

Effecten van flutamide op gen- expressie en reproductie bij de zebravis (*Danio rerio*).

Door:
Marleen Eyckmans

*Eindverhandeling voorgelegd tot het behalen van de graad van
Licentiaat in de Biomedische Wetenschappen*

30 juni 2006
Academiejaar 2006

Promotor: Prof. Dr. Wim De Coen
Begeleidster: Dorien Keil

Laboratorium voor Ecofysiologie, Biochemie en Toxicologie
Universiteit Antwerpen – Campus Groenenborger
Groenenborgerlaan 171
2020 Antwerpen

Dankwoord

Als eerste wil ik mijn promotor, Prof. Dr. Wim De Coen van harte bedanken voor de mogelijkheden die hij me heeft gegeven. Het was een unieke ervaring om te mogen meedraaien in het laboratorium voor Ecofysiologie, Biochemie en Toxicologie. Ondanks de driedubbel volgeboekte agenda, heeft hij zich kunnen vrijmaken om dit werk grondig door te nemen; waarvoor dank. De medelezers worden ook van harte bedankt voor de tijd die ze hebben gespendeerd aan de beoordeling van deze thesis.

Als volgende kan ik niemand beter bedanken dan Dorien Keil, mijn begeleidster tijdens de moeilijke maar spannende weg van het onderzoek en het schrijven van mijn thesis. Ik had me geen betere begeleiding kunnen inbeelden. De momenten achter de Nanodrop, waarbij we zenuwachtig op resultaten aan het wachten waren, zullen me altijd bij blijven en mede door haar, zag ik het plezier van het onderzoeken in. Ik wil haar nog superveel succes wensen met haar doctoraat en haar ventje, bij wie ze al het geluk heeft gevonden dat ze verdient. Dorien, bedankt voor alles.

Verder bedank ik ook Marijke De Wit en An Hagenaars, voor de toffe momenten tijdens het eitjes tellen en de dissectie en alle andere leuke uurtjes die ik in hun gezelschap heb doorgebracht. Ook alle andere mensen op het labo, waaronder Rosa en Karlijn, wil ik bedanken voor de goede opvang en antwoorden op mijn vragen. Mijn medestudenten en andere studenten op hetzelfde labo wens ik ook nog erg veel succes toe en bedank ik voor de aangename gesprekken. Vooral Steven, bedankt voor alle lachwekkende momenten in de kelder en het labo.

Daarnaast wil ik mijn vriend, Kenneth, bedanken voor zijn geloof in mij én liefde voor mij. Bedankt lieverd, voor alles wat je voor me doet en alles wat je voor me betekent. Ook al mijn vrienden verdienen een bedankje, want zij zorgden mee voor mijn ontspanning en zelfvertrouwen; niet enkel tijdens de maanden van mijn thesis, maar ook tijdens de hele studie. Liselotte, Kato, Isabelle en Maarten, bedankt om altijd voor me klaar te staan en er te zijn wanneer ik jullie nodig had; mijn vriendschapsrotsen in de branding. Bedankt Nikki, voor alle flower power en de vriendschap, en nog meer voor de talloze autoritjes. Bedankt Kelly, Manu, Julie, Joke, Natasja, Geert, Marieke en Natalie, voor nóg meer ontspanning en vriendschap. Bedankt An Blommaert, voor de al 21-jaar-durende-vriendschap en ontroerende momenten.

Nog iemand die alle dank van de wereld verdient, is mijn moeder: bedankt mama voor alle steun, niet enkel financieel, maar ook mentaal en emotioneel. Ook mijn zus, Eva, bedankt voor de uurtjes labeltjes maken en alle andere fijne momenten. Mijn broers, Tom en Stefan, bedankt voor de autoritjes en zoveel meer. Ook de rest van mijn familie, waaronder mijn tantes, nonkels, neven en nichten die altijd voor me klaar staan, bedank ik van harte.

Tenslotte wil ik mijn thesis opdragen aan mijn Bompa, Bomma, en Moeke, die veel voor mij betekenen. Bedankt voor alle lieve zorgen. Bedankt aan al diegene die ik niet persoonlijk vernoem, maar die weten dat ik ook hén dankbaar ben.

Bedankt allemaal,
Marleen

Samenvatting

Het is wereldwijd erkend dat bepaalde chemische stoffen in het milieu over de mogelijkheid beschikken het endocriene systeem te moduleren. Zo kunnen ze interfereren met de ontwikkeling en reproductie van dieren en mensen. Het voortbestaan van bepaalde soorten in het ecosysteem wordt zo in gevaar gebracht, waardoor een verlies in biodiversiteit zou kunnen optreden. Het is daarom erg belangrijk dat alle mechanismen van endocriene verstoring ontrafeld worden.

Om een geïntegreerd en volledig beeld te kunnen geven van de effecten van een endocriene verstoorder, moet er onderzoek verricht worden naar meerdere niveaus van biologische organisatie, zoals naar gen-expressie, het hele organisme, het gedrag en het effect op het ecosysteem. In deze thesis zullen we specifieke effecten van endocriene verstoorders vanuit een vernieuwend perspectief belichten door de effecten van een gekend anti-androgeen, flutamide, na te gaan op verschillende niveaus van biologische organisatie van de zebravis.

In ons onderzoek werden zebravissen (*Danio rerio*) blootgesteld aan flutamide gedurende 4 en 28 dagen. De blootstelling gebeurde met een doorvloeisysteem, dat zorgde voor een constante concentratie flutamide in de blootstellingsaquaria. Op het laagste niveau van biologische organisatie analyseerden we de differentiële gen-expressie in gonaden van de verschillende blootstellingscondities, met behulp van oligo microarrays. Omdat de expressie van duizenden genen tegelijk kon worden waargenomen, kon een specifiek gen-expressieprofiel worden samengesteld voor deze stof. Op een hoger biologisch niveau onderzochten we de spermaviabiliteit aan de hand van flow cytometrie, bepaalden we de fertiliteit en Ovarium Somatische Index (OSI), en gingen we het Vitellogenine (Vtg) gehalte na in het bloed. Om nog ecologisch relevanter te werken, registreerden we ook het gedrag met behulp van een 3D-gedragsanalyse-systeem.

Differentiële gen-expressie analyse toonde aan dat genen betrokken bij het endocrien systeem en reproductie beïnvloed werden. Maar ook genen gerelateerd aan signaaltransductie, translatie en stress, ondervonden een invloed van blootstelling aan flutamide. De geslachtsbepaling en gonadale ontwikkeling, alsook de vorming van de gameten ondervonden nadelige effecten. De resultaten geven dus een ‘vervrouwelijkend’ effect weer. De analyse van sperma van mannelijke vissen toonde een duidelijke daling in viabiliteit. Vtg bepaling in het bloed van mannelijke vissen na een blootstelling van 28 dagen, toonde een verhoging van de Vtg concentratie aan in de populatie die werd blootgesteld aan 1000µg/l flutamide. De eileg werd niet duidelijk significant beïnvloed.

Een geïntegreerde benadering kan resulteren in een uniek beeld van de effecten van een endocriene verstoorder op verschillende niveaus van biologische organisatie bij de zebravis. In de toekomst zal men kunnen voorspellen wat de impact van een stof is, nog voor de effecten in het ecosysteem zichtbaar zijn, door vroege veranderingen in het gen-expressie patroon na te gaan.

Abstract

It is widely recognised that certain chemicals possess the ability to modulate the endocrine system. Through this mechanism, interfering with reproduction and developmental processes in animals and humans. The survival of certain species in the ecosystem can be threatened, causing a loss of biodiversity. Therefore it is important to reveal all the mechanisms of endocrine disruption.

In order to obtain an integrated and complete insight into the effects of an endocrine disruptor, one has to investigate several levels of biological organisation, like gene-expression, the organismal level, behaviour and effect on the entire ecosystem. In this thesis, we will unravel the impact of an endocrine disruptor, flutamide (a known anti-androgen) on several levels of biological integration.

In the present study, we exposed zebrafish (*Danio rerio*) to flutamide, during 4 and 28 days. The exposure was conducted by a flow through system; which keeps the concentration of flutamide at the same level during the entire exposure. At the lowest level of biological organisation, we studied the differences in gene-expression levels in gonads of the different exposure conditions, by means of oligonucleotide microarray. With this technique, we could evaluate thousands of genes at the same time and create a specific gene-expression profile. Evaluating effects at higher levels of biological organization, we examined the viability of sperm with a flow cytometer, we determined the fertility and the Ovarian Somatic Index (OSI), and detected the Vitellogenin (Vtg) concentration in blood of male zebrafishes. Even more ecological relevant work has been done by registering the behaviour of fishes, using a 3D- behaviour analysis.

The results revealed differential gene-expression of transcripts related to the endocrine system and reproduction. Genes involved in signal transduction, translation and stress, experienced an influence of exposure to flutamide, too. The sex differentiation and development of the gonads, as well as the modulation of gametes were disrupted. The results indicated a 'feminisation' of the male zebrafishes. The analysis of sperm quality showed a clear decrease of viability and Vtg concentration in blood of male zebrafishes was more abundant in the population exposed to 1000µg/l flutamide compared to the population that served as a control. The number of eggs laid by female zebrafishes wasn't influenced by exposure to flutamide.

Eventually, an integrated approach can lead to an unique insight of the impact of an endocrine disruptor on several levels of biological integration in zebrafish.

Towards the future, we will be able to detect and predict the impact of a chemical in the environment, before the effects are seen in the ecosystem, by exploring the early changes in gene-expression profiles.

Inhoudstabel

Dankwoord	2
Samenvatting	3
Abstract	4
Inhoudstabel	5
Lijst van figuren	7
Lijst van tabellen	8
Lijst van grafieken.....	9
Lijst van afkortingen	10
Hoofdstuk 1: Inleiding	12
1.1 Probleemstelling.....	12
1.2 Ecotoxicogenomics	13
1.3 Het endocrien systeem	16
1.3.1 Inleiding	16
1.3.2 Het reproductief endocrien systeem bij vissen.....	17
1.3.3 Geslachtshormonen	18
1.3.4 Geslachtsdifferentiatie.....	19
1.4 Endocriene verstoring	20
1.4.1 Onderverdeling Endocriene verstoorders.....	20
1.4.2 Werkingsmechanismen	24
1.4.3 Effecten van endocriene verstoorders	25
Hoofdstuk 2: Doelstelling	29
Hoofdstuk 3: Materialen en Methoden.....	31
3.1 Testspecies	31
3.2 Teststof.....	31
3.3 Blootstelling	32
3.4 Analyse differentiële gen-expressie met microarrays	33
3.4.1 Dissectie	33
3.4.2 RNA extractie.....	33
3.4.3 NanoDrop	35
3.4.4 Aminoallyl labeling van RNA.....	35
3.4.5 Hybridisatie van de gelabelde cDNA probes met de Oligo microarrays	37
3.4.6 Scannen van de microarrays.....	38
3.4.7 Analyse van de microarrays	38
3.5. Gameetfysiologie	40
3.5.1 Analyse sperma	40
3.5.2 Analyse ovaria en eileg	41
3.6 Vitellogenine bepaling	42
3.7 Gedragsbepaling.....	43
Hoofdstuk 4: Resultaten	44
4.1 Analyse differentiële gen-expressie met microarrays	44
4.1.1 Controle van het geëxtraheerde RNA met NanoDrop	44
4.1.2 Controle van de labelingsreactie van het aminoallyl gelabeld cDNA aan het Cy Dye ester.....	44
4.1.3 Hybridisatie van de microarrays	45
4.1.4 Scan van een microarray	46
4.1.5 Analyse van de microarray.....	47
4.2. Gameetfysiologie	51

4.2.1 Analyse Sperma.....	51
4.2.2 Analyse ovaria en eileg	52
4.3 Vitellogenine bepaling	53
Hoofdstuk 5: Discussie.....	54
5.1 Analyse differentiële gen-expressie met microarrays	54
5.2 Gameetfysiologie en vitellogenine	60
5.3 Integratie van de resultaten	61
Hoofdstuk 6: Conclusie en aanbevelingen	63
Referenties.....	64

Lijst van figuren

Figuur 1.1: Microarray technologie.

Figuur 1.2: Het reproductief endocrien systeem bij vissen.

Figuur 1.3: Endocriene klieren bij de mens.

Figuur 2.1: Verschillende niveaus van biologische organisatie.

Figuur 3.1: Opstelling van het blootstellingsexperiment.

Figuur 3.2: Principe van een flow cytometer.

Figuur 3.3: Vtg ELISA

Figuur 3.4: Plaat van Vtg ELISA

Figuur 4.1: Voorbeeld van een oligo microarray

Lijst van tabellen

Tabel 3.1: Volumes die nodig zijn voor de DNase behandeling van mRNA geëxtraheerd uit testes en ovaria.

Tabel 3.2: De post-hybridisatie wasstap.

Tabel 4.1: Resultaten Nanodrop.

Tabel 4.2: Resultaten Nanodrop.

Tabel 5.1: Functionele klassen waartoe genen behoren die het meest tot expressie komen.

Tabel 5.2: Differentiële gen-expressie van genen die besproken worden in de discussie.

Lijst van grafieken

Grafiek 4.1: Genen die differentieel tot expressie komen in ovaria na 4 dagen blootstelling aan 100µg/l flutamide.

Grafiek 4.2: Genen die differentieel tot expressie komen in testes na 4 dagen blootstelling aan 100µg/l flutamide.

Grafiek 4.3: Genen die differentieel tot expressie komen in ovaria na 4 dagen blootstelling aan 1000µg/l flutamide.

Grafiek 4.4: Genen die differentieel tot expressie komen in testes na 4 dagen blootstelling aan 1000µg/l flutamide.

Grafiek 4.5: Genen die differentieel tot expressie komen in ovaria na 28 dagen blootstelling aan 100µg/l flutamide.

Grafiek 4.6: Genen die differentieel tot expressie komen in testes na 28 dagen blootstelling aan 100µg/l flutamide.

Grafiek 4.7: Genen die differentieel tot expressie komen in ovaria na 28 dagen blootstelling aan 1000µg/l flutamide.

Grafiek 4.8: Genen die differentieel tot expressie komen in testes na 28 dagen blootstelling aan 1000µg/l flutamide.

Grafiek 4.9: Sperma analyse op dag 30 van de blootstelling.

Grafiek 4.10: Vtg concentratie van de verschillende blootstellingsgroepen op dag 30 van de blootstelling.

Grafiek 4.11: De gemiddelde OSI op dag 28 van de blootstelling.

Grafiek 4.12: De gemiddelde eileg per aquarium per blootstellingsconditie op week 1 en 4.

Lijst van afkortingen

AR: androgen receptor
ARE: androgen responsive element
BSA: bovine serum albumine
CO₂: koolstofdioxide
CYP19: cytochroom P450 aromatase gen
CYP450: cytochroom p450 aromatase
DAZ: deleted in azoospermia
DDT: 1,1,1-trichloro-2,2-di(4-chlorophenyl)ethaan
DEPC: diethylpyrocarbonaat
DES: diethylstilbestrol
DMSO: dimethylsulfoxide
(c)DNA: (copy) desoxyribonucleïnezuur
DDE: dichlorodiphenyldichloroethyleen
DTT: dithiotreitol
EDTA: ethylenediaminetetra-acetic acid
ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay
FSH: follikel stimulerend hormoon
FOI: frequency of dye incorporation
GnRH: Gonadotropine releasing hormoon
GtH: Gonadotropine
HCl: waterstofchloride
HRE: Hormoon responsive element
ISLab: intelligent systems lab
KCl: kaliumchloride
LH: luteïniserend hormoon
MAP: mitogen activated proteïn
MIAME: minimum information about microarray experiment
MS: methaansulfonaat
NaCl: natriumchloride
NaOH: natriumhydroxide
NHS: N-hydroxysuccinimide
NR5A: nucleaire receptor 5 groep A
OESO: organisatie voor economische samenwerking en ontwikkeling
OSI: ovarium somatische index
PAK: polyaromatische koolwaterstoffen
PBDE: polygebromeerde difenylether
PBS: fosfaat buffer saline
PCR: polymerase chain reaction
PMT: photomultiplier
PI: propidium iodide
REACH: registration, evaluation and authorisation of chemicals
(m) RNA: (boodschappers-) ribonucleïnezuur
RT: reverse transcriptase
SDS: sodium dodecyl sulfaat
SSC: standard saline citrate
SSH: suppressieve subtractieve hybridisatie
TBBPA: tetrabromobisfenol A

TBT: tributyltin
TCDD: 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxine
TNF: tumor necrosis factor
Vtg: vitellogenine
ZP: zona pellucida
Zr : zona radiata

Hoofdstuk 1: Inleiding

1.1 Probleemstelling

Sinds de jaren '50 zijn meerdere duizenden chemische stoffen in grote hoeveelheden in het milieu terecht gekomen. Vaak zijn deze stoffen onvoldoende gekarakteriseerd en kunnen ze accumuleren in aquatische en terrestrische ecosystemen. Met het REACH programma (registration, evaluation and authorisation of chemicals) wil men toxicologische en fysicochemische eigenschappen onderzoeken van in het milieu voorkomende chemicaliën. Hierdoor zal men meer kennis over de kenmerken en gebruik van chemicaliën verwerven en zal risk assessment sneller en efficiënter kunnen gebeuren (Levin *et al.*, 2004). Ondertussen worden mens en dier nog steeds via de voeding, de lucht, het water, of zelfs via de placenta tijdens het foetale leven blootgesteld aan schadelijke chemicaliën. Hoewel reeds jarenlang bij in het wild levende dieren, allerlei problemen met de voortplanting en de ontwikkeling van jongen werden gerelateerd met blootstelling aan door de mens gemaakte chemicaliën, was het pas sinds '90 dat deze problematiek wereldwijd de nodige aandacht kreeg. Steeds meer gegevens wijzen er namelijk op dat de milieustressoren die voortplantingsstoornissen veroorzaken bij in het wild levende dieren, ook bij de mens verantwoordelijk zouden zijn voor o.a. de stijging van het aantal gevallen in de laatste tiental jaren, van testeskanker en hypospadie bij de man en borstkanker bij de vrouw (Weber *et al.*, 2002; Sin-Eng, 2000). Milieuvervuiling wordt ook in verband gebracht met de geobserveerde afname van de spermakwaliteit bij de mens (Sharpe en Skakkebaek, 1993).

Er is dus een toenemende bezorgdheid over bepaalde antropogene chemicaliën die de natuurlijke werking van hormonen kunnen beïnvloeden. De regulatie en werking van hormonen zijn uiterst precieze processen met als doel de homeostase binnen een organisme te handhaven. Een verstoring in het natuurlijke evenwicht van deze hormonen kan zeer ernstige gevolgen hebben. Men noemt stoffen die kunnen interfereren met het endocriene systeem dan ook endocriene verstoorders. Endocriene verstoorders kunnen natuurlijke stoffen zijn die aangemaakt worden door mensen en dieren (natuurlijke hormonen) of planten en schimmels (fyto-oestrogenen) of kunnen antropogene chemische stoffen zijn gebruikt in industriële, huishoudelijke en farmaceutische producten (xeno-oestrogenen).

In laboratoriumstudies met zoogdieren, vissen, reptielen, amfibieën, vogels en invertebraten is endocriene verstoring na blootstelling aan verschillende antropogene en natuurlijke chemicaliën reeds meermaals aangetoond. Veel belangrijker zijn echter de voorbeelden van endocriene verstoring die in de natuur worden waargenomen: abnormale seksuele ontwikkeling van alligators in het met pesticiden vervuilde Apopka Meer in Florida (Guillett *et al.*, 1994), vervrouwelijking van meeuwen die blootgesteld waren aan 1,1,1,-trichloro-2,2-di(4-chlorofenyl)ethaan (DDT) (Frye en Toone, 1981), imposex- en intersexfenomenen bij mariene gastropoden (Matthiessen en Gibbs, 1998) en vervrouwelijking van vissen nabij de industriële effluenten van fabrieken (Bortone *et al.*, 1989; Purdom *et al.*, 1994; White *et al.*, 1994; Jobling *et al.*, 2003).

Van het hele milieu, is het aquatisch ecosysteem het meeste vatbaar voor vervuiling, omdat zeer vele chemicaliën hun weg kunnen vinden naar rivieren en oceanen. Vissen en andere organismen die in het water leven, worden beïnvloed door chemicaliën. Deze chemicaliën oefenen vaak een specifiek effect uit op componenten van het reproductief systeem. Zulke componenten omvatten de hypofyse, de gonaden en hun geslachtshormonen, steroïden en

Vitellogenine (Vtg)(een dooierewit) synthese in de lever, spermamobiliteit, bevruchtingsratio en de overleving van larven (Arukwe, 2001).

Dit zijn voldoende redenen om extra waakzaam te zijn over de aanwezigheid van endocriene verstoorders in het milieu. Het voortbestaan van bepaalde soorten in het ecosysteem wordt in gevaar gebracht, waardoor een verlies in biodiversiteit zou kunnen optreden. Verlies in biodiversiteit leidt tot verstrekende gevolgen voor levensgemeenschappen en voor gehele ecosystemen (Oetken *et al.*, 2004). Het is daarom erg belangrijk dat alle mechanismen van endocriene verstoring ontrafeld worden. Er is al heel wat gekend over fysiologische gebeurtenissen betrokken bij hormoonresponsen, maar er is weinig geweten over de relatie tussen deze fysiologische responsen en effecten op lagere niveaus van biologische organisatie.

In deze thesis zullen we de effecten van een endocriene verstoorder vanuit een vernieuwend perspectief belichten door de effecten van een gekend anti-androgeen, flutamide, na te gaan op verschillende niveaus van biologische organisatie. We maken gebruik van innovatieve technieken (microarray, flow cytometrie en gedragsanalyse). Hierdoor zal het mogelijk zijn om nieuwe aspecten van de reproductieve fysiologie in een ecotoxicologische context te belichten bij de zebravis (*Danio rerio*).

1.2 Ecotoxicogenomics

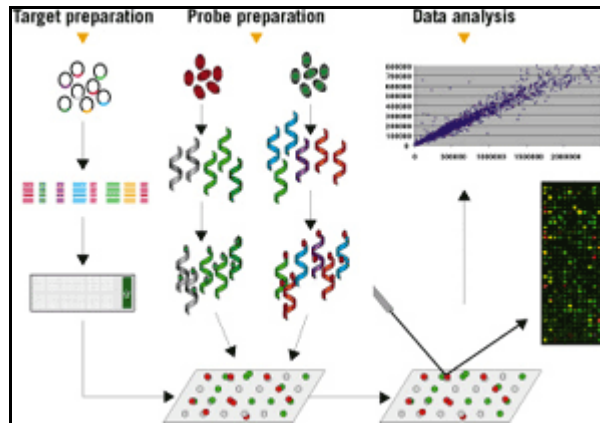
De term ecotoxicogenomics omschrijft de integratie van genomics en ecotoxicologie (Breitholtz *et al.*, 2006). Het doel van de ecotoxicogenomics is om via genomics en bio-informatica, gen-expressie profielen te maken die verkregen worden na de blootstelling van organismen aan verontreinigende stoffen. Deze profielen kunnen dan gebruikt worden om de potentiële endocriene verstoring van nieuwe chemische stoffen te voorspellen (Gant en Zhang, 2005).

Het onderzoek naar endocriene verstoring wordt opgehouden door de diversiteit aan mogelijk endocrien verstorende componenten, die synergistische of individuele effecten kunnen uitoefenen. Vele toxiciteitstesten kunnen geen informatie geven over het werkingsmechanisme van endocriene verstoorders. Hierin kwam verandering met de ontwikkeling van de microarray (Francois *et al.*, 2003). **Microarrays** kunnen gebruikt worden als screeningsmethoden voor de toxicologische eigenschappen van een geneesmiddel of chemisch stof, of om de werkingsmechanismen van milieucontaminanten te karakteriseren door de identificatie van gen-expressie netwerken (Neumann en Galvez, 2002).

De toepassingen van microarrays zijn gebaseerd op de eigenschap van endocriene verstoorders om wijzigingen te veroorzaken in expressie van genen, die voor de cel nodig zijn om te kunnen reageren op deze stoffen. Zo kan bijvoorbeeld schade aan DNA een verhoging van expressie veroorzaken van genen die instaan voor de reparatie van DNA of de initiatie van apoptose. Daarom kan de aard van genen die worden opgereguleerd, een aanwijzing vormen om die bepaalde stof in een toxiciteitsklasse onder te brengen (Gant en Zhang, 2005).

Een DNA microarray bestaat uit een glazen microscoopglasje waarop vele duizenden DNA stalen gespot zijn in een rooster. Deze spots kunnen bestaan uit korte oligonucleotiden of volledige cDNA's, die men bekomen heeft door mRNA om te zetten naar cDNA door middel van reverse transcriptase. Het mRNA wordt uit het weefsel geïsoleerd en omgezet in cDNA. Dan worden blootgestelde en controle populaties met verschillende labels gemerkt en het gemerkte cDNA zal hybridiseren met de oligonucleotiden op de microarray. Bij deze hybridisatie treedt specifieke fluorescentie op, die gemeten wordt met een confocale scanner

en er ontstaat een digitaal beeld waarvan de differentiële gen-expressie kan worden afgeleid. Bij geen differentiële gen-expressie zie je een gele spot, het gen was dus in dezelfde hoeveelheden aanwezig in blootgestelde en controle populatie. Een groene spot betekent dan dat dat gen downgereguleerd is in de blootgestelde populatie, en bij een rode spot, upgereguleerd in de blootgestelde populatie (Francois *et al.*, 2003)(zie figuur 1.1).



Figuur 1.1: Microarray technologie. RNA wordt uit weefsels geïsoleerd en omgezet naar cDNA, waarna de controle en blootgestelde populatie met een verschillende fluorescent label gemerkt worden. Bij hybridisatie treedt fluorescentie op. Dit signaal wordt gemeten met een confocale scanner.

De microarray techniek laat dus toe om transcripten van 2 verschillende celpopulaties te vergelijken en geeft de mogelijkheid om snel en simultaan duizenden genen te bekijken zodat de hele metabolische pathway die verstoord wordt door een contaminant, bestudeerd kan worden. Een nadeel kan zijn dat de array niet gevoelig genoeg is om zeldzame gentranscripten te detecteren en ook dat de functies van vele genen gespot op de array niet gekend zijn (Larkin *et al.*, 2003). Nochtans is het meest significante nadeel van de microarray technologie dat men alleen kan werken met modelorganismen en dat de arrays voor niet model organismen uitermate duur zijn. Niet zozeer een nadeel van de techniek, maar meer een beperking van het toestel dat gebruikt wordt om een digitaal beeld te krijgen, is de beperking in de detectie van het aantal kleurstoffen. Zo kan men enkel vergelijken tussen 2 behandelingen omdat er maar 2 kleurstoffen kunnen gedetecteerd worden. Het gebruik van meerdere probes gehybridiseerd op 1 array vergroot het gebruik in vergelijkende fysiologie enorm (Wiseman en Singer, 2002). Microarrays worden nu toegepast in onderzoek om specifieke genen en proteïnen te identificeren die worden beïnvloed door blootstelling aan endocriene verstoorders (Hutchinson *et al.*, 2006; Rotchell en Ostrander, 2003).

