

Wirkungen endokrin wirksamer Substanzen auf aquatische Tiere

Effects of endocrine disruptors on aquatic animals

Werner Kloas^{1,2*}, Gregor Levy¹, Robert Opitz¹, Christian Bögi¹, Sven Würtz¹, Jörg Oehlmann³, Ulrike Schulte-Oehlmann³, Christoph van Ballegoy¹, Ralph Urbatzka¹, Oana Jagnytsch¹ und Ilka Luiz¹

¹Abteilung Binnenfischerei, Leibniz-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei im Forschungsvverbund Berlin e. V., Müggelseedamm 310, 12587 Berlin

²Abteilung Endokrinologie, Institut für Biologie, Humboldt Universität zu Berlin

³Abteilung Ökologie und Evolution – Ökotoxikologie, Johann-Wolfgang Goethe Universität Frankfurt

Zusammenfassung

Das Vorkommen endokrin wirksamer Substanzen, die als „endocrine disruptors“ bezeichnet werden, in Oberflächengewässern und deren Wirkungen auf aquatische Tiere stellt ein besonders aktuelles Problem innerhalb der Ökotoxikologie dar. Bisher wurden hauptsächlich Verweiblichungsphänomene durch Xenööstrogene beschrieben, obwohl die Wirkmechanismen auf das endokrine System vielfältiger sind. Neben der Reproduktionsbiologie von Wirbeltieren und bestimmten Wirbellosen wie den Weichtieren kann auch das nur bei Wirbeltieren vorhandene Schilddrüsensystem endokrin negativ beeinflusst werden. Für die Reproduktionsbiologie spielen hierbei neben (anti)östrogenen auch (anti)androgene Mechanismen eine Rolle, die anhand von verschiedenen Tiermodellen wie Fischen, Amphibien und Schnecken bestimmt werden können. Für das Schilddrüsensystem stellt die Amphibien-Metamorphose das sensitivste Modell dar, dessen Anwendung hier vorgestellt wird.

Stichworte: endocrine disruptors; Reproduktionsbiologie; Schilddrüsensystem; Fische, Amphibien, Weichtiere

Summary

Endocrine active compounds, the so-called endocrine disruptors, are present in surface waters and resemble a major problem in ecotoxicology. Mainly feminization phenom-

ena caused by xenoestrogens have been reported until yet despite the fact that the mutual modes of action on endocrine system do exist. Beside effects on reproductive biology of vertebrates and some invertebrates e. g. molluscs endocrine disruption arises also in thyroid system present exclusively in vertebrates. Concerning reproductive biology (anti)estrogenic as well as (anti)androgenic actions play important roles being determined by several models in fishes, amphibians, and molluscs. Metamorphosis of amphibians is the most sensitive model to assess endocrine disruption of the thyroid system being introduced herewith.

Keywords: endocrine disruptors; reproductive biology; thyroid system; fishes, amphibians, molluscs

1 Einführung

Besondere Aktualität in der Ökotoxikologie hat die anthropogene Belastung der Gewässer erlangt, da neben den bereits bekannten klassischen toxischen Wirkungen auf Flora und Fauna des aquatischen Ökosystems durch Kontaminationen mit Schwermetallen und organischen Chemikalien weitere bisher nicht beachtete Wirkmechanismen vor allem auf die Tierwelt gefunden wurden. Hierbei werden vor allem Substanzen diskutiert, die direkt oder indirekt das endokrine System beeinflussen, ohne eine relevante Toxizität aufzuweisen [Colborn et al., 1993; McLachlan und Arnold, 1996]. Als Stoffsenke für diese Substanzen dienen aufgrund ihrer großenteils anthropogenen Herkunft die Oberflächengewässer und so stellt sich die Frage, wie aquatische Organismen als Individuen oder sogar auf der Populationsebene durch solche endokrin wirksamen Stoffe, die auch als "endocrine disruptors" bezeichnet werden, geschädigt werden können. Die Definition des Begriffes endocrine disruptor (ED) beinhaltet, entsprechend der beim Weybridge Workshop von der Europäischen Kommission 1996 gefassten Vereinbarung, dass es sich hierbei um eine "exogene Substanz handelt, die als Folge der Veränderung der endokrinen Funktionen adverse Gesundheitseffekte in einem intakten Organismus oder seiner Nachkommenschaft verursacht." Diese Definition ist relativ weit gewählt, um auch alle Stoffe, die in irgendeiner Form durch Einflüsse auf die endokrinen Systeme der zahlreichen Tiergruppen negativ wirken bzw. wirken können, zu erfassen. Dennoch erscheint es notwendig diese Definition restriktiver zu gebrauchen, so

dass als ED nur solche Stoffe bezeichnet werden, die endokrin wirksam sind ohne gleichzeitig eine relevante Toxizität aufzuweisen.

