekrümmte Schwänze auf – eine klassische Reaktion auf Toxine.

Analog konnte mit der Proteomanalyse bestätigt werden, dass die Exposition an Estradiol, dem weiblichen Geschlechtshormon, zu einer Zunahme von Vitellogenin führt. Derzeit nutzen wir die Methode auch im Projekt «Genezis», das die sexuelle Differenzierung der Zebra bärblinge erforscht und vom Schweizer Nationalfonds finanziert wird. Nun da die Technik an der Eawag etabliert ist, ist es sogar ohne grössere Schwierigkeit möglich, sie auf andere Organismen wie z. B. Bakterien oder Grünalgen zu übertragen. ○○○

Abb. 3: Massenspektrum eines Peptids aus der schweren Kette von Myosin (Motorprotein der Muskelfasern). Details siehe Text.



- [1] Nesatyy V.J., Suter M.J.F. (2007): Proteomics for the analysis of environmental stress responses in organisms. *Environmental Science and Technology* 41, 6891–6900.
- [2] Washburn M.P., Wolters D., Yates J.R. (2001): Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nature Biotechnology* 19, 242–247.
- [3] Durr E., Yu J.Y., Krasinska K.M., Carver L.A., Yates J.R., Testa J.E., Oh P., Schnitzer J.E. (2004): Direct proteomic mapping of the lung microvascular endothelial cell surface *in vivo* and in cell culture. *Nature Biotechnology* 22, 985–992.
- [4] Vermeirssen E.L.M., Burki R., Joris C., Peter A., Segner H., Suter M.J.F., Burkhardt-Holm P. (2005): Characterization of the estrogenicity of Swiss midland rivers using a recombinant yeast bioassay and plasma vitellogenin concentrations in feral male brown trout. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 2226–2233.

Publikationen

Die hier aufgelisteten und alle älteren Eawag-Publikationen können als PDF-Dateien heruntergeladen werden: <http://library.eawag.ch/ris/risweb.isa>
Suche nach Autor, Titel oder Stichwort möglich. Bei Problemen: bibliothek@eawag.ch

- Seehausen O.** (2007): Evolution and ecological theory – Chance, historical contingency and ecological determinism jointly determine the rate of adaptive radiation. *Heredity* 99 (4), 361–363.
- Yang J., Reichert P., Abbaspour K.C.** (2007): Bayesian uncertainty analysis in distributed hydrologic modeling: A case study in the Thur River basin (Switzerland). *Water Resources Research* 43 (10), Article number W10401.
- Hudson A.G., Vonlanthen P., Müller R., Seehausen O.** (2007): Review: The geography of speciation and adaptive radiation in coregonines. *Advances in Limnology* 60, 111–146.
- Eckmann R., Gerdeaux D., Müller R., Rösch R.** (2007): Re-oligotrophication and whitefish fisheries management – A workshop summary. *Advances in Limnology* 60, 353–360.
- Müller R.** (2007): The re-discovery of the vanished «Edelfisch» *Coregonus nobilis* Haack, 1882, in Lake Lucerne, Switzerland. *Advances in Limnology* 60, 419–430.
- Fette M., Weber C., Peter A., Wehrli B.** (2007): Hydropower production and river rehabilitation: A case study on an alpine river. *Environmental Modeling & Assessment* 12 (4), 257–267.
- Meierhofer R., Wegelin M.** (2007): Was braucht es, damit SODIS erfolgreich ist? *Revue Lion* 1, 6–7.
- Meierhofer R.** (2007): Auf dem Weg nach Afrika. Welche Projekte werden unterstützt? *Lion Revue*, 1 S.
- Meierhofer R.** (2007): Begeisterte Teilnehmer an SODIS-Ausbildungs-Workshop in Uganda. *Lion Revue*, 2 S.
- Birkenmaier A., Holert J., Erdbrink H., Moeller H.M., Friemel A., Schoenenberger R., Suter M.J.F., Klebensberger J., Philipp B.** (2007): Biochemical and genetic investigation of initial reactions in aerobic degradation of the bile acid cholate in *Pseudomonas* sp strain Chol1. *Journal of Bacteriology* 189 (20), 7165–7173.
- Nesatyy V.J., Suter M.J.F.** (2007): Proteomics for the analysis of environmental stress responses in organisms. *Environmental Science & Technology* 41 (20), 6891–6900.
- Tobias R., Würzebesser C., Mosler H.J.** (2007): A model of prospective memory and habit phenomena calibrated with dynamic field data. The 2007 European Simulation and Modelling Conference St. Julians. Malta, October 22–24, 373–380.
- Mosler H.J., Tobias R.** (2007): How do commitments work? An agent based simulation using data from a recycling campaign in Santiago de Cuba. **The 2007 International Conference on Artificial Intelligence, Las Vegas, USA, June 25–28, 6 pp.**
- Klump S., Tomonaga Y., Kienzler P., Kinzelbach W., Baumann T., Imboden D.M., Kipfer R.** (2007): Field experiments yield new insights into gas exchange and excess air formation in natural porous media. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 71 (6), 1385–1397.
- McCracken K.G., Beer J.** (2007): Long-term changes in the cosmic ray intensity at Earth, 1428–2005. *Journal of Geophysical Research* 112 (A10), Article number A10101, 15 pp.
- Wang Y., Hammes F., Boon N., Egli T.** (2007): Quantification of the filterability of freshwater bacteria through 0.45, 0.22, and 0.1 µm pore size filters and shape-dependent enrichment of filterable bacterial communities. *Environmental Science & Technology* 41 (20), 7080–7086.
- Ibelings B.W., Chorus I.** (2007): Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater «seafood» and its consequences for public health: A review. *Environmental Pollution* 150 (1), 177–192.
- Larsen T.A., Maurer M., Udert K.M., Lienert J.** (2007): Nutrient cycles and resource management: Implications for the choice of wastewater treatment technology. *Water Science and Technology* 56 (5), 229–237.
- Lienert J., Bürki T., Escher B.I.** (2007): Reducing micropollutants with source control: Substance flow analysis of 212 pharmaceuticals in faeces and urine. *Water Science and Technology* 56 (5), 87–96.
- Pronk W., Zuleeg S., Lienert J., Escher B., Koller M., Berner A., Koch G., Bollner M.** (2007): Pilot experiments with electrodialysis and ozonation for the production of a fertiliser from urine. *Water Science and Technology* 56 (5), 219–227.
- Kunz Y., Pohl J., Langhans S.D.** (2007): Uferbezogene Indikatoren – Neue Ansätze zur Fließgewässerbewertung. *Wasser Energie Luft* 99 (1), 71–74.
- Koné D., Cofie O., Zurbrügg C., Gallizzi K., Mosser D., Drescher S., Strauss M.** (2007): Helminth eggs inactivation efficiency by faecal sludge dewatering and co-composting in tropical climates. *Water Research* 41 (19), 4397–4402.
- Doering M., Uehlinger U., Rotach A., Schlaepfer D.R., Tockner K.** (2007): Ecosystem expansion and contraction dynamics along a large Alpine alluvial corridor (Tagliamento River, Northeast Italy). *Earth Surface Processes and Landforms* 32 (11), 1693–1704.
- Alder A.C., Bruchet A., Carballa M., Clara M., Joss A., Löffler D., McArdell C.S., Miksch K., Omil F., Tuhkanen T., Ternes T.A.** (2006): The challenge of micropollutants in urban water management (Chapter 2). In: Ternes T.A., A. Joss (Eds.) *Human Pharmaceuticals, Hormones and Fragrances: The challenge of micropollutants in urban water management*. IWA Publishing, London, UK, 15–54.
- Efimov A.E., Tonevitsky A.G., Dittrich M., Matisko N.B.** (2007): Atomic force microscope (AFM) combined with the ultramicrotome: a novel device for the serial section tomography and AFM/TEM complementary structural analysis of biological and polymer samples. *Journal of Microscopy* 226 (3), 207–217.
- Müller B., Stöckli A., Stierli R., Butscher E., Gächter R.** (2007): A low cost method to estimate dissolved reactive phosphorus loads of rivers and streams. *Journal of Environmental Monitoring* 9 (1), 82–86.
- Muscheler R., Joos F., Beer J., Müller S.A., Vonmoos M., Snowball I.** (2007): Solar activity during the last 1000 yr inferred from radionuclide records. *Quaternary Science Reviews* 26 (1–2), 82–97.
- Robinson C.T., Buser T.** (2007): Density-dependent life history differences in a stream mayfly (*Deleatidium*) inhabiting permanent and intermittent stream reaches. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 41 (3), 265–271.
- Vonlanthen P., Excoffier L., Bittner D., Persat H., Neuenschwander S., Largiadèr C.R.** (2007): Genetic analysis of potential postglacial watershed crossings in Central Europe by the bullhead (*Cottus gobio* L.). *Molecular Ecology* 16 (21), 4572–4584.
- Wittmer D., Lichtensteiger T.** (2007): Development of anthropogenic raw material stocks: A retrospective approach for prospective scenarios. *Minerals and Energy – Raw Materials Report* 22 (1–2), 62–71.
- Dytczak M.A., Londry K.L., Siegrist H., Oleszkiewicz J.A.** (2007): Ozonation reduces sludge production and improves denitrification. *Water Research* 41 (3), 543–550.
- Hölker F., Dörner H., Schulze T., Haertel-Borer S.S., Peacor S.D., Mehner T.** (2007): Species-specific responses of planktivorous fish to the introduction of a new piscivore: implications for prey fitness. *Freshwater Biology* 52 (9), 1793–1806.
- Kwon J., Liljestran H.M., Katz L.E., Yamamoto H.** (2007): Partitioning thermodynamics of selected endocrine disruptors between water and synthetic membrane vesicles: Effects of membrane