Er kunnen ook andere technieken gebruikt worden voor het bestuderen van gen-expressie, zoals Northern blotting, kwantitatieve PCR en Suppressieve subtractieve hybridisatie (Larkin *et al.*, 2003). Deze technieken hebben echter als nadeel dat ze slechts enkele genen per experiment kunnen analyseren, waardoor de experimenten erg veel tijd in beslag nemen en complexe interacties van gen-expressie niet kunnen worden waargenomen. De microarray heeft dit nadeel niet en kan duizenden genen tegelijk analyseren. Bij blootstelling aan een endocriene verstoorder, zoals flutamide, zullen sommige genen in de blootgestelde groep meer of minder tot expressie komen dan de genen in de controle groep. Deze differentiële gen-expressie wordt gevisualiseerd en gekwantificeerd op een array. Op die manier wordt een gen-expressie-patroon gegeneerd, kenmerkend voor een bepaalde endocriene verstoorder (Wiseman en Singer, 2002).

Gen-expressie alleen is onvoldoende om een uitspraak te kunnen doen over de ecologische impact van een stof en daarom moeten de resultaten van de gen-expressie gecorrigeerd worden aan effecten die optreden op hogere niveaus van biologische organisatie (Moens *et al.*, 2003). Daarom worden er ook andere biomerkers nagegaan.

Biomerkers worden gedefinieerd als een biologische respons die gerelateerd kan worden aan blootstelling aan, of toxisch effect van, een milieuverstoorder. Hoewel vaak verwezen wordt naar biomerkers als een sub-organismale respons, kunnen zij in een bredere context eindpunten van alle stadia van biologische organisatie omvatten, gaande van moleculaire en biochemische veranderingen tot gedragsmatige aanpassingen. Het gebruik van biomerkers in milieu-monitoring is voordeliger dan traditionele chemische metingen omdat (Wu *et al.*, 2005):

- Biobeschikbaarheid en interactie met contaminanten in het milieu mee worden opgenomen.
- Een tijdsgeïntegreerde schatting van concentraties van contaminanten bekomen kan worden.
- De concentratie van contaminanten in biologisch weefsel is vaak hoger, waardoor chemische analyse gemakkelijker wordt.
- Blootstelling en schadelijke effecten kunnen worden gecorrigeerd met contaminanten waardoor men een causaal verband kan leggen.
- De gemeten biologische effecten zijn directer verbonden met het milieu en daarom betekenisvoller.

Hierdoor ontstond de trend om chemische criteria aan te vullen met biologische/ecologische criteria om milieustandaarden vast te leggen. In de laatste 20 jaar, werden verschillende biomerkers succesvol ontwikkeld en toegepast bij vele nationale en internationale monitoringsprogramma's in Noord-Amerika, Europa, Australië en Nieuw-Zeeland. Om gebruikt te kunnen worden in milieumonitoring moet een biomarker een goede kwantitatieve relatie vertonen ten opzichte van de concentratie contaminanten in het milieu en een tijdsgeïntegreerde schatting van de concentratie van contaminanten kunnen geven (nl. door de accumulatie in het weefsel na te gaan) tijdens de periode van monitoring. Een biomarker moet een duidelijk eindpunt omvatten en mag niet gevoelig zijn aan versturende factoren die mogelijk voorkomen in het milieu, zoals temperatuur, seizoen, geslacht, afmeting, inter- en intra-individuele variabiliteit. Verder moet een goede biomarker ecologisch relevant zijn, gevoelig en specifiek voor een bepaalde contaminant, reproduceerbaar, bijna altijd beschikbaar en kosteneffectief.

Men neemt ook aan dat biomerkers op een lagere biologische hiërarchie (moleculaire en biochemische veranderingen) sneller veranderen dan biomerkers op een hogere biologische hiërarchie (fysiologische, cytologische en organisme aanpassingen), en zo dus beter een beeld kunnen geven van vroege vervuiling in het milieu (Wu *et al.*, 2005).

Een biomarker die vaak wordt gebruikt om endocriene verstoorders op te sporen bij vissen, is Vtg. Vitellogenese is het proces waarbij dooierewitten worden geproduceerd en omvat de synthese van Vtg door de lever en de opname door groeiende oöcyten, waar Vtg wordt opgeslagen om uiteindelijk als voedselbron te dienen voor de ontwikkeling van embryo's. Uit onderzoek is gebleken dat het Vtg-gen, en dus de synthese van Vtg, onder multihormonale controle staat maar 17 β -oestradiol heeft hierbij de dominante rol. Plasmaconcentraties van Vtg stijgen dus tijdens seksuele rijping van vrouwelijke vissen door een stijgende concentratie

17 β -oestradiol. Vtg kan hierbij het belangrijkste proteïne in het bloed worden, wat overigens nodig is om een ovarium te ontwikkelen. Het ovarium vormt de opslagplaats van duizenden oöcyten en kan tot 25% van het totale lichaamsgewicht omvatten. Tegengesteld daalt de concentratie van Vtg tot erg lage waarden buiten het paarseizoen. Bij mannelijke vissen kan nauwelijks Vtg gedetecteerd worden omdat de circulerende oestrogeenconcentraties te laag zijn om expressie van het Vtg-gen te veroorzaken. Desondanks zijn mannelijke vissen erg gevoelig aan oestrogeen aanwezig in het water en kan het Vtg-gen toch tot expressie komen wanneer de mannelijke vissen worden blootgesteld aan oestrogeen (Sumpter en Jobling, 1995). Deze brede waaier vormt een goede basis voor een sensitieve bioassay voor blootstelling aan oestrogeen bij vissen (Hutchinson en Pickford, 2002).

Om de effecten van endocriene verstoring na te gaan wordt ook nog gekeken naar de kwaliteit en viabiliteit van sperma (Kleinkauf *et al.*, 2004). Andere biomerkers zijn o.a. de gonadosomatische index en de kwaliteit van gameten die een maat zijn voor de reproductie (Kime en Nash, 1999), histopathologische verschijnselen (Wu *et al.*, 2005) en enzymatische activiteit zoals de inductie van cytochroom P450 bij blootstelling aan dioxines (Sakamoto *et al.*, 2003).

1.3 Het endocrien systeem

1.3.1 Inleiding

Het endocrien systeem is een controle systeem van het lichaam, bestaande uit een groep klieren, die een stabiel intern milieu onderhouden door het produceren van chemische regulerende bestanddelen: de hormonen. Het omvat de hypofyse, schildklier, bijschildklieren, bijniere, pancreas, ovaria en testes en controleert en reguleert verschillende fysiologische processen, zoals ontwikkeling, groei, behoud van intern milieu, energiebeschikbaarheid en gedrag (The Columbia Encyclopedia, 2006). De meeste dieren met een goed ontwikkeld zenuwstelsel en bloedvatstelsel, hebben een endocrien systeem. Endocriene klieren ontstaan tijdens de ontwikkeling in alle embryologische kiemlagen (endoderm, mesoderm, ectoderm). Klieren van ectodermale en endodermale oorsprong produceren peptide en amine hormonen, mesodermale afkomstige klieren produceren hormonen gebaseerd op lipiden (Janz, 2000).

De primaire functie van een endocrien systeem bestaat erin de verschillende exogene stimuli om te vormen in chemische boodschappen, resulterend in expressie van een gepast gen en dus in de synthese van eiwitten, of resulterend in de activatie van al bestaande weefselspecifieke enzymesystemen. Het endocrien systeem vertegenwoordigt een belangrijk mechanisme om de coördinatie van ontwikkeling en metabolisme te regelen. Exogene stimuli, zoals de lengte van de dag, temperatuur, licht, feromonen en endogene stimuli, zijn meestal gekend als de "interne klok" van het organisme en worden verwerkt in het centrale zenuwstelsel. Na een complexe keten van biochemische processen, zet de hypothalamus een aantal hormonen vrij die de secretie van hormonen van de hypofyse controleren. Deze glandotrofines induceren de synthese en vrijzetting van weefselspecifieke hormonen in verschillende klieren. Hormonen die gesecreteerd worden door deze klieren, worden via de bloedstroom vervoerd naar de doelwitorganen en doelwitcellen, waar ze veranderingen induceren in cellulaire activiteit door te binden op een receptorproteïne (Lintelmann *et al.*, 2003). De cascade van verschillende, van elkaar afhankelijke, fysiologische processen wordt gereguleerd door complexe mechanismen zoals negatieve feedback, dat aan en af wordt gezet in antwoord op fluctuerende hormoonconcentraties: wanneer de hormoonproductie erg groot is, ageert het hormoon als een inhibitor en zorgt ervoor dat de hypothalamus en/of de hypofyse het hormoon niet meer aanmaakt (Genuth, 1998). Vele stappen van dit gevoelige systeem kunnen beïnvloed worden door verschillende externe stimuli, waarbij de meeste effecten worden gezien op de gonaden,

die de ontwikkeling van de seksuele differentiatie, secundaire geslachtskenmerken en de functie van geslachtsorganen controleren (Lintelmann *et al.*, 2003).

1.3.2 Het reproductief endocrien systeem bij vissen

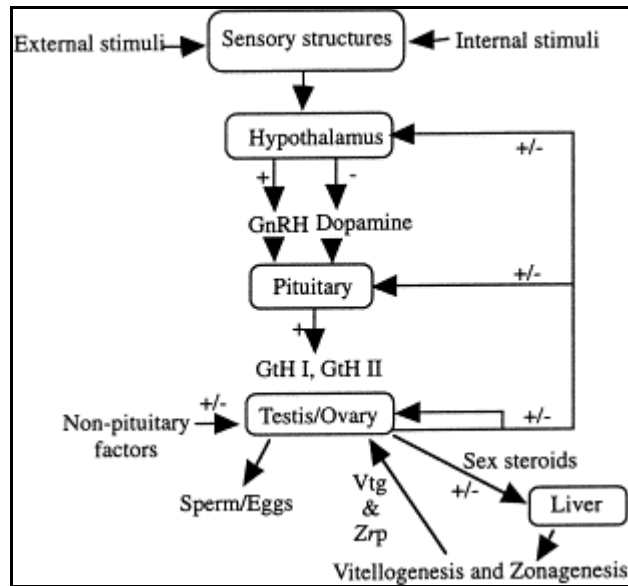
Het endocrien systeem van de vis bestaat net zoals bij zoogdieren uit een complex samenspel tussen externe stimuli, hypothalamische en hypofysaire hormonen, gonadale hormonen en de lever. De hypothalamus controleert onder invloed van milieusignalen (temperatuur, lichtperiode, voedsel en sociale factoren), de synthese en vrijzetting van hormonen en chemische stoffen die de hypofyse stimuleren tot vrijzetting van gonadotrofines.

De meeste vissen hebben 2 gonadotrofines (GtH-I en II) analoog aan het luteïniserend hormoon (LH) en het follikel stimulerend hormoon (FSH) in zoogdieren. Gonadotrofines stimuleren gonadale ontwikkeling en productie van steroïdhormonen (Kime, 1999) (zie figuur 1.2).

De ontwikkeling van de oögenese wordt gecontroleerd door GtH-I. Circulerend GtH-I verhoogt tijdens vroege oöcyt-ontwikkeling en bindt op receptoren op de thecale en granulosa cellaag van de follikel. De thecale cellen synthetiseren testosteron en laten aromatisatie toe die resulteert in de vorming van oestradiol in de granulosa laag, vooraleer het wordt gesecreteerd in het plasma. Plasma oestradiol bindt op een oestrogeen receptor en veroorzaakt een serie van stappen die resulteren in de productie van Vtg en eischaal zona radiata (Zr) proteïnen in de lever. Deze proteïnen worden vrijgezet in de bloedbaan en geïncorporeerd in de oöcyten door middel van receptor-gemedieerde endocytose. Wanneer de oöcyt groeit, daalt de concentratie GtH-I. De Hypothalamus-hypofyse-gonadale-lever-as wordt vnl. gecontroleerd door feedbackmechanismen. Oestrogeen geproduceerd door de ovaria kan een positief of negatief effect hebben op de hypothalamus, hypofyse of gonaden, afhankelijk van de concentratie nodig om de fysiologische en reproductieve noden van de vis te kunnen vervullen. In mannelijke vissen is GtH-I verhoogd tijdens spermatogenese en verlaagd tijdens de periode van eileg, en GtH-II is laag tijdens groeiprocessen en verhoogd tijdens de periode van eileg. De gonadotrofines stimuleren de proliferatie van spermatogonia en ook de synthese van androgenen, nodig voor gametogenese en ontwikkeling van secundaire geslachtskenmerken. Androgeen synthese gebeurt in Leydig cellen. Een daling in androgeenlevels en een stijging in progestines tijdens eileg worden veroorzaakt door verhoogde concentraties van GtH-II (Arukwe, 2001).

Wanneer oestradiol en 11-ketotestosteron secretie wordt stopgezet, wisselt de biosynthetische pathway om naar een secretie van progestageen, dat de finale rijping van de oöcyten of spermacellen induceert (germinal vesicle breakdown). Plasma steroïd concentraties tonen niet enkel de snelheid van synthese aan, maar ook de snelheid van deactivatie door de lever. De gonaden kunnen hun status doorgeven aan de hypofyse en hypothalamus door de steroïden die ze secreteren, alsook door inhibines (Kime, 1999).

Ovariële en testiculaire functies worden niet enkel gereguleerd door de gonadotrofines, maar ook door vele hormonen en groeifactoren die werken op een endocriene, paracriene of autocriene manier. Zo zal de insuline-like growthfactor een belangrijke rol spelen in de regulatie van de groei van de ovaria en de testes, en zal de epidermale groeifactor betrokken zijn bij de productie van steroïden en prostaglandinen (Janz, 2000).



Figuur 1.2: Het reproductief endocrien systeem bij vissen. Externe en interne stimuli geven een signaal aan de hypothalamus waardoor deze gonadotropin releasing hormoon (GnRH) vrijstelt. Dit GnRH werkt in op de hypofyse waardoor hier gonadotrofines (GtH) worden geproduceerd en gesecreteerd. Deze GtH werken in op de gonaden met de productie van geslachtshormonen tot gevolg. De hormonen worden onder controle gehouden door een negatief feedbacksysteem op de hypothalamus-hypofysaire-gonadale as.

1.3.3 Geslachtshormonen

De geslachtshormonen zijn van zeer groot belang voor reproductie, gametogenese, geslachtsdifferentiatie en gedragskarakteristieken. Dus niet enkel secundaire geslachtskenmerken, vorming en rijping van gameten, maar ook het voortplantingsgedrag en cycliciteit van de voortplanting wordt door de geslachtshormonen bepaald. De geslachtshormonen worden ingedeeld in drie functionele groepen: oestrogenen, androgenen en progestagenen. Ze behoren tot de groep van steroïden (lipiden) waarvan de biosynthese uitgaat van cholesterol.

Vissen verschillen met zoogdieren in hun belangrijkste testiculaire androgeen dat 11-ketotestosteron is in plaats van testosteron. Oestradiol is het belangrijkste hormoon dat geproduceerd wordt in de ovaria (Lintelmann *et al.*, 2003). Oestrogenen spelen een belangrijke rol in ontwikkeling, groei en seksuele differentiatie en reproductie in alle vertebraten die al bestudeerd zijn. In lagere vertebraten beïnvloedt oestrogeen op een directe manier een aantal ontwikkelings- en reproductieve aangelegenheden, zoals Vtg en eimembraan synthese, oöcytgroei, germinale cellen ontwikkeling, gonadale geslachtsdifferentiatie en reproductief gedrag (Kazeto *et al.*, 2004).

Controle van de productie van geslachtshormonen gebeurt voornamelijk door regulatie van sleutelenzymes in de biosynthetische pathway. In vissen zijn de belangrijkste biosynthetische enzymen leden van de cytochroom P450 (CYP450) enzyme familie, die de snelheidsbepalende stap in alle steroïd hormoon synthese medieert, nl de klieving van de zijketen van cholesterol (Redding en Patino, 2000). Teleosten hebben 2 structureel verschillende CYP19 isovormen die 60% hetzelfde zijn en afkomstig zijn van verschillende CYP19 loci, CYP19A1 en A2. CYP19A1 komt vooral tot uiting in de ovaria en speelt een belangrijke rol in geslachtsdeterminatie en oöcytgroei. Neuronale weefsels, zoals hersenen, retina en hypofyse, expresseren meer CYP19A2, dat belangrijk is in de ontwikkeling van het centrale zenuwstelsel en het seksuele gedrag (Bjerselius *et al.*, 2001).

De biosynthese van geslachtshormonen komt voornamelijk voor in de gonaden, voor de progestagenen in het corpus luteum, voor de androgenen in de testes en voor de oestrogenen in de ovaria. Maar ook extragonadale steroïdogenese wordt gevonden in de hersenen, hypofyse en ruggegraat van de vis (Redding en Patino,2000).

1.3.4 Geslachtsdifferentiatie

Geslachtsdeterminatie en geslachtsdifferentiatie worden in vissen als twee verschillende, maar zeer sterk correlerende processen gezien. Geslachtsdeterminatie wordt beschouwd als het proces dat ontstaan geeft aan het genetische geslacht van het individu en neemt plaats op het moment van de bevruchting. In contrast daarmee, is geslachtsdifferentiatie de ontwikkeling en de expressie van mannelijke of vrouwelijke fenotypes, i.e. de ontwikkeling van testes of ovaria, met hun geassocieerde ducti en gerelateerde structuren. Primaire geslachtsdifferentiatie beperkt zich tot de gonaden, secundaire geslachtsdifferentiatie refereert naar alle andere weefsels. Het patroon van differentiatie wordt geassocieerd met de aanwezigheid of afwezigheid van SRY (sex determining region Y), een gen gelokaliseerd op het Y chromosoom coderend voor een testes-determinerende factor. SRY zou de actie van een repressor van testiculaire ontwikkeling onderdrukken en daardoor de mannelijke differentiatie toelaten. Een andere mogelijkheid is dat SRY zelf zou kunnen onderdrukt worden door ovariumontwikkeling en zo dus mannelijke differentiatie induceren (Blazquez *et al.*, 1998). In alle jonge zebravissen ontstaan tijdens de gonadale ontwikkeling, ongedifferentieerde ovaria-achtige gonaden, onafhankelijk van het genotypische geslacht. In mannelijke zebravissen verdwijnen alle oöcyten 30 dagen na het uitkomen uit het ei en ontwikkelen zich spermatocyten met testiculaire differentiatie. Oöcyten in ovaria van vrouwtjes blijven verder groeien. Het hebben van ongedifferentieerde ovaria-achtige gonaden tijdens juveniele periode, wordt 'juvenile hermafroditisme' genoemd. Het verdwijnen van de oöcyten in de mannelijke vissen wordt veroorzaakt door apoptose (Uchida *et al.*, 2004). Ovariumdifferentiatie komt meestal voor testesdifferentiatie en kan worden herkend aan de verhoogde mitotische activiteit van de oögonia en de vergroting van de ovaria. Sommige van de oögonia vormen zich snel om naar oöcyten door middel van meiose. De oöcyt meiose wordt vaak gebruikt als histologische index voor de ovariumdifferentiatie. Na het begin van meiose, groeien de oöcyten continu tot de profase van de eerste deling, tot de tijd er is om te rijpen en te ovuleren. Een vroeg teken van testiculaire ontwikkeling is de organisatie van germinale cellen in nestjes die lijken op testiculaire lobben. Ook een duidelijk teken is de ontwikkeling van de efferente spermaducten. De primaire germinale geslachtscellen van de ontwikkelende testes worden spermatogonia genoemd en meiosis in spermatocyten is een continu doorlopend proces (Redding en Patino,2000). De hormonale balans tussen oestrogenen en androgenen is cruciaal tijdens het proces van geslachtsdifferentiatie bij ontwikkelende vissen. Deze balans steunt op de beschikbaarheid en activiteit van steroïd synthetiserende enzymen, en vooral van het CYP450 aromatase complex. Inhibitie kan genetische vrouwtjes omzetten naar fenotypische mannetjes (Fenske en Segnert, 2004). Gonadale geslachtsdifferentiatie bij vissen steunt niet enkel op het genotype, maar wordt ook sterk beïnvloed door omgevingsfactoren, zoals hoge en lage watertemperaturen, lage pH, vervuiling, voeding, dichtbevolking en sociale factoren (Manning en Kime,1985). Vele vissen en reptielen ondergaan een temperatuurafhankelijke geslachtsdeterminatie en thermosensitiviteit van gonadale geslachtsdifferentiatie, waarbij de temperatuur van de jonge vis of ei het geslacht bepaalt. De proportie mannetjes verhoogt bij stijgende watertemperatuur en die van de vrouwtjes bij dalende watertemperatuur bij tilapias (Cooke *et al.*, 1996). Verschillende bevindingen duiden erop dat er een kritische periode is tijdens de ontwikkeling, waarin hormonen geslachtswisseling kunnen induceren (Lintelmann *et al.*, 2003).

1.4 Endocriene verstoring

Wereldwijd wordt er aandacht geschonken aan pollutanten in het milieu die de reproductieve capaciteit en seksuele ontwikkeling in vele species bedreigen.

Alle stoffen die het endocrien systeem verstoren, worden samengebracht onder de noemer endocriene verstoorder. Een endocriene verstoorder is een exogeen chemisch bestanddeel of mengsel, dat de structuur of functie van het endocrien systeem verandert en schadelijke effecten veroorzaakt op organisme-, reproductie-, populatie- of subpopulatie niveau. (Lintelmann *et al.*, 2003).

Organismen zijn erg gevoelig aan endocriene verstoorders tijdens vroege levensstadia, en blootstelling kan leiden tot genitale defecten, abnormale gameet-ontwikkeling, onvruchtbaarheid of volledige geslachtsverandering (McAllister en Kime, 2003). Een stijgende incidentie van slechte spermakwaliteit uitgaande van een abnormale ontwikkeling van Sertolicellen en genitale defecten bij mannen, wordt verbonden met mogelijke prenatale en/of blootstelling tijdens de eerste levensjaren aan oestrogene componenten. Talrijke incidenten benadrukken het feit dat vele chemicaliën schadelijk kunnen zijn zonder dat ze onmiddellijk de dood van het organisme betekenen (Kime, 1999).

Door de manier waarop natuurlijke en synthetische hormonen in het milieu belanden, namelijk via rioolwaterzuiveringsinstallaties (RWZI's) of door afspoeling in gebieden met landbouw of veeteelt, worden vooral aquatische ecosystemen met deze stoffen belast (Gezondheidsraad, 1999).

1.4.1 Onderverdeling Endocriene verstoorders

1.4.1.1 Synthetische endocriene verstoorders

A. Xenobiotica

Xenobiotica zijn natuurvreemde stoffen met het vermogen schade te berokkenen aan fauna en flora. Ze zijn structureel zeer divers en vertonen slechts in sommige gevallen een chemische structuur analoog aan natuurlijke hormonen. (Potentieel) endocrien verstorende stoffen zijn o.a. bepaalde pesticiden zoals organochloorverbindingen, organotinverbindingen, organofosforverbindingen en triazines; alkylfenolen en alkylfenolpolyethoxylaten; polyaromatische koolwaterstoffen (PAK's); ftalaten; polygechloreerde bifenylen (PCB's); dioxines en bisfenol A (Gezondheidsraad, 1999).

Xenobiotica kunnen het endocrien systeem verstoren of ook rechtstreeks een effect hebben op de ontwikkeling van gameten door hun cytotoxische werking (Kime, 1999). Zo was reeds in 1978 aangetoond dat alkylfenolen, afbraakproducten van detergenten in waterzuiveringsinstallaties, konden binden op de oestrogeenreceptor.

Pesticiden bestaan uit een grote klasse van chemicaliën met meer dan honderd actieve bestanddelen. Vele van deze actieve bestanddelen blijken potentiële endocriene verstoorders te zijn, zoals bevoorbeeld Endosulfan (insecticide), Atrazine (herbicide), Butylhydroxyanisole (antioxidant) en Benzylphthalate (plastifiëerder) (Vidaeff en Sever 2005).

Een goed gekend voorbeeld is DDT, een pesticide dat al lange tijd gebruikt wordt tegen insecten die ziekten overbrengen zoals malaria en de slaapziekte. In de jaren '70 werd het gebruik ervan verboden in de meeste ontwikkelde landen, maar niet in tropische regio's van

ontwikkelingslanden. De hoeveelheid DDT dat in het milieu terecht is gekomen, wordt geschat op 2 miljoen ton (Cocco *et al.*, 2006). In Lake Apopka ontdekte men dat blootstelling aan DDT zorgde voor abnormale seksuele ontwikkeling bij alligators (Guillette *et al.*, 1994). Een congeneer van DDT, p,p'-DDE oefent echter anti-androgene effecten uit. Omdat DDE zeer persistent is, en er een globale verspreiding bestaat via de atmosfeer, bestaat er zeker een blootstelling over heel de wereld. De blootstellingsdosis kan veel lager zijn dan deze die effecten doet ontstaan op geslachtsdifferentiatie, maar, wanneer er additieve of synergistische effecten met andere anti-androgenen of oestrogenen bestaan, dan kan het wel bijdragen tot een schadelijk effect (Toppari en Skakkebaek, 1998). DDE is ook nog eens zeer lipofiel en zal dus erg goed bioaccumuleren (Bayley *et al.*, 2002).

Als vervanger voor DDT werd Metoxychlor ontwikkeld, een breed spectrum pesticide. Na onderzoek ontdekte men dat metabolieten hiervan ook een oestrogene werking vertoonden (Vidaeff en Sever 2005).

Vinclozoline is een dicarboximide fungicide dat gebruikt wordt bij teelt van fruit, groenten en druiven. Het wordt tot verschillende metabolieten gedegradeerd in bodem, planten en dierlijke organismen. Deze metabolieten werden geïdentificeerd als anti-androgene componenten die schadelijke effecten uitoefenen (Toppari en Skakkebaek, 1998).

In de industrie werden ook veel **PCB's** of polychloorbifenylen gebruikt. Dit zijn gechlorideerde scheikundige verbindingen waarvan in totaal 209 verwante stoffen voorkomen. Tussen 1930 en het begin van de jaren tachtig werden ze geproduceerd voor toepassingen in industriële elektrische en hydraulische toestellen. Daar kwam hun uitstekend elektrisch isolatievermogen, prima brandweerstand, geschikte warmtegeleiding en viscositeit goed van pas. Er kwam een verbod in 1985 toen duidelijk werd dat PCB's een gevaar voor mens en milieu betekenden (Jules Houtmeyer, 2004). Zelfs na de verbanning van PCB productie in de meeste landen, wordt de hoeveelheid PCB aanwezig in het milieu geschat op 1,2 miljoen ton (Lintelmann *et al.*, 2003).

Vlamvertragers, zoals tetrabromobisfenol A (TBBPA) en polygebromeerde difenylethers (PBDEs), worden toegevoegd aan verven, plastic, textiel en electronicatoestellen om de ontvlambaarheid ervan te verminderen. Ondanks dit grote voordeel, is er bezorgdheid ontstaan over de persistentie, de bioaccumulatie, de potentiële toxiciteit en/of endocrien versturende eigenschappen van deze stoffen voor het milieu (Legler en Brouwer, 2003). Vlamvertragers verminderen bijvoorbeeld perifeer thyroïd hormoon gehalten in knaagdieren (Boas *et al.*, 2006).

Er wordt ook gesuggereerd dat zelfs **metalen**, zoals cadmium, arseniet en seleniet kunnen interageren met steroïdreceptoren. Cadmium is een veel voorkomende vervuiler van het milieu, vooral door zijn aanwezigheid in tabaksrook. Blootstelling aan dit metaal wordt verbonden met effecten op reproductie van zoogdieren, door zijn effect op progesteron (Henson en Chedrese, 2004).