Die meisten Untersuchungen, die sich mit den Wirkungen von ED befassen, wurden aufgrund der stark anthropozentrischen Sichtweise, mit der diese Thematik behandelt wird, mit Vertebraten und zwar vor allem mit Säugetieren und, als Vertreter der niederen Wirbeltiere, mit Fischen durchgeführt. Dies ist um so erstaunlicher als die Wirbeltiere nur einen Unterstamm der Chordata im Tierreich repräsentieren, endokrine Systeme aber schon ab den Coelenteraten auftreten und somit vor allem aquatische Tiergruppen beinhalten, die der Exposition mit ED aufgrund von Bioakkumulation und Biomagnifikation primär ausgesetzt sind. Gerade aber Invertebraten, die ca. 30 Tierstämme und insgesamt ungefähr 95% aller Tierarten repräsentieren, weisen aufgrund ihrer Mannigfaltigkeit eine große Diversität hinsichtlich ihrer Lebenszyklen wie z.B. Larvalstadien, Verpuppung, Metamorphose, Diapause etc. auf. Obwohl sie in der Ökologie als Schlüsselarten für die Struktur und Funktion von Ökosystemen von herausragender Bedeutung sind, fehlt dennoch oftmals das umfassende Grundlagenwissen zur Biologie und Physiologie vieler Invertebraten. Dies wird besonders daran ersichtlich, dass in der Vergleichenden Endokrinologie überwiegend bei kommerziell wichtigen Arten endokrinologische Grundlagenforschung betrieben wurde. Aufgrund der großen Diversität unter den Invertebraten steht zu erwarten, dass auch ihre endokrinen Systeme große Unterschiede aufweisen und es hierbei noch völlig unentdeckte endokrine Wirkungen von ED auf bis jetzt noch nicht berücksichtigte oder gar unbekannte endokrine Systeme von Invertebraten gibt. Im Folgenden soll eine gestraffte Übersicht gegeben werden, welche Wirkungen von ED auf aquatische Tiere festzustellen sind und wie diese exemplarisch an sensitiven Modellen getestet werden können, wobei schwerpunktmäßig die Amphibienmetamorphose als sensitives Nachweissystem für Wirkungen der ED auf das Schilddrüsensystem diskutiert wird.

2 Wirkungen endokrin wirksamer Substanzen

Die Wirkungen von ED erstrecken sich bisher hauptsächlich auf zwei endokrine Systeme, die Reproduktionsbiologie bei verschiedenen Tierstämmen sowie das Schilddrüsensystem der Vertebraten. Während in der Vergangenheit vor allem Verweiblichungsphänomene durch Substanzen, die ähnlich dem natürlich vorkommenden weiblichen

Sexualsteroid Östradiol bei Wirbeltieren und einigen Wirbellosen (Mollusken) wirken, beschrieben wurden, konzentrieren sich gegenwärtige Forschungen auf eine umfassende Bearbeitung der Wirkmechanismen, die die Reproduktionsbiologie bei den verschiedenen Tiergruppen haben können. ED können nicht nur durch Hormonrezeptoren vermittelt wie ein Hormon z.B. als Xenöstrogen oder als Antihormon sondern auch indirekt über die Synthese- und Degradations- bzw. Exkretionssysteme auf die Hormonspiegel wirken und so die hormonellen Regelkreise stören. Neben den östrogenen finden sich noch antiöstrogene, androgene (den männlichen Sexualsteroiden (Androgenen) entsprechende) und antiandrogene Effekte. Hierbei führen östrogene aber auch antiandrogene Stoffe zur Verweiblichung, androgene zur Vermännlichung und antiöstrogene zu einer Neutralisierung bei der Sexualdifferenzierung von Fischen und Amphibien [Opitz et al., 2002; Kloas, 2002] und auch bei Mollusken, die ebenfalls die Sexualsteroiden der Wirbeltiere haben, konnten androgene [Oehlmann et al., 1999] und östrogene Wirkungen [Oehlmann et al., 2000] gezeigt werden.