compositions. *Environmental Science & Technology* 41 (11), 4011–4018.

Ort C., Siegrist H., Hosbach H., Studer C., Morf L., Scheringer M. (2007): Mikroverunreinigungen. Nationales Stoffflussmodell. *GWA Gas, Wasser, Abwasser* 87 (11), 853–859.

Hollender J., McArdell C.S., Escher B.I. (2007): Mikroverunreinigungen. Vorkommen in Gewässern der Schweiz. *GWA Gas, Wasser, Abwasser* 87 (11), 843–852.

Cirja M., Zuehlke S., Ivashechkin P., Hollender J., Schäffer A., Corvini P.F.X. (2007): Behavior of two differently radiolabelled 17β -ethinylestradiols continuously applied to a laboratory-scale membrane bioreactor with adapted industrial activated sludge. *Water Research* 41 (19), 4403–4412.

Lienert J., Larsen T.A. (2007): Soft paths in wastewater management – the pros and cons of urine source separation. *GWA* 16 (4), 280–288.

Zeidenitz C., Mosler H.J., Hunziker M. (2007): Outdoor recreation: From analysing motivations to furthering ecologically responsible behaviour. *Forest Snow and Landscape Research* 81 (1–2), 175–190.

Herlyn A., Maurer M. (2007): Status quo der Schweizer Abwasserentsorgung. Kosten, Zustand und Investitionsbedarf. *GWA Gas, Wasser, Abwasser* 87 (3), 171–176.

Herlyn A., Maurer M. (2007): Was ARA und Kanalisation kosten. *Umwelt Perspektiven* 2007 (1), 20–21.

Stamm C., Frey M., Reichert P. (2007): Managing critical source areas to reduce diffuse herbicide losses – prospects and limitations. A Swiss case study. *AFPP – Protection des eaux de surface contre les transferts diffuse de produits phytosanitaires*, Paris, France, November 15–16, 2007, 8 pp.

Baccini P., Baumgartner F., Lichtensteiger T., Michaeli M., Thalman E. (2007): Urbane Schweiz. In: *Anonymous Klimaänderung und die Schweiz 2050*. OcCC/ProClim, Bern, Schweiz, 123–136.

Siegrist H., Joss A. (2007): Mikroverunreinigungen. Technische Verfahren zur Elimination. *GWA Gas, Wasser, Abwasser* 87 (11), 861–867.

Siegrist H., Salzgeber D., Eugster J., Joss A. (2007): Anammox brings WWTP closer to energy autarky due to increased biogas production and reduced aeration energy for N-removal. 11th World Congress on Anaerobic Digestion (AD11), Brisbane, Australia, September 24–27, 2007, 7 pp.