Cadmium zou de oestrogeenreceptor activeren en gelijkaardige effecten induceren als oestradiol (Vidaeff en Sever 2005) én zou bij chronische blootstelling zorgen voor een daling in de motiliteit van sperma (Au *et al.*, 2001).

B.Farmaca

Farmaca bestaan uit een groot aantal bestanddelen die erg verschillen in chemische structuur, fysiologische eigenschappen en gedrag in milieu. Er is experimenteel bewijs dat ze schadelijke effecten kunnen uitoefenen op de morfologie, metabolisme en reproductie van aquatische organismen (Bottoni en Fidente 2005).

Het besef dat de consumptie van geneesmiddelen een invloed kan hebben op het milieu ontstond reeds in 1976, toen clofibrinezuur ontdekt werd in het effluent van een waterzuiveringsstation in Kansas. Na gebruik worden namelijk veel geneesmiddelen geëxcreteerd in hun originele vorm, of in wateroplosbare metabolieten. Deze substanties worden maar gedeeltelijk verwijderd uit het afvalwater en komen dus terecht in het milieu. Niet enkel excretie leidt tot de aanwezigheid van farmaca in het milieu, maar eveneens het weggooiden ervan in het toilet zorgt hiervoor. Ook de landbouw, die grote hoeveelheden farmaca gebruikt als veterinaire geneesmiddelen en voeradditieven, draagt bij tot de lozing van farmaca in het milieu (Scheytt *et al.*, 2006).

Geneesmiddelen werken bij lage concentraties en zijn ontwikkeld om specifieke effecten uit te oefenen. Daardoor vormen ze een belangrijke pijler in de endocriene verstoring. Meer dan 80 farmaca en hun metabolieten zijn al terug te vinden in het milieu, waaronder: Ciprofloxacin, ofloxacin, sulfamethoxazole (antibiotica), atenolol (cardiovasculair geneesmiddel), ibuprofen (anti-inflammatoir), furosemide, hydrochlorothiazide (diuretica), ranitidine (gastrointestinaal geneesmiddel), en bezafibrate (lipide regulator) (Hernando *et al.*, 2006; Castiglioni *et al.*, 2006).

Geneesmiddelen zijn vaak lipofiel, om beter door te kunnen dringen in de cellen langsheen membranen en persistent, om te verhinderen dat ze inactief worden vooraleer ze een effect hebben uitgeoefend. Door deze eigenschappen hebben een aantal geneesmiddelen de neiging te bioaccumuleren in aquatische en terrestrische ecosystemen (Halling-Sorensen *et al.*, 1998).

In deze thesis zal de aandacht gevestigd worden op de klasse van **anti-androgenen**. Anti-androgenen representeren een grote groep van mogelijke endocriene verstoorders omdat androgenen hormonen zijn, die een erg belangrijke rol spelen in ontwikkeling en behoud van mannelijke seksuele karakteristieken (Roy *et al.*, 2004).

De androgeen receptor (AR) is een lid van de nucleaire receptor superfamilie en medieert het fysiologisch effect van androgenen als een ligand-afhankelijke transcriptie-factor. Binding van de androgenen aan de AR initieert de dimerisatie en translocatie naar de nucleus, waar de dimeer bindt aan een specifiek DNA sequentje, een androgen respons element (ARE), en dat leidt tot transcriptie van androgeen-afhankelijke genen. Androgenen reguleren de expressie van verschillende genen betrokken in celcyclus controle, apoptose, celdgroei en celdifferentiatie (Simon en Mueller, 2006).

Farmaceutische anti-androgenen, zoals flutamide, binden op de androgeenreceptor met gematigde affiniteit, maar inhiberen androgeen-geïnduceerde transcriptionele activiteit door te interfereren met DNA binding, en anderen, vb cyproterone acetaat, promoten DNA binding bij gematigde concentraties en induceren partiële agonist activiteiten (Toppari en Skakkebaek, 1998). Flutamide werkt dus als een antagonist van androgenen en kan zo in organismen zorgen voor endocriene verstoring, wat verder onderzocht wordt in het kader van deze thesis (Ankley *et al.*, 2004).

1.4.1.2 Natuurlijke endocriene verstoorders

Natuurlijke steroïden spelen een erg belangrijke rol bij de controle van reproductie en ontwikkeling in organismen. De minste verstoring van de unieke balans aanwezig in het organisme zelf, kan zorgen voor schadelijke effecten (Roy *et al.*, 2004).

Natuurlijke steroïd hormonen worden gesecreteerd door de bijnierschors, de testes, de ovaria en de placenta bij mens en dier. Het zijn lipofiele, vetoplosbare moleculen die vooral worden geëxcreteerd als wateroplosbare glucuronaten (Lintelmann *et al.*, 2003).

De steroïdhormonen kunnen onderverdeeld worden in progestagenen, glucocorticoïden, mineralocorticoïden, androgenen en oestrogenen (Raven en Johnson, 1999). Oestrogenen (oestradiol, oestrone en oestriol) zijn hoofdzakelijk vrouwelijke hormonen, belangrijk voor de reproductieve organen, de melkklieren, de huid en de hersenen. Progestagenen (progesteron) hebben meer een stabiliserende functie op de hormonale huishouding van de oestrogenen. Androgenen (testosteron, dehydroepiandrosteron en androsteendion) spelen een belangrijke rol bij weefsel regeneratie, vooral van de huid, de beenderen en de spieren.

Glucocorticoïden (cortisol) worden geproduceerd onder invloed van stress in de bijnierschors. Alle steroïdhormonen gaan langs het plasmamembraan en binden aan intracellulaire receptoren om hun functie uit te voeren.

De excretie van endogene geslachtshormonen gebeurt hoofdzakelijk via de urine en de fecaliën, waardoor steroïdhormonen ook in het milieu terecht kunnen komen. Oestrogene steroïden zijn al gedetecteerd in afvalwater in verschillende landen, met concentraties tot 70ng/l (Yin *et al.*, 2002). Door de grote aantallen mensen en (landbouw)huisdieren is de emissie van natuurlijke hormonen qua omvang niet meer als natuurlijk te bestempelen en worden er wel effecten waargenomen. Concentraties van 1 ng/l 17 β -oestradiol kunnen al leiden tot de inductie van Vtg in primaire viscellijnen (Hansen *et al.*, 1998).

Van nature blijken veel planten **fyto-oestrogenen** te bevatten, stoffen die de hormoonhuishouding van mens en dier kunnen verstoren. Vooral de plantensoorten die met behulp van bacteriën stikstof uit de lucht op kunnen nemen, zoals klavers en lucerne, bevatten hoge concentraties van deze stoffen. Zij produceren deze stoffen om de gewenste bacteriën aan te trekken en om het kiemen van bepaalde mycorrhizaschimmels te stimuleren. De fyto-oestrogenen zijn in te delen in een viertal stofgroepen; de isoflavonoïden (genisteïne, daidzeïne, formononetine, Biochanin A, glyciteïne), de coumestranen (coumestrol), de resorcyclische zure lactonen en de lignanen (enterolacton, enterodiol, matairenisol) (Baker, 1995).

Zo komen in effluenten van papierfabrieken β -sitosterolen van planten voor, die bij blootgestelde vissen kleinere gonaden en verlaagde concentraties geslachtshormonen in het plasma induceren (Gilman *et al.*, 2003).

Essentiële metalen worden ook geklasseerd als natuurlijke endocriene verstoorders. Koper en zink kunnen interfereren met het endocrien metabolisme ondanks hun belang bij verschillende enzymatische reacties (Medesani *et al.*, 2004).

1.4.2 Werkingsmechanismen

Het endocrien systeem is een zeer complex systeem, waardoor een groot aantal aangrijpingspunten open staan voor verstoring. Normaal zal een hormoon binden aan zijn receptor op het celoppervlak, in het cytoplasma of in de nucleus. Deze binding leidt dan tot verschillende reacties die een verandering veroorzaken in gen-expressie specifiek voor dat hormoon (Birnbaum, 1994). Algemeen hangt de grootte van de cellulaire respons op hormonen af van het aantal receptoren die bezet worden door een hormoon, wat op zijn beurt gerelateerd is aan de hormoonconcentratie (Thomas, 2000). Endocriene verstoorders beschikken over verschillende mechanismen om de normale hormoonhuishouding te verstoren:

1.4.2.1 Rechtstreekse interactie met het endocrien systeem

- Een endocriene verstoorder kan binden aan een geslachtshormoonreceptor en zich gedragen als een geslachtshormoon (hormoonmimicry), doordat na binding op de receptor ook activatie van de receptor plaatsvindt (Gezondheidsraad, 1999). De activatie van de hormoonreceptor leidt tot hetzelfde effect dat veroorzaakt kan worden door endogene hormoonactie. De kracht van deze exogene agonisten, is afhankelijk van de affiniteit voor de receptor en van de mogelijkheid om de receptor te activeren. Voorbeelden van stoffen die effecten van oestrogeen nabootsen zijn de synthetische oestrogenen Diethylstilbestrol (DES) en ethinylestradiol. Ook oefenen de meeste xeno-oestrogenen hun effect uit door agonistische werking op de hormoonreceptor (Lintelmann *et al.*, 2003).
- Een endocriene verstoorder kan binden aan een geslachtshormoonreceptor zonder die receptor te activeren. De bezetting van de receptor leidt ertoe dat het echte hormoon niet meer kan binden. De stof werkt dan als hormoon-antagonist (competitieve inhibitie) (Gezondheidsraad, 1999). Typische antagonisten voor hormoonreceptoren zijn de herbiciden linuron, vinclozolin en hun metabolieten. Ook Tamoxifen dingt mee naar de bindingsplaats op de androgeen en oestrogeen receptoren (Lintelmann *et al.*, 2003).
- Binding van endocriene verstoorders op die delen van het DNA waar zich de *responsive elements* van de geslachtshormonen bevinden leidt ook tot verstoring van het endocriene systeem (Gezondheidsraad, 1999).
- Extra receptoren kunnen ook geïnduceerd worden in de cel, waardoor het effect van hormonen op de celactiviteit sterk toeneemt (Arukwe, 2001). Zoals blootstelling aan oestradiol het aantal oestrogeenreceptoren zal doen toenemen (Pakdel *et al.*, 1991).

1.4.2.2 Indirecte interactie met het endocrien systeem

Een endocriene verstoorder kan ook aangrijpen op het metabolisme, het transport en de uitscheiding van het geslachtshormoon, en alle eiwitten en enzymen die daarbij betrokken zijn.

Hormoonproductie kan verhinderd worden door de inhibitie van belangrijke enzymgecatalyzeerde reacties. De biosynthese van oestrogenen omvat een omzetting van testosteron naar oestrogeen dat gecatalyzeerd wordt door aromatase. Xenobiotica kunnen dit enzyme inhiberen, wat leidt tot een hoger testosterongehalte en een lager oestrogeengehalte.

Hormoonmetabolisme kan ook beïnvloed worden door inductie van hormoonmetaboliserende enzymen, zoals CYP450 in de lever. Deze enzymen hebben een belangrijke functie in de synthese en degradatie van steroïd hormonen en hun productie of activiteit kan beïnvloed worden door verschillende xenobiotica zoals PCB-congeneren en dioxines (Kazeto *et al.*, 2004).

Een beïnvloeding op het transport van hormonen via de bloedbaan naar doelwitweefsels en organen kan ook leiden tot een verstoring van het endocrien systeem. Slechts een klein deel van de lipofiele componenten circuleren vrij in het bloed, omdat ze voornamelijk gebonden zijn op speciale hormooncarrier proteïnen zoals albumines en globulines. De intensiteit van receptor-gemedieerde effecten is afhankelijk van de hoeveelheid vrije hormoonbestanddelen omdat enkel vrije hormonen kunnen binden en de receptor activeren. Chemicaliën die concurreren met geslachtshormonen voor binding op de plaats van transporters, kunnen dus de concentratie vrij hormoon, en dus de concentratie effectief hormoon, doen stijgen. Zo werd bij zwangere muizen, blootgesteld aan een congener van PCB :3,3', 4,4'-tetrachlorobiphenyl, vastgesteld dat dit congener op transthyretine bindt, en zo een daling van foetaal thyroxine concentraties in het plasma kan veroorzaken (Darnerud *et al.*, 1996).

Neerregulatie van geslachtshormonen wordt toegekend aan sommige anti-oestrogene bestanddelen, vooral aan 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), dat een exogene agonist is van de arylhydrocarbon receptor. Deze receptor is niet direct betrokken in hormoonmetabolisme, maar de activatie ervan beïnvloedt het endocrien systeem door verschillende manieren nl. : een stijging in degradatie van oestrogenreceptoren, een inductie van oestradiolmetaboliserende enzymen en een inhibitie van gen-expressie gecontroleerd door oestradiol of groeifactoren (Lintelmann *et al.*, 2003).

1.4.3 Effecten van endocriene verstoorders

De effecten van endocriene verstoorders zullen eerst optreden op moleculair niveau, pas later op cellulair niveau en op heel het organisme, om tot slot gehele ecosystemen te beïnvloeden (Arukwe, 2001).

1.4.3.1 Effecten bij vissen

A.Effecten op moleculair niveau

De reproductieve impact van blootstelling aan xeno-oestrogenen bestaat vooral uit de inductie van synthese van Zr proteïnen en Vtg (Sarmah *et al.*, 2006). In mannelijke vissen hebben Zr proteïnen en Vtg geen functie, terwijl ze bij gezonde vrouwtjes bijna continu aanwezig zijn. De directe gevolgen van Zr proteïnen en Vtg synthese in mannetjes is nog niet helemaal duidelijk, maar kan een daling van calcium in de botten en vinnen teweegbrengen, lever hyperplasie/hypertrofie en nierschade veroorzaken. Het zorgt ook voor een verspilling van energie bij mannetjes en bij vrouwtjes en zal dus zeker leiden tot een daling in reproductieve capaciteit. Er zijn waarnemingen (Arukwe, 2001) van premature rijping in vrouwelijke platvissen door oestrogenblootstelling, wat zorgde voor onnodige productie van gonadotrofines, die niet-seizoensgebonden vroege ontwikkeling van de ovaria veroorzaakten. Ook bestaat er een hypothese die zegt dat verstoorde Zr proteïnen synthese in vrouwtjes, abnormale eierschalen voortbrengt, resulterend in een lagere kwaliteit van het ei of problemen met het uitkomen en de overleving van de nakomelingen (Arukwe, 2001).

Tijdens seksuele ontwikkeling en reproductie, zijn Cytochroom P450 aromatase activiteiten en Aryl hydrocarbon hydroxylase activiteiten erg beïnvloedbaar door concentraties van oestradiol in vrouwelijke vissen. Door verstoring van dit systeem kan de intrinsieke balans van hormonen, signaaltransmissie en immuunsysteem verloren gaan, wat resulteert in groei, gezondheid en gedragsveranderingen (Greytak *et al.*, 2005).

B.Effecten op gameten en gonaden

Polluenten kunnen sperma en ei-ontwikkeling indirect beïnvloeden via verstoring van het hormonaal milieu en direct via verstoring van het lokaal hormonaal milieu waarin de gameet zich ontwikkelt (Kime, 1999).

Zowel de kwaliteit als de kwantiteit van sperma kan beïnvloed worden door endocriene verstoring. Wijzigingen in de secreties van de hypothalamus en hypofyse, of het onvermogen van de Leydig cellen om het juiste steroïd hormoon te produceren, kunnen de ontwikkeling van spermacellen verstoren. Ook kan de groei van de testes geïnhibeerd worden waardoor er geen mature spermacellen ontstaan (Kime en Nash, 1999).

De bevruchtingscapaciteit van sperma bij vissen daalt onder de invloed van endocriene verstoorders (Graham, 2001). Sperma van teleosten verschilt met dat van zoogdieren omdat het onbeweeglijk is tot aan de ejaculatie en pas geactiveerd wordt door contact met water. Het blijft ongeveer 2 minuten beweeglijk en in die tijd moet het de oöcyt binnendringen via de micropilus (Kime *et al.*, 2001). Daarna neemt de beweeglijkheid van het sperma snel af omwille van celschade veroorzaakt door het activatieproces en uitputting van energiereserves (Cosson *et al.*, 1999). Vele endocriene verstoorders hebben een effect op de spermatogenese in de testes, waardoor er afwijkingen ontstaan in de morfologie van het sperma, vaak met een verminderde beweeglijkheid tot gevolg.

Ook op de ontwikkeling van de ovaria en de kwaliteit en de kwantiteit van de eieren kunnen effecten van endocriene verstoring gezien worden. Levenslange blootstelling van zebravissen aan 5ng/l ethinyl-oestradiol kan namelijk leiden tot het stoppen van de ontwikkeling van eieren geproduceerd op het vroege blastula stadium (Kime en Nash, 1999). Het aantal oöcyten kan ook afnemen doordat endocriene verstoorders de ontwikkeling van oöcyten tegen gaan door in te werken op onder andere de biosynthese van oestrogenen en de productie van Vtg (Tyler en Sumpter, 1996).

Zink is een essentieel element voor de ontwikkeling in sperma en oöcyten, en de natuurlijke balans wordt behouden door metallothioneïnen, waarvan de productie gereguleerd wordt door veranderingen in gonadale steroïden tijdens de reproductieve cyclus. Zware metalen die metallothioneïnen synthese induceren in de gonaden of de lever, kunnen dus de gameetontwikkeling verstoren door het verstoren van de normale zink homeostase (Kime, 1999).

C.Effecten op seksuele differentiatie

Endocriene verstoorders kunnen seksuele differentiatie van de gonaden, tijd van seksuele rijping, Gonado-Somatische Index, reproductieve tractus en de morfologie van gonaden veranderen. Blootstelling van mannelijke vissenlarven aan oestrogene hormonen tijdens gevoelige fasen van gonadale ontwikkeling, kan het fenotype doen vervrouwelijken. Mannelijke genotypes worden dan vrouwelijke fenotypes. Zoals te zien was bij blootstelling van medaka aan nonylfenol, wat resulteerde in het ontstaan van ovo-testes. Secundaire

seksuele geslachtskenmerken en lichaamsmarkeringen zullen ook niet goed ontwikkelen, wat leidt tot een abnormaal of afwezig reproductief gedrag (Arukwe, 2001).

Imposeks, een conditie die voortvloeit uit verstoorde gonadale differentiatie en typisch omschreven als de simultane aanwezigheid van ovaria en testiculair weefsel in hetzelfde geslachtsorgaan, ontstaat ook door endocriene verstoring. In vervrouwelijkte mannelijke dieren, kunnen oöcyten over het gehele testesweefsel verspreid zijn of voorkomen in afgesloten regio's in het testiculaire weefsel. Experimenten met transgene zebravissen toonden aan dat de oestrogeen receptor erg actief is tijdens seksuele ontwikkeling en dat kan een reden zijn dat de periodieke gonadale differentiatie ontvankelijk is voor verstoring door oestrogene stoffen. Na het toedienen van oestrogenen tijdens de periode van gonadale differentiatie kan imposex ontstaan, zoals gezien werd bij een aantal vissoorten (Japanese medaka en de karper) (Milnes *et al.*, 2006).

Tributyltin (TBT), een antiwieren middel, kan aanleiding geven tot het ontstaan van imposex. Bij blootstelling van mannelijke zebravissen aan TBT, zag men een vermannelijking (Santos *et al.*, 2005(b)).

Er zijn twee hypothesen over de werking van TBT. De ene hypothese gaat uit van een verstoring van de geslachtshormoonregulatie. Het is namelijk duidelijk dat blootstelling aan TBT leidt tot een verhoging van het testosteronniveau. De andere hypothese zoekt de oorzaak in een neuro-endocrien mechanisme. Voor die laatste hypothese pleit dat juist zeer jonge vissen, waarbij de primaire geslachtsorganen zich nog niet hebben ontwikkeld, het meest gevoelig zijn voor TBT. TBT illustreert dat er stoffen bestaan die al bij zeer lage concentraties de geslachtshormoonhuishouding van slechts een bepaald aantal diersoorten ontregelen. Effecten van dergelijke stoffen zijn zowel in veld- als in laboratoriumonderzoek gemakkelijk over het hoofd te zien (Milnes *et al.*, 2006).

D.Effecten op populaties

In vissen kan blootstelling aan endocriene verstoorders leiden tot veranderingen in reproductieve fysiologie en morfologie. Bezorgdheid over het effect van endocriene verstoorders op het dierlijke leven wordt gedreven door de hypothese die zegt dat verstoring van het reproductief systeem enorme gevolgen kan hebben op de reproductieve capaciteit van populaties (Nash *et al.*, 2004)

Als vissen worden blootgesteld aan agentia die de geslachtshormonen veranderen, kan de geslachtsratio omslagen. Wanneer dit gebeurt in vispopulaties die werden blootgesteld aan oestrogenen of anti-androgenen, is de ratio typisch meer gericht naar de vrouwtjes (James, 2006). Door verstoring van deze geslachtsratios, verandert de reproductieve mogelijkheid van de vispopulatie.

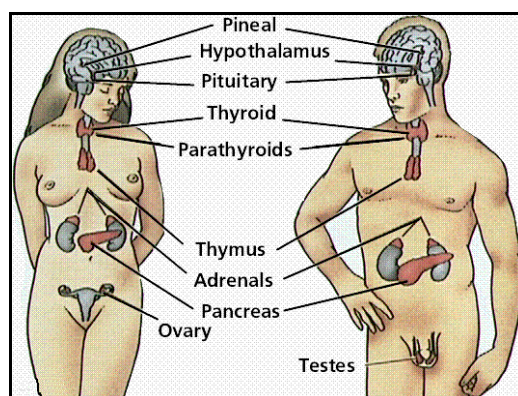
De onmiddellijke blootstelling van vis aan endocriene verstoorders kan dus diepgaande gevolgen hebben, die de sexualiteit van het dier op verschillende manieren verandert, waardoor de normale reproductiecapaciteit verloren gaat (Arukwe, 2001).

1.4.3.2 Effecten bij mensen

Bij de mens kan men nog geen acute veranderingen zien die aan endocriene verstoring zouden kunnen toegeschreven worden (zie figuur 1.3). Wel kunnen subtiele effecten van langdurige blootstelling worden waargenomen zoals stijgende incidenties van het Androgeen-Insensiviteits Syndroom (AIS), prostaat- en testeskankerontwikkeling, alsook ontwikkelingsdefecten van de reproductionele tractus (Simon en Mueller, 2006).

Rapporten over een dalende spermakwaliteit werden reeds gepubliceerd sinds de jaren '70 en gelijkaardige bevindingen worden steeds vaker gezien. Volgens Sharpe en Skakkebaek (1993) kunnen oestrogenen FSH secretie door de mannelijke hypofyse inhiberen, wat resulteert in onderdrukking van de vermenigvuldiging van Sertolicellen na testiculaire differentiatie. Hoe lager het aantal Sertolicellen in de foetus, hoe minder sperma er kan geproduceerd worden tijdens het volwassen leven. In vertebraten inhibeert oestradiol ook de Leydig cel precursoren ontwikkeling in de testes en zo daalt de testosteron productie, met niet afgewerkte masculinisatie tot gevolg (hypospadias) (Vidaeff en Sever 2005). Verschillende onderzoeken tonen een stijging van de prevalentie van cryptorchidisme en hypospadias aan. Testiculaire misvorming en hypospadias worden gerelateerd aan verstoorde foetale seksuele differentiatie. Al deze condities zijn onderling gelinkt, testiculaire kanker is geassocieerd met het niet indalen van de testes, wat ook gelinkt is aan hypospadias. Cryptorchidisme is een risico factor voor testiculaire kanker, maar ook voor een lage spermakwaliteit (Toppari en Skakkebaek, 1998).

Wetenschappelijk onderzoek toonde aan dat Amerikaanse meisjes op jongere leeftijd de puberteit bereikten en dit werd gevolgd door resultaten die in een gelijkaardige bevolkingsgroep duiden op een vervroegde puberteitsontwikkeling bij jongens. Mogelijke verklaringen hiervoor zijn de verhoogde zwaarlijvigheid, veranderde sociale factoren en de aanwezigheid van vrouwelijke hormonen in het milieu. Jonge Puerto-Ricaanse meisjes met vervroegde borstontwikkeling hadden in 68% van de gevallen ftalaten in hun bloed in tegenstelling tot de controlegroep. Ftalaten zijn stoffen die harde plastic zacht maken. Echter is het niet zo dat een verhoogde aanwezigheid van deze stoffen in het bloed, automatisch wil zeggen dat deze stoffen verantwoordelijk zijn voor de vervroegde borstontwikkeling (Vandenbergh *et al.*, 1996). Valproaat, een anti-androgeen en anti-progesteron kan ook bijdragen tot vertraagde puberteit, vooral bij mannen met epilepsie (Death *et al.*, 2005). Een aantal minder genoemde aandoeningen die gerelateerd worden aan endocriene verstoring veroorzaakt door milieufactoren, zijn prostaat- en borstkanker bij de man en endometriumkanker bij de vrouw (Vandenbergh *et al.*, 1996).



Figuur 1.3: Endocriene klieren bij de mens. Deze klieren zijn mogelijk vatbaar voor endocriene verstoring.

Hoofdstuk 2: Doelstelling

Om een geïntegreerd en meer volledig beeld te kunnen geven van de effecten van een endocriene verstoorder, moet er onderzoek verricht worden naar meerdere niveaus van biologische organisatie, zoals naar de gen-expressie, het hele organisme, het gedrag en het effect op het ecosysteem. De meeste studies over endocriene verstoring beperken zich tot het bestuderen van effecten op één niveau, zoals het nagaan van het Vtg gehalte bij vissen. Zo verliest men belangrijke geïntegreerde informatie en weet men niet of een blootstelling ook effecten uitoefent op het reproductief gedrag en dus de overleving van een soort. Het is juist wanneer de overleving van een soort in het gedrang komt, dat het effect van een blootstelling nadelig kan genoemd worden. Wanneer men ook naar hogere biologische niveaus kijkt, krijgt men een ecologisch relevanter en juist beeld van de effecten die optreden. Het onderzoek naar deze hogere biologische niveaus is echter complexer en duurt langer. Men neemt aan dat biomerkers op een lagere biologische hiërarchie (moleculaire en biochemische veranderingen) sneller veranderen dan biomerkers op een hogere biologische hiërarchie (fysiologische, cytologische en organisme aanpassingen), en zo beter een beeld kunnen geven van vervuiling in het milieu (Wu *et al.*, 2005).

Het doel van deze thesis is om een correlatie te vinden tussen de verschillende niveaus van biologische organisatie (zie figuur 2.1) door gebruik te maken van innovatieve technieken, waaronder die van de microarray. Als testspecies gebruiken we *Danio rerio*, een door de OESO erkend testorganisme, waarvan het genoom volledig gekarakteriseerd is. Deze vissen worden blootgesteld aan flutamide, een niet-steroïdaal anti-androgeen, dat vaak gebruikt wordt in screening testen om endocriene actieve componenten te detecteren. Het is dus een modelstof waarmee we de karakteristieken van in het milieu aanwezige anti-androgenen kunnen bepalen. De blootstelling gebeurt met een doorvloeisysteem, dat er voor zorgt dat de concentratie gedurende de gehele blootstelling constant blijft. Bij blootstelling aan een endocriene verstoorder, zoals flutamide, zullen sommige genen in de blootgestelde groep meer of minder tot expressie komen dan de genen in de controle groep. Deze differentiële gen-expressie wordt gevisualiseerd en gekwantificeerd op een microarray. Op die manier wordt een gen-expressie patroon gegeneerd, kenmerkend voor een bepaalde endocriene verstoorder (Wiseman en Singer, 2002). Gen-expressie alleen is niet voldoende om de ecologische impact van een stof te bepalen en daarom moeten de resultaten van de gen-expressie gecorreleerd worden aan effecten die optreden op hogere niveaus van biologische organisatie (Moens *et al.*, 2003). Daarom worden er ook andere biomerkers nagegaan. Wanneer we naar een hoger niveau kijken, kijken we naar de spermakwaliteit aan de hand van flow cytometrie, bepalen we de fertiliteit en gaan het Vtg gehalte na in het bloed. Om nog ecologisch relevanter te werken, zal in deze studie ook het gedrag geregistreerd worden met behulp van een gedragsanalyse, in samenwerking met de bio-informatica van de universiteit van Antwerpen, de ISLab, die ook een op maat gemaakt programma hebben om de statistische verwerking van deze technieken uit te voeren.