2.1 ED und Reproduktionsbiologie bei Wirbellosen

Gerade bei Vorderkiemerschnecken konnte bisher am eindeutigsten gezeigt werden, dass ED nicht nur prinzipiell adverse Effekte auf die Fortpflanzung haben, sondern auch eine tatsächliche populationsrelevante ökologische Bedrohung für bestimmte Arten darstellen. Tributylzinn (TBT)-Verbindungen, deren Einsatz als Biozide in „antifouling agents“ bei Bootsanstrichen wie in der Textilindustrie zu großen Einträgen in die Oberflächengewässer führte und die auch heute trotz Verbots immer noch in relevanten Konzentrationen auftreten, verursachten bei der marinen Schnecke *Nucella lapillus* Vermännlichungsphänomene, die schon bei niedrigen Umweltkonzentrationen von etwas mehr als 1 ng/L TBT auftraten [Bryan et al., 1986]. Im Gegensatz zu den meisten bekannten ED, die Wirkungen auf die Reproduktionsbiologie aufweisen, wirkt TBT nicht direkt über eine Interaktion mit den Rezeptoren der Sexualsteroiden. TBT greift indirekt in das endokrine System ein, indem es das Enzym Aromatase hemmt, das die Umwandlung von Androgenen in das Östrogen Estradiol katalysiert, so dass als Folge kein Östrogen gebildet wird und die Sexualsteroid-Synthese bei den Androgenen endet, was zu Vermännlichungs-Phänomenen führt. Besonders sensibel reagieren hierauf Vertreter der Vorderkiemerschnecken wie *Nucella lapillus*, bei denen weibliche Individuen vermännlichen und sogenannte Imposex-Stadien ausbilden, was bedeutet, dass sie mor-

phologisch einen *Vas deferens* (Samenleiter) ausbilden, wie er normalerweise nur bei Männchen vorkommt. Die Imposex-Ausprägungen werden entsprechend ihrer Intensität in 6 Stadien unterteilt, wobei ab Stadium 4 eine erhöhte Sterilität zu verzeichnen ist. Weibchen mit einem höheren Maskulinisierungsgrad im Stadium 5 oder 6 sind definitiv nicht mehr fortpflanzungsfähig. Biomonitoring-Studien in der Nord-Bretagne konnten eine eindeutige Korrelation zwischen TBT-Gehalten in Flußmündungen und Küstennähe mit der Ausprägung von Imposex-Phänomenen zeigen, was einhergeht mit der Feststellung, dass die am stärksten belasteten Gebiete nur noch sterile Weibchen aufwiesen und somit die Populationen äußerst bedroht sind. Vergleichbare Befunde konnten bei der Strandschnecke *Littorina littorea* in deutschen Küstengewässern ebenfalls nachgewiesen werden [Oehlmann et al., 1999].

Doch nicht nur Vermännlichung durch ED auch Verweiblichungs-Phänomene können mit Vorderkiemerschnecken am sensitivsten aufgezeigt werden. Die Umweltchemikalie Bisphenol A zeigt schon bei Konzentrationen von 1 µg/L östrogene Wirkungen, indem sie bei *Marisa cornuarietis* und *Nucella lapillus* sogenannte „Superweibchen“ induziert [Oehlmann et al., 2000]. Die betroffenen Individuen entwickeln zusätzliche weibliche Organe wie die Vagina, eine Vergrößerung der akzessorischen pallialen Sexualdrüsen, grobe Missbildungen der pallialen Eileiter, einhergehend mit erhöhter Mortalität, und einer massiven Stimulation der Oocyten- und Laich-Produktion. Hierbei konnte der bisher weitaus niedrigste biologische Wirkungswert mit einem LOEC von 48,3 ng BPA/L festgestellt werden [Schulte-Oehlmann et al., 2001].