Siegrist H., Joss A., Ternes T. (2007): Fate of micropollutants in drinking and wastewater treatment and consequences for process design. 4th Leading Edge Conference on Water and Wastewater Technologies, Singapore, 3–6 June, 2007, 8 pp.

Menon M., Robinson B., Oswald S.E., Kaestner A., Abbaspour K.C., Lehmann E., Schulin R. (2007): Visualization of root growth in heterogeneously contaminated soil using neutron radiography. *European Journal of Soil Science* 58 (3), 802–810.

Salzgeber D., Joss A., Siegrist H. (2007): Autotrophe Schlammwasserentstickung (Nitritation/Anammox). Im SBR-Verfahren (Sequencing batch reactor). *GWA Gas, Wasser, Abwasser* 87 (3), 205–209.

Herlyn A., Maurer M. (2007): Zustand und Investitionsbedarf der Schweizer Abwasserentsorgung. *Schweizer Gemeinde* 44 (11; Nr. 441), 14–17.

Winkel L., Alxneit I., Sturzenegger M. (2007): New paths for a SO_2 -free copper production. *Minerals Engineering* 20 (12), 1179–1183.

Deplazes G., Anselmetti F.S. (2007): Auf den Spuren des Flimsler Bergsturzes in Lag La Cauma und Lag Grond. *Geosciences ACTUEL* 2007 (3), 46–50.

Liu J., Williams J.R., Zehnder A.J.B., Yang H. (2007): GEPIC – modelling wheat yield and crop water productivity with high resolution on a global scale. *Agricultural Systems* 94 (2), 478–493.

Liu J., Wiberg D., Zehnder A.J.B., Yang H. (2007): Modeling the role of irrigation in winter wheat yield, crop water productivity, and production in China. *Irrigation Science* 26 (1), 21–33.

Liu J. (2007): Modelling global water and food relations – development and application of a GIS-based EPIC model. Dissertation 17 069, ETH-Zürich, Switzerland, 118 pp.

Liu J., Zehnder A.J.B., Yang H. (2007): Drops for crops: modelling crop water productivity on a global scale. Proceedings of the 10th International Conference on Environment Science and Technology, Kos island, Greece, September 5–7, 2007, A-835–A-842.

Robinson C.T., Hieber M., Wenzelides V., Lods-Crozet B. (2007): Macroinvertebrate assemblages of a high elevation stream/lake network with an emphasis on the Chironomidae. *Fundamental and Applied Limnology* 169 (1), 25–36.

Chèvre N., Loepfe C., Fenner K., Singer H., Escher B. (2007): Pesticides dans les eaux superficielles de Suisse. *GWA Gas, Wasser, Abwasser* 87 (7), 529–539.

Canonica S. (2007): Oxidation of aquatic organic contaminants induced by excited triplet states. *Chimia* 61 (10), 641–644.

Nozhevnikova A.N., Nekrasova V., Ammann A., Zehnder A.J.B., Wehrli B., Holliger C. (2007): Influence of temperature and high acetate concentrations on methanogenesis in lake sediment slurries. *FEMS Microbiology Ecology* 62 (3), 336–344.

Hoehn E. (2007): Überwachung der Auswirkung von Flussaufweitungen auf das Grundwasser mittels Radon. *Grundwasser* 12 (31), 66–72.

Hoehn E., Cirpka O., Hofer M., Zobrist J., Kipfer R., Baumann M., Scholtis A., Favero R. (2007): Untersuchungsmethoden der Flussinfiltration. *GWA Gas, Wasser, Abwasser* 87 (7), 497–505.

Markard J. (2007): E-Track: Entwicklung eines Standards. Wie sich Eigenschaften der Stromerzeugung in Europa verfolgen und bilanzieren lassen. *Bulletin SEV/VSE* Jg. 98 (16), 28–31.

Moser R., McArdell C.S., Weissbrodt D. (2007): Mikroverunreinigungen. Vorbehandlung von Spitalabwasser. *GWA Gas, Wasser, Abwasser* 87 (11), 869–875.

Reichert P., Borsuk M.E., Hostmann M., Schweizer S., Spörri C., Tockner K., Truffer B. (2007): Concepts of decision support for river rehabilitation. *Environmental Modelling & Software* 22 (2), 188–201.

Heimerl S., Kohler B., Ruef A., Markard J., Schneider M.F.K., Wieprecht S. (2007): Machbarkeitsstudie für Grün-Strom-Zertifizierung aus Wasserkraft für Deutschland abgeschlossen. *Wasserwirtschaft* 97 (5), 39–40.

Flichakova N., Bader H.P., Scheidegger R., Robinson D., Scartezzini J.-L. (2007): Urban district energy futures: A dynamic material flow analysis (MFA) model. Proceedings of Renewables in a changing Climate Innovation in the built environment CISBAT, Lausanne, Switzerland, September 4–5, 585–590.

Bader H.P., Scheidegger R., Real M. (2007): Photovoltaic energy on a global scale: Dynamic modelling of implementation and costs. Proceedings of Renewables in a changing Climate Innovation in the built environment CISBAT, Lausanne, Switzerland, September 4–5, 541–546.

Seyler C., Oetjen L., Bader H.P., Scheidegger R., Kytzia S. (2007): Potentials for mineral construction wastes as secondary resources in Switzerland – case study on concrete wastes. Congress Proceedings of the R'07 World Congress on Recovery of Material and Energy for Resource Efficiency, Davos, Switzerland, September 3–5, 6 pp.

Buser A., Morf L., Taverna R., Bader H.P., Scheidegger R. (2007): Temporal behaviour of the anthropogenic metabolism of selected brominated flame retardants: Emissions to the environment. 4th International Workshop on Brominated Flame Retardants, Amsterdam, The Netherlands, April 24–27, 4 pp.

Kwonpongagoon S., Scheidegger R., Bader H.P. (2007): Modeling the cadmium flows in Australia. Proceedings of the 2nd International Conference on Asian Simulation and Modelling (ASIMMOD) Chian Mai, Thailand, January 9–11, 364–370.