Uiteindelijk willen we dan een uniek en geïntegreerd beeld vormen van de effecten van een endocriene verstoorder in het milieu en daarbij zoeken we dus ook naar nieuwe methoden voor snelle evaluatie van endocriene eigenschappen van chemicaliën. De integratie van deze parameters zal leiden tot nieuwe biomerkers voor endocriene verstoring, die directer verbonden zijn met effecten op de reproductieve gezondheid van organismen.



Figuur 2.1: Verschillende niveaus van biologische organisatie. Gen-expressie ligt aan de basis van elke fysiologische respons en kan daardoor een vroege waarschuwing zijn voor effecten die kunnen optreden op hogere niveaus. De hogere niveaus vormen de fysieke manifestatie van de moleculaire en vroege fysiologische respons van een organisme op zijn omgeving. Hoe complexer het niveau is, hoe later effecten zichtbaar zullen zijn, maar hoe groter de ecologische relevantie.

Deze thesis kadert ook in een groter geheel waarvan het doel is om op een geïntegreerde wijze de effecten van endocriene verstoorders op verschillende niveaus van biologische organisatie na te gaan en de ecologische impact van deze endocriene verstoorders te ontrafelen. In de predictieve toxicologie stelt men namelijk de hypothese dat specifieke groepen stoffen (gegroepeerd volgens toxicologisch eindpunt, mechanisme, structuur, doelorgaan etc.) unieke mRNA expressie profielen kunnen induceren. Hierdoor wordt het mogelijk om gen-expressie patronen te gebruiken voor de karakterisatie van stoffen met een ongekend werkingsmechanisme (Pennie *et al.*, 2001). In de toekomst zal men dan door vroege veranderingen in het gen-expressie patroon na te gaan, kunnen voorspellen wat de impact van een stof is, nog voor de effecten in het ecosysteem zichtbaar zijn.

Hoofdstuk 3: Materialen en Methoden

3.1 Testspecies

We gebruiken de zebravis (*Danio rerio*) als testspecies voor de blootstelling. De zebravis heeft in de laatste 20 jaar een belangrijke plaats ingenomen als modelorganisme voor onderzoek in gewervelde dieren en de mens. De zebravis heeft namelijk vele eigenschappen die deze vis een ideaal model maakt voor onderzoek naar ontwikkeling en is de eerste vertebraat die bruikbaar is om op grote schaal genetische screening te verrichten. Tevens werd de zebravis door de OESO ('organisatie voor economische samenwerking en ontwikkeling') erkend als testorganisme (Fishman, 2001).

De kracht van het zebravismodel ligt vooral op het terrein van de genetica en de embryologie. De genomsequentie is ondertussen bekend en het blijkt dat 90% van alle humane genen een overeenkomstig gen in de zebravis bezitten. Zebravissen zijn kleine zoetwatervissen en gemakkelijk te huisvesten in een recirculerend systeem, broeden continu doorheen het jaar en hebben korte termijn generatietijden van 3 tot 5 maanden.

Een groot voordeel is de toegankelijkheid van de embryo's; de reproductie gebeurt immers door externe bevruchting en externe embryo-ontwikkeling (ovipare species), wat chirurgische ingrepen overbodig maakt en het proces van observatie en manipulatie van ontwikkelende embryo's erg vergemakkelijkt. De embryo's zijn bovendien transparant en daarom uitstekend geschikt voor microscopische technieken (Spitsbergen en Kent, 2003). De kleine afmetingen van de zebravis hebben vele voordelen, maar creëren ook uitdagingen, zoals bij de voorbereiding van een individueel orgaan histologie of isolatie van orgaanspecifiek RNA.

Behalve voor fundamenteel ontwikkelingsbiologisch onderzoek, wordt de zebravis nu ook steeds meer gebruikt als model voor humane ziekten en bij toxicogenomics om de effecten van toxische stoffen en pollutanten in het milieu te analyseren. De zebravis is namelijk zeer permeabel voor kleine moleculen toegevoegd aan het water, waardoor het effect van het milieu op deze vissen gemakkelijk bestudeerd kan worden (Aleström *et al.*, 2006).

Hoewel het endocrien systeem van vissen verschilt van dat van de mens, zullen effecten gevonden bij vissen een waarschuwing zijn voor de effecten die bij zoogdieren zullen optreden.

De zebravissen worden geleverd door een commerciële verdeler (Antwerp aquaria), die de vissen invoert vanuit de VS, Singapore of Indonesië. De zebravis is dus een tropische vis, die in water op een temperatuur van $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ wordt gehouden.

3.2 Teststof

Als teststof gebruiken we flutamide, een niet-steroïdaal anti-androgeen, dat vaak gebruikt wordt in de medische wereld, voornamelijk als een geneesmiddel voor prostaatkanker. Ook in screening testen staat het bekend als een stof om endocriene actieve componenten te detecteren. Flutamide is dus een modelstof, waarmee we de karakteristieken van in het milieu aanwezige anti-androgenen willen bepalen.

In 2005 is er een grootschalig onderzoek gebeurd naar de mortaliteit bij verschillende vissoorten, waaronder ook de zebravis, en daaruit hebben we subletale concentraties afgeleid om te gebruiken in ons experiment; 100 µg/l en 1000 µg/l (<http://www.oecd.org>).

De flutamide wordt aangekocht per gram. We maken telkens een moederstock van 1 g/l. Deze stock wordt verder verdund in de mengaquaria van het doorvloeisysteem tot concentraties van respectievelijk 100 en 1000 µg/l. Het solvent in de moederstock is aceton. De finale hoeveelheid aceton bedraagt steeds minder dan 0,1 %.

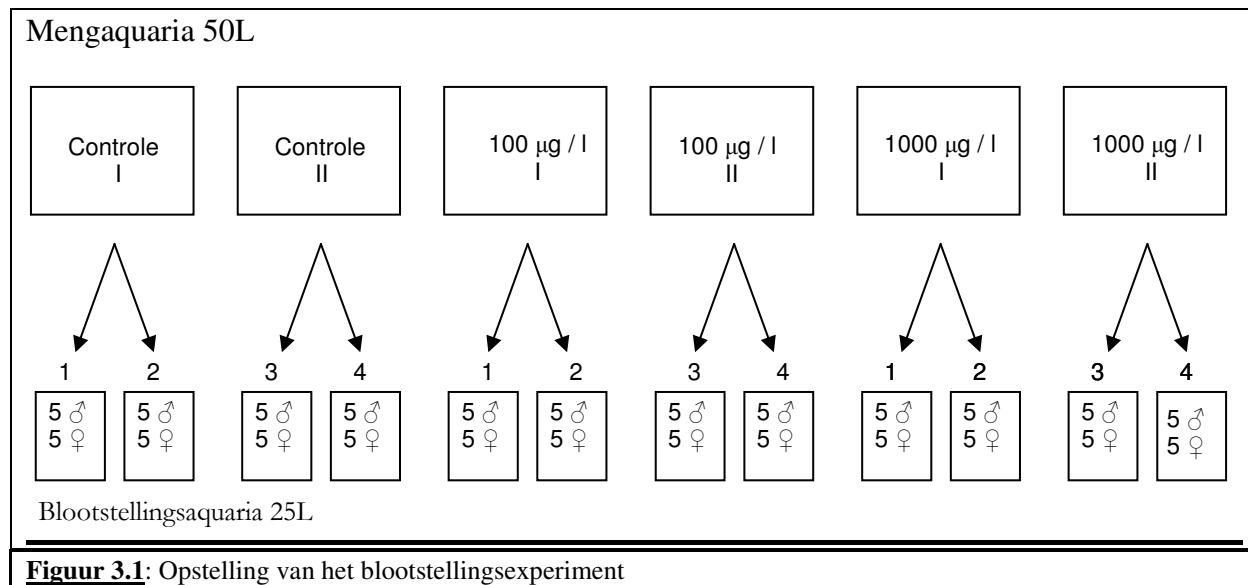
3.3 Blootstelling

De blootstelling gebeurt aan de hand van een doorvloeisysteem (zie figuur 3.1). Via 6 mengaquaria worden 12 aquaria voorzien van belucht drinkwater. Elk mengaquaria is verbonden met een peristaltische pomp, die op zijn beurt verbonden is met 2 blootstellingsaquaria. Het water wordt met buisjes uit de mengaquaria, via de pomp, naar de blootstellingsaquaria gevoerd. De pomp zorgt er dus voor dat er simultaan water wordt gepompt in de aquaria en de concentratie van elke conditie gedurende het gehele experiment constant blijft. Zo is er ook een volledige verversing van de aquaria elke 33 uur. In de blootstellingsaquaria zitten zuurstofsteentjes en verwarmingselementen en telkens 5 mannetjes en 5 vrouwtjes. We werken met drie verschillende blootstellingcondities:

- de controlegroep, die wordt blootgesteld aan aceton, het oplosmiddel van flutamide
- een groep die blootgesteld wordt aan een lage concentratie (100 µg/l) flutamide
- een groep die blootgesteld wordt aan een hoge concentratie (1000 µg/l) flutamide

Van alle condities zijn er 4 aquaria voorzien. Van alle aquaria worden de fecunditeit (het totaal aantal eitjes), bevruchtingspercentage en ontluiking gedurende week 1 en week 4 bepaald. Aquaria 1 en 2 worden gebruikt voor de vitellogeninebepaling en bepaling van de spermakwaliteit, aquaria 3 en 4 worden gebruikt voor genomics.

Bij het begin van het experiment wordt in de mengaquaria Controle I en II, die 50l water bevatten, 50 ml aceton toegevoegd, want dat is de hoogste concentratie aceton dat gebruikt wordt tijdens het experiment. In de mengaquaria 100 µg/l flutamide I en II wordt 5 ml flutamide gevoegd en in de mengaquaria 1000 µg/l flutamide I en II, wordt 50 ml flutamide gevoegd. In de blootstellingsaquaria wordt op de eerste dag ook teststof toegevoegd, zodat de concentratie in deze aquaria overeenkomt met de concentraties in de mengaquaria (in de controleaquaria wordt 25 ml aceton toegevoegd, want de aquaria bevatten 25 l water, in de 100 µg/l flutamide wordt 2,5 ml flutamide toegevoegd en in de 1000 µg/l flutamide wordt 25 ml flutamide toegevoegd). Na de eerste dag worden de mengaquaria telkens leeggezogen tot er nog 10l over blijft, en worden ze bijgevuld tot 50l. Bijgevolg wordt er ook gespiked voor 40l en niet voor 50l (dus 40 ml aceton in de controle-mengaquaria, 4ml flutamide in de 100 µg/l flutamide en 40 ml flutamide in de 1000 µg/l flutamide). Zo zorgen we ervoor dat de concentratie flutamide juist en constant blijft.



3.4 Analyse differentiële gen-expressie met microarrays

3.4.1 Dissectie

Op dag 4 van het experiment worden de vissen van aquaria 3 en 4, van alle blootstellingcondities, gedood door decapitatie. Dit is de meest optimale manier voor het doden van vissen omdat dit het minste stress toebrengt en zo dus onze resultaten het minst zal beïnvloeden. Op dag 28 wordt dit herhaald voor alle aquaria 3 en 4 en op dag 30 worden de vissen uit de aquaria 1 en 2 gedood (vitellogenine- en sperma viabiliteitsbepaling). Op dag 28 wordt tevens de Ovarium Somatische Index (OSI) bepaald. De organen (ovaria en testes) worden in cryovails bewaard, mannetjes en vrouwtjes gescheiden. Ze worden eerst in vloeibare stikstof en dan, na de volledige dissectie, op $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in de diepvriezer bewaard.

3.4.2 RNA extractie

Het RNA wordt geëxtraheerd uit de gonaden op dag 4 en 28 van het experiment. Voor de testes en de ovaria wordt gebruik gemaakt van de TRIzol methode van Invitrogen. Aangezien RNA erg snel afbreekt moeten we voorzichtig zijn en de stalen steeds bewaren op ijs of in $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ook het dragen van handschoenen en het gebruik van RNase-vrij materiaal (Biopur epjes en tipjes) dragen bij tot het beschermen van het RNA en zo wordt voorkomen dat RNase het RNA afbreekt.

A. Homogenisatie

Als eerste stap in het protocol moeten alle weefsels gehomogeniseerd worden. Het weefsel wordt zeer fijn geplet met behulp van een vijzel en mortier in vloeibare stikstof en een deel wordt in 1,5 ml Biopur epjes bewaard. Dit weefsel wordt gebruikt voor de RNA extractie, de rest van het weefsel wordt terug ingevroren in $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

B. RNA extractie

Het weefsel wordt opgelost in 1ml TRIzol Reagent per 50-100mg weefsel. Het staalvolume mag niet meer dan 10% van het gebruikte homogeniseervolume TRIzol Reagent bedragen. Het reagens bestaat uit fenol en guanidine isothiocyanaat en zorgt voor het behoud van de integriteit van het RNA terwijl celcomponenten worden opgelost. Om de complete dissociatie van nucleoproteïnencomplexen toe te laten, incuberen we de stalen voor 5 minuten bij 15-30 °C.

Voor stalen met een hoog vet-, proteïne-, saccharide- of extracellulair materiaal- gehalte, kan eerst het onoplosbaar materiaal verwijderd worden door te centrifugeren op 12000g voor 10 minuten bij een temperatuur van 2-8 °C. Het supernatans bevat dan het RNA en de pellet het onoplosbaar materiaal. Het supernatans wordt dan overgebracht in een nieuw epje, waarna ook een incubatie gebeurt van 5 minuten bij 15-30 °C. Dan wordt er 200µl chloroform toegevoegd, geschud, geïncubeerd voor 2 minuten op kamertemperatuur en gecentrifugeerd aan 12000g voor 15minuten op een temperatuur van 2-8 °C. Deze centrifugatie resulteert in een scheiding van drie fasen. Het RNA is aanwezig in de bovenste kleurloze fase (± 60% van het TRIzol Reagent volume), een witte interfase bevat DNA en proteïnen en de onderste rode fase fenol-chloroform.

Door de waterige fase in een nieuw epje te brengen en te mengen met isopropyl alcohol(0,5 ml/1ml TRIzol Reagent) precipiteert het RNA. We laten de stalen dan incuberen overnacht op -20°C. Wanneer we nu centrifugeren(12000g voor 10 minuten bij 2-8 °C), vormt het RNA-precipitaat een gel-achtige structuur op de onderkant van het epje. Na het verwijderen van het supernatans, moet het RNA gewassen worden in 1ml 75% ethanol. Deze oplossing wordt gecentrifugeerd (7500g voor 5 min op 2-8 °C) en de ethanol wordt verwijderd. De pellet wordt vervolgens opgelost in diethylpyrocarbonate (DEPC) -behandeld (RNase-vrij) water.

C. DNase behandeling

De DNase behandeling wordt uitgevoerd om het overige DNA en andere onzuiverheden uit de stalen te verwijderen. Afhankelijk van de hoeveelheid DEPC waarin de stalen zijn opgelost, moeten er andere volumes DNase buffer, RNase-vrij DNase en RNase inhibitor worden toegevoegd (zie tabel 3.1).

	Testes	Ovaria
RNA staal (µl)	30	60
DNase buffer (µl)	4	7
RNase-vrij DNase (µl)	1	2
RNase inhibitor (µl)	1	1

Tabel 3.1: Volumes die nodig zijn voor de DNase behandeling van mRNA geëxtraheerd uit testes en ovaria.

Nadien incuberen we voor 30 minuten op 37°C. Met RNase-vrij water worden de volumes dan aangevuld tot 200µl. Drie wasstappen, twee met fenol-chloroform en een met chloroform, zorgen ervoor dat het resterende DNA verwijderd wordt. Tussen deze wasstappen wordt telkens het supernatans overgebracht naar een nieuw Biopur epje waarmee verder wordt gewerkt. Na het toevoegen van 20µl 3M natrium acetaat en 400µl 100% ethanol, incuberen we de stalen overnacht op -20°C. Vervolgens centrifugeren we (14000g voor 15 minuten bij 2-8 °C), verwijderen we het supernatans en lossen we de pellet op in 200 µl 70% ethanol om het geheel nog eens te kunnen wassen. Aangezien er geen ethanol mag achterblijven, centrifugeren we nog een keer (14000g, 5 minuten) en verwijderen we de restjes ethanol. De

pellet wordt opgelost in een gepaste hoeveelheid DEPC-behandeld water (30 µl voor de testes en 60µl voor de ovaria).

3.4.3 NanoDrop

Na de DNase-behandeling moet de kwaliteit en de kwantiteit van het RNA nagegaan worden aan de hand van de Nanodrop spectrofotometer. Dit wordt gedaan met het programma Nanodrop 3.0.0[®] via nucleïnezuur-metingen. Om de absorptiewaarden bij 230nm, 260nm en 280nm te kunnen meten, wordt een druppel (1µl) van het staal aangebracht op het oogje van een meetplaatje. Bij 230nm worden de fenolische componenten waargenomen, bij 260nm het RNA en bij 280nm de eiwitten. De verhouding van 260nm op 280nm geeft de hoeveelheid aanwezige zouten en proteïnen weer en de verhouding van 260nm op 230nm geeft de hoeveelheid aanwezige contaminanten uit de kit weer. Deze verhoudingen geven de zuiverheid van het staal weer en moeten minimum 1.5 zijn, optimaal meer dan 2 om een goede kwaliteit van het RNA te kunnen waarborgen. We kunnen hier eveneens de concentratie RNA bepalen.

3.4.4 Aminoallyl labeling van RNA

Nu het mRNA uit het weefsel is geïsoleerd, kunnen we dit omzetten naar cDNA met behulp van Reverse transcriptase. Tegelijkertijd worden er aminoallyl nucleïnezuren ingebouwd die later zorgen voor de binding met de Cy Dy's, de kleurstoffen die voor de merking van het blootgesteld en controle DNA worden gebruikt. Het gemerkte cDNA zal hybridiseren met de oligonucleotiden op de microarray. Bij de hybridisatie treedt dan fluorescentie op, die gemeten wordt met een confocale scanner.

Vooraleer we kunnen starten met de labeling, moeten we zeker zijn dat het geïsoleerde RNA aan alle kwaliteiten voldoet. Zoals eerder vermeld, moeten de absorptieratios 260/280 en 260/230 minstens 1.5 bedragen. Bijkomend moet de concentratie minimaal 7-10µg bedragen in 18.5 µl RNase-vrij water.

A. Labeling

Om 7 µg RNA in de reactie te gebruiken, moeten we een correct volume geëxtraheerd RNA nemen (zie berekeningen Labeling). Daarbij wordt 2 µl Random Hexameer primers toegevoegd. 2 µl mRNA dat dient als test en referentie RNA (Lucidea) wordt toegevoegd aan respectievelijk de blootgestelde stalen en de controle stalen als controle RNA. We lengen het geheel aan met RNase vrij water tot een volume van 18,5 µl. Tijdens een incubatie van 10 minuten op 70°C kunnen de primers binden aan het RNA. Nadien koelen we de stalen snel af door ze op ijs te zetten voor 30 seconden, waarna we verder kunnen werken op kamertemperatuur. Er wordt 6,0µl 5x Superscript II buffer, 3,0µl 0,1 M DTT, 0,6µl 50 x aminoallyl-dNTP mix en als laatste 2,0µl Superscript II RT (reverse transcriptase) toegevoegd. De 50 x aminoallyl-dNTP mix bestaat uit 5µl dATP (100 mM), 5µl dCTP (100 mM), 5µl dGTP (100 mM), 3µl dTTP (100 mM), 2µl aa-dUTP (100 mM). Deze mix bevat dus een ratio van 2:3 van aminoallyl-dUTP tot het ongelabelde dTTP. De stalen worden geïncubeerd op 42°C overnacht, zodat het reverse transcriptase het RNA (waarop de primers zijn gebonden) naar cDNA kan omzetten door middel van incorporatie van de dNTP's. Om het RNA dat overblijft te hydrolyseren, wordt 10µl 1M NaOH en 10µl 0,5M EDTA toegevoegd. We laten dit incuberen voor 15 minuten op 65°C zodat de reactie optimaal verloopt. Omdat we NaOH hebben toegevoegd, is ons staal basisch en dat moet

gecompenseerd worden door een zuur namelijk 10µl 1M HCL toe te voegen waardoor ons mengsel wordt geneutraliseerd.

Het stabiele cDNA bevat nu geïncorporeerde aminoallyl-dNTP's en we kunnen dus gebruik maken van geautoclaveerde epjes en tipjes. De niet-geïncorporeerde aminoallyl-dNTP's en de vrije amines moeten nog wel verwijderd worden omdat er anders interferentie kan optreden tussen het NHS-ester CyDye en de vrije amines, wat vermeden moet worden. De zuiveringsstap begint met het toevoegen van 300µl PB buffer, waarna het geheel wordt overgebracht naar een QIAquick kolom. Het cDNA zal binden aan het silicamembraan in aanwezigheid van hoge zoutconcentraties. Door toevoegen van 750µl Fosfaat wasbuffer, worden de onzuiverheden weggewassen. Deze stap wordt herhaald, zodat zeker alleen het DNA achterblijft. Om het DNA van de kolom te elueren, wordt 30µl 4mM KPO₄ (pH 8,5) toegevoegd. We laten deze vloeistof in het membraan van de QIAquick kolom trekken door 1 min te incuberen op kamertemperatuur. Na het centrifugeren voor 1 minuut op 14000g, zal het cDNA zich in het epje bevinden. Deze stap wordt ook herhaald, zodat we zeker alle cDNA uit de kolom hebben geëluëerd. Vervolgens worden de stalen gedroogd in een Speed vac.

B. Covalente binding van het aminoallyl-gelabeld cDNA aan het Cy Dye ester

De aminoallyl-dNTP's die geïncorporeerd zijn in het cDNA zullen het anker worden waaraan de fluorescente moleculen (Cy Dye esters) covalent worden gebonden. Omdat deze kleurstoffen fluoresceren, mogen zij niet te veel aan licht worden blootgesteld, omdat er dan fotobleking optreedt en het fluorescente signaal daardoor sterk zal verminderen.

De Cy3 en Cy5 esters worden opgelost in 4,5µl DMSO (dimethylsulfoxide). Alvorens de Cy Dye's toe te voegen, brengen we 4,5µl 0,1M Carbonaatbuffer (pH 9,0) bij onze aa-cDNA. Het cDNA van de controle populatie wordt gelabeld met Cy3 en deze van de blootgestelde populatie met Cy 5. Dit gebeurt door de juiste Cy Dye bij het juiste staal te voegen. Na een incubatieperiode van 1,5 uur, wordt de reactie stopgezet door het aanbrengen van 35µl 100mM NaOAc (pH 5,2). Na het toevoegen van 250µl PB buffer, brengen we het gehele mengsel over naar een QIAquick kolom. Tijdens de centrifugatie (1 minuut 14000 g) zal het cDNA binden op de kolom. Om het ongebonden Cy Dye weg te wassen, brengen we 750µl PE buffer op de kolom aan. Na tweemaal te hebben gecentrifugeerd (1 minuut 14000 g) zetten we de kolom op een nieuw epje en elueren we het gemerkte cDNA door toevoegen van 30µl EB (elutiebuffer) gevolgd door een incubatie van 1 minuut bij kamertemperatuur en een centrifugatie (1 minuut 14000 g). Deze stap voeren we nogmaals uit om optimaal het gemerkte cDNA te kunnen opvangen.

C. Analyse van de labelingsreactie

Vooraleer we kunnen hybridiseren moeten we nagaan of de labelingsreactie goed verlopen is. Een hybridisatie met een slechte probe levert namelijk geen bruikbare data op. Met de Nanodrop wordt voor elk staal gemeten wat de hoeveelheid Dye is, die geïncorporeerd werd (= FOI: Frequency of dye incorporation). Hieruit kan dan de hoeveelheid geïncorporeerde Dye per staal berekend worden. Die hoeveelheid is namelijk gelijk aan het aantal pmol geïncorporeerde Dye/ µl x 59µl. Voor een goede probe is 150pmol geïncorporeerde Dye nodig, dus we kunnen berekenen hoeveel µl staal nodig is. De FOI moet een waarde boven 10 hebben om een goede waarde te kunnen zijn. Een voorbeeld van deze berekening:

Staal: vrouwtjes 28dagen controle

A 260: 0,173 ; A Cy: 0,141 → FOI: ACy/A 260: 47,68

Na de analyse van de labelingsreactie worden de gelabelde probes gedroogd in een Speed vac.

3.4.5 Hybridisatie van de gelabelde cDNA probes met de Oligo microarrays

A. Prehybridisatie

Vooraleer er een hybridisatie kan plaatsvinden, moeten de arrays eerst gespot worden met een set van 3479 niet weefsel-specifieke oligonucleotidesequenties van zebrafishgenen. Om te voorkomen dat de losgekomen oligo's gaan binden met oligo's op het array en een vals resultaat geven, worden de arrays voor de hybridisatie gewassen in een prehybridisatie-oplossing. Deze bestaat uit 20xSSC, 10% SDS, 20 mg/ml BSA en steriele MilliQ. SSC zorgt voor de buffering van de oplossing, SDS (sodium dodecyl sulfaat) is een detergent dat zal zorgen voor de gelijkmatige verspreiding van het staal op het dekglasje door de oppervlaktespanning te laten dalen. BSA (bovine serum albumine) zal de specifieke bindingsplaatsen afdekken. In deze prehybridisatie-oplossing worden de gespote arrays 30 tot 60 minuten geïncubeerd op 42 °C. Om de oplossing weg te wassen, geef je de arrays een badje van 1 minuut in steriele MilliQ en 1 minuut in isopropanol, waarna je de array kan drogen met N₂.

B. Hybridisatie

De probes werden gedroogd in de Speed vac en worden vooraleer de hybridisatie te starten, opgelost in een hybridisatie-oplossing. Deze oplossing bestaat uit Formamide 30%, om de smeltemperatuur van de probe te doen dalen, wat de hybridisatietemperatuur ook doet dalen, 20x SSC, 10% SDS, 20mg/ml BSA, steriele MilliQ en zalm sperma. Het zalm sperma wordt toegevoegd om de achtergrond en de niet-specifieke signalen te minimaliseren.

Van deze hybridisatie-oplossing wordt telkens 25µl toegevoegd aan elke probe, waarna de controle en de blootgestelde probes met elkaar worden gemengd. Nadien worden de probes geïncubeerd op 95°C voor 5 minuten, wat er voor zorgt dat het cDNA geen helixen vormt, maar in single strands voorkomt en zo kan binden aan de oligo's op de array. De probes worden dan op dekglasjes aangebracht, waarop dan de array komt te liggen. De probe spreidt zich dan over de array uit. Luchtbelletjes moeten wel verwijderd worden, anders zal daar geen hybridisatie kunnen plaatsvinden. De hybridisatie gebeurt in een GENETIX hybridisatiekamer op 42°C overnacht. De arrays mogen niet uitdrogen en daarom wordt er 5 ml steriele MilliQ toegevoegd in hybridisatiekamer, dat voor de optimale luchtvochtigheid zal zorgen.