2.2 ED und Reproduktionsbiologie bei Wirbeltieren

Im Gegensatz zur Reproduktionsbiologie von Wirbellosen ist die der Vertebraten in den einzelnen Klassen endokrinologisch recht gut aufgeklärt, wobei gerade im Rahmen der ED-Forschung klar wird, dass auch hier noch wesentliche Grundlagenforschung zum richtigen Verständnis der natürlichen Abläufe und erst recht deren Störungen notwendig ist. Da im aquatischen Bereich überwiegend mit Fischen als Modellen für ED und Reproduktion gearbeitet wurde und die Ergebnisse auch durch mehrere exzellente Reviews [z. Übersicht s. Kime, 1998] allgemein einen hohen Bekanntheitsgrad haben, soll hier anhand der Wirbeltierklasse der Amphibien mit *Xenopus laevis* ein Modellorganismus vorgestellt werden, der hinsichtlich der Reproduktionsbiologie eine große Sensitivität hinsichtlich des Endpunkts Sexualdifferenzierung aufweist [Kloas, 2002]. Wie die Se-

xualdifferenzierung unter Einschluß der vier prinzipiellen (anti)östrogenen und (anti)androgenen Wirkmechanismen vor allem aber natürlicherweise verläuft, ist durch eine neue Hypothese zur Sexualdifferenzierung jüngst beschrieben worden [Bögi et al., 2002]. Eine zusammenfassende Darstellung der Wirkungen von (Anti)östrogenen und (Anti)androgenen während der Larvalentwicklung auf die Sexualdifferenzierung von *Xenopus laevis* (siehe Abbildung 1) belegt, dass Östrogene (Östradiol, Ethinylöstradiol) ebenso wie Antiandrogene (Vinclozolin, p,p'-DDE, Cyproteron-Azetat) zur Verweiblichung mit einem erhöhten Anteil an Weibchen führen, während Antiöstrogene (Tamoxifen) keine Verschiebung des Geschlechterverhältnisses hervorrufen, dafür aber die Gonadenentwicklung stark beeinträchtigen, so dass keine normale Fertilität gegeben sein kann.

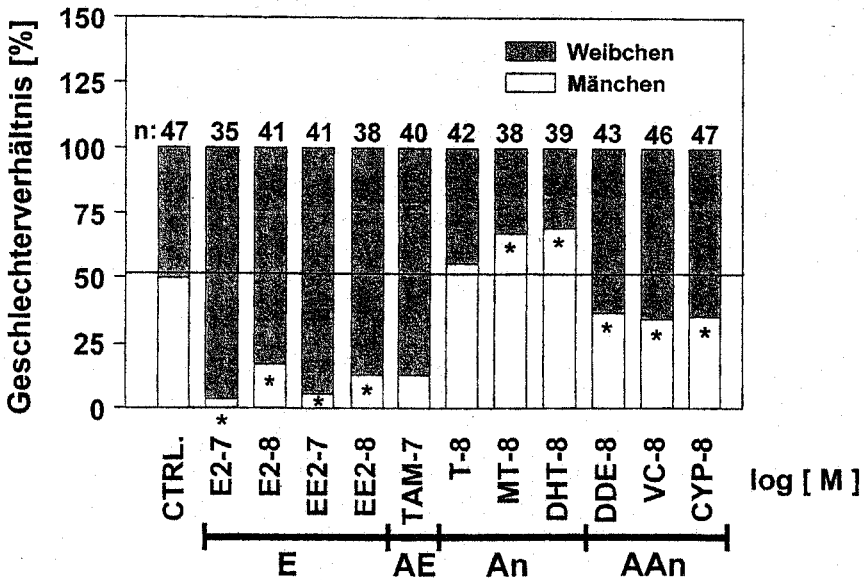


Abbildung 1: Sexualdifferenzierung durch endokrin wirksame Substanzen während der Larvalentwicklung von *Xenopus laevis*. Als Östrogene (E) sind 17 β -Östradiol (E2) und Ethinylöstradiol (EE2), als Antiöstrogen (AE) Tamoxifen (T), als Androgene (An) Testosteron (T), Methyltestosteron (MT) und Dihydrotestosteron (DHT) und als Antiandrogene (AAAn) p,p'-DDE (DDE), Vinclozolin (VC) und Cyproteron-Azetat (CYP) verwendet worden. Die nominal eingesetzten Konzentrationen sind als negativer dekadischer Logarithmus hinter den jeweiligen Abkürzungen eingetragen. Signifikante Unterschiede nach dem U-Test von Mann-Whitney sind mit * ($p < 0,05$) angegeben.