- Bader H.P., Scheidegger R., Gujer W., Huang D.** (2007): Modellierungsunterstützte Suche nach neuen Lösungen für das Abwassermanagement in Kunming (China). Simulation in Umwelt- und Geowissenschaften, Workshop, Berlin, Deutschland, 22.–23. März, 61–70.
- Huang D., Bader H.P., Scheidegger R., Schertenleib R., Gujer W.** (2007): Confronting limitations: New solutions required for urban water management in Kunming City. *Journal of Environmental Management* 84 (1), 49–61.
- Bluemling B., Yang H., Pahl-Wostl C.** (2007): Making water productivity operational – A concept of agricultural water productivity exemplified at a wheat-maize cropping pattern in the North China plain. *Agricultural Water Management* 91 (1–3), 11–23.
- Gabriel F.L.P., Cyris M., Giger W., Kohler H.P.E.** (2007): ipso-Substitution: A General Biochemical and Biodegradation Mechanism to Cleave α -Quaternary Alkylphenols and Bisphenol A. *Chemistry & Biodiversity* 4 (9), 2123–2137.
- Borer P.M., Hug S.J., Sulzberger B., Kraemer S.M., Kretzschmar R.** (2007): Photolysis of citrate on the surface of lepidocrocite: An *in situ* attenuated total reflection infrared spectroscopy study. *Journal of Physical Chemistry C* 111 (28), 10560–10569.
- Roberts L.C., Hug S.J., Dittmar J., Voegelin A., Saha G.C., Ali M.A., Badruzzaman A.B.M., Kretzschmar R.** (2007): Spatial distribution and temporal variability of arsenic in irrigated rice fields in Bangladesh. 1. Irrigation water. *Environmental Science & Technology* 41 (17), 5960–5966.
- Dittmar J., Voegelin A., Roberts L.C., Hug S.J., Saha G.C., Ali M.A., Badruzzaman A.B.M., Kretzschmar R.** (2007): Spatial distribution and temporal variability of arsenic in irrigated rice fields in Bangladesh. 2. Paddy soil. *Environmental Science & Technology* 41 (17), 5967–5972.
- Katsoyiannis I.A., Hug S.J., Ammann A., Zikoudi A., Hatziliontos C.** (2007): Arsenic speciation and uranium concentrations in drinking water supply wells in Northern Greece: Correlations with redox indicative parameters and implications for ground-water treatment. *Science of the Total Environment* 383 (1–3), 128–140.
- Miniaci C., Bunge M., Duc L., Edwards I., Bürgmann H., Zeyer J.** (2007): Effects of pioneering plants on microbial structures and functions in a glacier forefield. *Biology and Fertility of Soils* 44 (2), 289–297.
- Neretin L.N., Abed R.M.M., Schippers A., Schubert C.J., Kohls K., Kuypers M.M.M.** (2007): Inorganic carbon fixation by sulfate-reducing bacteria in the Black Sea water column. *Environmental Microbiology* 9 (12), 3019–3024.
- Störmer E., Wegelin C., Truffer B.** (2007): Lokale Systeme unter globalen Einflüssen langfristig planen. «Regional Infrastructure Foresight» als Ansatz zum Umgang mit Unsicherheiten bei Abwasserinfrastruktursystemen. In: Bora A., S.Bröchler, M. Decker (Eds.) *Technology Assessment in der Weltgesellschaft*. Edition Sigma, Berlin, Deutschland, 123–132.
- Bontes B.M., Verschoor A.M., Pires L.M.D., van Donk E., Ibelings B.W.** (2007): Functional response of *Anodonta anatina* feeding on a green alga and four strains of cyanobacteria, differing in shape, size and toxicity. *Hydrobiologia* 584, 191–204.
- Störmer E.** (2007): Strategieplanung für Abwasserentsorgung. *Umwelt Perspektiven* 2007 (5), 12–16.
- Schubert U., Störmer E.** (Eds.) (2007): Sustainable development in Europe. Concepts, evaluation and application. In: Martinuzzi A., P. Hardi (Eds.) *Evaluating sustainable development*. Edward Elgar Publishing, Cheltenham UK and Northampton (MA) USA, 368 pp.
- Muscheler R., Joos F., Beer J., Müller S.A., Vonmoos M., Snowball I.** (2007): Reply to the comment by Bard et al. on «Solar activity during the last 1000 yr inferred from radionuclide records». *Quaternary Science Reviews* 26 (17–18), 2304–2308.
- Renn O., Dreyer M., Klinke A., Schweizer P.J.** (2007): Systemische Risiken: Charakterisierung, Management und Integration in eine aktive Nachhaltigkeitspolitik. In: Anonymous *Soziale Nachhaltigkeit*, Metropolis, Marburg, 161–191.
- Heck T., Frank M., Anselmetti F.S., Kubick P.W.** (2007): Origin and age of submarine ferromanganese hardgrounds from the Marion Plateau, offshore northeast Australia. *Proceedings of the Ocean Drilling Program, Scientific Results* 194, Manuscript number 194SR-008 (22 pp.).
- Cheshenko K., Pakdel F., Segner H., Kah O., Eggen R.I.L.** (2008): Interference of endocrine disrupting chemicals with aromatase CYP19 expression or activity, and consequences for reproduction of teleost fish. *General and Comparative Endocrinology* 155 (1), 31–62.
- Bezault E., Clota F., Derivaz M., Chevassus B., Baroiller J.F.** (2007): Sex determination and temperature-induced sex differentiation in three natural populations of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) adapted to extreme temperature conditions. *Aquaculture* 272 (Supplement 1, Genetics in Aquaculture IX), S3–S16.
- Larned S., Datry T., Robinson C.T.** (2007): Invertebrate and microbial responses to inundation in an ephemeral river reach in New Zealand: effects of preceding dry periods. *Aquatic Sciences*, 14 pp.
- Ohlendorf C., Sturm M.** (2007): A modified method for biogenic silica determination. *Journal of Paleolimnology* 39 (1), 137–142.
- von Gunten L., Heiri O., Bigler C., van Leeuwen J., Casty C., Lotter A.F., Sturm M.** (2007): Seasonal temperatures for the past ~ 400 years reconstructed from diatom and chironomid assemblages in a high-altitude lake (Lej da la Tscheppa, Switzerland). *Journal of Paleolimnology Online First*, 17 pp.
- Blass A., Grosjean M., Livingstone D.M., Sturm M.** (2007): Signature of explosive volcanic eruptions in the sediments of a high-altitude Swiss lake. *Journal of Paleolimnology* 39 (1), 35–42.
- Wedekind C., Evanno G., Urbach D., Jacob A., Müller R.** (2007): «Good-genes» and «compatible-genes» effects in an Alpine whitefish and the information content of breeding tubercles over the course of the spawning season. *Genetica* 132 (2), 199–208.
- Kallivretaki E., Eggen R.I.L., Neuhaus S.C.F., Kah O., Segner H.** (2007): The zebrafish, brain-specific, aromatase *cyp19a2* is neither expressed nor distributed in a sexually dimorphic manner during sexual differentiation. *Developmental Dynamics* 236, 3155–3166.
- Matzinger A., Pieters R., Ashley K.I., Lawrence G.A., Wüest A.** (2007): Effects of impoundment on nutrient availability and productivity in lakes. *Limnology and Oceanography* 52 (6), 2629–2640.
- Kwon J.H., Lee H.K., Kwon J.W., Kim K., Park E., Kang M., Kim Y.H.** (2007): Mutagenic activity of river water from a river near textile industrial complex in Korea. *Environmental Monitoring and Assessment*.
- Witte F., Wanink J.H., Kische-Machumu M., Mkumbo O.C., Goudswaard P.C., Seehausen O.** (2007): Differential decline and recovery of haplochromine trophic groups in the Mwanza Gulf of Lake Victoria. *Aquatic Ecosystem Health & Management* 10 (4), 416–433.
- Seehausen O., Takimoto G., Roy D., Jokela J.** (2008): Speciation reversal and biodiversity dynamics with hybridization in changing environments. *Molecular Ecology* 17 (1), 30–44.
- Jacob A., Nusslé S., Britschgi A., Evanno G., Müller R., Wedekind C.** (2007): Male dominance linked to size and age, but not to «good genes» in brown trout (*Salmo trutta*). *BMC Evolutionary Biology* 7, Article number 207.
- Acuña V., Dahm C.N.** (2007): Impact of monsoonal rains on spatial scaling patterns in water chemistry of a semiarid river network. *Journal of Geophysical Research* 112, Paper number G04009 (11 pp.).
- van der Sluijs I., van Alphen J.J.M., Seehausen O.** (2007): Preference polymorphism for coloration but no speciation in a population of Lake Victoria cichlids. *Behavioral Ecology Advance Access published online*, 7 pp.