C. Posthybridisatie

Na de hybridisatie volgt er een posthybridisatie, die bestaat uit een aantal wasstappen. De eerst wasstap gebeurt met wasbuffer 1 bestaande uit 20x SSC, 10% SDS en steriele MilliQ. De array wordt met deze wasbuffer op 42°C gewassen tot de dekglasjes van de array loskomen. Dan wordt de array nog eens voor 5 minuten gewassen in wasbuffer 1 en deze stap wordt herhaald. Nadien wordt de array tweemaal voor 10 minuten gewassen in wasbuffer 2, die bestaat uit 10x SSC, 10% SDS en steriele MilliQ. Als laatste wasbuffer wordt wasbuffer 3 gebruikt, die bestaat uit 10x SSC en steriele MilliQ en hierin wordt de array vier maal 1 minuut gewassen. Hierna wordt de array gespoeld met MilliQ voor 1 minuut en uiteindelijk nog 1 minuut in isopropanol om nadien droog geblazen te worden met gasvormige stikstof (zie tabel 3.2). Na elke wasstap verlaagt de ionsterkte waardoor de stringency zal toenemen.

Stringency is een term die gebruikt wordt in hybridisatie experimenten, om de graad van homologie tussen de probe en de nucleïnezuren aan te geven, hoe hoger de stringency, hoe hoger de homologie. Bij nucleïnezuur hybridisatie kan namelijk een bepaald aantal mismatches van baseparen ontstaan. Hoe groter de proportie mismatches, hoe groter de kans dat de moleculen denatureren. Stringency kan dus worden gezien als een maat voor de graad van mismatch dat getolereerd kan worden, en de graad van specificiteit van een probe voor zijn target. De probe blijft echter wel aan het gespotte DNA kleven.

Wasbuffer (temp. °C)	wastijd	aantal wasstappen
wasbuffer 1	tot de dekglasjes lossen	1
wasbuffer 1	5 minuut	2
wasbuffer 2	10 minuut	2
wasbuffer 3	1 minuut	4
Steriel MilliQ water	1 minuut	1
Isopropanol	1 minuut	1
	Slide drogen met gasvormige stikstof	

Tabel 3.2: De post-hybridisatie wasstap. Bij elke stap verlaagt de ionsterkte en verhoogt de stringentie.

3.4.6 Scannen van de microarrays

We scannen de arrays met een Genepix scanner (een confocale scanner) aan de hand van Genepix software. De Cy3/Cy5 ratio moet ongeveer 1 zijn, dus om de photomultiplicator (PMT) waarden aan te passen, maken we eerst een prescan tot de PMT een goede ratio geven van Cy3/Cy5. De preview heeft geen negatieve invloed op de intensiteit van de fluorescente probes. Nadien maken we een nauwkeurige scan van de array.

3.4.7 Analyse van de microarrays

De primaire uitdaging in microarray data analyse is de bepaling van de genen die differentieel geëxprimeerd zijn en in welke hoeveelheid. Dit is ingewikkeld omdat systematische en random fouten geassocieerd zijn met microarray metingen die ervoor zorgen dat het signaal varieert van array tot array. Deze variaties maakt vergelijkingen van differentiële expressie ratios in en tussen experimenten bijna onmogelijk.

Systematische fouten die de microarray metingen kunnen verstoren omvat de karakteristieken van de fluorescente nucleotiden gebruikt in de labeling. Reverse transcriptase bouwt Cy 3 en Cy 5 niet met dezelfde efficiëntie in. Verder hebben Cy 3 en Cy 5 verschillend fluorescentie efficiënties en detectie karakteristieken zodat de geobserveerde signaalintensiteit niet uniform zullen zijn tussen dezelfde hoeveelheid Cy3 gelabelde probes tov Cy 5 gelabelde probes. Door deze verstoringen bevindt de ratio van Cy3/Cy5 zich niet rond 1 en is niet normaal gedistribueerd.

Om een kwantitatieve analyse van de arrays mogelijk te maken, werden er controles (Lucidea controles) gespot op de array. Er bestaan verschillende Lucidea controles:

- Negatieve controles: Negatieve controles worden gebruikt voor de beoordeling van niet-specifieke hybridisatie (Van der Ven *et al.*, 2005).
- Ratio controles: Deze controles worden gebruikt om de normalisatie te controleren. Er zijn 5 verschillende ratiocontroles die ratios genereren van 3:1, 1:3, 10:1, 1:10 en 1:1. Ratio controles worden gebruikt om de precisie van de microarray data te verhogen.
- Calibratiecontroles: Deze bestaan uit 10 unieke DNA sequenties die op de array zijn gespot. De combinatie van deze componenten resulteert in een calibratie curve. De calibratiecontroles binden met een 1:1 ratio, maar met een verschillende concentratie. De resultaten van de calibratiecurve kunnen worden gebruikt om de detectielimiet van de microarray te bepalen, de lineaire range van de data en de signaalsaturatie.

MIAME beschrijft de minimum informatie over microarray experimenten die nodig is om de resultaten op een duidelijke manier te kunnen interpreteren en om het experiment zo reproduceerbaar mogelijk te maken. MIAME checklist is een beschrijving van MIAME principes, dat gemaakt is om microarray data op een bruikbare manier te kunnen meedelen (<http://www.mged.org/Workgroups/MIAME/miame.html>).

De analyse van de microarray gebeurt in samenwerking met het ISLab (Intelligent systems lab, de bio-informatica aan de universiteit van Antwerpen, campus Middelheim). Er zijn ook meerdere stappen nodig om tot een goede analyse te komen.

Eerst wordt er een raster gelegd op het beeld dat bekomen werd met het scannen van de microarray. Het raster bevat informatie over de gespotte genen en zo worden de genen gekoppeld aan de spots op het beeld en krijgt elke spot een eigen identiteit. Het raster bestaat uit bolletjes, die aangepast moeten worden aan de spots. Dan volgt er een lokale achtergrond substractie waardoor de ruis op de achtergrond wordt afgetrokken van de bekomen waarden om een zo hoog mogelijke signaal/ruis verhouding te verkrijgen.

Via de website www.islab.ua.ac.be/base/ gebeurt de verdere analyse (Saal *et al.*, 2002). BASE is een web- gebaseerde database oplossing voor de enorme hoeveelheden data die verkregen wordt met microarray analyse. De gemiddelde pixel intensiteit voor de calibratiespots zou normaal 1 moeten zijn ($\log \text{rood/ groen} = 0$) omdat er evenveel mRNA van het controle gen aan het controle staal is toegevoegd als aan het blootgestelde staal. Vaak kan men hier toch een verschil bemerken aangezien in experimenten waar men twee verschillende fluorescente labels (groen en rood) gebruikt, de intensiteit afhankelijke variatie van de labels een ongewenste variatie in de data kan veroorzaken. Dit wordt verholpen door de Lowess normalisatie die ervoor zorgt dat de signalen zodanig worden aangepast dat er geen variatie optreedt. Deze normalisatie brengt ook het $\log \text{rood/groen}$ terug op nul. Dit is nodig omdat bij lage intensiteiten groen prominenter aanwezig is dan rood, waardoor het logaritme van rood op groen niet gelijk is aan nul.

Daarna worden de 'ratio of medians' van de genen van interesse gedeeld door de gemiddelde calibratiewaarde. Deze ratio geeft de groen-rood verhouding weer van elke spot. Indien deze ratio gelijk is aan 1, dan krijg je gele spots en dit betekent dat er evenveel Cy 3 en Cy 5 gebonden is en er geen differentiële gen-expressie aanwezig is. Wanneer deze ratio lager is dan 0,5 verkrijgt men groene spots omdat er meer Cy3 van het controleweefsel aanwezig is, dus dat er downregulatie van het gen is opgetreden in de blootgestelde populatie. Als de spots rood zien, ligt de ratio boven de 2, en komt het gen van deze spot tot overexpressie in het blootgestelde weefsel en dan gaat het hier over een opgereguleerd gen.

Van de gonaden geëxtraheerd na 28 dagen blootstelling aan de hoogste concentratie flutamide, 1000 $\mu\text{g/l}$ flutamide werd ook een colorflip en een Self-Self uitgevoerd. Bij een

colorflip wordt de controle gelabeld met Cy5 en de blootgestelde groep met Cy3, zodat verschillen in incorporatie van de dye kunnen opgespoord worden. Bij een Self-Self, hybridiseer je 2 controle groepen van hetzelfde weefsel waarop er geen differentiële gen-expressie zou mogen optreden. Aangezien er steeds een fout ontstaat bij het maken van een micro-array (een technische fout), kan de Self-Self array gebruikt worden om die fout te verkleinen. De bio-informatica kan de variantie rond de ratio 1 (dus gele spots, en geen differentiële gen-expressie) bepalen en die variantie kan gebruikt worden om correcter te bepalen wanneer een gen op-of neergereguleerd is.

Vervolgens worden de 'cut-off' waarden voor elke array bepaald. Dit is de laagste intensiteit van het signaal van de spots dat nog te onderscheiden is van de achtergrond. De spots waarvan zowel het signaal voor Cy3 als voor Cy 5 lager dan de cut off waarde liggen, kunnen niet duidelijk van de achtergrond worden gescheiden en worden niet verder in de analyse opgenomen.

Als laatste stap worden de differentieel geëxprimeerde genen die geselecteerd werden op basis van de 'ratio of medians', onderverdeeld in functionele klassen.

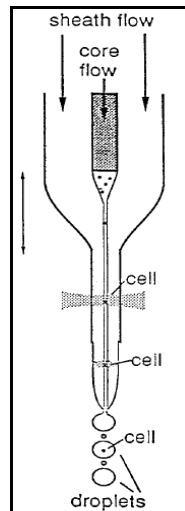
3.5. Gameetfysiologie

3.5.1 Analyse sperma

De sperma afname moet gebeuren vooraleer de aquaria belicht worden, anders zijn de vissen al bezig met paringsgedrag, waardoor er geen sperma meer gevonden zal worden in de mannelijke vis. De vissen worden verdoofd in MS- oplossing (methaansulfonaat oplossing; 0,1 g/l). De genitale opening moet worden afgedept met een doekje, zodat er geen water wordt afgenomen in plaats van sperma en om te voorkomen dat het sperma geactiveerd wordt door water. Er wordt een microcapillair tegen de opening gehouden en een lichte abdominale druk uitgeoefend. De druk mag niet te groot zijn omdat er dan faeces mee kunnen uitkomen. Het sperma wordt door de juiste druk aangezogen door de microcapillair. Nadien wordt de microcapillair uitgeblazen in een falcon tube en aangelengd met 3 ml extender. De extender (5,52 g/l NaCl; 2,0 g/l KCL, 2,42 g/l Tris-HCl; 3,75 g/l glycine in 0,5 liter gedestilleerd water, pH 7,5; 302 ± 2 mOsm/Kg) is een fysiologische oplossing met dezelfde osmotische druk als het seminaal vocht (300 mOsm/kg), waardoor het sperma inactief blijft.

A. Flow cytometrie

Flow cytometrie staat voor de detectie van lichtsignalen, opgewekt ten gevolge van de snelle doorgang van afzonderlijke cellen door het centrum van een, tot een microscopisch kleine spot gefocuseerde, lichtstraal wat mogelijk is door de hydrodynamische focusering van de celsuspensie stroom in een laminaire geleidingsvloeistofstroom. De lichtsignalen worden nadien in een computer verwerkt.



Figuur 3.2: Principe van een flow cytometer.

De sperma afname gebeurt op dag 30 van de blootstelling. De stalen worden in een falcontube aangelengd met extender oplossing. Elke tube wordt aangekleurd met Propidium Iodide (PI 1g/l) om de viabiliteit van het sperma te meten. Propidium Iodide is een fluorescente probe die op het DNA bindt. Cellen met een intact plasmamembraan zullen geen PI opnemen, dit zijn levende cellen. Dode cellen hebben een beschadigd celmembraan, waardoor PI de cel kan binnendringen en het DNA kan aankleuren (Graham, 2001). Er werd een standaardcurve opgesteld door gebruik te maken van verschillende percentages (0, 25, 50, 75 en 100%) van dode cellen. De dode cellen werden bekomen door cellen te verwarmen op 70°C gedurende 5 minuten. Vervolgens werd de viabiliteit gemeten van de stalen. De statistische analyse gebeurt met een one-way ANOVA test.

3.5.2 Analyse ovaria en eileg

A. Ovarium Somatische index

Tijdens de dissectie op dag 28, wordt het totaal nat lichaamsgewicht van de vrouwtjes vissen bepaald en ook de ovaria. De ovaria zijn bilateraal gelegen en bevatten de oöcyten. De Ovarium Somatische Index geeft de verhouding van het gewicht van de ovaria op het totaal nat lichaamsgewicht van het visje weer. De statistische analyse wordt uitgevoerd met een 2-way ANOVA gevolgd door een Bonferroni posttest.

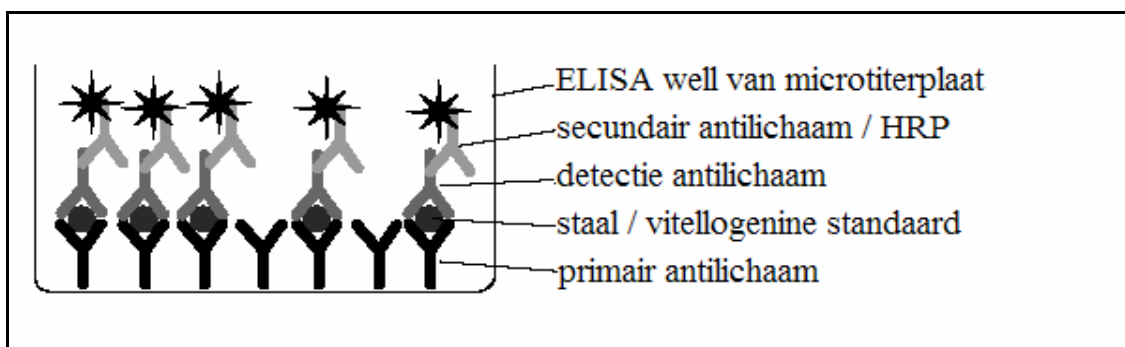
B. Eileg

Tijdens week 1 en week 4 van de blootstelling van de blootstelling gaan we de eileg na door de bodems van de aquaria af te zuigen met een sifon. De opgezogen eitjes worden in petrischaaltjes geteld. Gedurende de perioden van de blootstelling waarop eitjes geteld worden, plaatsen we de visjes in netjes, omdat ze zelf hun eitjes opeten en de tellingen dan niet meer correct zouden kunnen gebeuren.

3.6 Vitellogenine bepaling

Vtg is een belangrijke biomerker voor de beoordeling van endocriene verstoring in het milieu, het geeft meer informatie over de oestrogene verstoring in aquatische organismen. Dit dooiereiwit precursor wordt geproduceerd in de lever na stimulatie van hepatische oestrogeen receptoren, wordt gesecreteerd in het bloed en geïncorporeerd in zich ontwikkelende oöcyten. Onder fysiologische condities is Vtg enkel aanwezig in seksueel actieve vrouwtjes (Kime *et al.*, 1999). De aanwezigheid van polluenten met oestrogene werking in het milieu kan verhoogde Vtg concentraties veroorzaken in aquatische organismen. De meest gebruikte detectie methoden is de Vtg ELISA. Deze methode laat de quantitative analyse van Vtg toe in het hele lichaam, maar ook in het bloedplasma of orgaanhomogenaten.

Een ELISA is een sandwich assay die gebruik maakt van de specifieke binding tussen Vtg en zijn antilichaam. Een vitellogenine-specifiek antilichaam zit gebonden op een microtiterplaat en kan binden met het Vtg dat aanwezig is in de stalen die aan de plaat worden toegevoegd. Het ongebonden antilichaam wordt gewassen en een tweede enzym-gelinkt antilichaam wordt toegevoegd. Na een laatste wasstap wordt de enzymactiviteit bepaald door toevoeging van een substraat dat een gekleurd product geeft. De enzymactiviteit is evenredig met de concentratie Vtg in het staal. De assay is gecalibreerd door het opstellen van een standaardcurve met gezuiverd Vtg afkomstig van de zebravis.



Figuur 3.3: Vtg ELISA. Voorbeeld van sandwichassay.

De vissen worden gewogen en verdund in 1:2(gewicht:volume) staalbuffer (PBS, 1% BSA, 2 TIU aprotinine. Daarna homogeniseren we de stalen en verdelen we het homogenaat in 1,5 ml epjes. Na een centrifugeer stap van 4 °C bij 14000 rpm voor 30 minuten, transfereren we het supernatans in een nieuw 1,5 ml ebje.

De inhoud van één zebravis Vtg standaard wordt opgelost in 450 µl koude verdunningsbuffer (PBS, 1%BSA) en zo wordt een stock concentratie van 10 µg Vtg/ml bekomen. Hieruit wordt een verdunningsreeks bekomen door 10µl stockoplossing op te lossen in 790 µl verdunningsbuffer (= 125 ng/ml Vtg). Zo werk je verder voor 62,5 ng/ml Vtg, 31,3;15,6; 7,81; 3,91; 1, 95; 0,49; 0,24 en 0,12 ng/ml Vtg. Gezien de brede range van Vtg levels gevonden in experimentele studies, worden er tenminste drie verschillende verdunningen van ieder staal gemaakt, om in het lineaire gebied van de standaardcurve te zitten. De verdunningen die gemaakt worden zijn 1:500, 1:30000 en 1:1800000.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NSB	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11
B	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
C	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12
D	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
E	P13	P14	P15	P16	P17	P18	P19	P20	P21	P22	P23	P24
F	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
G	P25	P26	P27	P28	P29	P30	P31	P32	P33	P34	P35	P36
H	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓

Figuur 3.4: Plaat Vtg ELISA: NSB = niet specifieke binding wells, S1-S11 = standaarden 1-11 (0,12- 125 ng/ml Vtg), P1-P36 = stalen

Aan de NSB wellletjes wordt 100 µl verdunningsbuffer gevoegd. Nadien wordt in duplicaat 100 µl van iedere zebravis Vtg standaard verdunning toegevoegd en 100 µl van ieder staal, in het juiste welletje. De plaat wordt dan afgedekt en geïncubeerd voor 1 uur op kamertemperatuur. De platen worden dan drie keer gewassen met 300 µl wasbuffer (PBS en 0,05% Tween-20).

Vervolgens wordt er 100 µl van het verdunde detectie antilichaam toegevoegd aan alle wells en wordt de plaat afgedekt en een uur geïncubeerd op kamertemperatuur. Weer wordt de plaat drie keer gewassen met 300 µl wasbuffer er well, maar nu wordt er 100 µl van het verdunde secundair antilichaam toegevoegd aan alle wells. Ook nu wordt de plaat afgedekt en wordt er geïncubeerd voor één uur op kamertemperatuur. De platen worden dan vijf keer gewassen met 300 µl wasbuffer per well en er wordt 100 µl substraatoplossing (een Urea Hydrogen Peroxide tablet in 20 ml gedistilleerd water en een o-phenylenediamine tablet) toegevoegd aan elke well. Om enzymatische activiteit toe te laten, wordt een half uur geïncubeerd. De plaat moet wel afgedekt worden met aluminiumfolie zodat de kleur die vrijkomt niet kan verbleken. De reactie wordt stopgezet door 50 µl H₂SO₄ toe te voegen aan alle wells. Na 5 minuten kan de absorptie worden afgelezen bij 492 nm met een microplaatlezer.

3.7 Gedragsbepaling

Het gedrag wordt nagegaan aan de hand van een opstelling, uitgewerkt door het ISLab (Intelligent Systems Laboratorium), de bio-informatica aan de Universiteit van Antwerpen. Een controle groep en een blootgestelde groep (1000µg/l flutamide) worden telkens 2 dagen per week, gedurende 4 weken gefilmd. Een 3D-gedragsanalyse systeem werd ontworpen in samenwerking met het Intelligent Systems Laboratorium (ISLab) aan de Universiteit van Antwerpen. De analysesoftware om de beelden om te zetten in trajecten is op dit ogenblik voldoende om al een eerste ruwe classificatie te doen en de gemiddelde zwemsnelheid van de vissen te bepalen. In komende maanden zullen concrete parameters zoals afgelegde weg en aantal draaiingen van individuele vissen gekwalificeerd en gekwantificeerd worden. Daarna kunnen reproductieve parameters bepaald worden, met name de interacties tussen de vissen. De resultaten konden wegens tijdsgebrek niet meer worden opgenomen in deze thesis.

Hoofdstuk 4: Resultaten

4.1 Analyse differentiële gen-expressie met microarrays

4.1.1 Controle van het geëxtraheerde RNA met NanoDrop

De zuiverheid en de concentratie van het RNA werden nagegaan met NanoDrop 3.0.0®. Beide waarden moeten voldoende hoog liggen (zie voor meer uitleg: paragraaf 3.4.3).

		A 260/280	A 260/230	Concentratie RNA (ng/μl)
4 dagen	<u>Ovaria</u>			
	Controlegroep	1,97	1,97	3332,90
	blootgestelde groep 100μg/l	1,97	1,90	3398,60
	blootgestelde groep 1000μg/l	2,04	1,86	1922,60
	<u>Testes</u>			
	Controlegroep	1,98	2,31	1178,60
	blootgestelde groep 100μg/l	1,93	2,25	1534,80
	blootgestelde groep 1000μg/l	1,93	2,29	1085,90
			A 260/280	A 260/230
28 dagen	<u>Ovaria</u>			
	Controlegroep (aq 3)	2,03	2,14	1959,20
	blootgestelde groep 100μg/l (aq 3)	2,03	2,10	2949,40
	blootgestelde groep 1000μg/l (aq 3)	2,08	2,12	1823,90
	Controlegroep (aq 4)	2,06	2,18	2453,00
	blootgestelde groep 100μg/l (aq 4)	1,98	2,07	3541,00
	blootgestelde groep 1000μg/l (aq 4)	2,00	2,04	2409,40
	<u>Testes</u>			
	Controlegroep	2,06	2,29	880,00
blootgestelde groep 100μg/l	2,05	2,27	2049,50	
blootgestelde groep 1000μg/l	2,02	2,23	2683,70	

Tabel 4.1: Resultaten Nanodrop. Overzicht van de absorptiewaarden A260/A280 en A260/A230, en van de concentratie in (ng/μl) van de gonaden en testes op dag 4 en 28.

4.1.2 Controle van de labelingsreactie van het aminoallyl gelabeld cDNA aan het Cy Dye ester

De stalen van de controle- en blootgestelde groep werden gelabeld met respectievelijk Cy 3 en Cy 5. De analyse van de labeling gebeurt door de concentratie van de dye in pmol/ μl te meten. Met deze gegevens kan de hoeveelheid geïncorporeerde kleurstof per staal berekend worden (zie paragraaf 3.4.4 C).

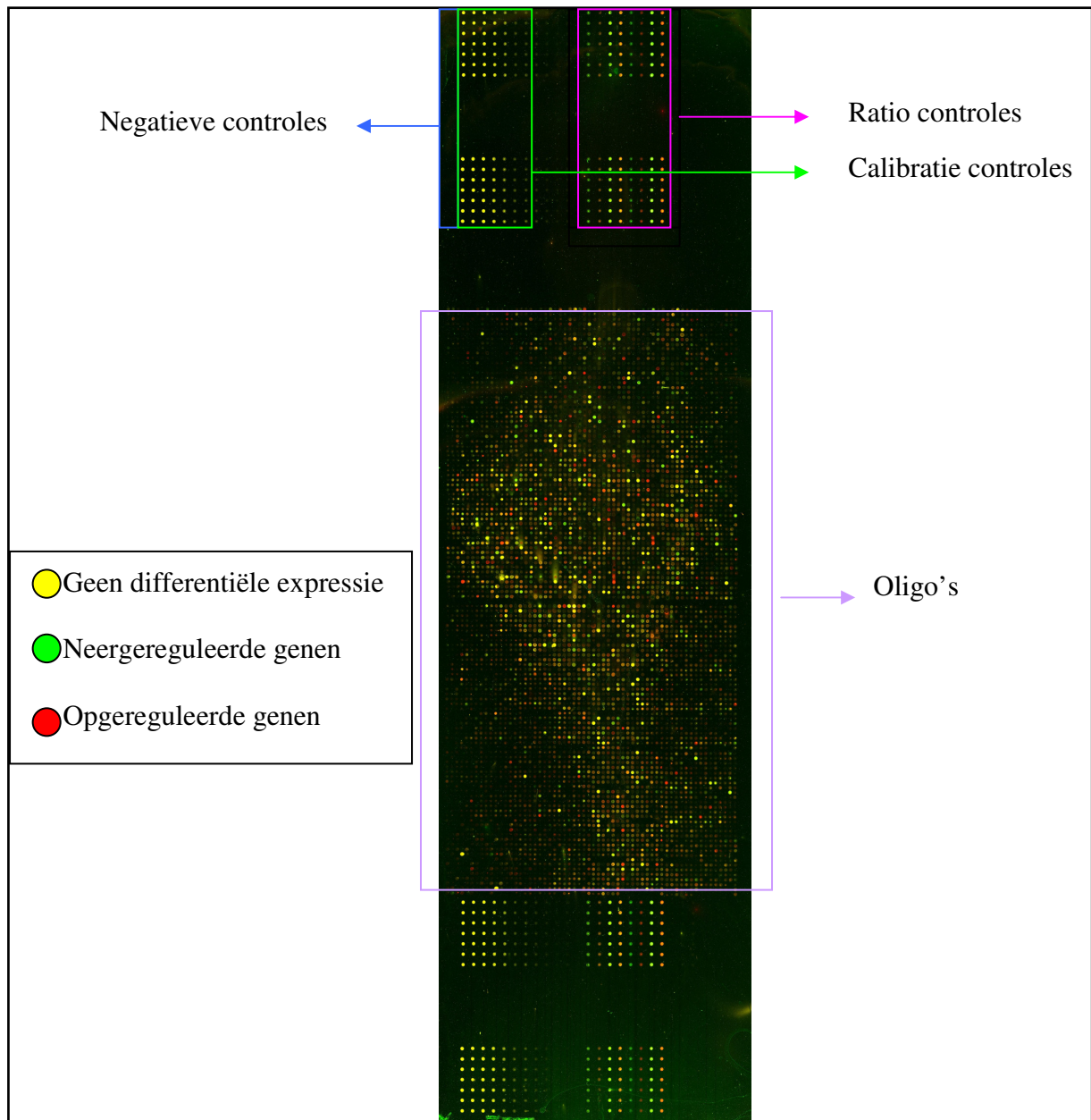
		pmol dye/ μ l	geïncorporeerde dye (pmol)
4 dagen	<u>Ovaria</u>		
	Controlegroep	8,5	501,5
	blootgestelde groep 100 μ g/l	6,5	383,5
	blootgestelde groep 1000 μ g/l	7,6	448,4
	<u>Testes</u>		
	Controlegroep	9,1	536,9
	blootgestelde groep 100 μ g/l	8,1	477,9
	blootgestelde groep 1000 μ g/l	7,1	418,9
		pmol dye/ μ l	geïncorporeerde dye (pmol)
28 dagen	<u>Ovaria</u>		
	Controlegroep (aq 3)	9,4	554,6
	blootgestelde groep 100 μ g/l (aq 3)	9,5	560,5
	blootgestelde groep 1000 μ g/l (aq 3)	8,7	513,3
	<u>Testes</u>		
	Controlegroep	8	472,0
	blootgestelde groep 100 μ g/l	7,2	424,8
	blootgestelde groep 1000 μ g/l	6,9	407,1
		pmol dye/ μ l	geïncorporeerde dye (pmol)
28 dagen	<u>Ovaria</u>		
	<i>Colorflip</i>		
	Controlegroep	4,4	240,3
	blootgestelde groep 1000 μ g/l	9,4	554,6
	<i>Self-Self</i>		
	Controle Ref	8,1	477,9
	Controle Test	4,9	289,1

Tabel 4.2: Resultaten Nanodrop. Analyse van de labelingsreactie van cDNA van de ovaria en testes. De concentratie van de kleurstof in pmol/ μ l van de labeling van het cDNA dat voorkomt uit de ovaria en testes van de controlegroep, de populatie blootgesteld aan 100 μ g/l flutamide en de populatie blootgesteld aan 1000 μ g/l flutamide.