Androgene ergeben wie erwartet eine Vermännlichung mit Erhöhung des Anteils an männlichen Phänotypen, wobei interessanterweise nur das natürliche Androgen Dihydrotestosteron einen signifikanten Effekt hatte, während Testosteron nur tendenziell vermännlichte also weniger wirksam war. Das synthetische Androgen Methyltestosteron führte ebenfalls zu einer klaren Vermännlichung. Ergänzend zu dieser *in vivo* Methodik existieren bei *Xenopus laevis* auch noch die Möglichkeiten Wirkungen der ED auf verschiedenen Nachweisebenen mit Rezeptorbindungsstudien [Lutz & Kloas, 1999] und Induktion von endokrinen Biomarkern wie der Vitellogenin-mRNA in Primärzellkulturen nachzuweisen [Kloas et al., 1999], so dass Hinweise auf potentielle endokrine Beeinflussung der Reproduktion durch ED mit *in vitro*-Tests erhalten werden können.

2.3 ED und Schilddrüsensystem bei Wirbeltieren

Ein weiterer endokriner Regelkreis, der durch ED negativ beeinflusst werden kann, ist das Schilddrüsensystem der Wirbeltiere. Die Schilddrüse und die von ihr produzierten Hormone steuern allgemein den Stoffwechsel sind aber insbesondere für Entwicklungs- und Differenzierungsvorgänge von essentieller Bedeutung. Das in der Entwicklungsbiologie bei Vertebraten wohl komplizierteste Beispiel für Reorganisation und Differenzierung ist die Amphibien-Metamorphose, die innerhalb kurzer Zeit eine Vielzahl spezifisch gesteuerter Prozesse beinhaltet, die die Umwandlung vom aquatischen Larval- in das z. T. terrestrisch lebende Juvenil-Stadium bewirkt, wobei nicht nur morphologische sondern auch vielfältige physiologische Veränderungen einhergehen [z. Übersicht Shi, 2000]. Da die Schilddrüsenhormone für die komplexe Steuerung der Amphibien-Metamorphose die Hauptrolle spielen, stellen die Amphibien auch die sensitivsten Modellorganismen für ED mit Wirkungen auf das Schilddrüsensystem dar [Kloas, 2002]. Hierfür kommen vielfältige Wirkmechanismen in Betracht, die entweder zu einer Erhöhung oder zu einer Erniedrigung der Schilddrüsenhormone mit den entsprechenden Wirkungen, Beschleunigung bzw. Verlangsamung oder Stopp der Metamorphose, führen. Anders als bei den ED mit Wirkungen auf die Reproduktionsbiologie, die meist über Sexualsteroidrezeptoren vermittelt werden, greifen ED bei der Schilddrüse fast ausschließlich an den vielfältigen Mechanismen zur Schilddrüsenhormon-Synthese (Jod-Transporter, Peroxidase), deren Transportproteinen (Transthyretin, Thyroxin

bindendes Globulin), (de)aktivierenden Enzymen (Dejodasen) sowie Exkretionsenzymen in vielfältiger Weise an (siehe Abbildung 2).

Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse: Mögliche Beeinflussungen durch endocrine disruptors (ED)