- Robinson C.T., Matthaei S.** (2007): Hydrological heterogeneity of an alpine stream-lake network in Switzerland. *Hydrological Processes* 21 (23), 3146–3154.
- Helle S., Helama S., Jokela J.** (2007): Temperature-related birth sex ratio bias in historical Sami: warm years bring more sons. *Biology Letters* First cite early online publishing, 3 pp.
- Pettay J.E., Helle S., Jokela J., Lummaa V.** (2007): Natural Selection on Female Life-History Traits in Relation to Socio-Economic Class in Pre-Industrial Human Populations. *PLoS ONE* 2 (7), e606 (9 pp.).
- Yang H., Zehnder A.J.B.** (2007): «Virtual water»: An unfolding concept in integrated water resources management. *Water Resources Research* 43, Article number W12301 (10 pp.).
- Finger D., Schmid M., Wüest A.** (2007): Comparing effects of oligotrophication and upstream hydropower dams on plankton and productivity in perialpine lakes. *Water Resources Research* 43, Article number W12404 (27 pp.).
- Lienert J., Larsen T.A.** (2007): Pilot projects in bathrooms: a new challenge for wastewater professionals. *Water Practice & Technology* 2 (3).
- Dijkstra P.D., Seehausen O., Groothuis T.G.G.** (2007): Intrasexual competition among females and the stabilization of a conspicuous colour polymorphism in a Lake Victoria cichlid fish. *Proceedings of the Royal Society B FirstCite e-Publishing*, 8 pp.
- Burkhardt M., Rossi L., Boller M.** (2008): Diffuse release of environmental hazards by railways. *Desalination* 226, 106–113.
- Kwonpongsagoon S., Bader H.P., Scheidegger R.** (2007): Modelling cadmium flows in Australia on the basis of a substance flow analysis. *Clean Technologies and Environmental Policy* 9 (4), 313–323.
- Liu J., Zehnder A.J.B., Yang H.** (2007): Historical trends in China's virtual water trade. *Water International* 32 (1), 78–90.
- Liu J., Yang H., Zehnder A.J.B.** (2007): Simulation of crop water relations on large scales with high spatial resolutions. *TIAS-GWSP workshop «Global Environmental Assessments: Bridging Scales and Linking to Policy»*, Issues in global water system research, No. 2, Adelphi, Maryland, USA, May 10–11, 2007, 44–48.
- Forster D., Bühler Y., Kellenberger T.W.** (2007): Object-oriented land cover/land use classification for upscaling agricultural nutrient budgets. In: Bill R. (Ed.) *GIS – Theory and Applications*, Textbook for the DAAD Summer School, Internal Report, Volume 16, Rostock University, Rostock, Germany, 177–188.
- Kracht O., Gresch M., Gujer W.** (2007): A stable isotope approach for the quantification of sewer infiltration. *Environmental Science and Technology* 41 (16), 5839–5845.
- Rieckermann J., Bares V., Kracht O., Braun D., Gujer W.** (2007): Estimating sewer leakage from continuous tracer experiments. *Water Research* 41 (9), 1960–1972.
- Huang D.B., Scholz R.W., Gujer W., Chitwood D.E., Loukopoulos P., Schertenleib R., Siegrist H.** (2007): Discrete event simulation for exploring strategies: An urban water management case. *Environmental Science and Technology* 41 (3), 915–921.
- Störmer E.** (2008): Greening as strategic development in industrial change – Why companies participate in eco-networks. *Geoforum* 39, 32–47.
- Tellenbach C., Wolinska J., Spaak P.** (2007): Epidemiology of a *Daphnia* brood parasite and its implications on host life-history traits. *Oecologia* 154 (2), 369–375.
- Truffer B., Markard J., Wüstenhagen R.** (2007): Eco-labeling of electricity – strategies and trade-offs in the definition of environmental standards. In: Teisl, M. (Ed.) *Labelling strategies in environmental policy*. Ashgate Publishing Limited, Hampshire, England, 353–365.
- Vermeirssen E.L.M., Asmin J., Escher B.I., Kwon J.H., Steimen I., Hollender J.** (2008): The role of hydrodynamics, matrix and sampling duration in passive sampling of polar compounds with Empore™ SDB-RPS disks. *Journal of Environmental Monitoring* 10 (1), 119–128.
- Boller M., Langbein S., Steiner M.** (2007): Characterization of road runoff and innovative treatment technologies. In: Morrison G.M., P. Rauch S. (Eds.) *Highway and urban environment – Proceedings of the 8th Highway and Urban Environment Symposium*, Springer, 441–452.
- Steiner M., Langbein S., Boller M.** (2007): Development and full-scale implementation of a new treatment scheme for road runoff. In: Morrison G.M., S. Rauch (Eds.) *Highway and Urban Environment – Proceedings of the 8th Highway and Urban Environment Symposium*, Springer, 453–463.
- Burkhardt M., Kasteel R., Vanderborght J., Vereecken H.** (2008): Field study on colloid transport using fluorescent microspheres. *European Journal of Soil Science* 59 (1), 82–93.
- Grünschloß L., Hanika J., Schwede R., Keller A.** (2007): (t, m, s)-Nets and maximized minimum distance. *Monte Carlo and Quasi-Monte Carlo Methods 2006*, Proceedings of the 7th International Conference on Monte Carlo and Quasi-Monte Carlo Methods in Scientific Computing, Ulm, Germany, August 14–18, 2006, 397–412.
- Neuenschwander S., Largiadèr C.R., Ray N., Currat M., Vonlanthen P., Excoffiere L.** (2008): Colonization history of the Swiss Rhine basin by the bullhead (*Cottus gobio*): Inference under a Bayesian spatially explicit framework. *Molecular Ecology*.
- Thevenon F., Anselmetti F.S.** (2007): Charcoal and fly-ash particles from Lake Lucerne sediments (Central Switzerland) characterized by image analysis: anthropologic, stratigraphic and environmental implications. *Quaternary Science Reviews* 26 (19–21), 2631–2643.
- Holzner C.P., McGinnis D.F., Schubert C.J., Kipfer R., Imboden D.M.** (2008): Noble gas anomalies related to high-intensity methane gas seeps in the Black Sea. *Earth and Planetary Science Letters* 265 (3–4), 396–409.
- Luo J., Cirpka O.A., Dentz M., Carrera J.** (2008): Temporal moments for transport with mass transfer described by an arbitrary memory function in heterogeneous media. *Water Resources Research* 44, Article number W01502 (7 pp.).
- Hollender J., Singer H., Mcardell C.S.** (2008): Polar organic micropollutants in the water cycle. Dangerous pollutants (xenobiotics) in urban water cycle. *Proceedings of the NATO Advanced Research Workshop on Dangerous Pollutants (Xenobiotics) in Urban Water Cycle*, Lednice, Czech Republic, May 3–6, 2007, 103–116.
- Tuominen I., Pollari M., von Wobeser E.A., Tyystjärvi E., Ibelings B.W., Matthijs H.C.P., Tyystjärvi T.** (2008): Sigma factor SigC is required for heat acclimation of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *FEBS Letters* 582 (2), 346–355.
- Hammes F., Berney M., Wang Y., Vital M., Köster O., Egli T.** (2008): Flow-cytometric total bacterial cell counts as a descriptive microbiological parameter for drinking water treatment processes. *Water Research* 42 (1–2), 269–277.
- Mieleitner J., Reichert P.** (2008): Modelling functional groups of phytoplankton in three lakes of different trophic state. *Ecological Modelling* 211 (3–4), 279–291.
- Aeppli C., Berg M., Hofstetter T.B., Kipfer R., Schwarzenbach R.P.** (2008): Simultaneous quantification of polar and non-polar volatile organic compounds in water samples by direct aqueous injection-gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1181 (1–2), 116–124.
- Tobias R., Mosler H.J.** (2007): Einsatz der Computersimulation in der Umweltpsychologie. *Umweltpsychologie* 11 (2), 22–37.
- Steinhilber F., Abreu J.A., Beer J.** (2008): Solar modulation during the Holocene. *Astrophysics and Space Sciences* 1 (4), 1–6.
- Lively C.M., Delph L.F., Dybdahl M.F., Jokela J.** (2008): Experimental test for a co-evolutionary hotspot in a host–parasite interaction. *Evolutionary Ecology Research* 10, 95–103.