4.1.3 Hybridisatie van de microarrays

De probes uit paragraaf 4.1.3 waren van voldoende kwaliteit om verder te gebruiken voor hybridisatie met oligo microarrays. Er werden in totaal 10 arrays succesvol gehybridiseerd en deze konden verder gebruikt worden voor analyse van de microarrays.

4.1.4 Scan van een microarray

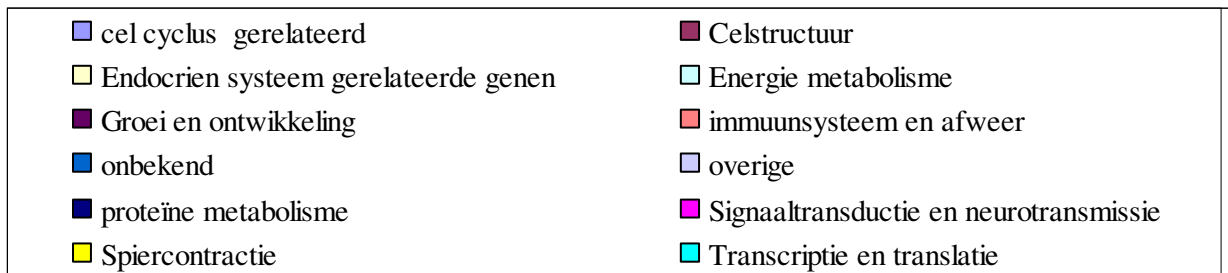


Figuur 4.1: Voorbeeld van een oligo microarray : Mannetjes testes 28 dagen controle vs 1000 μ g/l flutamide

4.1.5 Analyse van de microarray

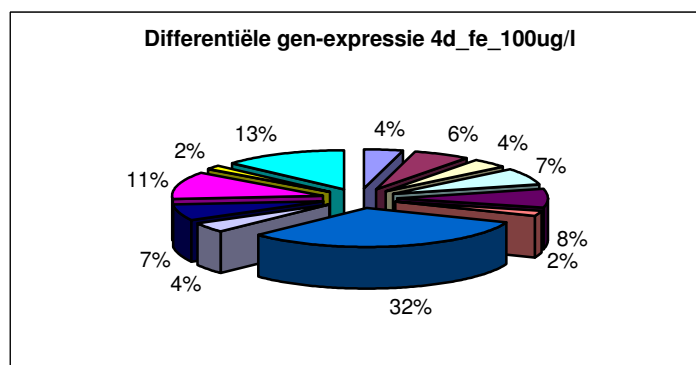
Om de differentieel geëxprimeerde genen te kunnen onderverdelen in functionele klassen, werd eerst de functie en het biologische proces waarin een gen betrokken is, opgezocht. Met die informatie kunnen de differentieel geëxprimeerde genen in functionele klassen worden onderverdeeld:

- Cel cyclus gerelateerd
- Celstructuur
- Endocrien systeem gerelateerde genen
- Energie metabolisme
- Groei en ontwikkeling
- Immuunsysteem en afweer
- Onbekend
- Overige
- Proteïne metabolisme
- Signaaltransductie en neurotransmissie
- Spiercontractie
- Transcriptie en translatie



A. Vrouwtjes ovaria 4 dagen controle versus 100 µg/l

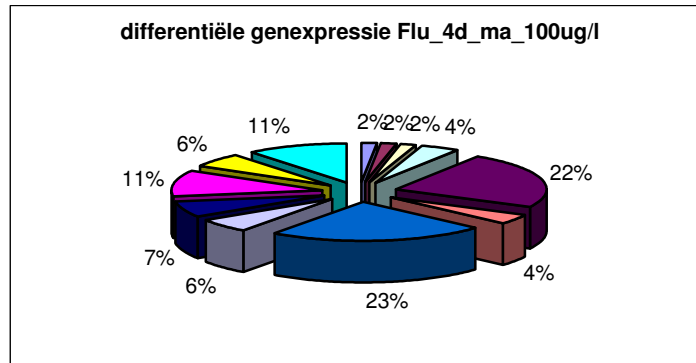
Uit de analyse bleek dat er bij deze array 212 genen differentieel tot expressie kwamen, waarvan 123 neergereguleerd en 89 opgereguleerd. Genen in de functionele klasse ‘signaaltransductie en neurotransmissie’ en ‘transcriptie en translatie’ zijn opmerkelijk meer tot expressie gekomen dan andere klassen (de klasse ‘onbekend’ wordt niet mee in overweging gebracht).



Grafiek 4.1: Genen die differentieel tot expressie komen in ovaria na 4 dagen blootstelling aan 100µg/l flutamide.

B. Mannetjes testes 4 dagen controle versus 100 µg/l

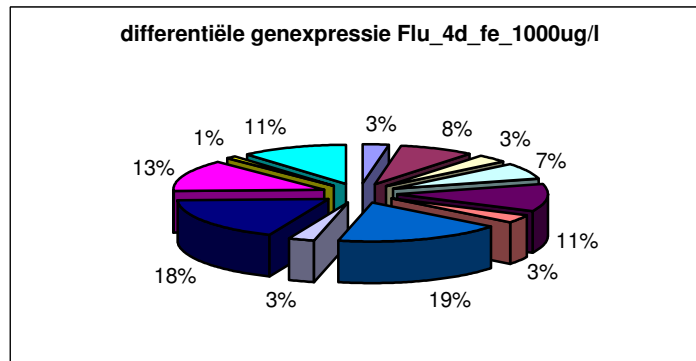
Bij deze array komen er 120 genen differentieel tot expressie, waarvan er 83 neergereguleerd zijn en 27 opgereguleerd. Genen betrokken in 'signaaltransductie en neurotransmissie', 'transcriptie en translatie' en 'groei en ontwikkeling' worden meer beïnvloed door de blootstelling aan flutamide dan andere genen.



Grafiek 4.2: Genen die differentieel tot expressie komen in testes na 4 dagen blootstelling aan 100µg/l flutamide.

C. Vrouwtjes ovaria 4 dagen controle versus 1000 µg/l

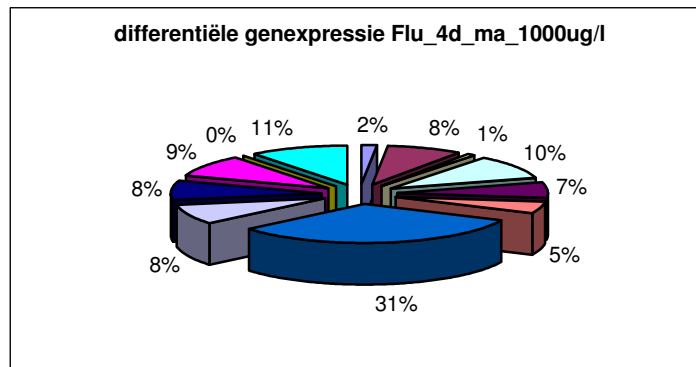
Bij blootstelling van vrouwtjes aan 1000µg/l flutamide, blijkt dat er in de ovaria 183 genen tot expressie komen. Hiervan zijn er 88 neergereguleerd en 95 opgereguleerd. Opmerkelijk hier is dat genen betrokken bij 'proteïne metabolisme', 'groei en ontwikkeling' en 'transcriptie en translatie' meer tot expressie komen dan genen betrokken bij andere processen.



Grafiek 4.3: Genen die differentieel tot expressie komen in ovaria na 4 dagen blootstelling aan 1000µg/l flutamide.

D. Mannetjes testes 4 dagen controle versus 1000 µg/l

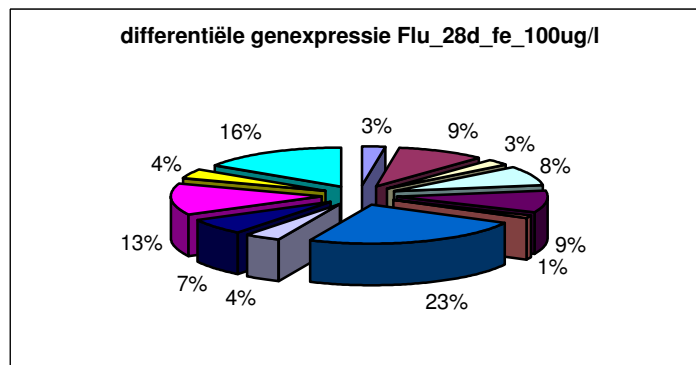
Bij blootstelling van mannetjes aan 1000 µg/l flutamide gedurende 4 dagen, komen er 122 genen differentieel tot expressie, waarvan 61 genen neergereguleerd zijn en eenzelfde aantal genen opgereguleerd zijn. In de functionele klasse 'Transcriptie en translatie' bevinden zich genen die vaak differentieel geëxprimeerd zijn.



Grafiek 4.4: Genen die differentieel tot expressie komen in testes na 4 dagen blootstelling aan 1000µg/l flutamide.

E. Vrouwtjes ovaria 28 dagen controle versus 100 µg/l

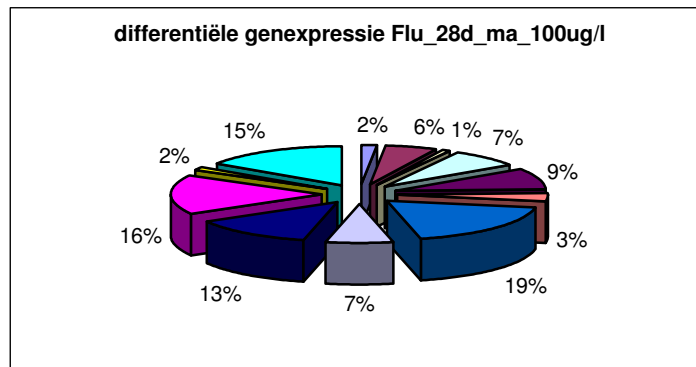
Uit de analyse bleek dat er bij deze array 76 genen differentieel tot expressie komen, waarvan 11 opgereguleerd en 65 neergereguleerd. Weer blijkt uit de analyse dat genen betrokken in ‘signaaltransductie en neurotransmissie’, en ‘transductie en translatie’ meer tot expressie komen dan andere genen.



Grafiek 4.5: Genen die differentieel tot expressie komen in ovaria na 28 dagen blootstelling aan 100µg/l flutamide.

F. Mannetjes testes 28 dagen controle versus 100 µg/l

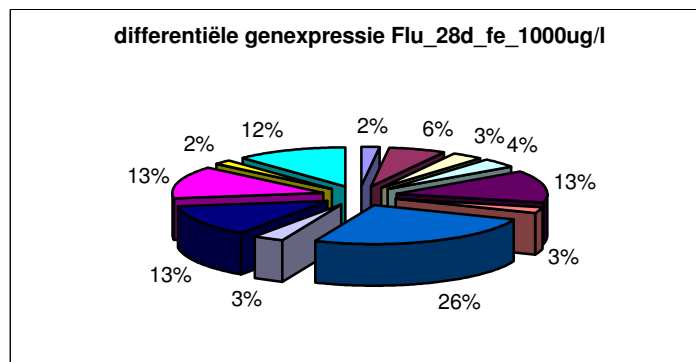
Bij deze array komen er 123 genen differentieel tot expressie, waarvan er 100 zijn neergereguleerd en 23 opgereguleerd. Naast genen betrokken bij ‘signaaltransductie en neurotransmissie’ en ‘transductie en translatie’, komen ook genen betrokken bij ‘proteïne metabolisme’ meer tot expressie dan genen betrokken in andere processen.



Grafiek 4.6: Genen die differentieel tot expressie komen in testes na 28 dagen blootstelling aan 100µg/l flutamide.

G. Vrouwtjes ovaria 28 dagen controle versus 1000 µg/l

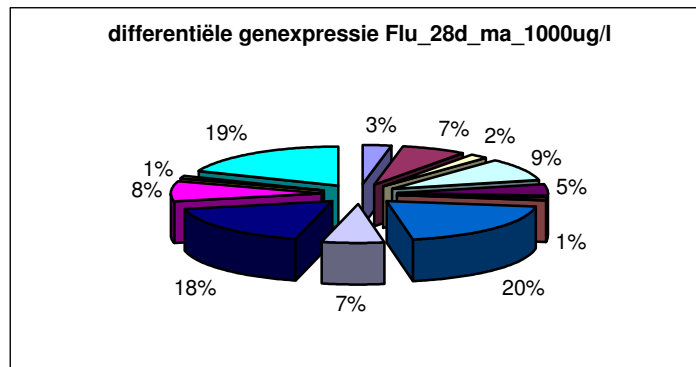
Bij blootstelling van vrouwtjes aan 1000µg/l flutamide gedurende 28 dagen, blijkt dat er in de ovaria 151 genen differentieel tot expressie komen. Hiervan zijn er 125 neergereguleerd en 26 opgereguleerd. Zoals bij sommige andere arrays ook blijkt, zijn genen betrokken bij 'signaaltransductie en neurotransmissie', 'transductie en translatie' en 'proteïne metabolisme' meer tot expressie gekomen dan andere genen. Behalve genen betrokken bij 'groei en ontwikkeling', die ook meer tot expressie komen dan andere genen.



Grafiek 4.7: Genen die differentieel tot expressie komen in ovaria na 28 dagen blootstelling aan 1000µg/l flutamide.

H. Mannetjes testes 28 dagen controle versus 1000 µg/l

Mannetjes die werden blootgesteld aan 1000µg/l flutamide, bleken 319 genen differentieel te expresseren in de testes. Hiervan waren er 144 neergereguleerd en 175 opgereguleerd. In tegenstelling tot de vorige arrays, komen genen betrokken bij 'signaaltransductie en neurotransmissie' niet meer tot expressie dan andere genen. Genen die wel meer tot expressie komen, behoren tot de klasse 'transductie en translatie' en 'proteïne metabolisme'.

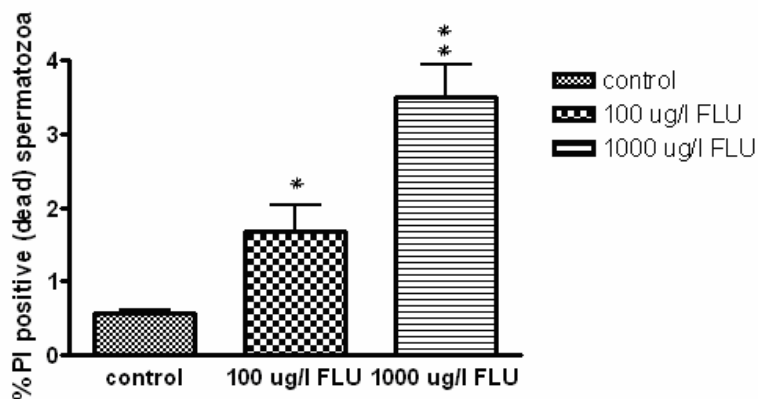


Grafiek 4.8: Genen die differentieel tot expressie komen in testes na 28 dagen blootstelling aan 1000µg/l flutamide.

4.2. Gameetfysiologie

4.2.1 Analyse Sperma

A. Flow Cytometrie

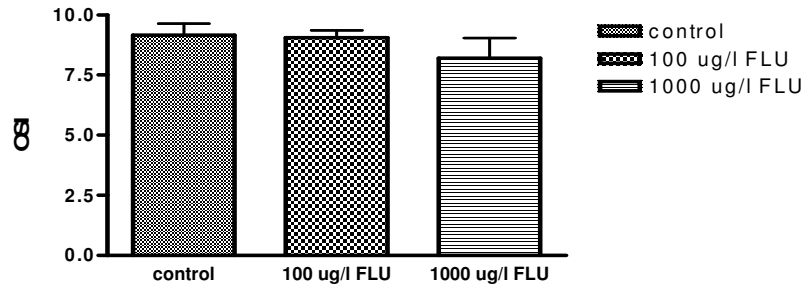


Grafiek 4.9: Sperma analyse op dag 30 van de blootstelling. Het procent dode spermatozoa wordt uitgezet ten opzichte van de blootstellingsconditie. (Controle: n=5, blootgesteld aan 100µg/l flutamide: n=7, blootgesteld aan 100µg/l flutamide: n=9).

De statistische analyse (one-way-anova en Bonferroni post-hoc test) toonde significante verschillen aan tussen alle groepen. De populatie die blootgesteld werd aan 100µg/l flutamide is significant verschillend van de controlegroep ($p < 0,05$) en de populatie blootgesteld aan 1000µg/l flutamide is ook significant verschillend van de controlegroep ($p < 0,001$).

4.2.2 Analyse ovaria en eileg

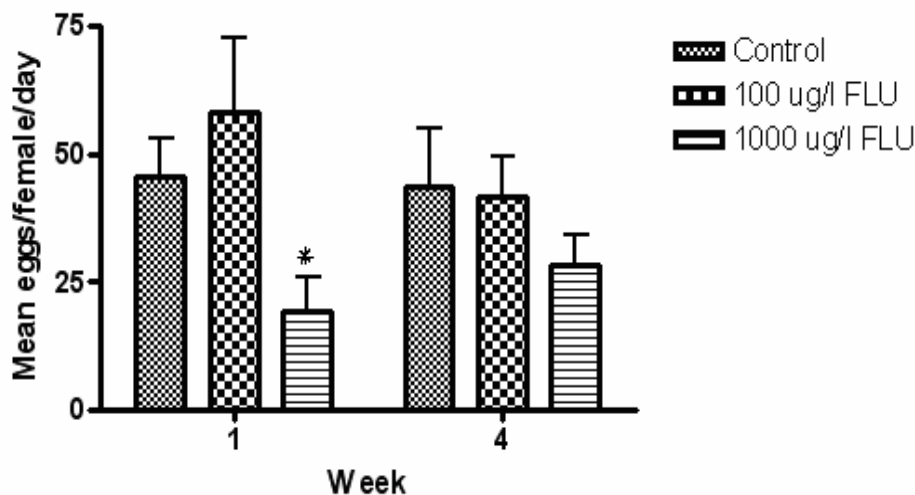
A. Ovarium somatische index



Grafiek 4.11: De gemiddelde OSI (percentage gonaden ten opzichte van totaal nat gewicht) per blootstellingsconditie op dag 28 van de blootstelling. (Controle: n=7, blootgesteld aan 100µg/l flutamide: n=7, blootgesteld aan 100µg/l flutamide: n=9).

Voor de OSI werd een 2-way-anova uitgevoerd, gevolgd door een Bonferroni post-hoc test omdat we werken met 2 variabelen (tijdstip en blootstellingsconditie). Er werden geen significante verschillen gevonden ($p > 0,05$).

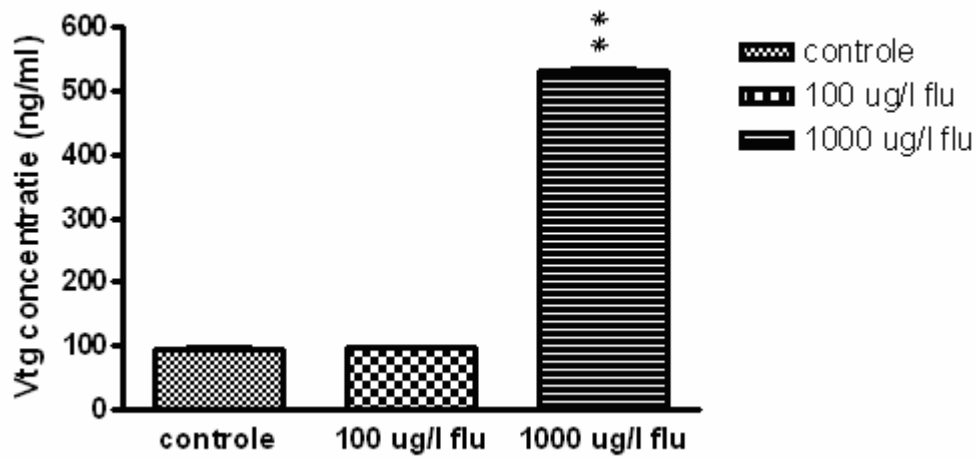
B. Eileg



Grafiek 4.12: De gemiddelde eileg per aquarium per blootstellingsconditie op week 1 en 4. (Controle: n=5, blootgesteld aan 100µg/l flutamide: n=5, blootgesteld aan 100µg/l flutamide: n=5).

De gemiddelde eileg per vrouwtje per aquarium werd berekend voor week 1 en week 4. Er werd eveneens een 2-way-anova uitgevoerd gevolgd door een Bonferroni post-hoc test. Er werd maar één significant verschil gevonden, namelijk de populatie blootgesteld aan 1000µg/l legden minder eitjes in de eerste week van de blootstelling dan de controle populatie ($p < 0,05$).

4.3 Vitellogenine bepaling



Grafiek 4.10: Vtg concentratie van de verschillende blootstellingsgroepen op dag 30 van de blootstelling. (Controle: n=6, blootgesteld aan 100 μ g/l flutamide: n=6, blootgesteld aan 100 μ g/l flutamide: n=6).

Een one-way-anova geeft een significant verschil ($p < 0,05$) weer tussen de controle populatie en de populatie blootgesteld aan 1000 μ g/l, waar de Vtg concentratie veel hoger ligt.

Hoofdstuk 5: Discussie

5.1 Analyse differentiële gen-expressie met microarrays

Uit de tabel (zie tabel 4.1) kan worden afgelezen dat het mRNA waarmee gewerkt werd, voldoende zuiver was en een voldoende hoge concentratie bezat, zodat hybridisaties konden worden uitgevoerd. De stalen van de controle- en blootgestelde groep werden gelabeld met Cy 3 en Cy 5. Deze labeling was ook een succes, wat af te leiden valt uit de tabel 4.2 . Uiteindelijk verkregen we dan 10 micro-arrays, die werden ingescand.

Uit de analyse van de scans bleek dat er gemiddeld 4.6% genen differentieel tot expressie kwamen. Aan de hand van tabel 5.1 werd duidelijk dat genen betrokken bij ‘transcriptie en translatie’ in elke blootstellingsconditie vaak tot uiting werden gebracht. Genen behorend tot de functionele klasse ‘signaaltransductie en neurotransmissie’ duiken op in alle arrays waarbij mRNA gebruikt werd van ovaria en testes blootgesteld aan 100 µg/l flutamide en éénmaal in een array waarbij mRNA gebruikt werd van ovaria blootgesteld aan 1000 µg/l flutamide. ‘Groei en ontwikkeling’ was een klasse die meer tot uiting kwam in testes blootgesteld aan 100 µg/l flutamide. Ook genen behorend tot de functionele klasse van ‘proteïne metabolisme’ kwamen vaker tot expressie dan andere genen in testes na 28 dagen blootstelling aan 100 en 1000 µg/l flutamide, en in ovaria na 28 dagen blootstelling aan 1000 µg/l flutamide.

Omwille van tijdsdruk worden de data vanuit een semi-kwantitatief perspectief besproken. Verdere confirmatie zal nodig zijn in de toekomst (aan de hand van real time PCR en grondigere statistische analyse).

	♀4d 100	♂4d 100	♀28d 100	♂28d 100	♀4d 1000	♂4d 1000	♀28d 1000	♂28d 1000
Signaaltransductie en neurotransmissie	X	X	X	X			X	
transcriptie en translatie	X	X	X	X	X	X	X	X
groei en ontwikkeling		X			X			
proteïne metabolisme				X			X	X

Tabel 5.1: Functionele klassen waartoe genen behoren die het meest tot expressie komen

Flutamide genereert dus een typisch gen-expressie profiel dat later gebruikt kan worden voor de identificatie en classificatie van potentiële endocriene verstoorders. Spijtig genoeg is het niet mogelijk om alle genen die differentieel tot expressie kwamen, in deze thesis te bespreken. In tabel 5.2 wordt een overzicht gegeven van genen die wel in de discussie worden aangehaald. De meeste aandacht gaat naar genen die in verband kunnen worden gebracht met het endocrien systeem.

	♀4d 100	♂4d 100	♀28d 100	♂28d 100	♀4d 1000	♂4d 1000	♀28d 1000	♂28d 1000
apoptose gerelateerd								
Caspase 3	↓							
Caspase b							↓	
TNF					↓			
Death Domain					↓			
Bcl-2	↑							
Celstructuur gerelateerd								
Claudine 12			↓			↓	↓	
Claudine 7					↑	↑		
β-tubuline	↑				↑			
tubuline				↓			↓	
tubuline α-chain	↑				↑	↓	↑	↓
tubuline β-polypeptide		↑		↓				↓
Immuunsysteem en afweer								
Prostagl D synthese-like	↓				↑			
Proteïne metabolisme								
Cathepsine					↓			↓
Groei en ontwikkeling								
Nucl rec 5 groep A		↓	↓	↓				
germ cell nucl factor		↓						
Signaaltransductie en translatie								
odorant rec fam 13 m 3			↓			↓	↓	
odorant rec fam 2 m 1	↓				↓		↓	
odorant rec fam 5 m 1							↓	
odorant rec fam 5 m 2	↓					↓		
odorant rec fam 2 m 2						↓		
odorant red fam 4 m 1	↓							
olfactor. Marker proteïne								↓
P38 Map kinase				↑				
Overige								
Multiple drug resist	↑			↑				↑
Calmoduline			↓					↓
Endocrien systeem gerelateerd								
Cyp 450		↓				↑		
ZP2		↓						
ZP domain containing proteïn								↑
oestrogeen rec α	↓						↓	
oestrogeen rec β							↓	
Vtg 1 gen	↓							
oestrogeen	↑			↑				
activine B								↓
Daz-like gen					↓			
SRY-box		↓			↓			↑
SRY-box gen 10					↓		↓	
SR-box gen 11b							↓	
Mos oncogen		↑						

Tabel 5.2: Differentiële gen-expressie van genen die besproken worden in de discussie.

Uit analyse van de differentieel geëxprimeerde genen bleek duidelijk dat bijna alle genen gerelateerd aan apoptose, neergereguleerd waren; caspase 3 (differentieel geëxprimeerd in ovaria na 4 dagen blootstelling aan 100µg/l flutamide) en caspase b (differentieel geëxprimeerd in ovaria na 28 dagen blootstelling aan 1000µg/l flutamide). Naar de rol van **apoptose** in de reproductieve dynamica van teleosten is nog niet veel onderzoek verricht. Apoptose wordt wel gerelateerd met de eliminatie van onnodige cellen tijdens gonadale differentiatie, ontwikkeling van ovariële follikels, regressie van post-ovulaire follikels en folliculaire atresia (Santos *et al.*, 2005 (a)). **Caspases** zetten de apoptose in, en wanneer deze zijn neergereguleerd, zal de cascade van apoptose trager, of niet in werking treden. Caspases kunnen door vele mechanismen worden beïnvloed, zoals door **TNF** (tumor necrosis factor). TNF werd neergereguleerd teruggevonden in ovaria na 4 dagen blootstelling aan 1000µg/l flutamide. Nog vele andere proteïnen zijn betrokken in het apoptose proces, zoals **death domains** en **Bcl-2**. Een death domain gen werd neergereguleerd in ovaria na 4 dagen blootstelling aan 1000µg/l flutamide (Reed, 2000). Bcl-2 werd opgereguleerd teruggevonden in ovaria na 4 dagen blootstelling aan 100µg/l flutamide.