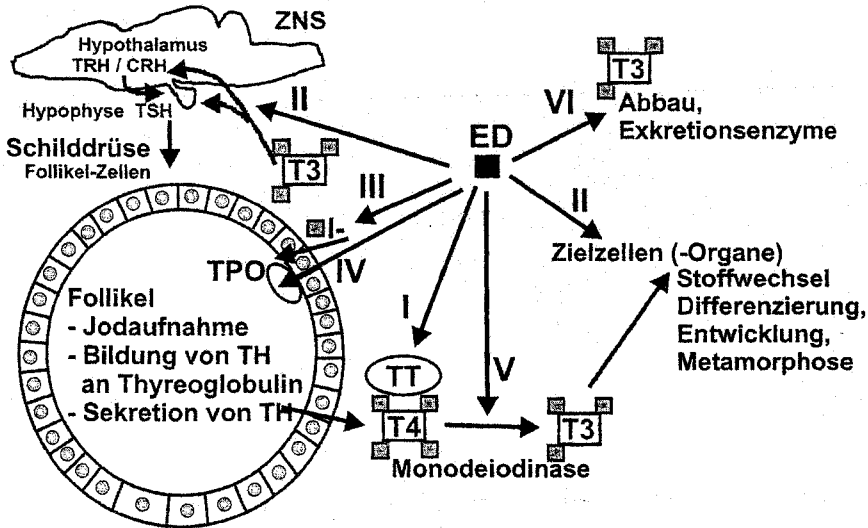


Abbildung 2: Potentielle Möglichkeiten der Beeinflussung des Schilddrüsen-systems durch ED. I. Interaktion mit Transportproteinen, II. Imitierung bzw. Blockierung von Schilddrüsenhormonen (TH: T3 und T4) am Rezeptor, III. Hemmung der Jodaufnahme in den Schilddrüsenfollikel, IV. Hemmung der Schilddrüsenperoxidase (TPO), V. Beeinflussung der Monodejodasen, VI. Effekte auf Degradations- und Exkretionsenzyme. Abkürzungen: CNS: Zentralnervensystem, TRH: Thyreotropin Releasing Hormon, CRH: Corticotropin Releasing Hormon, TSH: Thyreotropin, TH: Schilddrüsenhormone, TT: Transthyretin, T3: Trijodthyronin, T4: Tetrajodthyronin/Thyroxin.

All diese z. T. für verschiedene Entwicklungsperioden spezifischen Wirkmechanismen resultieren letztendlich in einer Änderung der zur Verfügung stehenden Schilddrüsenhormone, was sich auf den zeitlichen Ablauf der Metamorphose auswirkt und somit als einfach zu bestimmenden Endpunkt die Erfassung der Stadienentwicklung zulässt. Bisher sind nur negative Wirkungen von ED auf die Schilddrüsenhormon-Konzentrationen bekannt geworden, was auch bei Amphibien wie bei allen anderen Vertebraten zur Kropfbildung (Schilddrüsen-Hyperplasie) führt (siehe Abbildung 3).

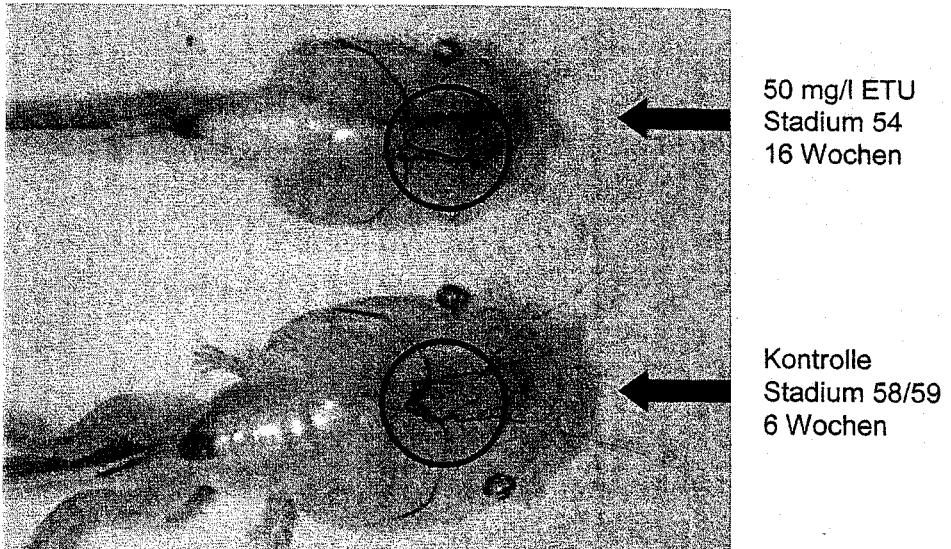


Abbildung 3: Effekte der Chemikalie Ethylthiouracil, einem häufigen Metaboliten von Pflanzenschutzmitteln, auf die Schilddrüse bzw. Metamorphose. Oben: Selbst nach 16 Wochen befindet sich die Kaulquappe noch im Stadium 54 (Beginn des Hinterbeinwachstums) und innerhalb des Kreises ist die stark vergrößerte Schilddrüse (Kropf, Hyperplasie) umrandet zu erkennen. Unten: Bei den Kontrolltieren sind schon nach 6 Wochen die Tiere im Stadium 58/59, wobei trotz größter Aktivität die Schilddrüse kaum zu erkennen ist.