Eawag-Spin-off: Sinnvoller Umgang mit Oberflächenabflüssen

Ein wenig Angst vor der eigenen Courage hatte er schon. Würde er sich im Haifischbecken der Unternehmerwelt behaupten können? Vor zwei Jahren gründete Michele Steiner die Firma wst21 – Wasser, Strategie und Technologie im 21. Jahrhundert.

Einfach aus dem schützenden Rahmen der Eawag-Forschung herauszugehen, war für den ETH-Umweltingenieur Michele Steiner kein einfacher Schritt. Bestärkt durch seinen Betreuer an der Eawag, Prof. Markus Boller, wagte er Ende 2005 mit seiner Firma wst21 dennoch den Weg in die Praxis. Zwar galt es, viel Neues und Ungewohntes zu lernen: angefangen beim Marketing und Corporate Design über die Wahl der Firmenform, den Handelsregistereintrag und den Abschluss notwendiger Versicherungen bis hin zu Auftragsakquisition und Vertragswesen. Doch mit einem soliden Wissen aus Studium und Forschung im Rucksack freute sich Michele Steiner auf die neue Herausforderung.

wst21 – Wasser, Strategie und Technologie im 21. Jahrhundert. Die Leitidee

von wst21 ist, die Entwicklung von Technologien und Strategien in der Siedlungswasserwirtschaft miteinander zu verknüpfen. Dabei geht es neben Dach- und Fassadenwasser hauptsächlich um Strassenabwasser. Zurzeit führt wst21 beispielsweise das Monitoring der Behandlungsanlage für Strassenabwasser (SABA) in Attinghausen durch. Darin wird das Abwasser eines ca. 2 km langen Abschnitts der Gotthardautobahn gefasst und gereinigt. Einerseits wird überprüft, ob die SABA optimal eingestellt und dimensioniert ist, damit bei künftigen typengleichen Anlagen Kosten gespart werden können. Andererseits kontrolliert wst21 das Betriebs- und das Entsorgungs-

konzept und bietet Antworten auf Fragen wie: Wann müssen die Sand- und Adsorbierschichten regeneriert bzw. entsorgt werden? Wie häufig müssen die Leitungen gereinigt und der Schlamm abgepumpt werden? Auftraggeber von wst21 sind neben der öffentlichen Hand auf Gemeinde-, Kantons- und Bundesebene auch Ingenieurbüros, Planer und Privatpersonen.