De regulatie van de geprogrammeerde celdood in gonaden is afhankelijk van vele factoren, alsook van GnRH. GnRH speelt een belangrijke rol in de controle van spermatogenese in de goudvistestes (Andreu-Vieyra *et al.*, 2004). Studies hebben aangetoond dat gonadotrofines, 17 β oestradiol en epidermal growth factor, apoptose kunnen onderdrukken in pre-ovulatoire follikels van de regenboogforel (Santos *et al.*, 2005 (a)). Anti-androgenen zouden daarom in staat kunnen zijn om de apoptose te onderdrukken, aangezien ze op sommige vlakken de oestrogene activiteit nabootsen. Men vermeldt ook dat androgenen en hun receptor pro- en anti-apoptotische functies kunnen uitoefenen, maar dat het juiste mechanisme nog niet bekend is (Lin *et al.*, 2006).

De opslag van sperma is belangrijk voor teleosten en draagt bij tot de reproductieve cyclus. Junctionele complexen van tight junctions en desmosomen aanwezig in opslagplaatsen zorgen hierbij voor een goede afscherming (Potter en Kramer, 2000).

Tight junctions bestaan uit **claudines**, waarvan er in de zebravis 15 verschillende types bestaan. Er zijn een aantal studies die veranderingen in claudine expressie in antwoord op fysiologische en farmacologische stimuli opmerkten (Van Itallie en Anderson, 2006). In ons onderzoek zagen we ook een algemene neerregulatie van claudin 12 in testes na 4 dagen blootstelling aan 1000µg/l flutamide, in ovaria na 28 dagen blootstelling aan 100µg/l en 1000µg/l flutamide. Een opregulatie werd gezien voor claudin 7 in testes en ovaria na 4 dagen blootstelling aan 1000µg/l flutamide.

Genen gerelateerd aan **α- en β- tubuline** werden erg veel teruggevonden in de op- en neergereguleerde genen van alle blootstellingscondities. Dit is niet zo vreemd omdat de concentraties van α- en β-tubuline mRNA tot 25 keer kunnen stijgen rond de periode van synthese van de spermatidestaart (Kennedy *et al.*, 1985) en er dus een grote variatie in expressie kan bestaan. **Microtubuli**, homologe polymeren van α- en β- tubuline, zijn dynamische componenten van het cytoskelet van de cel (Brevini *et al.*, 2005) en sommige endocriene verstoorders kunnen dit netwerk verstoren (Nakagomi *et al.*, 2001).

Microtubuli hebben een belangrijke rol in het handhaven van de functie van Sertolicellen. Ze zorgen namelijk voor het behoud van de vorm, voor de positie en transport van intracellulaire organellen, het verplaatsen van de spermatiden in de seminifere epithelia en het aanpassen van het membraan van de Sertolicellen aan de onregelmatige vorm van de kopjes van de spermatiden (Dolores en Cheng., 2004). Veranderingen in bestanddelen van microtubuli zorgen dus voor schadelijke effecten op het niveau van Sertolicellen en zodoende ook op het reproductief gedrag.

Het prostaglandine D synthese-like gen werd neergereguleerd teruggevonden in ovaria en opgereguleerd in testes na 4 dagen blootstelling aan 100 µg/l flutamide en 1000 µg/l flutamide. In een studie van Malki *et al.*, werd in 2005 (b) waargenomen dat tijdens gonadale ontwikkeling bij muizen, de translocatie van SOX9 naar de nucleus (een belangrijke stap in de geslachtsbepaling), beïnvloed werd door **prostaglandine D**. Ze stelden prostaglandine D2 als een autocriene factor die de SOX9 translocatie naar de nucleus kan induceren en zo dus de differentiatie van Sertolicellen kan beïnvloeden. Een neerregulatie van het prostaglandine D synthese-like gen zou dus weer een verminderde translocatie van SOX9 naar de nucleus kunnen betekenen. **SOX9** is een geslachtsbepalende factor die Sertoliceel differentiatie induceert en vervolgens ook de vorming van testesstrengen. Het wordt tot uiting gebracht in ongedifferentieerde gonaden in het cytoplasmatische compartiment van de pre-Sertolicellen. Tijdens geslachtsdifferentiatie beweegt SOX9 zich naar de nucleus van de mannelijke pre-Sertolicellen, en bij de vrouwelijke blijft het in het cytoplasma. Bij mannetjes zorgt het voor een complete reorganisatie van het microtubuli netwerk in epitheliale Sertolicellen (Malki *et al.*, 2005 (a)). Een verstoring van het microtubuli netwerk (zie hoger) en een verminderde translocatie van SOX9 naar de nucleus, kunnen zorgen voor het ontstaan van minder fenotypische mannetjes.

Een gen gerelateerd aan **cathepsine** werd neergereguleerd teruggevonden in ovaria en testes na respectievelijk 4 dagen blootstelling en 28 dagen blootstelling aan 1000µg/l flutamide. Cathepsine D is aanwezig in lysosomen in de oöcyten en zorgt voor de omzetting van Vtg in dooierewit (Arukwe en Goksøyr., 2003). Vtg dient als voedingsbron voor de larfjes en wanneer cathepsine minder aanwezig is om het Vtg in de juiste vorm om te zetten, zal de concentratie Vtg in de oöcyt en dus ook de voedselbron verminderen. Een daling in cathepsine zou dus aanleiding kunnen geven aan een hogere larvemortaliteit.

Opvallend was dat leden van de **nucleaire receptor 5 groep A** waren neergereguleerd in testes na 4 dagen en 28 dagen blootstelling aan 100µg/l flutamide, en in ovaria na 28 dagen blootstelling aan 100µg/l flutamide. De functie van de teleost nucleaire receptor 5 A (NR5A) genen en hun betrokkenheid in geslachtsbepaling en hormoon synthese is nog niet helemaal duidelijk maar ze zijn betrokken in de reproductieve capaciteit en geslachtsdifferentiatie (Von Hofsten, 2004). Men zag dat wanneer vissen behandeld waren met oestrogeen, de nucleaire receptoren waren neergereguleerd, wat kan leiden tot een verstoring in het maturatieproces van de vissen. Teleost NR5A2 genen leken ook erg belangrijk voor de gonadale ontwikkeling en geslachtsbepaling. Bij blootstelling aan oestrogeen kan de geslachtsratio veranderen en op lange termijn kan de populatie hierdoor verzwakken en zelfs uitsterven (Von Hofsten, 2004). Omdat flutamide een anti-androgene werking heeft en oestrogene effecten kan opwekken, is het goed mogelijk dat de neerregulatie van de NR5A genen een verstoring in gonadale ontwikkeling weergeeft.

De **germ cell nucleaire factor** leunt dicht aan bij de nucleaire receptor groep, want de nucleaire factor is een 'orphan receptor' in de nucleaire receptor superfamilie (Süsens en Borgmeyer, 2001). Nucleaire orphan receptoren zijn DNA bindende proteïnen die de domeinstructuur van de nucleaire hormoon receptor superfamilie hebben, ondanks dat hun liganden onbekend zijn. De zebrafish germ cell nucleaire factor wordt vooral tot uiting gebracht in previtellogenetische oöcyten in de ovaria en in de spermatocyten in de testis (Braat *et al.*, 1999). Wij zagen een neerregulatie van deze germ cel nucleaire factor in testes na 4 dagen blootstelling aan 100µg/l flutamide, wat zou kunnen wijzen op een daling in de kwaliteit van de gameten.

Wij namen een neerregulatie waar van het Cyt P450 gen in testes na 4 dagen blootstelling aan 100µg/l flutamide, maar een opregulatie van hetzelfde gen in testes na 4 dagen blootstelling aan 1000µg/l flutamide. Xenobiotica kunnen **cytochroom P450 aromatase** inhiberen en daarmee ook de snelheidsbepalende stap in steroïdogenese, door in te werken op de Ah receptor (Aluru en Vijayan, 2006). Ah receptoren worden tot uiting gebracht in hersenen en gonaden van vissen en zijn betrokken bij reproductie en ontwikkeling. In de literatuur wordt vermeld dat dioxines de expressie van CYP 19 A gen neerreguleren (Greytak *et al.*, 2005) en dat oestrogene bestanddelen CYP19A2 gen expressie verhogen in een dosisafhankelijke manier (Kazeto *et al.*, 2004). Omdat er geen differentiële gen-expressie werd gevonden in ovaria, zouden we kunnen zeggen dat flutamide minder invloed uitoefent op vrouwelijke vissen, dan op mannelijke.

In onze studie bleek dat alle odorant receptoren die voorkwamen in de resultaten van de microarrays, neergereguleerd waren in ovaria en testes na 4 dagen blootstelling aan 100 en 1000µg/l flutamide en in ovaria na 28 dagen blootstelling aan 100 en 1000µg/l flutamide. Het olfactorisch systeem gebruikt **odorant receptoren** om duizende verschillende chemische substanties te herkennen (Specca *et al.*, 1999). Wanneer een odorant receptor wordt geactiveerd, wordt een elektrisch signaal naar de hersenen gestuurd (Axel en Buck, 2004). Odorant receptoren zouden geslachtsferomonen kunnen detecteren (Hamdani en Døving, 2006). Wanneer odorant receptoren neergereguleerd zijn, is er waarschijnlijk minder mogelijkheid om de geslachtsferomonen te detecteren, wat nadelig is voor de reproductie van de soort. Dit zou men kunnen nagaan door naar het gedrag te kijken. De kwantitatieve gedragsanalyse die wij hebben uitgevoerd, wordt momenteel voor verder verwerkt door de dienst ISLab aan de Universiteit van Antwerpen, maar echt resultaten met betrekking tot reproductieve parameters kunnen nog niet gegeven worden. Ook neergereguleerd was het **olfactorisch marker proteïne** in testes na 28 dagen blootstelling aan 1000µg/l flutamide. Dit marker proteïne karakteriseert de expressie van mature olfactorische receptor neuronen (Rössler *et al.*, 1998) en zou dus bij neerregulatie voor een verminderde verbinding met de hersenen en dus ook voor een verminderde detectie van geslachtsferomonen kunnen veroorzaken.

Het **p38 Mitogen-activated protein kinase** oefent vooral een functie uit in stressresponsen zoals ontsteking en apoptose (Schaeffer en Weber., 1999) en was opgeregeerd in testes na 28 dagen blootstelling aan 100µg/l flutamide. Uit een experiment van Prifti *et al.*, (2003) bleek dat blootstelling aan ethinylestradiol kan leiden tot de activatie van MAP kinase, waardoor cellulaire functies ontregeld worden. Omdat er geen verstoring van MAP kinase in ovaria werd waargenomen, zou dit kunnen wijzen op een verschillende beïnvloeding van flutamide op mannelijke en vrouwelijke vissen.

Een opregulatie van **multiple drug resistance** genen werd gezien bij ovaria na 4 dagen blootstelling aan 100µg/l flutamide en in testes na 28 dagen blootstelling aan 100µg/l Flutamide en 1000µg/l flutamide. In zoogdieren kunnen vele xenobiotica de expressie van multiple drug resistance genen verhogen via de pregnane X receptor pathway (Bresolin *et al.*, 2005). Multiple drug resistance proteïnen spelen een belangrijke rol in het transport en de detoxificatie van verschillende endogene componenten en xenobiotica (Borst *et al.*, 2000). Deze organismen hadden waarschijnlijk meer xenobiotica te verwerken dan de controle groepen.

Calmoduline werd onder invloed van flutamide neergereguleerd in testes en ovaria na 28 dagen blootstelling aan respectievelijk 1000 en 100µg/l flutamide. Calmoduline medieert vele calcium gedreven metabolische reacties. De betrokkenheid van calciumafhankelijke signaal transductie pathways in de regulatie van ovariële steroïdogenese werd onderzocht in een Atlantische vissoort (*Micropogonias undulatus*) en men zag dat calcium de regulatie van de aromatase activiteit in vertebrate ovaria beïnvloedde. De neerregulatie die hier werd waargenomen zou een betrokkenheid in de regulatie van de ovariële steroïdogenese kunnen betekenen (Benninghoff en Thomas, 2005).

De **zona pellucida** bestaat uit drie glycoproteïnen (ZP1, ZP2 en ZP3). ZP2 was neergereguleerd in testes na 4 dagen blootstelling aan 100µg/l flutamide, maar er werd wel een opgereguleerd **Zona pellucida domain containing protein** gevonden in testes na 28 dagen blootstelling aan 1000µg/l Flutamide. Tijdens de bevruchting moet sperma binden op een species-specifieke manier aan de dikke extracellulaire laag van de oöcyt, de zona pellucida (Wassarman, 2002). De zona pellucida is essentieel voor de overleving van de oöcyten en de bevruchting in het algemeen. Bij vissen speelt de zona pellucida een belangrijke rol in de preventie van bevruchting tussen verschillende species (Oehninger, 2003) en vormt een extracellulaire matrix rond de oöcyt om deze te beschermen tegen mechanische schade (Sinowatz *et al.*, 2001). Korte termijn blootstelling had dus geen nadelig effect, maar langere blootstelling zou dus wel kunnen zorgen voor inductie van de zona pellucida, wat er op zou kunnen wijzen dat de testes vervrouwelijkten.

Bij ovaria werd na 4 dagen blootstelling aan 100µg/l flutamide en 28 dagen blootstelling aan 1000µg/l flutamide een neerregulatie van de **oestrogeen receptor** alfa en beta teruggevonden. Deze receptor is belangrijk voor de reproductie (Bouma en Nagler, 2001). Een verminderde expressie van de oestrogeen receptor kan het gevolg zijn van de anti-androgene werking van flutamide. Het organisme heeft minder behoefte aan oestrogeen, en vermindert de expressie van de oestrogeen receptor, die de effecten van de oestrogenen medieert. In de testes werd de oestrogeen receptor beta opgereguleerd teruggevonden na 28 dagen blootstelling aan 1000µg/l flutamide. We zouden kunnen stellen dat de mannelijke vis normaal gezien niet in aanraking komt met een anti-androgene stof, en als reactie op de verhoogde oestrogene activiteiten meer oestrogeen receptoren induceert.

Het **Vtg 1 gen** werd neergereguleerd in ovaria na 4 dagen blootstelling aan 100µg/l flutamide, en in dezelfde ovaria werd oestrogeen opgereguleerd teruggevonden, wat niet overeenkomt met de verminderde Vtg expressie. Het gen voor Vtg is meestal onderdrukt in de mannelijke vis, maar kan worden geïnduceerd tijdens oestrogeen of anti-androgene blootstelling. Mannelijk plasma Vtg gehalte kan dienen als indicator voor verminderde vrouwelijke reproductieve functie veroorzaakt door deze blootstellingen (Mills *et al.*, 2003). Vtg kan worden geïnduceerd door hoge dosissen androgenen (Le Menn *et al.*, 1980). Omdat we hebben blootgesteld met een anti-androgeen (flutamide), is het niet ondenkbaar dat Vtg door flutamide kan worden neergereguleerd. Een opregulatie van **oestrogeen** werd gezien in testes na 28 dagen blootstelling aan 100µg/l flutamide en 1000µg/l flutamide. Dit zou een aanwijzing kunnen vormen dat continue blootstelling aan een anti-androgeen de ontwikkeling van de testes kan stoppen (Fenske *et al.*, 2005).

Een neerregulatie van **Activine B** werd gezien in testes na 28 dagen blootstelling aan 1000µg/l flutamide. Stimulatie van activine B mRNA brengt de spermatogoniële proliferatie op gang (Nagahama *et al.*, 1994). Activines reguleren de secretie van FSH en ovariële functies, zoals steroid hormoonproductie en oöcyt maturatie (DiMuccio *et al.*, 2005).

Activines hebben ook een effect op de oöcytrijping, maar dit werd niet teruggevonden in ons onderzoek (Wang en Ge., 2003; Wei, 2000; Ge *et al.*, 1993, Galp *et al.*, 2003). Neerregulatie van dit activine B houdt dus een verminderde spermaproductie in, met een verminderde reproductionele capaciteit tot gevolg.

Het **DaZ-like gen** (deleted in azoospermia) (Vera *et al.*, 2002) werd neergereguleerd in ovaria na 4 dagen blootstelling aan 1000µg/l Flutamide. Daz genen spelen een belangrijke rol in de gametogenese (Maegawa *et al.*, 2002) en dus zou neerregulatie aanleiding kunnen geven tot een verstoring in de vorming van de gameten.

De **SRY box** genen werden veelvuldig neergereguleerd tijdens blootstelling aan flutamide. In ovaria werd SRY box en SRY box gen10 na 4 dagen blootstelling aan 1000µg/l flutamide neergereguleerd, in ovaria werd SRY box gen 10 en gen 11 neergereguleerd na 28 dagen blootstelling aan 1000µg/l flutamide. In testes werd er een neerregulatie gezien na 4 dagen blootstelling aan 100µg/l flutamide en een opregulatie in testes na 28 dagen blootstelling aan 1000µg/l flutamide. De SRY box is een transcriptionele activator die de genetische omschakeling in mannelijke ontwikkeling regelt en is verantwoordelijke voor de inductie van de ontwikkeling naar het mannelijke fenotype (Nikolova en Vilain, 2006). De neerregulatie in de ovaria zou er op kunnen wijzen dat, door de anti-androgene effecten, de vissen het vrouwelijke fenotype kunnen aannemen en dat het mannelijke fenotype kan worden onderdrukt.

Mos oncogen heeft een hoge expressie in germ cellen. Mos is een regulator van meiotische rijping en is nodig voor de initiatie en progressie van oöcyt maturatie dat leidt tot de productie van onbevuchte eieren (Yew *et al.*, 1993). Dit gen werd opgeregleerd teruggevonden in testes na 4 dagen blootstelling aan 100µg/l flutamide, wat een vervrouwelijking zou kunnen aantonen.

5.2 Gameetfysiologie en vitellogenine

Een one-way-anova onthulde significante verschillen in **spermaviabiliteit** tussen de controle en beide blootstellingsgroepen. De groep vissen die 28 dagen waren blootgesteld aan 100 µg/l flutamide, vertoonde dubbel zoveel dode spermacellen in vergelijking met de controlegroep. De groep die 28 dagen was blootgesteld aan de hoogste concentratie flutamide (1000 µg/l) gaf zelfs een verviervoudiging aan, van het aantal dode spermacellen in vergelijking met de controle groep en een verdubbeling in vergelijking met de groep die werd blootgesteld aan 100 µg/l flutamide. Deze resultaten komen overeen met andere dalingen in spermakwaliteit. Flutamide gaf aanleiding tot een daling in sperma-aantallen in guppies (Bayley *et al.*, 2002; Baatrup en Junge, 2001). Als oorzaak vermeldt men in Kinnberg en Toft (2003) een blokkade van de spermatogonale mitose. Ook andere anti-androgenen, zoals vinclozoline toonden een daling in sperma-aantallen aan (Bayley *et al.*, 2003). Niet enkel bij vissen worden deze resultaten bekomen, ook bij mannelijke ratten, die na de geboorte een androgeen receptor agonist toegedient kregen, zag men een daling in het aantal spermacellen (Grey *et al.*, 1998). Het lijkt erop dat zowel androgeen receptor agonisten als antagonist, de spermaproductie kunnen beïnvloeden via andere mechanismes dan de klassieke receptor bindende mechanisme's en signaal transductie pathways (Shilling en Williams, 2000). Een daling in het aantal spermacellen, of een verminderde spermaviabiliteit zijn erg bedreigend voor het voortbestaan van een soort.

De **Ovarium Somatische Index** gaf geen significante verschillen tussen controle en blootgestelde groepen. Ook dit is in overeenstemming met resultaten van andere studies, Bayley *et al.*, (2002) zagen ook geen beïnvloeding van de Gonado-Somatische Index bij guppies na blootstelling aan anti-androgenen. Panter *et al.*, (2004) zochten de oorzaak hiervan in de lage werkingscapaciteit van flutamide bij vissen in vergelijking met de hogere werkingscapaciteit bij zoogdieren.

Er werd geen duidelijk effect gevonden op **eileg**. Er was wel een significant verschil te zien na 1 week tussen de blootstelling aan 1000 µg/l flutamide en de controle groep. Dit verschil werd wel niet teruggevonden in de 4^{de} week van de blootstelling, maar dezelfde trend werd wel zichtbaar. In een OESO (2005) document dat de 21 dagen vissen-assay voor detectie van endocrien actieve bestanddelen reviseert, komen dezelfde waarnemingen tot uiting.

Het bloed van mannelijke vissen die waren blootgesteld aan 100 en 1000 µg/l flutamide werd onderzocht op de aanwezigheid van **Vtg**. In grafiek 4.18 is er een significant verschil ($p < 0,05$) te zien tussen de controlepopulatie en de populatie blootgesteld aan 1000 µg/l flutamide. In mannetjes is er normaal maar weinig circulerend oestrogeen aanwezig in het bloed en wordt er dus geen Vtg geproduceerd. De hoge concentratie flutamide, met een oestrogeenachtige werking, kan de expressie van Vtg induceren (Panter *et al.*, 2004).

Flutamide zou ook geen rechtstreeks effect uitoefenen op de Vtg concentratie via de androgeenreceptor (Ankley *et al.*, 2004), wat kan verklaren waarom er geen effect werd gezien bij de laagste blootstellingconcentratie, die te laag zal zijn om de oestrogene werking op de oestrogeenreceptoren te imiteren, waardoor er geen Vtg geproduceerd wordt.

5.3 Integratie van de resultaten

Gen-expressie alleen is onvoldoende om uitspraak te kunnen doen in verband met de nadelige effecten van toxicologische blootstelling. Daarom is het noodzakelijk de resultaten tussen de verschillende niveaus van biologische organisatie te vergelijken. Data bekomen uit microarrays kunnen worden vergeleken met andere biomerkers, zoals spermakwaliteit, fertiliteit en Vtg concentratie in het bloed.

De flow cytometrische analyse **van het sperma**, duidde op een daling van de spermaviabiliteit bij toenemende concentraties flutamide. Ook op het niveau van de genexpressie. Verschillende genen betrokken in spermaproductie en gameetvorming werden dan ook verstoord tijdens deze blootstelling:

- Een daling in Activine B en een daling in germ cell nucleaire factor kunnen in verband worden gebracht met een dalende spermaproductie.
- Verandering in expressie van proteïnen die microtubuli vormen, kan zorgen voor een verstoring van de functie van Sertolicellen, waardoor sperma schadelijke effecten ondervindt.
- Een onderdrukking van het mannelijke fenotype ontstaat door neerregulatie van de SRY box genen, wat mogelijks de kwaliteit van het sperma ook niet ten goede komt.
- Vervrouwelijking van de testes door opregulatie van ZPdomain containing protein, opregulatie van een oestrogeen-gen en opregulatie van het Mos oncogen, kunnen ook gecorreleerd worden met een dalende kwaliteit van sperma.
- Door een verandering in expressie van claudines, veranderen de tight junctions. De opslag van sperma kan daardoor in het gedrang komen, omdat deze tight junctions zorgen voor een afsluiting tussen de cellen die de opslagplaats van het sperma vormen.

De **Vtg concentratie** in het bloed was hoger in de populatie blootgesteld aan 1000µg/l flutamide, dan in de controlepopulatie. In de gen-expressie kon geen verstoring van genen gerelateerd aan Vtg productie worden teruggevonden. Om een beter idee te krijgen van de effecten van een anti-androgeen op Vtg productie, zal een langere blootstelling nodig zijn. Ook kan er beter in de lever gezocht worden naar effecten op Vtg, omdat daar hoofzakelijk de inductie van Vtg plaatsvindt.

De **OSI** werd niet beïnvloed door de blootstelling aan flutamide, wat ook bleek uit de resultaten van de arrays. De eileg toonde een dalende trend bij toenemende concentraties flutamide. Op gen-expressie niveau werden maar weinig genen gecorreleerd met eileg differentieel tot expressie gebracht. Een eventuele verklaring voor de dalende trend in eileg zou een dalende expressie van het daz-like gen kunnen zijn, waardoor de vorming van gameten wordt verstoord. Ook hier zal een langere blootstelling nodig zijn om de juiste mechanismen te achterhalen.

Hoofdstuk 6: Conclusie en aanbevelingen

Uit de resultaten bleek dat flutamide een effect had op het niveau van gen-expressie in de gonaden van blootgestelde zebravissen. Er werd duidelijk differentiële gen-expressie waargenomen bij genen die betrokken zijn bij het endocrien systeem en reproductie. Maar ook genen gerelateerd aan signaaltransductie, translatie en stress ondervonden een invloed van de blootstelling aan flutamide. Genen betrokken bij geslachtsbepaling en gonadale ontwikkeling, alsook de vorming van de gameten werden op verschillende plaatsen verstoord. De resultaten suggereerden een algemeen beeld van de onderdrukking van het mannelijke fenotype, dus een 'vervrouwelijkend' effect. De vrouwelijke vissen bleken minder gevoelig te zijn voor flutamide en ondervonden minder schadelijke effecten van de oestrogeen-achtige werking van flutamide. Flutamide genereerde een typisch gen-expressie profiel dat later gebruikt kan worden voor de identificatie en classificatie van potentiële endocriene verstoorders. De gevonden resultaten bleken immers nauw aan te sluiten bij wat in de literatuur beschikbaar is.

De analyse van sperma van mannelijke vissen met de flow cytometer gaf een duidelijke daling in viabiliteit weer. Dit resultaat stemde overeen met gegevens verkregen via microarrays, waaruit duidelijk bleek dat genen gerelateerd aan spermaproductie en gameetvorming, verstoord waren. In dit geval lijken de data tussen de verschillende niveaus van biologische organisatie elkaar te bevestigen.

Vitellogenine bepaling in het bloed van mannelijke vissen na een blootstelling van 28 dagen, toonde een verhoging van de Vtg concentratie aan in de populatie die werd blootgesteld aan 1000µg/l flutamide. We ontdekten dat bijna geen genen gerelateerd aan Vtg differentieel tot expressie kwamen, echter de belangrijkste inductie plaats voor Vtg in vissen is de lever, en in deze studie werd voornamelijk op ovaria en testis gefocust.

Hetzelfde geldt voor de resultaten van de eileg, waar 1 significant verschil werd vastgesteld (tussen controle en de populatie blootgesteld aan 1000µg/l flutamide in week 1 van de blootstelling), maar waar wel een dalende trend werd gezien bij blootstelling aan stijgende concentraties flutamide.

In de toekomst is het duidelijk dat door meer dergelijke studies uit te voeren, meer gedetailleerde inzichten zullen verkregen worden over werkingsmechanismen van endocriene verstoorders. Door nog meer naar correlaties tussen verschillende niveaus van biologische organisatie te zoeken, evolueert men naar een betere kwaliteit van ecotoxicologische evaluatie en uiteindelijk tot een uniek en geïntegreerd beeld van de effecten van endocriene verstoorders op verschillende niveaus van biologische organisatie bij de zebravis. Het ultieme doel blijft om op basis van vroege veranderingen in het gen-expressie patroon, te kunnen voorspellen wat de impact van een stof is, nog voor de effecten op populatie of ecosysteem niveau zichtbaar zijn.