Gegenwärtig bemühen sich hierfür mehrere Arbeitsgruppen einen validen und gut reproduzierbaren Bioassay zu erstellen, der zu einer Risikobewertung solcher Substanzen bzw. zu deren Identifizierung in der Umwelt herangezogen werden kann. Mit dem von uns im Rahmen eines Ringtests validierten XEMA (*Xenopus* metamorphosis assay) soll hier die Möglichkeit vorgestellt werden, wie Schilddrüsen beeinflussende Substanzen anhand eines einfachen Tests detektiert werden können [Opitz et al., 2002]. Die Abbildung 4 belegt, dass nach 28 Tagen Exposition beginnend mit prämetamorphen Tieren die Kontrollen bei ca. Stadium 59 liegen, während die positiven Kontrollen, stimuliert durch 1,3 nM T₄, im Schnitt ca. 2 Stadien signifikant weiter sind und die negativen Kontrollen (Propylthiouracil, PTU) nicht über Stadium 54 hinauskommen. Für weitergehende Entwicklungen über Stadium 54 ist die endogene Bildung von Schilddrüsenhormonen notwendig. Bei der Dosis-Wirkungsbeziehung der Hemmwirkung von Ethylthiouracil, einem häufig in der Umwelt vorkommenden Herbizid-Abbauprodukt, wird diese gut sichtbar. Konzentrationen von mehr als 10 mg/L hemmen signifikant die

Metamorphose, so dass ihre Hemmwirkung auf die Schilddrüsenhormon-Spiegel indirekt bewiesen werden kann.

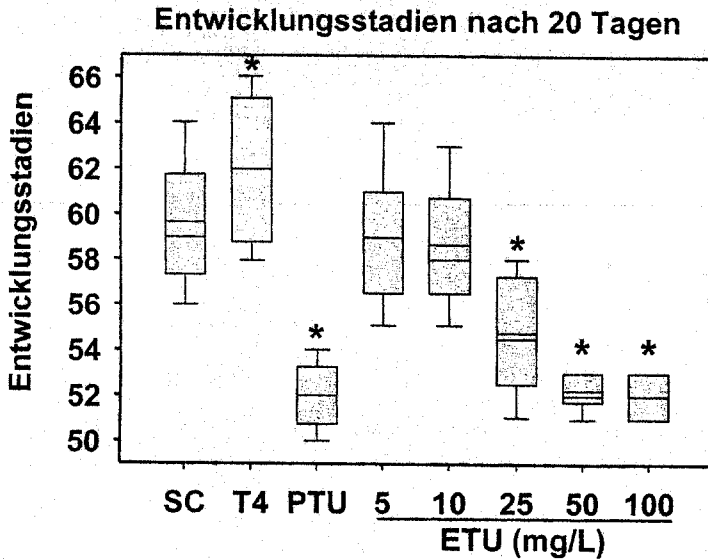


Abbildung 4: Dosis-Wirkungsbeziehung verschiedener Konzentrationen von Ethylthiouracil (ETU) auf die Metamorphose bei *Xenopus laevis* im Vergleich mit der Lösungsmittelkontrolle (SC) und der Positiv- (mit 1.3 nM T4 behandelt) bzw. Negativ- (mit 75 mg Propylthiouracil (PTU)/L behandelt) Kontrolle als Box-Plot-Darstellung. Signifikante Hemmung der ETU-Behandlung nach U-Test von Mann-Whitney sind mit * ($p < 0,05$) angegeben.

3 Perspektiven

Endokrin wirksame Substanzen sind vor allem in anthropogen belasteten Oberflächengewässern vorhanden, so dass sie als ED besonders aquatische Tiere bedrohen. Bei Wirbeltieren sind dies vor allem Fische und Amphibien sowie deren Raptoren, die am Ende der Nahrungskette stehen. Hierbei zeichnet sich ab, dass besonders die aufgeführten Wirkungen auf die Reproduktionsbiologie und das Schilddrüsen-system ökotoxikologisch relevant sind bzw. sein können. Gerade für die Bestimmung der Wirkungen von ED auf das Schilddrüsen-system zeichnet sich ein relativ einfaches und valides Tiermodell anhand der Amphibien-Metamorphose (XEMA) ab. Die bisherigen Ergebnisse innerhalb eines Ringtests sowie internationale Vergleichsuntersuchungen belegen, dass der XEMA zum Nachweis von ED mit Wirkungen auf die Schilddrüse geeignet ist.