Erfolgreich auf eigenen Beinen. Vor der Gründung von wst21 stand die Eawag dem angehenden Unternehmer mit fachlichem und administrativem Rat zur Seite. Darüber hinaus konnte die junge Firma zwei Jahre lang Büroräumlichkeiten und Infrastruktur der Eawag zu moderaten Preisen nutzen. Vorteile, die Michele Steiner sehr geschätzt hat, und auch zukünftig will er den Kontakt zur Eawag und zur Forschung

Die eigenen Fähigkeiten kennen und von anderen lernen sind die Grundlagen für erfolgreiches Zusammenarbeiten.

Michele Steiner

beibehalten. Heute hat wst21 bereits 3 Mitarbeiter und ist seit Dezember 2007 im Technopark Zürich ansässig.

www.wst21.ch



Martina Bauchrowitz

SABA Attinghausen an der Gotthardautobahn: Basierend auf den hier gewonnenen Monitoringdaten erarbeitet wst21 die Dimensionierungsgrundlagen für zukünftige Anlagen.



Ein reicher Erfahrungsschatz



1997 kam Michele Steiner an die Eawag. In seiner ersten Arbeit, einer Literaturstudie, wurden potenzielle Adsorbentien zur Entfernung von Schwermetallen wie Kupfer und Zink aus Dach- und Fassadenwasser evaluiert. Thema der anschliessenden Dissertation war, die Effizienz und Praxistauglichkeit dieser Materialien experimentell zu testen. Ein Filtersystem aus granuliertem Eisenhydroxid gemischt mit Kalksand stellte sich als besonders geeignet heraus und wurde seitdem bereits mehrfach erfolgreich angewendet, z. B. beim Neubau des mit einer Kupferfassade verkleideten Bundesamts für Metrologie und Akkreditierung in Wabern (BE). Zudem beschäftigte sich Michele Steiner in einem Postdoc-Projekt mit der Behandlung von verschmutztem Wasser, das von Autobahnen und stark befahrenen Strassen abfließt. Es ging einerseits darum, technische Verfahren zu entwickeln, die trotz geringem Platzbedarf eine hohe Reinigungsleistung erbringen, und andererseits Monitoringkonzepte zu erstellen, um die Leistung der neuartigen Anlagen beurteilen zu können.

Neues Zentrum für angewandte Ökotoxikologie

Die Risiken von Chemikalien sollen in der Schweiz besser erforscht werden – zu diesem Ergebnis kommen Bundesrat und Parlament. Gemeinsam mit der EPFL baut die Eawag nun ein Zentrum für angewandte Ökotoxikologie auf.

(mb) In seinem Bericht vom Mai 2007 über die unabhängige Toxikologie-Forschung in der Schweiz kommt der Bundesrat zum Schluss, dass die aktuellen universitären Ressourcen und Strukturen nicht genügen, um die Grundlagen zur Beurteilung chemikalienbedingter Gesundheits-, Umwelt- und Sicherheitsrisiken erarbeiten zu können. Dies insbesondere nachdem das von ETH Zürich und Uni Zürich gemeinsam betriebene Institut für Toxikologie in Schwerzenbach im Juni 2001 geschlossen wurde. Mit dem Ja des Parlaments im Oktober 2007 kann die Eawag nun gemeinsam mit der EPF Lausanne ein Zentrum für angewandte Ökotoxikologie aufbauen.

Nahe an Forschung, Lehre und Praxis.

Im Rahmen der Grundfinanzierung von jährlich 2 Millionen Franken bietet das Zentrum für Ökotoxikologie drei Grundleistungen:

► **Drehscheibenfunktion:** Das Zentrum verfolgt die nationale und internationale Entwicklung in der angewandten Ökotoxikologie und diskutiert aktuelle und zukünftige Probleme sowie Lösungsmöglichkeiten regelmässig mit Vertretern aus Praxis und Wissenschaft.

► **Forschung und Entwicklung:** Z. B. sollen Kosten und Zeit sparende Testmethoden zum Nachweis ökotoxischer Effekte, chemische Analysemethoden und benutzerfreundliche Modelle zur Modellierung von Schadstoffrisiken entwickelt werden.

► **Informationsplattform:** Das Zentrum publiziert wichtige Erkenntnisse in Fachzeitschriften und stellt darüber hinaus Informationen im Internet, in einem Newsletter, in Medienbeiträgen und in Form von Weiterbildungsveranstaltungen für

Fachleute und Studierende zur Verfügung. Daneben ist es im Sinne des Service Public Anlaufstelle für Fachauskünfte.

Sitz in Dübendorf und Lausanne. Unter Federführung von Prof. Rik Eggen, dem stellvertretenden Direktor der Eawag, konzipierte und begleitete eine nationale

Taskforce den Aufbau des Ökotoxikologiezentrums. Die neue Institution ist an der Eawag in Dübendorf (ca. 6 Mitarbeitende) und an der EPF Lausanne (ca. 3 Mitarbeitende) angesiedelt. Während sich die Forschung in Dübendorf schwerpunktmässig um Fragen zur aquatischen Ökotoxikologie dreht, fokussiert man in Lausanne auf die terrestrische Ökotoxikologie. Das Zentrum für Ökotoxikologie betreibt auch Auftragsforschung, wird aber die Privatwirtschaft nicht konkurrenzieren, sondern dort Dienstleistungen anbieten, wo eine neutrale Expertise oder spezifische Kompetenzen sonst nicht verfügbar sind. ○ ○ ○

Martina Bauchrowitz

Drei Fragen an die neue Leiterin des Ökotoxikologiezentrums



Das neue Zentrum für angewandte Ökotoxikologie wird von der Biologin **Almut Gerhardt** geleitet. Sie tritt ihre Aufgabe am 1. Juni 2008 an. Neben einer akademischen Laufbahn in aquatischer Ökotoxikologie hat Almut Gerhardt ihr eigenes Unternehmen LimCo International gegründet und geführt.