Referenties

- Aleström P, Holter LJ en Nourizadeh-Lillabadi R (2006) Zebrafish in functional genomics and aquatic biomedicine. *Trends in Biotechnology* **24**, 15-21
- Aluru N en Vijayan MM (2006) Aryl Hydrocarbon Receptor Activation Impairs Cortisol Response to Stress in Rainbow Trout by Disrupting the Rate-Limiting Steps in Steroidogenesis. *Endocrinology* **147**, 1895-1903
- Andreu-Vieyra CV, Buret AG en Habibi HR (2004) Gonadotropin-Releasing Hormone Induction of Apoptosis in the Testes of Goldfish (*Carassius auratus*). *Endocrinology* **146**, 1588-1596
- Ankley GT, Defoe DL, Kahl MD, Jensen KM, Makynen EA, Miracle A, Hartig P, Gray LE, Cardon M en Wilson V (2004) Evaluation of the model anti-androgen flutamide for assessing the mechanistic basis of responses to an androgen in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ. Sci. Techn.* **38**, 6332-6337
- Arukwe A (2001) Cellular and Molecular Responses to Endocrine-Modulators and the Impact on Fish Reproduction. *Marine Pollution Bulletin* **42**, 643-655
- Arukwe A en Goksøyr A (2003) Eggshell and egg yolk proteins in fish: hepatic proteins for the next generation: oogenetic, population, and evolutionary implications of endocrine disruption. *Comparative Hepatology* **2**, 4
- Au DWT, Lee CY, Chan KL en Wu RSS (2001) Reproductive impairment of sea urchins upon chronic exposure to cadmium. Part I: Effects on gamete quality. *Environmental Pollution* **111**, 1-9
- Author not available (2006) *The Endocrine System*. In: The Columbia Encyclopedia, Sixth Ed. Columbia University Press
- Axel R and Buck LB (2004) "odorant receptors and the organization of the olfactory system" *The 2004 Nobel Prize in Physiology or Medicine*
- Baatrup E en Junge M (2001) Antiandrogenic pesticides disrupt sexual characteristics in the adult male guppy *Poecilia reticulata*. *Eviron. Health. Perspect.* **109**, 1063-1070
- Baker ME (1995) Endocrine activity of plant derived compounds: an evolutionary perspective. *Proceedings Society Experimental Biology and Medicine* **208**, 131-138
- Bayley M, Junge M en Baatrup E (2002) Exposure of juvenile guppies to three antiandrogens causes demasculinization and a reduced sperm count in adult males. *Aquatic toxicology* **56**, 227-239
- Bayley M, Larsen PF, Baekgaard H en Baatrup E (2003) The effects of vinclozolin, an anti-androgenic fungicide, on male guppy secondary sex characters and reproductive success. *Biol. Reprod.* **69**, 1951-1956
- Benninghoff AD en Thomas P (2005) Involvement of calcium and calmodulin in the regulation of ovarian steroidogenesis in Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*) and modulation by Aroclor 1254. *Gen. Comp. Endocrinol.* **144**, 211-223
- Birnbaum LS (1994) The mechanism of dioxin toxicity: relationship to risk assessment. *Eviron. Health. Perspect.* **102**, 157-167
- Blazquez M, Bosma PT, Fraser JK, Van Look KJW en Trudeau VL (1998) Fish as models for the neuroendocrine regulation of reproduction and growth. *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* **119**, 345-364
- Boas M, Feldt-Rasmussen U, Skakkebaek NE en Main KM (2006) Environmental chemicals and thyroid function. *European Journal of Endocrinology* **154**, 599-611

- Borst P, Evers R, Kool M en Wijnholds J (2000) A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J.Nat. Cancer Inst.* **92**, 1295-1302
- Bortone SA, Davis WB en Bundrick CM (1989) Morphological and behavioural characters in mosquito fish as potential bioindication of exposure to kraft mill effluent. *Bulletin of the Environmental Contamination Toxicology* **43**, 370-377
- Bottoni P en Fidente R (2005) A pilot study for the assessment of pharmaceuticals as water contaminants. *Ann. Ist. Super. Sanita.* **41**, 333-342
- Bouma J en Nagler JJ (2001) Estrogen receptor-alpha protein localization in the testis of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during different stages of the reproductive cycle. *Biol. Reprod.* **65**, 60-65
- Braat AK, Zandbergen MA, De Vries E, Van Der Burg B, Bogerd J en Goos HJ (1999) Cloning and expression of the zebrafish germ cell nuclear factor. *Mol. Reprod. Dev.* **53**, 369-375
- Breitholtz M, Rudén C, Hansson SO en Bengtsson BE (2006) Ten challenges for improved ecotoxicological testing in environmental risk assessment, review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **63**, 324-35
- Bresolin T, de Freitas Rebelo M, Celso Dias Bainy A (2005) Expression of PXR, CYP3A and MDR1 genes in liver of zebrafish. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* **140**, 403-407
- Brevini TAL, Cillo F, Antonini S en Gandolfi F (2005) Effects of Endocrine Disrupters on the Oocytes and Embryos of Farm Animals. *Reproduction in domestic animals.* **40**, 291
- Bsjerselius R, Lundstedt-Enkel K, Olsen H, Mayer I en Dimberg K (2001) Male goldfish reproductive behaviour and physiology are severely affected by exogenous exposure to 17 β -estradiol. *Aquatic toxicology* **53**, 139-152
- Calp MK, Matsumoto JA en Van Der Kraak G (2003) Activin and transforming growth factor-beta as local regulators of ovarian steroidogenesis in the goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* **132**, 142-150
- Castiglioni S, Bagnati R, Fanelli R, Pomati F, Calamari D en Zuccato E (2006) Removal of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Italy. *Environ. Sci. Techn.* **40**, 357-363
- Cocco P, Fadda D en Melis M (2006) Reproductive outcomes following environmental exposure to DDT. *Reproductive Toxicology* Epub ahead of print.
- Cooke PS, Zhao YD en Hansen LG (1996) Neonatal Polychlorinated Biphenyl Treatment Increases Adult Testis Size and Sperm Production in the Rat. *Toxicology and applied pharmacology* **136**, 112-117
- Cosson J, Billard R, Cibert C, Dreanno C en Suquet M (1999) Ionic factors regulating the motility of fish sperm. In : *The male gamete : From basic science to clinical applications*, Ed. Gagnon C, Cache river press, Vienna, pp. 161-186
- Darnerud PO, Morse D, Klasson-Wehler E en Brouwer A (1996) Binding of a 3,3', 4,4'-tetrachlorobiphenyl (CB-77) metabolite to fetal transthyretin and effects on fetal thyroid hormone levels in mice. *Toxicology* **106**, 105-114
- Death AK, McGrath KCY en Handelsman DJ (2005) Valproate is an anti-androgen and anti-progestin. *Steroids* **70**, 946-953
- DiMuccio T., Mukai S., Clelland E., Kohli G., Cuartero M., Wu T. and Peng C. (2005). Cloning of a second form of activin- β A cDNA and regulation of activin- β A subunits and activin type II receptor mRNA expression by gonadotropin in the zebrafish ovary. *General and Comparative Endocrinology* **143**, 287-299
- Dolores DM en Cheng CY (2004) Sertoli-Sertoli and Sertoli-Germ Cell Interactions and Their Significance in Germ Cell Movement in the Seminiferous Epithelium during Spermatogenesis. *Endocrine Reviews* **25**, 747-806

- Fenske M en Segner H (2004) Aromatase modulation alters gonadal differentiation in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic toxicology* **67**,105-126
- Fenske M, Maack G, Schafers C en Segner H (2005) An environmentally relevant concentration of estrogen induces arrest of male gonad development in zebrafish, *Danio rerio*. *Environ. Toxicol. Chem.* **24**, 1088-1089
- Fishman MC (2001) Zebrafish-the Canonical Vertebrate. *Science* **294**, 1290-1291
- Francois E, Wang DY, Fulthorpe R, Liss SN en Edwards EA (2003) DNA microarrays for detecting endocrine-disrupting compounds. *Biotechnology Advances* **22**, 17-26
- Frye DM en Toone CK (1981) DDT-induced feminization of gull embryos. *Science* **213**, 922-924
- Gant TW en Zhang SD. (2005) In pursuit of effective toxicogenomics. *Mutation Research* **575**, 4-16
- Ge W, Cook H, Peter RE, Vaughan J en Vale W (1993) Immunocytochemical evidence for the presence of inhibin and activin-like proteins and their localization in goldfish gonads. *Gen. Comp. Endocrinol.* **89**, 333-340
- Genuth SM (1998) The endocrine system. In: *Physiology*, Eds Berne RM en Levy MN, Mosby YearBook, St.Louis, 4th Ed., pp. 779-1013
- Gezondheidsraad: Hormoonontregelaars in ecosystemen. Den Haag: Gezondheidsraad, 1999; 1999/13.
- Gilman CI, Leusch FDL, Breckenridge WC en MacLatchy DL (2003) Effects of a phytosterol mixture on male fish plasma lipoprotein fractions and testis P450sc activity. *General and Comparative Endocrinology* **130**, 172-184
- Graham JK (2001) Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Animal Reproduction Science* **68**, 239-247
- Gray LE Jr (1998) Xenoendocrine disrupters: laboratory studies on male reproductive effects. *Toxicol. Lett.* **102**, 31-335
- Greytak SR, Champlin D en Callard GV (2005) Isolation and characterization of two cytochrome P450 aromatase forms in killifish (*Fundulus heteroclitus*): Differential expression in fish from polluted and unpolluted environments. *Aquatic Toxicology* **71**, 371-389
- Guillette Jr LJ, Gross TS, Masson GR, Matter JM, Percival HF en Woodward AR (1994) Developmental Abnormalities of the Gonad and Abnormal Sex Hormone Concentrations in Juvenile Alligators from Contaminated and Control Lakes in Florida. *Environmental Health Perspectives* **102**, 680-688
- Halling-Sorensen B, Nielsen SN, Lansky PF, Ingerslev F, Holten Lutzhoft HC en Jorgensen SE (1998) Occurrence, fate, and effect of pharmaceutical substances in the environment- a review. *Chemosphere* **36**, 357-393
- Hamdani EH en Døving KB (2006) Specific Projection of the Sensory Crypt Cells in the Olfactory System in Crucian Carp, *Carassius carassius*. *Chemical Senses* **31**, 63-67
- Hansen PD, Dizer H, Hock B, Marx A, Sherry J, McMaster M en Blaise C (1998) Vitellogenin- a biomarker for endocrine disruptors. *Trends Anal. Chem.* **17**, 448-451
- Henson MC en Chedrese PJ (2004) Endocrine disruption by cadmium, a common environmental toxicant with paradoxical effects on reproduction. *Exp. Biol. Med.* **229**, 383-392
- Hernando MD, Mezcuca M, Fernandez-Alba AR en Barcel D (2006) Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta* **69**, 334-342
- Houtmeyers Jules (2004) *Witboek van Chloor*, Belgochlor c/o Fedichem, Brussel

<http://www.mged.org/Workgroups/MIAME/miame.html>

<http://www.oecd.org>

Hutchinson TH en Pickford DB (2002) Ecological risk assessment and testing for endocrine disruption in the aquatic environment. *Toxicology* **181**, 383-387

Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ en Pickford DB (2006) Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. *Aquat, Toxicol.* **76**, 69-92

James WH (2006) Offspring sex ratios at birth as markers of paternal endocrine disruption. *Environmental Research* **100**, 77-85

Janz DM (2000) Gross functional anatomy: Endocrine system. In: *The Laboratory Fish (Handbook of Experimental Animals)*, Ed. Ostrander GK, Academic Press, London, UK, pp. 189-217

Jensen KM, Kahl MD, Makynen EA, Korte JJ, Leino RL, Butterworth BC en Ankley GT (2004) Characterization of responses to the antiandrogen flutamide in a short-term reproduction assay with the fathead minnow. *Aquatic toxicology* **70**, 99-110

Jobling S, Casey D, Rodgers-Gray T, Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Pawlowski S, Baunbeck T, Turner AP en Tyler CR (2003) Comparative responses of mollusks and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. *Aquatic Toxicology* **65**, 205-220

Kazeto Y, Place AR en Trant JM (2004) Effects of endocrine disrupting chemicals on the expression of CYP19 genes in zebrafish (*Danio rerio*) juveniles. *Aquatic Toxicology* **69**, 25-34

Kennedy BP, Crim LW en Davies PL (1985) Expression of histone and tubulin genes during spermatogenesis, Evidence of post-meiotic transcription. *Exp. Cell. Res.* **158**, 445-460

Kime DE (1999) A strategy for assessing the effects of xenobiotics on fish reproduction. *The Science of the Total Environment* **225**, 3-11

Kime DE en Nash JP (1999) Gamete viability as an indicator of reproductive endocrine disruption in fish. *The Science of the Total Environment* **233**, 123-129

Kime DE, Nash JP en Scott AP (1999) Vitellogenesis as a biomarker of reproductive disruption by xenobiotics. *Aquaculture* **177**, 345-352

Kime DE, Van Look KJ, McAllister BG, Huyskens G, Rurangwa E en Ollevier F (2001) Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. *Toxicol. Pharmacol.* **130**, 425-433

Kinnberg K en Toft G (2003) Effects of estrogenic and antiandrogenic compounds on the testis structure of the adult guppy (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **54**, 16-24

Kleinkauf A, Macfarlane C, Yeates S, Simpson MG en Leah RTR (2004) A biomarker approach to endocrine disruption in flounder-estrogen receptors, hepatocyte proliferation and sperm motility. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **58**, 324-334

Larkin P, Knoebel I en Denslow ND (2003) Differential gene expression analysis in fish exposed to endocrine disrupting compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology* **136**, 149-161

Le Menn F, Rochefort H en Garcia M (1980) Effect of androgen mediated by the estrogen receptor of fish liver: vitellogenin accumulation. *Steroids* **35**, 315-328

Legler I en Brouwer A (2003) Are brominated flame retardants endocrine disruptors? *Environ. Int.* **29**, 879-885

Levin R, Hansson SO en Ruden C (2004) Indicators of uncertainty in chemical risk assessments. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **39**, 33-43

- Lin Y, Kokontis J, Tang F, Godfrey B, Liao S, Lin A, Chen Y en Xiang J(2006) Androgen and its receptor promote Bax-mediated apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 1908-1916
- Lintelmann J, Katayama A, Kurihara N, Shore L en Wenzel A (2003) Endocrine disruptors in the environment. *Pure and Applied Chemistry* **75**, 631-681
- Maegawa S, Yamashita M, Yasuda K en Inoue K (2002) Zebrafish DAZ-like protein controls translation via the sequence 'GUUC'. *Genes Cells* **7**, 971-984
- Malki S, Berta P, Poulat F en Boizet-Bonhoure B (2005)(a) Cytoplasmic retention of the sex-determining factor SOX9 via the microtubule network. *Exp. Cell. Res.* **309**, 468-475
- Malki S, Nef S, Notarnicola C, Thevenet L, Gasca S, Méjean C, Berta P, Poulat F en Boizet-Bonhoure B (2005) (b) Prostaglandin D2 induces nuclear import of the sex-determining factor SOX9 via its cAMP-PKA phosphorylation *The EMBO Journal* **24**, 1798–1809
- Manning JN en Kime DE (1985) The effect of temperature on testicular steroid production in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*, in vivo and in vitro. *General and Comparative Endocrinology* **57**, 337-382
- Matthiessen P en Gibbs P (1998) A critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in molluscs. *Environmental Toxicology and Chemistry* **17**, 37-43
- McAllister BG en Kime DE (2003) Early life exposure to environmental levels of the aromatase inhibitor tributyltin causes masculinisation and irreversible sperm damage in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic toxicology* **63**, 309-316
- Medesani DA, Lopez Greco LS en Rodriguez EM (2004) Disruption of endocrine regulation of glycemia levels by cadmium and copper in the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **73**, 942-946
- Mills LJ, Gutjahr-Gobell RE, Horowitz DB, Denslow ND, Chow MC en Zaroogian GE (2003) Relationship between Reproductive Success and Male Plasma Vitellogenin Concentrations in Cunner, *Tautoglabrus adspersus*. *Environmental health perspectives* **111**,93-100.
- Milnes MR, Bermudez DS, Bryan TA, Edwards TM, Gunderson MP, Larking LV, Moore BC en Guilette LJ (2006) Contaminant-induced feminization and demasculinization of nonmammalian vertebrate males in aquatic environments. *Environmental Research* **10**, 3-17
- Moens L, Van der Ven K, Caturla M en De Coen WM (2003) Toxicogenomic applications in environmental toxicology. In: *In vitro methods in aquatic toxicology*, Eds. Mothershill C, Austin B, Praxis publishing, pp 185-215
- Nagahama Y, Miura T en Kobayashi T (1994) The onset of spermatogenesis in fish. *Ciba Found. Symp.* **182**, 255-267
- Nakagomi M, Suzuki E, Usumi K, Saitoh Y, Yoshimura S, Nagao T en Ono H (2001) Effects of endocrine disrupting chemicals on the microtubule network in Chinese hamster V79 cells in culture and in Sertoli cells in rats. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* **21**, 453-62.
- Nash JP, Kime DE, Van der Ven LTM, Wester PW, Brion F, Maack G, Stahlschmidt-allner P en Tyler CR (2004) Long-Term Exposure to Environmental Concentrations of the Pharmaceutical Ethynylestradiol Causes Reproductive Failure in Fish. *Environ. Health. Perspect.* **112**, 1725-1733
- Neumann NF en Galvez F (2002) DNA microarrays and toxicogenomics: applications for ecotoxicology? *Biotechnology Advances* **20**, 391-419
- Nikolova G en Vilain E (2006) Mechanisms of Disease: transcription factors in sex determination—relevance to human disorders of sex development. *Nature Clinical Practice Endocrinology and Metabolism* **2**, 231-238

OECD Working document (2005) Revised Draft report Phase 1B of the validation of the 21-day fish assay for the detection of endocrine active substances.

Oehninger S (2003) Biochemical and functional characterization of the human zona pellucida. *Reprod. Biomed.* **7**,641-648

Oetken M, Bachmann J, Schulte-Oehlmann U en Oehlmann J (2004) Evidence for endocrine disruption in invertebrates. *International Review of Cytology* **236**, 1-44

Pakdel F, Feon S, LeGac F, Lemenn F en Valotaire Y (1991) In vivo estrogen induction of hepatic estrogen receptor mRNAs and correlation with vitellogenin mRNA in Rainbow trout. *Mol. Cell. Endocrinol.* **75**, 205-212

Panter GH, Hutchinson TH, Hurd KS, Sherren A, Stanley RD en Tyler CR (2004) Successful detection of (anti-)androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development. *Aquat. Toxicol.* **70**, 11-21

Pennie WD, Woodyatt NJ, Aldridge TC en Orphanides G (2001) Application of genomics to the definition of the molecular basis for toxicity. *Toxicol. Lett.* **120**, 353-358

Potter H en Kramer CR (2000) Ultrastructural observations on sperm storage in the ovary of the platyfish, *Xiphophorus maculatus* (Teleostei: poeciliidae): the role of the duct epithelium. *J. Morphol.* **245**, 110-129

Prifti S, Mall P en Rabe T (2003) Synthetic estrogen-mediated activation of ERK 2 intracellular signaling molecule. *Gynaecological Endocrinology* **17**, 423-428

Purdum CE, Hardiman PA, Bye VJ, Eno NC, Tyler CR en Sumpter JP (1994) Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chemistry and Ecology* **8**, 275-285

Raven PH en Johnson GB (1999) *Biology*, 5th Ed., Boston: WCB/McGraw-Hill

Redding JM en Patino H (2000) Reproductive systems. In: *The laboratory Fish (Handbook of Experimental Animals)*, Ed. Ostrander GK, Academic Press, London, Uk pp. 261-270

Reed JC(2000) Mechanisms of Apoptosis. *American Journal of Pathology* **157**, 1415-1430

Rössler P, Mezler M en Breer H (1998) Two olfactory marker proteins in *Xenopus laevis*. *The Journal of Comparative Neurology* **395**, 273 - 280

Rotchell JM en Ostrander GK (2003) Molecular markers of endocrine disruption in aquatic organisms. *Toxicol. Environ. Health.* **6**, 453-496

Roy P, Salminen H, Koskimies P, Simola J, Smeds A, Saukko P en Huhtaniemi IT (2004) Screening of some anti-androgenic endocrine disruptors using a recombinant cell-based in vitro bioassay. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* **88**,157–166

Saal LH, Troein C, Vallon-Christersson J, Gruvberger S, Borg A en Peterson C (2002) BioArray Software Environment: A Platform for Comprehensive Management and Analysis of Microarray Data. *Genome Biology* **3**(8): software0003.1-0003.6

Sakamoto KQ, Nakai K, Aoto T, Yokoyama A, Ushikishi R, Hirose H, Ishizuka M, Kazusaka A en Fujita S (2003) Cytochrom P450 induction and gonadal status alteration in common carp (*cyprinus carpio*) associated with the discharge of dioxin contaminated effluent to the Hikiji River. Kanagawa Prefecture, Japan. *Chemosphere* **51**, 491-500

Santos HB, Rizzo E, Bazzoli N, Sato Y en Moro L (2005)(a) Ovarian regression and apoptosis in the South American teleost *Leporinus taeniatus* Lütken (Characiformes, Anostomidae) from the São Francisco Basin. *Journal of Fish Biology* **67**,1446

- Santos MM, Micael J, Carvalho AP, Morabito R, Booy P, Massanisso P, Lamoree M en Reis-Henriques MA (2005)(b) Estrogens counteract the masculinizing effect of tributyltin in zebrafish. *Science of the total environment* **343**, 1-34
- Sarmah AK, Northcott J, Leusch FDL en Tremblay LA (2006) A Survey of endocrine disrupting chemicals (EDCs) in municipal sewage and animal waste effluents in the Waikato region of New Zealand. *Science of the Total Environment* **335**,135-144
- Schaeffer HJ en Weber MJ (1999) Mitogen-Activated Protein Kinases: Specific Messages from Ubiquitous Messengers. *Molecular and Cellular Biology* **19**, 2435-2444
- Scheytt TJ, Mersmann P en Heberer T (2006) Mobility of pharmaceuticals carbamazepine, diclofenac, ibuprofen, and propyphenazone in miscible-displacement experiments. *Journal of contaminant hydrology* **83**, 53-69
- Sharpe RM en Skakkebaek NE (1993) Are estrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet* **341**, 1392-1395
- Shilling AD en Williams DE (2000) The non-aromatizable androgen, dihydrotestosterone, induces antiestrogenic responses in the rainbow trout. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **74**, 187-194
- Simon S en Mueller OS (2006) Human reporter gene assays: Transcriptional activity of the androgen receptor is modulated by the cellular environment and promoter context. *Toxicology* **220**, 90-103
- Sin-Eng C (2000) Endocrine disruptors and male reproductive function – a short review. *International journal of andrology* **23**, 45-46
- Sinowatz F, Töpfer- Petersen E, Kölle S en Palma G (2001) Functional morphology of the zona pellucida. *Anatomia, Histologia, Embryologia* **30**, 257-263
- Specia DJ, Lin DM, Sorensen PW, Isacoff EY, Ngai J en Dittman AH (1999) Functional identification of a goldfish odorant receptor. *Neuron* **23**, 487-498
- Spitsbergen MJ en Kent LM (2003) The State of the Art of the Zebrafish Model for Toxicology and Toxicologic Pathology Research-Advantages and Current Limitations. *Toxicologic Pathology* **31**, 62-87
- Sumpter JP en Jobling S (1995) Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ. Health. Perspect.* **103**,173-178
- Süsens U en Borgmeyer U (2001) Genomic structure of the gene for mouse germ cell nuclear factor (GCNF). *Genome Biol.* **2**
- Thomas P (2000) Chemical interference with genomic and nongenomic actions of steroids in fishes: role of receptor binding. *Marine Environmental Research* **50**,127-134
- Toppari J en Skakkebaek NE (1998) Sexual differentiation and environmental endocrine disrupters. *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism* **12**,143-156
- Tyler CR en Sumpter JP (1996) Oocyte growth and development in teleosts. *Rev.Fish.Biol. Fisheries* **6**, 287-318
- Uchida D, Yamashita M, Kitano T en Iguchi T (2004) An aromatase inhibitor or high water temperature induce oocyte apoptosis and depletion of P450 aromatase activity in the gonads of genetic female zebrafish during sex-reversal. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **137**, 11-20
- Van der Ven K, De Wit M, Keil D, Moens L, Van Leemput K, Naudts B en De Coen WM (2005): Development and application of a brain-specific cDNA microarray for effect evaluation of neuro-active pharmaceuticals in zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **141**, 408-417
- Van Itallie CM en Anderson JM (2006) Claudins and epithelial paracellular transport. *Annual Review of Physiology* **68**, 403-429

Vandenbergh G, Verslycke T, De Coen WM, Comhaire F, Dhooge W en Callebaut K (1996) “Duurzaam beheer van de Noordzee” evaluatie van de impact van endocrien versturende stoffen op het Noordzee-ecosysteem. Samenvatting van het onderzoek

Vera Y, Dai T, Hikim APS, Lue Y, Salido EC, Swerdloff RS en Yen PH (2000) Deleted in Azoospermia Associated Protein 1 Shuttles Between Nucleus and Cytoplasm During Normal Germ Cell Maturation. *Journal of Andrology* **23**, 622-628

Vidaeff AC en Sever LE (2005) In utero exposure to environmental estrogens and male reproductive health: a systematic review of biological and epidemiologic evidence. *Reproductive Toxicology* **20**, 5-20

Von Hofsten J (2004) Developmental and reproductive regulation of NR5A genes in teleosts. <http://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:umu:diva-374> (2006-05-27)

Wang R, Cheng H, Xia L, Guo Y, Huang X en Zhou R (2003) Molecular cloning and expression of *Sox17* in gonads during sex reversal in the rice field eel, a teleost fish with a characteristic of natural sex transformation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **303**, 452-457

Wang Y en Ge W (2003) Spatial expression patterns of activin and its signaling system in the zebrafish ovarian follicle: evidence for paracrine action of activin on the oocytes. *Biol. Reprod.* **69**, 1998-2006

Wassarman PM (2002) Sperm receptors and fertilization in mammals. *Mt. Sinai. J. Med.* **69**, 148-155

Weber RFA, Pierik FH, Dohle GR en Burdorf A (2002) environmental influences on male reproduction. *BJU International* **89**, 143-148

Wei Ge (2000) Roles of the activin regulatory system in fish reproduction. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **78**, 1077-1085

White R, Jobling S, Hoare SA, Sumpter JP en Parker MG (1994) Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology* **135**, 175-182

Wiseman SB en Singer TD (2002) Applications of DNA and protein microarrays in comparative physiology. *Biotechnology Advances* **20**, 379-389

Wu RSS, Sin WHL en Shin PKS (2005) Induction, adaptation and recovery of biological responses: implications for environmental monitoring. *Marine Pollution Bulletin* **51**, 623-634

Yew N, Strobel M en Vande Woude GF (1993) Mos and the cell cycle: the molecular basis of the transformed phenotype. *Current opinion in Genetics and development* **3**, 19-25

Yin GG, Kookana RS en Ru YJ (2002) Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Eviron. Int.* **28**, 545-551