Bei Wirbellosen konnte für Mollusken sogar eine höhere Sensitivität im Vergleich zu Wirbeltieren von einigen ED auf die Reproduktionsbiologie nachgewiesen werden. Es steht zu erwarten, dass weitere Gruppen von Wirbellosen wie z.B. Crustaceen und Insekten ebenfalls adverse Effekte durch die Einwirkung von ED aufweisen, wobei hier aufgrund der großen Unterschiede bei den endokrinen Systemen noch weitere Grundlagenforschung notwendig ist. Für eine Bewertung der ökotoxikologischen Bedeutung von ED ist es notwendig, die aufgeführten Wirkmechanismen durch geeignete Bioassays detektieren zu können, um so Reinsubstanzen im Rahmen von Zulassungsverfahren nach dem Vorsorge-Prinzip testen bzw. in Kombination mit fraktionierender chemischer Analytik die endokrin wirksamen Stoffe aus einer Mischprobe identifizieren und quantifizieren zu können. Gerade die Detektion von ED aus Umweltproben von Oberflächengewässern stellt aufgrund der komplexen und sehr verschiedenen Gewässermatrizes, die auch zu Interaktionen mit diesen Stoffen führen, hohe Anforderungen an chemische und biologische Testverfahren, die die Voraussetzung sind für weiterführende Risikobewertungen und die ökologische Relevanz für die betroffenen Tiergruppen.

4 Literatur

- Bögi, C., Levy, G., Lutz, I. & Kloas, W. (2002): Functional genomics and sexual differentiation in amphibians. *Comp. Biochem. Physiol.* B 133 (4), 559-570.
- Bryan, G. W., Gibbs, P. E., Hummerstone, L. & Burt, G. R. (1986): The decline of the gastropod *Nucella lapillus* around south-west England: Evidence for the effect of tributyltin from antifouling paints. *J. Mar. Biol. Ass. UK* 66, 611-640.
- Colborn, T., vom Saal, F. & Soto, A. (1993): Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Perspect.* 101, 378-384.
- Kime, D. (1998): *Endocrine disruption in fish*. Kluwer Academic Publishers, Boston-Dordrecht-London.
- Kloas, W. (2002): Amphibians as model to study endocrine disruptors. *Int. Rev. Cyt.* 216, 1-57.
- Kloas, W., Einspanier, R. & Lutz, I. (1999): Amphibians as a model to study endocrine disruptors: II. estrogenic activity of environmental chemicals in vitro and in vivo. *Sci. Total Environ.* 225, 59-68.
- Lutz, I. & Kloas, W. (1999): Amphibians as a model to study ED: I. Environmental pollution and estrogen receptor binding. *Sci. Total Environ.* 225, 49-57.

- McLachlan, J. & Arnold, S. (1996): Environmental estrogens. *Am. Scientist* 84, 452-461.
- Oehlmann, J., Bauer, B., Schulte-Oehlmann, U., Minchin, D., Fioroni, P. & Markert, B. (1999): Intersex bei *Littorina littorea*: Biologisches Effektmonitoring auf Tributylzinnverbindungen in deutschen Küstengewässern. In: *Ökotoxikologie. Ökosystemare Ansätze und Methoden* (Hrsg. Oehlmann, J. & Markert, B.), ecomed, Landsberg, 364-375.
- Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Tillmann, M. & Markert, B. (2000): Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part I: Bisphenol A and octylphenol as xeno-estrogens. *Ecotoxicol.* 9, 383-397.
- Opitz, R., Levy, G., Bögi, C., Lutz, I., & Kloas, W. (2002): Endocrine disruption in fishes and amphibians. Transworld Research Network, *Recent Res. Devel. Endocrinol.* 3, 127-170.
- Schulte-Oehlmann, U., Tillmann, M., Casey, D., Duft, M., Markert, B. & Oehlmann, J. (2001): Östrogenartige Wirkungen von Bisphenol A auf Vorderkiemerschnecken (Mollusca: Gastropoda: Prosobranchia). *UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox.* 13, 319-333.
- Shi, Y. (2000). *Amphibian metamorphosis*. Wiley-Liss, New York.

Danksagung

Wir danken für die Forschungsförderung durch das Ministerium für Umwelt und Verkehr Baden-Württemberg mit der Projektträgerschaft BW-PLUS (BWB 20 006) und durch das Umweltbundesamt (FKZ 200 67 409 und FKZ 299 65 221) sowie der Europäischen Gemeinschaft für die Förderung im Rahmen des Projektes COMPRENDO Contract No. EVK1-CT-2002-00129).