Was reizt Sie an der neuen Stelle?

Wenn man etwas Neues aufbauen kann, hat dies eine Pionierdimension, die mir liegt. Zudem reizt mich die Aufgabe, angewandte ökotoxikologische Forschung zu betreiben und dabei konkrete Produkte zu entwickeln wie z. B. sensitive Tests zur Chemikalienbewertung und zur Anwendung im ökotoxikologischen Gewässermonitoring. Und «last but not least» können wir hier das praxisorientierte Wissen an Studierende und Anwender weitergeben und so die Weichen für die Zukunft stellen.

Was kann das neue Zentrum im Gegensatz zu Hochschulen und Privatwirtschaft leisten?

Durch die Verwurzelung im ETH-Bereich ist das Zentrum stets am Puls der Forschung. Es kann fundierte Ergebnisse direkt aufgreifen und darauf aufbauend praxistaugliche Produkte entwickeln. Ich denke da an Toxizitätstests, Software zur Risikobewertung oder Bildungsmaterialien. Hochschulen dagegen sind eher in der Grundlagenforschung aktiv und Privatunternehmen entwickeln Produkte nur marktorientiert. Das neue unabhängige Zentrum hat da einfach mehr Freiheiten.

Welche Forschungsprojekte wollen Sie so schnell wie möglich starten?

Einerseits sollen bestehende Projekte, bei denen es um die effektorientierte Bewertung von Schadstoffen geht, fortgeführt und erweitert werden. Andererseits wollen wir neue multidisziplinäre Projekte starten. Ein konkretes Beispiel ist die Entwicklung einer so genannten multimetrischen Sensorplattform als Frühwarnsystem zur routinemässigen Gewässerüberwachung. Damit soll es möglich werden, biologische, chemische und physikalische Parameter gleichzeitig zu messen und diese mit ökologischen Parametern zu verknüpfen.

In Kürze

12. September 2008: Eawag-Infotag

Vom Gewässer ins Glas – gutes Trinkwasser für heute und morgen



Menge und Güte des Trinkwassers sind abhängig von den Wasserressourcen, aus denen es gewonnen wird. Beim diesjährigen Infotag wird diese Wechselbeziehung von verschiedenen Seiten her beleuchtet. Es geht um Fragen wie: Welche Bedeutung haben Fließgewässer für den Grundwasserschutz? Hat der Klimawandel einen Einfluss auf die Wasserressourcen? Und wie kann das Risiko geogener Verunreinigungen auf globaler Ebene abgeschätzt werden? Ausserdem fasst die Tagung die wichtigsten Resultate des Eawag-Querprojekts Wave21 (Wasserversorgung im 21. Jahrhundert) zusammen. Neben neuen Methoden zur Beurteilung der Trinkwasserhygiene und

zur Entfernung organischer Spurenstoffe werden auch moderne Konzepte der Trinkwasseraufbereitung vorgestellt.

Weitere Information: infotag@eawag.ch

Unterwegs auf dem Jangtse

Erstmals hat Chinas Regierung einem Team ausländischer Wissenschaftler erlaubt, gemeinsam mit chinesischen Kollegen die Wasserqualität des Jangtse zu untersuchen. Mit dabei waren auch Beat Müller und Michael Berg von der Eawag. Hunderte von Wasser- und Sedimentproben wurden genommen und die Resultate sind erstaunlich: Obwohl die Schadstofffrachten teils enorm sind, bleiben die Konzentrationen in «Chinas Hauptschlagader» zumeist in einem Bereich, wie er weltweit auch von anderen grossen Flüssen bekannt ist. Im Rahmen der gleichen Expedition suchten die Wissenschaftler zudem nach den letzten Exemplaren des Weissen Jangtse-Delfins. Doch leider ohne Erfolg. Wahrscheinlich ist der auch als Baiji bekannte Flussdelfin bereits ausgestorben. www.eawag.ch/jangtse



Neuer Aufbaustudiengang

«Integrated Water Resource Management»

Den Anteil der Menschen ohne Zugang zu sicherem Trinkwasser bis zum Jahr 2015 auf die Hälfte reduzieren, ist ein wichtiges Millennium-Entwicklungsziel der UN. Um dieses Ziel zu erreichen, braucht es weltweit Experten mit ganzheitlichen Lösungsansätzen für Wasserprobleme und die Verringerung der Armut. Aus diesem Grund bietet die Berner Fachhochschule Architektur, Holz und Bau seit 2007 gemeinsam mit verschiedenen anderen Hochschulen, Bundesinstitutionen, NGOs, sowie der Eawag einen Aufbaustudiengang im «Integrated Water Resource Management».

Weitere Informationen: www.ahb.bfh.ch/ahb/en/Weiterbildung/ndk

Agenda

Peak-Kurse

14.–16. Mai, Eawag Dübendorf

Household centred concepts and technologies for water and environmental sanitation in developing countries

7. Oktober 2008, Eawag Dübendorf

Der Einsatz von umweltspsychologischen Massnahmen für Verhaltensänderungen im Umweltbereich

29./30. Oktober 2008, Eawag Dübendorf

Wo ist Heizen und Kühlen mit Abwasser möglich, wo sinnvoll?

11./12. November, Eawag Dübendorf

Ökotoxikologie-Kurs: Coetox Basis-Modul

Eawag-Seminar

Eawag Dübendorf,
jeweils freitags von 11–12 Uhr

9. Mai

Climatic change and its impacts on the alpine environment

Martin Beniston, University of Geneva

16. Mai

Water Agenda 21: Actor platform for promoting sustainable water management in Switzerland

Bernhard Truffer und Ueli Bundi,
Eawag Dübendorf

23. Mai

The integrated Urban water cycle (IUWC): The role of natural systems in managing a semi-closed cycle

Gary Amy, UNESCO-IHE Institute for Water Education, Delft

Tagungen

15. Mai, Bern

1. Fachtagung ChloroNet: Sanierung von Altlasten mit chlorierten Lösungsmitteln

1.–4. Juni, ETH Zürich

5th IWA Leading-Edge Conference on «Water & wastewater technologies»

info unter: www.eawag.ch/veranstaltungen